



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**“Mecanismo de acción de la toxina alfa
hemolisina de *Escherichia coli*”**

Tesis presentada para optar al grado de Doctor de la Facultad
de Ciencias Exactas

Bioq. Romina Florencia Vazquez

Directora: Dra. Vanesa Herlax
Codirectora: Dra. Sabina Maté

Asesora: Dra. Laura Bakás

2015

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), bajo la dirección de la Dra. Vanesa Herlax, la codirección de la Dra. Sabina Maté y la asesoría de la Dra. Laura Bakás.

Se recibió apoyo económico de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y del CONICET, a través de becas iniciales y tipo II, respectivamente.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis fueron publicados en:

“Novel evidence for the specific interaction between cholesterol and alpha hemolysin of *E. coli*”. Romina F. Vazquez, Sabina M. Maté, Laura S. Bakás, Marisa M. Fernández, Emilio L. Malchiodi and Vanesa S. Herlax. *Biochemical Journal* (2014) 458 (3): 481-489.

“Boundary region between coexisting lipid phases as initial binding sites for *Escherichia coli* alpha-hemolysin: A real-time study”. Sabina M. Maté, Romina F. Vazquez, Vanesa S. Herlax, María A. Daza Millone, María L. Fanani, Bruno Maggio, María E. Vela, and Laura S. Bakás. *Biochimica et Biophysica Acta- Biomembranes* (2014) 1838 (7): 1832-1841.

A mi familia
y a Gabriel

Agradecimientos

A Laura, Vanesa y Sabina por haberme elegido para encarar este proyecto, por su apoyo e incentivo a lo largo de estos años, que sin dudas me han permitido crecer personal y profesionalmente.

A Tati que me llevó el primer día al INIBIOLP, y siempre está ahí, para dar una mano o un consejo. A Angela, Laurita C., y especialmente a Yanina, por su compañerismo y su alegría contagiosa.

A todo el personal del INIBIOLP que siempre están dispuestos a dar una mano. En especial a los integrantes del laboratorio 7, los actuales y los que ya no forman parte del *staff*, que me han prestado todo lo que uno se pueda imaginar que se puede pedir. A los integrantes del laboratorio 8, que me facilitaron el uso de su espectrofotómetro y el equipo 2D. A Marcos y Laura por su ayuda con el FPLC. A Betina Córscico por haberme facilitado sus equipos y a los integrantes de su laboratorio, en especial a Eduardo por su ayuda con el *stopped flow*. A Annie y Juan Pablo por prestarme el bloque de calentamiento cada vez que lo necesité. A Alejandra por su cariño y buena onda.

Al Dr. Carlos Muñoz Garay por recibirme en su laboratorio y abrirme las puertas de su casa. Por tratarme con tanto cariño y haber hecho de mi estadía en México una experiencia inolvidable.

A la gente maravillosa de la Cátedra de Introducción a la Química y Química General. En especial a Fede, Myriam, Florencia, Eduardo, Laurita, Cristian, Matías, Jazmín, Laura D., y muchos más, con quienes las horas de docencia son un verdadero placer y las horas de no docencia extremadamente divertidas. Por las reacciones que arruinan paredes, experiencias piloto destinadas al fracaso y arreglos que rara vez funcionan. Gracias por estar, por dejarme ser y darme la oportunidad de aprender tanto de ustedes, los quiero.

A Marina, por su ayuda en momentos en que necesité una mano.

A mi amigo Toto, y a su hermosa familia, por su amistad y cariño. Por aguantarme desde hace años a pesar de mis desapariciones a causa del trabajo.

A todos los amigos que me han acompañado a lo largo de mi vida y me han hecho inmensamente feliz.

A mi familia, a mi papá y mi mamá, que siempre me apoyan a seguir adelante en todo lo que quiero hacer y que me han permitido llegar hasta acá. Nada de esto hubiese sido posible sin ellos. Muchas gracias.

A mis hermanos que siempre me ayudan, en especial a Oscar que me aguanta todos los días y hace mi vida tan alegre.

A mis tíos y mi primo Luciano, que me tienen una fe tan grande que a veces asusta.

A mis abuelos, en especial a mi abuelo Martín quien ocupa un lugar privilegiado en mi corazón.

A María, Mabel, Rodolfo, Belén y Joaquín por su cariño y apoyo.

A Gabriel, por elegirme todos los días, cuidarme y bancarme en todo. Por contenerme, acompañarme y quererme. Por hacer mis días felices y llenar de música mi corazón.

Y a todas esas personas que a lo largo de mi vida han encendido mi alma y sin darse cuenta hicieron posible que llegara este momento...

... El mundo es eso... un montón de gente, un mar de fueguitos... Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca, se enciende.

Galeano.

Abreviaturas

ABC: cassette de unión a ATP

ACP: proteína transportadora de ácidos

AFM: microscopía de fuerza atómica

ANTS: Ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico

ATP: trifosfato de adenosina

BAM: microscopía de ángulo de Brewster

BLM: bicapas lipídicas planas

CARC: secuencia consenso de unión a colesterol con orientación de aminoácidos opuesta a los sitios CRAC

CDC: citolisinas dependientes de colesterol

Col: colesterol

CRAC: secuencia consenso de unión a colesterol

Cs⁻¹: módulo de compresibilidad

DOPC: dioleoilfosfatidilcolina

DPX: Bromuro de N,N'-p-xilen-bispiridinio

DRMs: membranas resistentes a detergentes

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

G: fase gaseosa

GnCl: cloruro de guanidinio

GUVs: vesículas unilamelares gigantes

HlyA: alfa hemolisina de *E. coli*

HPTLC: cromatografía en capa fina de alta performance

LB: Luria Bertani

Lc: líquido condensado

Ld: líquido desordenado

Le: líquido expandido

Lo: líquido ordenado

LPC: lisofosfatidilcolina

LUVs: vesículas unilamelares grandes

MARTX: del inglés *Multifunctional Autoprocessing RTX*, subgrupo de toxinas RTX de gran tamaño.

MLVs: vesículas multilamelares

NHS: N-hidroxisuccinimida

PA: ácido fosfatídico

PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida
PC: fosfatidilcolina
Pcol: fosforilcolina
PDB: del inglés *Protein Data Bank*, banco de datos de proteínas
PE: fosfatidiletanolamina
PFTs: toxinas formadoras de poros
PI: fosfatidilinositol
PIP: fosfatidilinositol-4-fosfato
PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
ProHlyA: prohemolisina de *E. coli*
PS: fosfatidilserina
RTX: del inglés *Repeats in Toxin*, familia de toxinas a la que pertenece HlyA de *E. coli*
RU: unidades de respuesta
S: fase sólida
SDS: dodecilsulfato de sodio
SM: esfingomielina
16:0 SM: palmitoil esfingomielina
24:1 SM: nervonoil esfingomielina
SMasa: esfingomielinasa
So: sólido ordenado
SPM: microscopía de barrido por sondas
SPR: resonancia de plasmones de superficie
SUVs: vesículas unilamelares pequeñas
TBS: Tris.HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4
TC: Tris.HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4
TCCIGn: buffer TC 6M GnCl
TLC: cromatografía en capa fina

Códigos de una letra de los aminoácidos mencionados en el texto

D: ácido aspártico	I: isoleucina	V: valina
F: fenilalanina	K: lisina	W: triptófano
G: glicina	L: leucina	Y: tirosina
H: histidina	R: arginina	

Índice

Capítulo 1: Introducción general y objetivos	1
1. Toxinas bacterianas	1
2. Familia de toxinas RTX	3
3. HlyA de <i>E. coli</i> : Prototipo de las toxinas RTX	6
3.1. Síntesis, activación y secreción de HlyA	6
3.2. Estructura de HlyA.....	8
3.3. HlyA como factor de virulencia de <i>E. coli</i>	10
4. La membrana plasmática: el punto de encuentro	12
5. Mecanismo de acción de HlyA.....	17
5.1. Unión de HlyA a la membrana.....	17
5.2. Inserción de HlyA en la membrana	19
5.3. Oligomerización de HlyA	19
5.4. Formación del poro lítico	20
6. Objetivos	23
Capítulo 2: Materiales y métodos generales	24
1. Purificación de HlyA	24
2. Ensayos de actividad hemolítica.....	26
3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	26
4. Preparación de sistemas modelo de membrana.....	27
Capítulo 3: Efecto de la segregación de fases en la interacción de HlyA con membranas	29
1. Introducción.....	29
2. Materiales y métodos	31
2.1. Materiales	31
2.2. Métodos.....	31
2.2.1. Ensayos empleando monocapas lipídicas como sistema modelo de membrana	31
2.2.1.1. Caracterización de las monocapas lipídicas mediante isothermas de compresión	32
2.2.1.2. Obtención de las isothermas de compresión	34
2.2.1.3. Cinética de inserción de HlyA en monocapas lipídicas	35

2.2.1.4. Microscopía de Ángulo de Brewster.....	36
2.2.1.5. Registro de imágenes por BAM.....	37
2.2.2. Utilización de bicapas soportadas como modelos de membrana	38
2.2.2.1. Preparación de bicapas soportadas sobre mica	39
2.2.3. Visualización de la interacción de HlyA con bicapas mediante AFM.....	40
2.2.3.1. Microscopía de barrido por sondas	40
2.2.3.2. Microscopía de Fuerza Atómica	40
2.2.3.3. Obtención de imágenes mediante AFM	42
3. Resultados y discusión	43
3.1. Caracterización de las monocapas lipídicas mediante isothermas de compresión.....	44
3.2. Visualización de las monocapas mediante BAM.....	46
3.3. Inserción de HlyA en monocapas.....	48
3.4. Visualización de la interacción de HlyA con monocapas mediante BAM.....	50
3.5. Visualización de la interacción de HlyA con bicapas mediante AFM	54
Capítulo 4: Interacción de HlyA con lípidos de membrana	64
1. Introducción.....	64
2. Materiales y métodos	67
2.1. Materiales	67
2.2. Métodos.....	67
2.2.1. Cinética de inserción de HlyA en monocapas lipídicas.....	67
2.2.2. Ensayos de inhibición de la lisis de glóbulos rojos de carnero	68
2.2.3. Tratamiento de glóbulos rojos con SMasa.....	69
2.2.4. Ensayos de hemólisis con glóbulos rojos tratados con SMasa	70
2.2.5. Ensayos de <i>Dot-Blot</i> de lípidos	70
2.2.6. Medidas empleando Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)....	71
2.2.6.1. Medidas de la interacción HlyA-lípidos mediante SPR	73
2.2.7. Ensayos de liberación del contenido de liposomas	74
2.2.8. Medidas de conductancia en bicapas lipídicas planas en presencia de HlyA.....	75
2.2.8.1. Técnica de bicapas lipídicas planas	75
2.2.8.2. Obtención de bicapas lipídicas planas	76
2.2.8.3. Registros de corriente	77
2.2.9. Búsqueda de sitios CRAC/CARC (<i>Cholesterol recognition/interaction aminoacid consensus region</i>) en la secuencia de HlyA.....	78

2.2.10. Alineamiento de secuencias	78
2.2.11. Predicción de estructura secundaria.....	79
3. Resultados y discusión	80
3.1. Inserción de HlyA en monocapas.....	80
3.2. Ensayos de Inhibición con Col y Pcol.....	81
3.3. Actividad hemolítica de HlyA en glóbulos rojos tratados con SMasa.....	83
3.4. Ensayos de <i>Dot-Blot</i> de lípidos	85
3.5. Ensayos de SPR	86
3.6. Ensayos de liberación del contenido de liposomas.....	89
3.7. Medidas de conductancia en bicapas lipídicas planas en presencia de HlyA	93
3.8. Búsqueda de sitios de unión a Col en la secuencia de HlyA	96
Discusión final y conclusiones	102
Referencias Bibliográficas.....	104

Capítulo 1

Introducción general y objetivos

Capítulo 1: Introducción general y objetivos

1. Toxinas bacterianas

Las toxinas bacterianas constituyen importantes factores de virulencia producidos por diversos microorganismos y, en muchos casos, representan piezas clave en la patogenia de las enfermedades causadas por los mismos.

Independientemente de su localización y del tipo de microorganismo que las produce, se pueden diferenciar dos clases principales de toxinas bacterianas en base a su estructura química: las toxinas proteicas y los lipopolisacáridos presentes en la superficie de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Las toxinas proteicas constituyen un conjunto de más de 300 proteínas y son en su mayoría exotoxinas que son secretadas por la bacteria durante su crecimiento (Alouf, 2000).

En cuanto a su mecanismo de acción, muchas de las toxinas proteicas actúan de manera directa sobre la célula blanco, produciendo un daño en su membrana. Estas toxinas son también llamadas citolisinas y constituyen cerca del 35% del repertorio de toxinas bacterianas, producidas tanto por microorganismos Gram positivos como Gram negativos. Dentro de este grupo se pueden diferenciar tres mecanismos distintos que conducen a la alteración de la membrana. Existen toxinas que actúan como surfactantes y tienen una acción tipo detergente solubilizando las membranas. Este es el caso de las δ -lisinas producidas por distintas especies de *Staphylococcus* o los ciclopéptidos producidos por *Bacillus subtilis* (Pokorny et al., 2002) (Bernheimer & Rudy, 1986). En segundo lugar, las toxinas pueden actuar como fosfolipasas y desestabilizar las membranas por hidrólisis enzimática de los fosfolípidos, lo que puede conducir a la lisis celular. Así, por ejemplo, las toxinas que presentan actividad de fosfolipasa C que hidrolizan fosfatidilcolina (PC) o esfingomiolina (SM) constituyen importantes factores de virulencia en la patogénesis de las enfermedades causadas por *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y diversas especies de *Clostridium* (Songer, 1997) (Vázquez-Boland et al., 2001) (Stonehouse et al., 2002). Sin embargo, la mayoría de las toxinas proteicas presentan un tercer mecanismo de daño de la membrana: son toxinas formadoras de poros PFTs (de sus siglas en inglés *Pore Forming Toxins*). Estas toxinas son secretadas por las bacterias como proteínas solubles en medio acuoso y luego se integran en la membrana de la célula blanco generando poros de tamaño variable según la toxina considerada.

Las PFTs no son exclusivas de bacterias sino que se las puede encontrar en organismos pertenecientes a distintos reinos de la naturaleza, en todos los casos la formación de poros hace que la membrana blanco de su acción se vuelva permeable a iones, pequeños solutos o incluso macromoléculas grandes (Anderluh & Lakey, 2008).

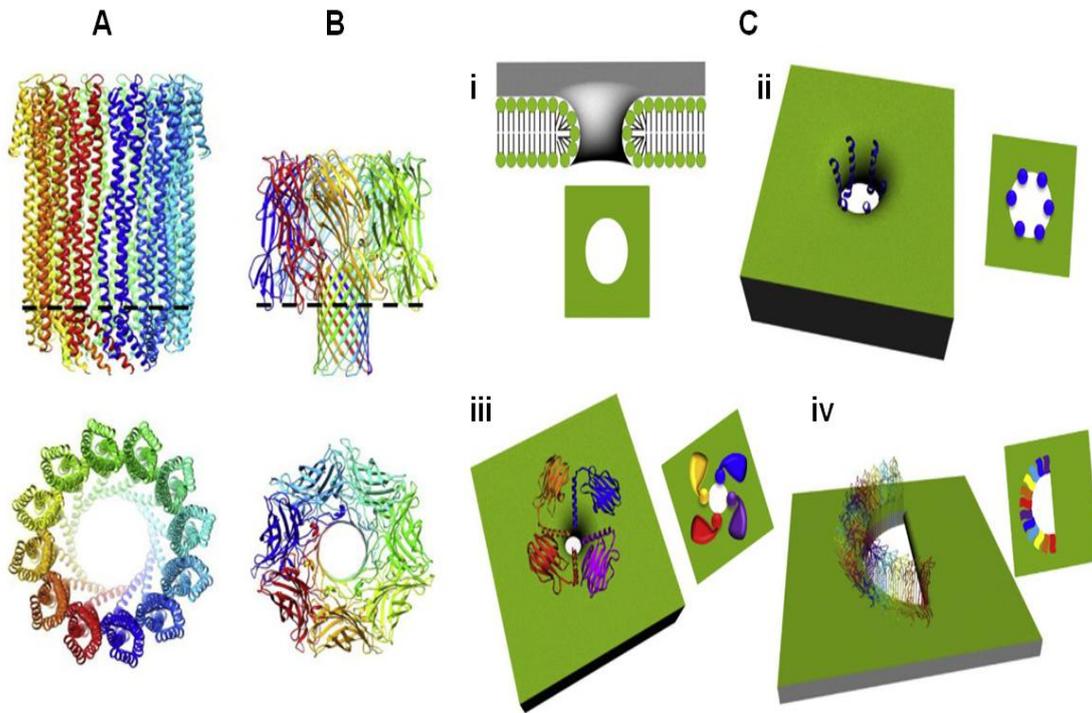


Figura 1.1. Estructuras formadas por PFTs. Las figuras muestran la organización en el plano de la membrana y cortes transversales de distintos tipos de poros. Los monómeros que están formando el poro están representados con distintos colores. (A) α -PFT: citolisina A de *Escherichia coli*; (B) β -PFT: α -hemolisina de *Staphylococcus aureus*. (C) Representación esquemática de poros toroidales: (i) Poro toroidal formado sólo por lípidos; (ii, iii y iv) Distintos arreglos de proteínas, tanto α como β -PFTs, y lípidos formando poros toroidales proteolipídicos. (ii) Poro propuesto para la interacción de los péptidos melitina y magainina con membranas; (iii) Poro propuesto para las toxinas actinoporinas; (iv) Poro toroidal tipo arco formado por toxinas CDC. Adaptado de Gilbert et al., 2014.

Las PFTs usualmente se clasifican de acuerdo a la estructura secundaria de la porción de la proteína que se inserta en la membrana y forma el poro. Así las α -PFTs, formarán el poro insertando α -hélices en la membrana formando un ramillete al que contribuyen distintas subunidades (Figura 1.1.A). Las β -PFTs usualmente tienen alto contenido de hojas β y contienen cadenas β anfipáticas que se organizan y forman un

barril β colectivo en la membrana a partir de la contribución de los distintos monómeros (Figura.1.1.B). Estas proteínas forman poros puramente proteicos que insertan en la membrana de la célula blanco (Parker & Feil, 2005). Existe otro mecanismo de formación de poro tanto para α como para β -PFTs, en el que tanto la proteína como los lípidos de la membrana participan en la formación del poro, originando poros proteolipídicos (Figura 1.1.C) (Gilbert et al., 2014). Su nombre designa el arreglo particular de las cabezas polares de los lípidos en las paredes del poro, que presentan curvatura positiva en el plano perpendicular a la membrana, adquiriendo la forma de un toroide.

Estos poros proteolipídicos son estructuras estables que se generan por adsorción superficial y posterior inserción de las proteínas. La presencia de las proteínas libera el estrés de curvatura que se genera en la zona de la membrana que forma la pared del poro, lo que se traduce en una disminución de la energía por unidad de longitud (tensión lineal) requerida para formar los bordes del poro (Garcia-Saez et al., 2007). Los poros proteolipídicos tienen características propias que los diferencian de los poros puramente proteicos, como una mayor flexibilidad estructural y tamaño variable.

Dentro de las PFTs se encuentra la familia de las citolisinas dependientes de colesterol (CDC) producidas por muchas bacterias Gram positivas y las toxinas de la familia RTX (de sus siglas en inglés *Repeats in Toxin*) producidas por bacterias Gram negativas, a la que pertenece la toxina alfa hemolisina (HlyA) de *Escherichia coli* (Gilbert, 2010) (Welch, 2001).

2. Familia de toxinas RTX

La familia de toxinas RTX está constituida por un grupo muy diverso de proteínas con un rango amplio de actividades biológicas y tamaños que pueden ir desde los 40 a los 4600 kDa. El primer grupo de proteínas RTX fue descrito por Welch en 1991 y para ese entonces, la información disponible permitió clasificar a esta familia como un grupo de toxinas líticas con capacidad formadora de poros que poseían ciertas características en común (Welch, 1991). Desde el descubrimiento de las primeras RTX, muchas otras proteínas han sido identificadas como miembros de esta familia, algunas de las cuales no poseen capacidad lítica, sino que actúan como proteasas (Dahler et al., 1990) (Liao & McCallus, 1998) (Woods et al., 2001) (Bowen et al., 2003) o lipasas (Duong et al., 1994) (Akatsuka et al., 1994). También se ha reportado que algunas RTX pueden actuar como bacteriocinas (Oresnik et al., 1999)

(Cherif et al., 2008) (Sugawara et al., 2007), participar en la nodulación (Oresnik et al., 1999) o incluso en la movilidad bacteriana (Brahamsha, 1996) (McCarren et al., 2005).

Recientemente, se ha descubierto un nuevo subgrupo de toxinas RTX constituido por proteínas de gran tamaño, que poseen más de 3000 residuos de aminoácidos en su secuencia, las cuales presentan múltiples actividades, que ha sido denominado MARTX (de sus siglas en inglés *Multifunctional autoprocessing RTX*) (Satchell, 2007) (Satchell, 2011). MARTXvc de *Vibrio cholerae* es considerada el prototipo de las MARTX y esta toxina, por ejemplo, cataliza el entrecruzamiento de actina en células epiteliales como parte de su mecanismo de toxicidad (Kudryashov et al., 2008).

Como se puede observar, el tipo de actividad biológica desempeñada por estas toxinas es realmente muy variado. De hecho, el rol específico que desempeñan muchas de ellas todavía se desconoce.

La característica saliente de este grupo de toxinas es la presencia en su secuencia de un nonapéptido de secuencia consenso GGXGDXLX que se repite un número variable de veces en la porción C-terminal de la proteína. En este nonapéptido G y D corresponden a residuos de glicina y ácido aspártico, respectivamente, mientras que L corresponde a un aminoácido hidrofóbico y X puede ser cualquier aminoácido. El número de repeticiones presentes varía dependiendo de la toxina considerada. Estos dominios constituyen motivos de unión a Ca^{2+} y su presencia permite a las proteínas adoptar una conformación funcional luego de la unión a Ca^{2+} en el medio extracelular (Felmlee & Welch, 1988) (Ludwig et al., 1988) (Rose et al., 1995).

Otra característica común en los miembros de esta familia es la secreción de las proteínas al medio extracelular a través de sistemas de secreción de tipo I. Este mecanismo de transporte ha sido bien caracterizado y en el caso de las toxinas RTX parte de los componentes del sistema de transporte están codificados dentro del propio operón de la toxina.

La tercera característica es la activación postraducciona que requieren la mayor parte de estas toxinas para volverse activas y que ocurre a través de la incorporación de ácidos grasos en residuos internos de lisina (K).

Así, las toxinas RTX forman una familia amplia de proteínas que, si bien comparten algunas similitudes estructurales, en conjunto presentan un espectro variado de actividades biológicas y bioquímicas (Linhartova et al., 2010), la tabla 1.1 resume las características de los miembros descritos hasta la fecha.

Toxina RTX	Bacteria	Tamaño (kDa)	Rango de Especificidad
HlyA	<i>E. coli Uropatogénica</i>	110	Amplio
EhxA	<i>E. coli Enterohemorrágica</i>	107	Eritrocitos humanos y bovinos, leucocitos
CyaA	<i>Bordetella pertussis</i>	177	Principalmente fagocitos mieloides CD11b+, también se detecta actividad en otros tipos celulares
LktA	<i>Mannheimia haemolytica</i>	102	Leucocitos y plaquetas bovinos, baja actividad hemolítica
LtxA	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	114	Leucocitos humanos y primates
PILktA	<i>Mannheimia varigena</i>	102	Leucocitos porcinos
PaxA	<i>Pasteurella aerogenes</i>	107.5	Actividad cohemolítica
PvxA	<i>Proteus vulgaris</i>	110	Eritrocitos
MmxA	<i>Morganella morganii</i>	110	Eritrocitos
ApxIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	110	Amplio
ApxIIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	102.5	Leucocitos porcinos, baja actividad hemolítica
ApxIIIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	120	Leucocitos porcino, actividad cohemolítica
ApxIVA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	200	Débil actividad hemolítica
ApxI	<i>Actinobacillus suis</i>	110	Linfocitos porcinos y de caballo, eritrocitos
ApxII	<i>Actinobacillus suis</i>	102.5	Linfocitos de caballo y porcinos, eritrocitos
ApxII	<i>Actinobacillus porcitosillarum</i>	102.5	Linfocitos, eritrocitos
AqxA	<i>Actinobacillus equuli</i>	110	Linfocitos equinos y porcinos, eritrocitos
VcRtxA	<i>Vibrio cholerae</i>	484	Fibroblastos renales de mono, células epiteliales laríngeas humanas
VvRtxA	<i>Vibrio vulnificus</i>	550	Células epiteliales intestinales humanas
MbxA	<i>Moraxella bovis</i>	99	Eritrocitos bovinos, eritrocitos

Tabla 1.1. Toxinas de la familia RTX caracterizadas hasta el momento. Adaptada de Linhartova et al., 2010.

3. HlyA de *E. coli*: Prototipo de las toxinas RTX

3.1. Síntesis, activación y secreción de HlyA

Históricamente, HlyA de *E. coli* ha sido considerada como el prototipo de las toxinas RTX.

La información necesaria para la síntesis, maduración postraduccional y secreción de HlyA está contenida en un operón, *hlyCABD* (Felmlee et al., 1985) (Issartel et al., 1991) (Koronakis et al., 1997) (Nieto et al., 1996). El gen estructural *hlyA* codifica para la síntesis de un polipéptido de 110 kDa, denominado proHlyA, que constituye la forma inactiva de la toxina. Para obtener la toxina activa es necesario que ocurra intracelularmente una modificación postraduccional de proHlyA. Esta modificación consiste en la adición de ácidos grasos a la protoxina que es catalizada por la aciltransferasa HlyC (20 kDa), codificada en el mismo operón *hlyCABD*, en conjunto con una proteína transportadora de grupos acilos, ACP (de sus siglas en inglés *Acyl Carrier Protein*) (Hardie et al., 1991), (Ludwig et al., 1996), (Trent et al., 1998). Durante este proceso, ácidos grasos de distinta longitud de cadena, más comúnmente de 14, 15 y 17 carbonos, son transferidos a los grupos ϵ -amino de dos residuos de K específicos en la proteína, K564 y K690 (Stanley et al., 1994) (Ludwig et al., 1996) (Lim et al., 2000).

Ambos sitios de acilación son independientes y no comparten similitud de secuencia, por lo que HlyC parece reconocer una estructura de orden superior y no sólo la secuencia de aminoácidos para identificar ambos sitios (Stanley et al., 1998) (Ludwig et al., 1996) (Langston et al., 2004). El mecanismo específico por el que se produce la acilación no está del todo claro, algunos autores han postulado la formación de un complejo proHlyA-HlyC-ACP (Stanley et al., 1999), mientras que otros sugieren un mecanismo tipo ping-pong donde el ácido graso primero es transferido a HlyC, generando un intermediario acil-HlyC antes de la unión de proHlyA y luego el ácido graso es transferido a la protoxina (Worsham et al., 2005) (Worsham et al., 2001). De los dos sitios de acilación, la falta de acilación en K564 produce sólo una disminución de la actividad lítica de la toxina, mientras que la no acilación en K690 lleva a la pérdida completa de la actividad (Pellett & Welch, 1996).

La acilación, si bien es necesaria para la activación de la toxina, no se requiere para su secreción al medio extracelular (Ludwig et al., 1987). La toxina es secretada a través de un sistema de secreción de tipo I formado por la proteína de membrana interna HlyB (Holland et al., 1990), la proteína de membrana externa TolC y la proteína que conecta ambas membranas formando el canal de secreción, HlyD (Wagner et al.,

1983). Tanto HlyB como HlyD están codificadas en el mismo operón *hlyCABD* que HlyA. La toxina presenta en su extremo C-terminal una secuencia de reconocimiento que la hace sustrato del sistema de secreción tipo I (Nicaud et al., 1986) (Stanley et al., 1991) y la secreción ocurre directamente al medio extracelular sin la existencia de intermediarios periplásmicos (Felmlee & Welch, 1988) (Koronakis et al., 1989).

HlyB constituye un transportador de tipo ABC (de sus siglas en inglés *ATP Binding Cassette*), siendo el ATP el que provee la energía necesaria para el transporte (Higgins, 1992). Una vez unidos a ATP, dos monómeros de HlyB se unen formando un dímero que constituye la forma activa de HlyB (Zaitseva et al., 2005). HlyD se localiza en la membrana interna e interacciona con TolC y con HlyB para formar el canal (Schulein et al., 1992). No se conoce exactamente la estructura de HlyD pero se ha postulado que actuaría en la forma de trímeros o hexámeros (Thanabalu et al., 1998) (Lee et al., 2012). TolC es una proteína homotrimérica y presenta un diámetro variable con sistema de apertura y cierre similar a un iris, que puede alternar entre 3.5Å en su conformación cerrada y 16Å en su forma abierta luego de la interacción con el resto del complejo de transporte (Andersen et al., 2002) (Koronakis, 2003) (Koronakis et al., 2000) (Thanabalu et al., 1998). Este diámetro indica que el canal es muy pequeño para el transporte de proteínas plegadas. HlyA, al igual que otras toxinas RTX, se secreta en conformación desplegada. Esto implica que el plegamiento en el interior de la bacteria está impedido y debe ocurrir en el medio extracelular sin la ayuda de chaperonas. En este sentido, la unión de iones Ca^{2+} al sitio de las repeticiones juega un papel central. Así, las bajas concentraciones intracelulares de Ca^{2+} (del orden de nM) (Gangola & Rosen, 1987), impiden el plegamiento temprano de la toxina, mientras que una vez que es secretada, los altos niveles de Ca^{2+} presentes en el medio extracelular (del orden de mM), inducen el plegamiento de la proteína. El plegamiento ordenado inducido por calcio comienza en el dominio de las repeticiones y se extiende al resto de la proteína permitiendo así la adopción de una estructura nativa en el medio extracelular. En este sentido, el calcio puede considerarse como una chaperona interna, y el cambio conformacional que ocurre a medida que la toxina es secretada puede a su vez ser un aspecto relevante en el proceso de secreción, ya que una vez que el extremo C-terminal se encuentra en el medio extracelular el plegamiento del dominio RTX podría actuar como una fuerza conductora que impulsa al resto de la toxina fuera del canal (Sotomayor-Perez et al., 2011) (Thomas et al., 2014) (Sotomayor-Perez et al., 2013). La unión a Ca^{2+} le da estabilidad a la proteína y constituye el segundo paso de activación necesario para que HlyA adquiera capacidad hemolítica (Bakás et al., 1998) (Ostolaza & Goñi, 1995). En la Figura 1.2 se muestra un esquema de los procesos descritos anteriormente.

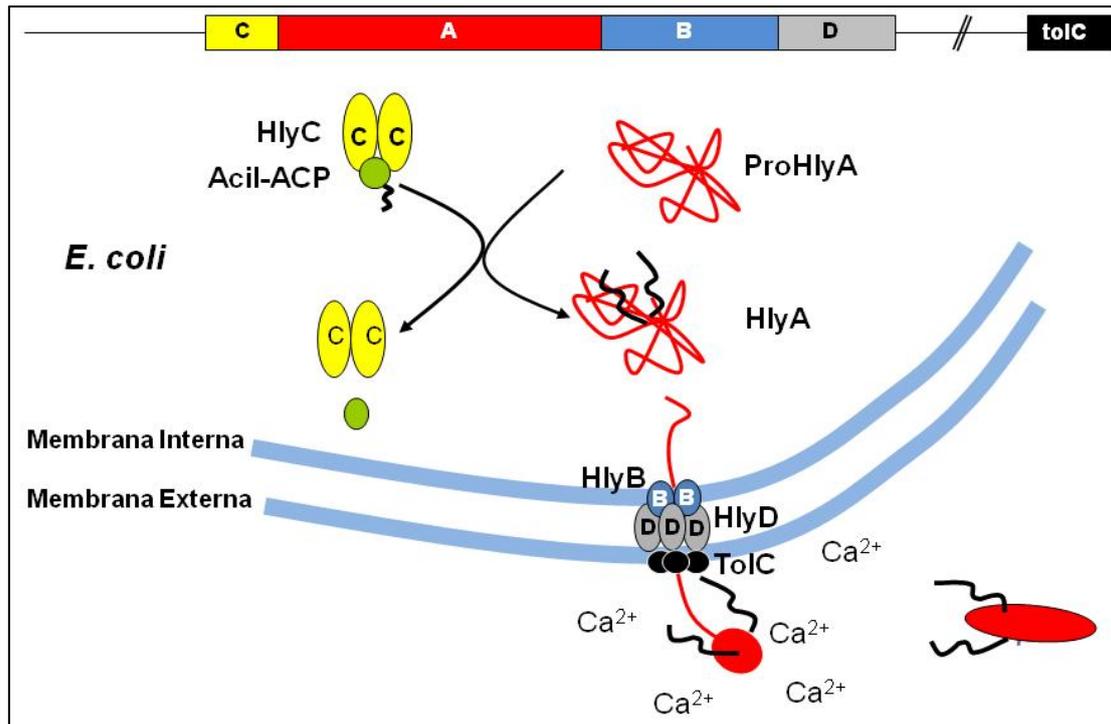


Figura 1.2. Esquema del proceso de síntesis, activación postraduccional y secreción de HlyA. Adaptado de Stanley et al., 1998.

Un segundo mecanismo de exportación utilizado por la bacteria para externalizar HlyA es a través de vesículas de membrana externa. La asociación de HlyA a estas vesículas le provee una vía de transporte protegida de la acción de proteasas y le permite alcanzar las células blanco de una manera más concentrada lo que hace más eficiente el proceso hemolítico (Balsalobre et al., 2006) (Herlax et al., 2010).

3.2. Estructura de HlyA

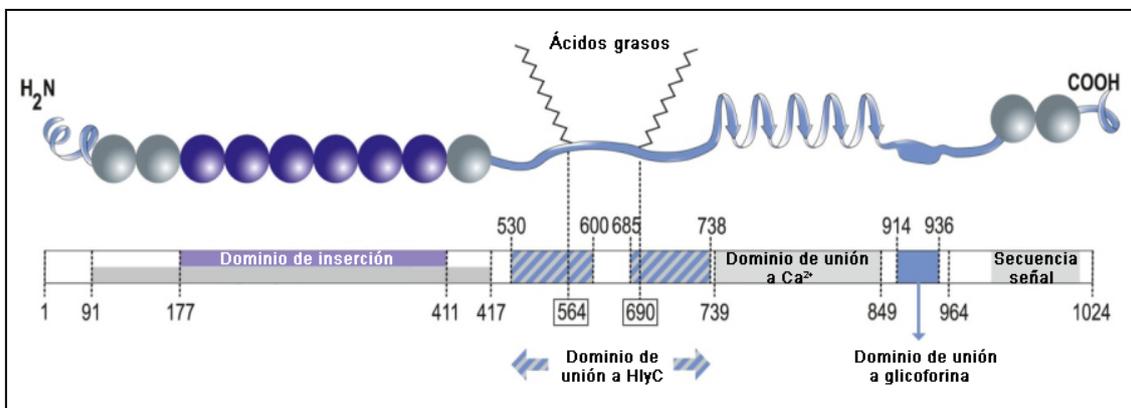


Figura 1.3. Esquema de la estructura de HlyA donde se indican los dominios más relevantes para el mecanismo de acción.

HlyA es una proteína muy grande cuya estructura tridimensional aún no ha podido ser determinada. Sin embargo, estudios de predicción y mutagénesis dirigida han permitido distinguir distintos dominios funcionales dentro de su estructura, como se muestra en la Figura 1.3:

- ❖ En la porción N-terminal, según estudios de predicción, existen 9 α -hélices anfipáticas muchas de las cuales parecen ser relevantes para la interacción con la membrana (Soloaga et al., 1999).
- ❖ Dentro del dominio N-terminal se ha identificado la zona determinante para la inserción en la membrana de la célula blanco y que se corresponde con la región comprendida entre los residuos 177-411 (Hyland et al., 2001).
- ❖ Las regiones que rodean a ambos sitios de acilación, K564 y K690, constituyen los sitios de reconocimiento para HlyC. Se requieren de 15 a 30 aminoácidos en cada uno de estos sitios para que haya un reconocimiento basal por parte de HlyC y entre 50 y 80 aminoácidos alrededor de cada residuo de K para que ocurra una acilación completa de HlyA. Como se dijo anteriormente, HlyC parece reconocer motivos estructurales en estos sitios y no sólo la secuencia de aminoácidos (Stanley et al., 1996) (Langston et al., 2004).
- ❖ El dominio de unión a calcio consiste de 11 a 17 repeticiones del nonapéptido rico en residuos de G y D, y presenta una estructura de hoja plegada β . La estructura tridimensional de este dominio se supone similar al de la región homóloga de la proteasa alcalina de *Pseudomonas aeruginosa*, otro miembro de la familia RTX y cuya estructura tridimensional ha sido resuelta mediante difracción de rayos-X (Baumann et al., 1993). En este dominio las láminas β se asocian formando estructuras β helicoidales paralelas. El dominio de unión a calcio sería el responsable de las etapas tempranas de la interacción de la toxina con la membrana de la célula blanco (Sanchez-Magraner et al., 2007).
- ❖ La secuencia comprendida entre los residuos 914 y 936 en el extremo C-terminal de la toxina se ha postulado como el dominio de unión a glicoforina A, una glicoproteína de la membrana de eritrocitos (Cortajarena et al., 2003).
- ❖ Los últimos 48 a 60 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal constituyen la secuencia de reconocimiento para el transporte de la toxina al medio extracelular a través del sistema de secreción tipo I. Se ha reportado que este dominio consiste en dos α -hélices separadas por 8 a 10 residuos cargados, y sólo la primera de las hélices y los aminoácidos separadores serían esenciales para el transporte (Gray et al., 1986) (Gray et al., 1989) (Kenny et al., 1992) (Kenny et al., 1994) (Hui et al., 2000).

En la Figura 1.4 se puede observar un modelo propuesto para la estructura de proHlyA obtenida mediante modelado molecular en el cual se pueden apreciar las α -hélices en el extremo N-terminal y las láminas β en el extremo C-terminal formando estructuras β helicoidales paralelas.



Figura 1.4. Modelo obtenido para proHlyA mediante el servidor I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Yang et al., 2015) y visualizado mediante el programa VMD (Humphrey et al., 1996) coloreado de acuerdo a la estructura secundaria. Las láminas β se representan por medio de flechas amarillas y las α -hélices por medio de bucles morados. Se puede observar la estructura de láminas β paralela que adopta el dominio de las repeticiones. En la parte inferior de la figura se puede observar el extremo N-terminal de la proteína donde se encuentran las α -hélices.

3.3. HlyA como factor de virulencia de *E. coli*

Dentro de las toxinas RTX la clasificación más común que se utilizó desde un comienzo se basó en el rango de especificidad que presentan las toxinas en cuanto a sus células blanco. Así han sido divididas en dos grandes grupos: las hemolisinas, que presentan un amplio espectro de células susceptibles y las leucotoxinas que presentan una mayor especificidad y sólo atacan células de la línea blanca. Las hemolisinas reciben su nombre por el hecho de que los eritrocitos son altamente susceptibles a la acción lítica de estas toxinas. HlyA pertenece al grupo de las hemolisinas. Muchos tipos celulares han demostrado ser susceptibles a la acción de HlyA, tanto monocitos

(Bhakdi et al., 1990) (Gadeberg et al., 1983), linfocitos (Cavalieri & Snyder, 1982), neutrófilos (Grimminger et al., 1991) como células endoteliales (Suttorp et al., 1990), células del epitelio renal (Keane et al., 1987), fibroblastos (Chaturvedi et al., 1969) y eritrocitos (DeBoy et al., 1980).

HlyA es un importante factor de virulencia de cepas uropatógenicas de *E. coli*. Estas cepas forman parte de la flora normal del intestino pero pueden adquirir la capacidad de diseminarse y establecerse en otros nichos, principalmente el tracto urinario, desde donde pueden colonizar la vejiga causando cistitis o llegar hasta los riñones causando pielonefritis. Dependiendo de la severidad del caso, pueden incluso alcanzar el torrente sanguíneo produciendo bacteriemia llegando así a distintos tejidos, incluido el sistema nervioso (Wiles et al., 2008).

Hasta el momento no se ha podido determinar con exactitud cuál es el papel que desempeña HlyA en la patogénesis de las enfermedades causada por *E. coli*. Se ha postulado que la lisis de las células, particularmente de los eritrocitos que presentan alto contenido de hierro, liberaría factores nutricionales requeridos para el desarrollo de la bacteria que, de otra manera, le resultan inaccesibles. Sin embargo, esto no ha podido ser probado hasta el momento. Estudios más recientes demuestran que los leucocitos reclutados a los tejidos infectados serían las principales células blanco de HlyA *in vivo* (Bhakdi et al., 1989). Utilizando un modelo de infección urinaria desarrollado en pez cebra, se encontró que el silenciamiento de la expresión de HlyA disminuye la virulencia de las cepas uropatógenicas y que ésta se recupera si se impide el desarrollo de neutrófilos y macrófagos en el sistema modelo. Estos estudios han permitido comprobar la importancia de HlyA como factor de virulencia de las cepas uropatógenicas y apoyan la hipótesis que postula como principal blanco de acción a las células fagocíticas del sistema inmune del huésped (Wiles et al., 2009).

Se ha encontrado que *E. coli* uropatógena coloniza la vejiga ingresando en las células epiteliales y multiplicándose en su interior formando comunidades bacterianas intracelulares. Una vez que estas comunidades maduran, las bacterias deben escapar de las células para poder invadir otras y así empezar nuevamente el ciclo. En este sentido, se ha postulado que HlyA juega un rol importante en el proceso de exfoliación del epitelio de la vejiga, permitiendo la salida de las bacterias. Se ha comprobado que la expresión regulada de HlyA por parte de la bacteria es indispensable para lograr su supervivencia dentro de la vejiga de modo de alcanzar su colonización (Dhakal & Mulvey, 2012) (Nagamatsu et al., 2015).

Independientemente de cuál sea su contribución a la patogénesis de las enfermedades, para poder ejercer su acción HlyA debe interactuar con las células

blanco. El conjunto de procesos que se desencadenan una vez que HlyA interacciona con la célula es realmente complejo y la información que se ha obtenido hasta la fecha acerca de este mecanismo es escasa. Se sabe que el primer paso esencial es la interacción de la toxina con la membrana y esto actúa como disparador de una serie de cambios estructurales importantes tanto en la proteína como en la membrana de manera tal que la toxina, que inicialmente interacciona con la membrana en una conformación soluble en medio acuoso, termina inmersa en la matriz hidrofóbica de la membrana plasmática formando un poro.

4. La membrana plasmática: el punto de encuentro

La membrana plasmática está compuesta por dos capas opuestas de lípidos o hemicapas (Gorter & Grendel, 1925). El modelo del mosaico fluido introducido por Singer y Nicolson en 1972 propuso que las membranas estaban formadas por una bicapa fluida de lípidos en la que tanto las proteínas como los lípidos podían moverse libremente (Singer & Nicolson, 1972). Inicialmente este modelo hacía referencia al movimiento aleatorio de las proteínas en la membrana como si se encontraran inmersas en un mar de lípidos. El modelo ha sido ampliado y contempla restricciones estructurales y funcionales en la organización de la membrana (Vereb et al., 2003). En este sentido, la mayoría de las membranas son asimétricas tanto lateralmente como en la composición de las distintas hemicapas (Verkleij et al., 1973). La hemicapa externa de la membrana plasmática está enriquecida en lípidos que contienen colina como PC y SM, mientras que la hemicapa interna está enriquecida en glicerofosfolípidos como fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS). Otros fosfolípidos minoritarios como ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol-4-fosfato (PIP), fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) son más abundantes en la hemicapa interna de la membrana donde participan en procesos de señalización intracelular (Bretscher, 1972) (Gascard et al., 1991). Las células poseen mecanismos especializados para controlar la composición de la membrana, enzimas como flipasas, flopasas y escramblasas son las responsables de mantener la asimetría de la membrana (Daleke, 2003) y esta heterogeneidad en la distribución de fosfolípidos es crítica para una correcta homeostasis celular. El colesterol (Col) es un componente esencial de la membrana plasmática de las células animales y su presencia imparte propiedades particulares a la membrana respecto de su permeabilidad, propiedades mecánicas, ordenamiento de las cadenas lipídicas, difusión lateral, espesor de membrana, organización lateral, etc (Mouritsen &

Zuckermann, 2004). La abundancia del Col en las distintas hemicapas de la membrana plasmática parece ser más homogénea comparada con la de los fosfolípidos debido a la rápida transferencia o *flip-flop* del Col entre las distintas hemicapas (Hamilton, 2003) (Steck & Lange, 2012) (Steck et al., 2002).

La membrana plasmática también presenta heterogeneidad lateral (Op den Kamp, 1979). Esto se observa por la presencia de regiones especializadas o microdominios de membrana entre los que se encuentran las caveolas y los *rafts* (Brown & London, 1998). Lo mismo se observa en distintos sistemas modelo de membrana que presentan en su composición dos o más clases de lípidos que exhiben un mezclado no ideal, lo que lleva a la formación de distintos microdominios (Mabrey et al., 1978) (Marguet et al., 2006). Esto constituye un aspecto estructural importante ya que permite la incorporación selectiva o la exclusión de ciertas proteínas de estas regiones, lo que provee un mecanismo que facilita la interacción proteína-proteína y lípido-proteína. En los últimos años, el interés científico se ha centrado particularmente en el estudio de una clase de dominios, los *lipid rafts*. Éstos se describen como microdominios enriquecidos en esfingolípidos y Col, que presentan una naturaleza altamente dinámica con gran movilidad en el plano de la membrana y han sido implicados en procesos de compartimentalización, modulación e integración de eventos de señalización, constituyendo plataformas para el ensamblaje de receptores de superficie (Lingwood & Simons, 2010) (Simons & Toomre, 2000). La Figura 1.5 muestra una imagen de un modelo de membrana en el que puede observarse la heterogeneidad lateral de lípidos presente en la misma.

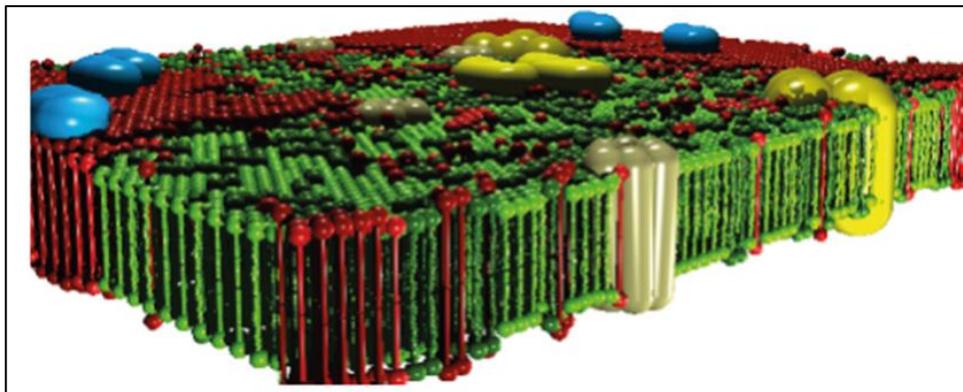


Figura 1.5. Imagen generada mediante simulación Monte Carlo que representa una visión más moderna de una membrana biológica donde puede observarse la heterogeneidad lateral de lípidos. Adaptada de Khalid, 2013.

En cuanto a la dinámica molecular de las membranas, se sabe que constituyen estructuras altamente dinámicas. Tanto la posición como la orientación de los lípidos

en la bicapa están cambiando constantemente. Asimismo, también ocurren cambios conformacionales en las cadenas hidrocarbonadas como isomerizaciones *trans-gauche* que afectan el orden conformacional de los lípidos. La Figura 1.6 muestra los distintos tipos de movimientos que caracterizan la dinámica de los lípidos en la membrana. El coeficiente de difusión lateral, determina la habilidad de los lípidos de intercambiarse con sus vecinos, fenómeno que ocurre en una escala temporal de menos de un minuto, mientras que el coeficiente de difusión rotacional define la rotación angular alrededor de su eje perpendicular al plano de la membrana, movimiento que se da en escala de nanosegundos. Los lípidos también pueden transferirse de una hemicapa a la otra, lo que equivale a una difusión transversal o *flip flop*. Este proceso es energéticamente desfavorable, ya que las cabezas polares de los fosfolípidos deben atravesar la matriz hidrofóbica de la bicapa, por lo que es muy lento y ocurre en lapsos de horas o incluso días. Sumado a los movimientos individuales de las moléculas de lípidos, en la membrana también ocurren distintos tipos de movimientos colectivos que involucran muchas moléculas de lípidos y que se dan en distinta escala de tiempo. Estas incluyen ondulaciones de la bicapa, fluctuaciones de su espesor, así como difusión colectiva de *clusters* de moléculas en el plano de la membrana (Mouritsen, 2005).

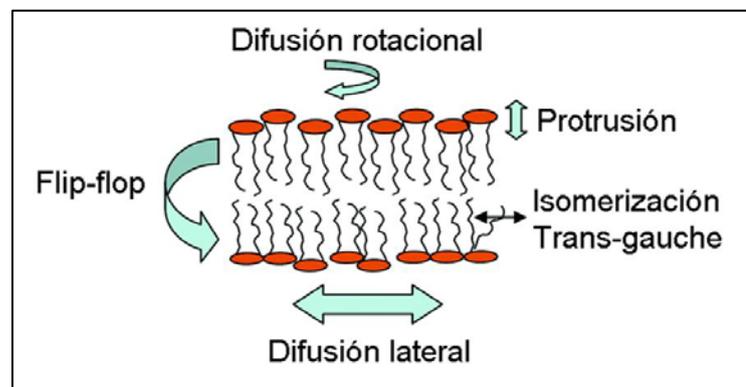


Figura 1.6. Esquema que ilustra los distintos movimientos individuales que experimentan las moléculas de lípidos en la membrana.

De la misma manera, las proteínas también pueden difundir lateralmente en el plano de la membrana, pero su coeficiente de difusión es mucho menor que el de los lípidos. Lo mismo ocurre al considerar los cambios conformacionales internos y los movimientos rotacionales, todos estos procesos, dado el tamaño relativo de las proteínas respecto de los lípidos, se dan a una velocidad mucho menor (Mouritsen, 2005).

La forma de los lípidos de membrana depende de la relación entre el área efectiva de su cabeza polar comparada con las dimensiones de su porción hidrofóbica, relación conocida como parámetro de empaquetamiento (Israelachvili, 1992). Así, los lípidos de membrana pueden presentar forma cilíndrica como PC o PS, forma cónica como PE o de cono invertido como lisoPC (Figura 1.7). Esto determina la localización de los lípidos en la bicapa y es responsable de la aparición de fenómenos de curvatura en la membrana, esencial en muchos procesos biológicos (Mouritsen, 2011) (Bagatolli & Mouritsen, 2013)

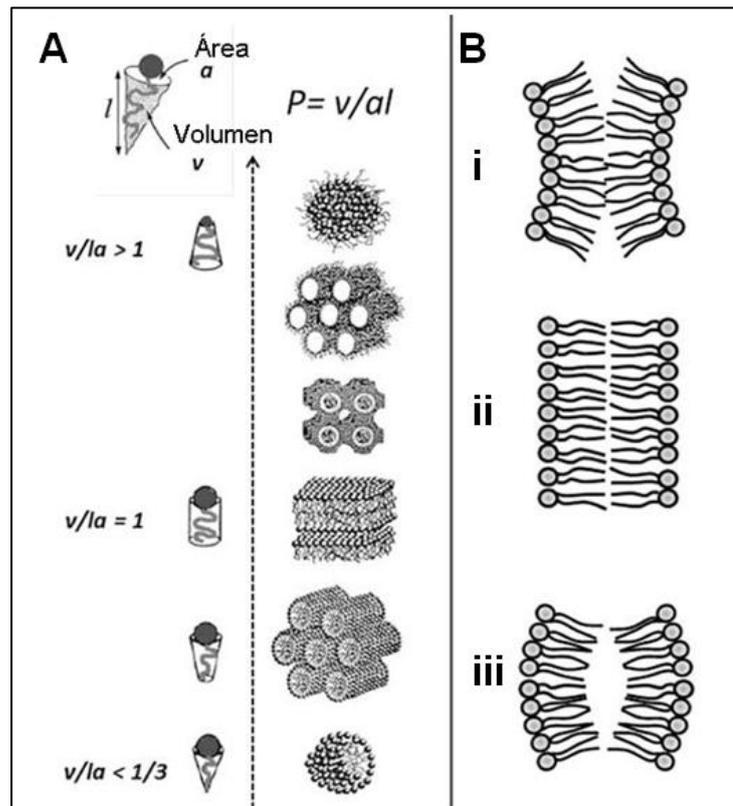


Figura 1.7. (A) Parámetros de empaquetamiento (P) de distintos lípidos de membrana y las estructuras lamelares o no lamelares que formarán los mismos por autoensamblado en medio acuoso de acuerdo a este parámetro. (B) Curvaturas de membrana generadas por la distinta forma de los lípidos presentes en la bicapa. i) Curvatura negativa en ambas monocapas lipídicas; ii) Cero curvatura; iii) Curvatura positiva. Adaptado de Bagatolli & Mouritsen, 2013.

En cuanto al comportamiento de fases de las membranas, la bicapa puede existir en distintos estados físicos, caracterizados por su organización lateral, el orden molecular y la movilidad de los lípidos que la constituyen. Las dos fases extremas que ocurren en las membranas biológicas son las llamadas fases gel y fases fluidas. En las fases gel, también llamadas fases sólidas ordenadas (S_o), las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos se disponen en configuración *trans* y elongadas al

máximo, generando una red compacta. Consecuentemente, la difusión lateral de los lípidos se encuentra fuertemente reducida. En la fase fluida, también llamada fase líquido desordenada (*Ld*), ocurren isomerizaciones *trans-gauche* lo que genera que las cadenas hidrocarbonadas se encuentren menos extendidas y tanto la difusión lateral como rotacional de los lípidos se ve favorecida en estas bicapas. La transición entre una fase gel y una fase fluida ocurre a una temperatura específica, la temperatura de transición de fases (Mouritsen, 2005).

En presencia de Col las bicapas lipídicas pueden adoptar un tercer estado de fase, denominado fase líquido ordenada (*Lo*). Esta fase comparte ciertas características con la fase gel y también con las fases fluidas (Ipsen et al., 1987). La inclusión de Col en la fase *So* perturba el empaquetamiento y por lo tanto reduce el orden de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. De la misma manera, cuando se intercala un motivo hidrofóbico rígido como el del Col en una fase *Ld* favorece una conformación *trans* de las cadenas hidrocarbonadas. En consecuencia la fase *Lo* presenta una difusión lateral y rotacional similar a una fase *Ld* pero un orden conformacional similar al del estado *So* (Ipsen et al., 1987) (Figura 1.8).

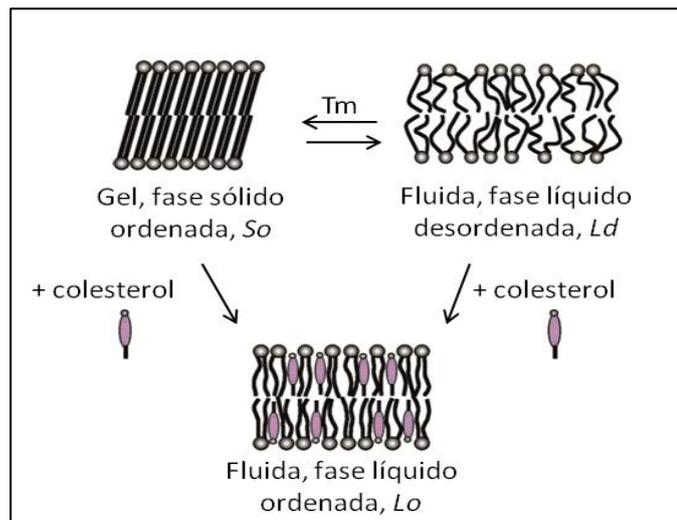


Figura 1.8. Esquema que representa las distintas fases en las que puede existir la membrana, *So* y *Ld*; y el efecto del Col sobre ambas fases intercalándose entre las cadenas de los lípidos, generando la fase *Lo*. Tm: temperatura de transición de fase.

En las membranas pueden coexistir fases *Lo-Ld* o *Lo-So*, esto ha sido observado experimentalmente en numerosos sistemas. La tendencia de los lípidos a formar una u otra fase dependerá esencialmente de su estructura química. Por ejemplo, la mayoría de los glicerofosfolípidos presentes en las membranas biológicas

poseen un ácido graso insaturado en posición *sn*-2 del glicerol. La presencia de este doble enlace en configuración *cis* produce un quiebre en la cadena hidrocarbonada que impide un empaquetamiento compacto de los lípidos, por lo que esta clase de lípido de membrana tendrá baja afinidad por los dominios ordenados. Por otro lado, los esfingolípidos que presenten cadenas hidrocarbonadas largas y saturadas, interaccionarán vía fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas, por lo que tendrán mayor propensión a formar fases ordenadas.

En este sentido, la hipótesis de la existencia de *rafts* propone que estos dominios, enriquecidos en SM y Col, presentan fase *Lo* y coexisten con el resto de la membrana en fase *Ld* (Lingwood & Simons, 2010).

Frente a este panorama complejo se encontrarán todas las PFTs, al igual que HlyA, al interaccionar con la célula blanco. La membrana no será un actor pasivo durante el proceso de interacción sino que sus características particulares y las propiedades que presente ejercerán influencia y afectarán los distintos pasos del mecanismo lítico.

5. Mecanismo de acción de HlyA

5.1. Unión de HlyA a la membrana

El primer paso en el mecanismo de acción de cualquier PFT es la unión a la membrana de la célula blanco. Muchas de ellas lo hacen a través de receptores proteicos específicos, por unión a oligosacáridos de glicoproteínas de membrana o a los lípidos mayoritarios presentes en la hemicapa externa de la membrana.

En la búsqueda de posibles receptores implicados en la unión de HlyA a sus células blanco, se ha reportado la participación de la β_2 integrina CD11a/CD18 de membrana en la unión de la toxina a leucocitos (Lally et al., 1997). Se determinó que HlyA se une a los oligosacáridos N-ligados de la subunidad β_2 de esta integrina (Morova et al., 2008). La utilización de receptores proteicos de la familia de las integrinas para la unión a leucocitos también ha sido reportado para otras toxinas de la familia RTX como LtxA de *A. actynomicetemcomitans* y Cya de *B. pertussis* (Morova et al., 2008). Sin embargo, otros estudios empleando granulocitos indican que la unión de HlyA ocurre sin que se registre saturación en la unión, lo que indicaría que la toxina no interacciona con un receptor específico en estas células (Valeva et al., 2005). Como ya se ha mencionado, los eritrocitos son células muy susceptibles a la lisis por HlyA.

Estas células no presentan β_2 integrina en su superficie pero sí poseen otras proteínas glicosiladas que podrían servir como sitios de unión de HlyA. En este sentido, se ha postulado que la glicoforina, actúa como receptor de HlyA en la membrana del glóbulo rojo (Cortajarena et al., 2001) y que la porción encargada del reconocimiento e interacción con la glicoproteína es la que se extiende entre los residuos 914-936 del extremo C-terminal de la toxina (Cortajarena et al., 2003). Sin embargo, al igual que lo encontrado al analizar la interacción con granulocitos, estudios realizados por Valeva *et al.*, indican que la interacción de HlyA con eritrocitos es independiente de la presencia de un receptor (Valeva et al., 2005). Estas diferencias encontradas podrían deberse al tipo de diseño experimental usado como ser la concentración de toxina ensayada, tipo celular, especie, etc. De todas maneras, estudios empleando liposomas desprovistos de proteínas confirman la actividad de HlyA en ausencia de receptores proteicos. Se ha comprobado que HlyA produce la liberación del contenido de liposomas de muy variada composición lipídica (Ostolaza et al., 1993). Esto implica que HlyA puede utilizar distintos mecanismos de unión a la membrana, tanto dependientes como independientes de receptor, dependiendo de la célula blanco, lo que podría significar un tipo de regulación adicional en su acción. Si se tiene en cuenta que los efectos generados por HlyA sobre la célula blanco no dependen específicamente de la unión a un receptor, es factible suponer que los mismos estén actuando simplemente como mediadores concentrando la toxina en la superficie de la membrana, facilitando así su inserción.

Se ha descrito que la interacción de HlyA con membranas desprovistas de receptor ocurre en dos etapas. Inicialmente, se produce la adsorción de la toxina a la superficie, siendo la región C-terminal de la toxina la responsable de estos primeros contactos, los que están gobernados por interacciones electrostáticas (Sanchez-Magraner et al., 2007). Esta adsorción inicial es un proceso reversible que no requiere de la unión a Ca^{2+} ni de la presencia de los ácidos grasos unidos covalentemente a la toxina (Bakas et al., 1996) (Ostolaza & Goñi, 1995) (Soloaga et al., 1996).

En cambio, para que la asociación de HlyA a la membrana se vuelva irreversible se requiere de la unión de Ca^{2+} al sitio de las repeticiones y de la activación por acilación de la toxina (Bakás et al., 1998) (Sanchez-Magraner et al., 2006) (Herlax & Bakas, 2003). Esta irreversibilidad en la unión está dada por la inserción de la toxina en la membrana y es un fenómeno que, a diferencia de la adsorción, está altamente influenciado por las características físicas de la misma (Bakas et al., 1996).

5.2. Inserción de HlyA en la membrana

La unión de Ca^{2+} al dominio de las repeticiones no modifica la estructura secundaria de la proteína pero produce un cambio conformacional que expone residuos hidrofóbicos en la superficie (Bakás et al., 1998). Este aumento de la superficie hidrofóbica favorece la inserción irreversible en la membrana, esencial para que tenga lugar la lisis.

La región de HlyA que se inserta en la membrana está localizada en la porción N-terminal, entre los residuos 177 y 411 (Hyland et al., 2001). Una vez que ocurre la inserción irreversible, la toxina se comporta como una proteína integral de membrana y sólo puede extraerse mediante el tratamiento con detergentes (Soloaga et al., 1999).

El estudio de la inserción de HlyA en bicapas de distinta composición lipídica, formadas ya sea por una única clase de fosfolípidos, o por mezclas binarias de fosfolípidos o de fosfolípidos y Col, permitió determinar que el estado de fase de la membrana tiene un fuerte impacto en el proceso de inserción (Bakas et al., 1996). En este sentido, la inserción irreversible se ve favorecida en las bicapas que presentan fases fluidas por sobre las que presentan fase gel y, dentro de las fases fluidas, se produce un mayor grado de inserción en las membranas en fase *L_d* que en fase *L_o* (Bakas et al., 1996).

5.3. Oligomerización de HlyA

En la mayoría de las PFTs la oligomerización constituye un paso previo o posterior a la inserción en la membrana que finalmente lleva a la formación del poro (Parker & Feil, 2005). En el caso de HlyA y otras toxinas de la familia RTX, no se ha podido aislar hasta el momento una estructura multimérica aunque existen medidas indirectas que indican que la toxina debe oligomerizar luego de su inserción para que ocurra la lisis (Benz et al., 1992) (Ludwig et al., 1993) (Herlax et al., 2009).

Se ha encontrado que la inserción de la toxina no siempre lleva a la lisis celular, ya que la introducción de diversas mutaciones puntuales en la toxina genera proteínas que son capaces de insertarse en la membrana pero que pierden su actividad lítica (Sanchez-Magraner et al., 2006).

La presencia de los ácidos grasos es indispensable para que ocurra el proceso lítico. En presencia de los ácidos grasos, y luego de la unión a Ca^{2+} , la toxina adquiere una conformación que permite la exposición de regiones intrínsecamente desordenadas dentro de la secuencia de la proteína. Estas regiones son las

responsables de promover interacciones proteína-proteína involucradas en el proceso de oligomerización (Herlax & Bakas, 2007). Se ha reportado que HlyA oligomeriza en la membrana de fantasmas de eritrocitos de carnero, mientras que esto no ocurre en el caso del precursor inactivo proHlyA que no se encuentra acilado (Herlax et al., 2009).

Se ha reportado que numerosas proteínas aciladas son dirigidas a microdominios de membrana enriquecidos en SM y Col (Levental et al., 2010) (Melkonian et al., 1999). En el caso particular de HlyA, se la ha encontrado asociada a membranas resistentes a detergentes (*DRMs* de sus siglas en inglés *Detergent Resistant Membranes*), con lo que se ha postulado su asociación a microdominios de membrana (Herlax et al., 2009). En el mismo trabajo se demostró que la disminución del contenido de Col de la membrana de eritrocitos de carnero produce una disminución de la oligomerización y altera la cinética del proceso, reduce notoriamente la asociación de HlyA a *DRMs*, al mismo tiempo que produce una caída abrupta de la actividad lítica. Considerando estos resultados, se propuso que los microdominios de membrana actuarían como plataformas de concentración de los monómeros facilitando la interacción proteína-proteína que lleva a la oligomerización. El análisis de la cinética de oligomerización indica que este sería un fenómeno progresivo, donde pequeños oligómeros se irían fusionando generando así el poro lítico (Herlax et al., 2009).

5.4. Formación del poro lítico

HlyA carece de dominios transmembrana bien definidos y dado que se aísla principalmente como monómero de las membranas, durante mucho tiempo ha sido cuestionada su capacidad de formar poros. Así, se han propuesto distintos mecanismos que podrían conducir a la lisis celular como una acción de tipo detergente o un efecto desestabilizador mediante la incorporación de la toxina en la hemicapa externa de la membrana, comportándose como una proteína integral no transmembrana (Ostolaza et al., 1993) (Soloaga et al., 1999). Sin embargo, en estudios de *patch clamp* en leucocitos y también empleando bicapas lipídicas planas, se observa actividad formadora de poros en membranas de diversas composiciones (Menestrina et al., 1996) (Menestrina et al., 1995) (Menestrina & Ropele, 1989) (Bakas et al., 2006). Estudios de protección osmótica indican que el tamaño de poro es variable y depende tanto de la concentración de toxina utilizada como de la temperatura y el tiempo de exposición (Moayeri & Welch, 1994).

Como se dijo, HlyA presenta actividad formadora de poro en bicapas lipídicas planas (BLMs). El poro, caracterizado por medidas de conductancia, es un poro

proteolipídico ya que sus parámetros son fuertemente dependientes de la composición lipídica de la membrana. Mediante medidas de tiempo de vida media de la membrana se ha demostrado que HlyA ejerce un potente efecto desestabilizador sobre la membrana, disminuyendo la barrera de energía para el desarrollo y crecimiento del poro (Bakas et al., 2006). Como ha sido sugerido para otras proteínas que desestabilizan la membrana, *el mismatch* hidrofóbico/hidrofílico de los lípidos en torno a la proteína reduce el costo energético para el agrandamiento del poro, lo que es equivalente a una disminución en la tensión lineal del poro. Llamativamente, en contraste con lo encontrado para otras proteínas desestabilizadoras de la membrana, se ha reportado que HlyA causa una disminución en la capacitancia de la membrana para distintas composiciones lipídicas analizadas (Bakas et al., 2006). Este efecto puede explicarse por un incremento en el espesor de la bicapa como consecuencia de la reorganización de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos que se produce como resultado de la interacción con la toxina (Figura 1.9).

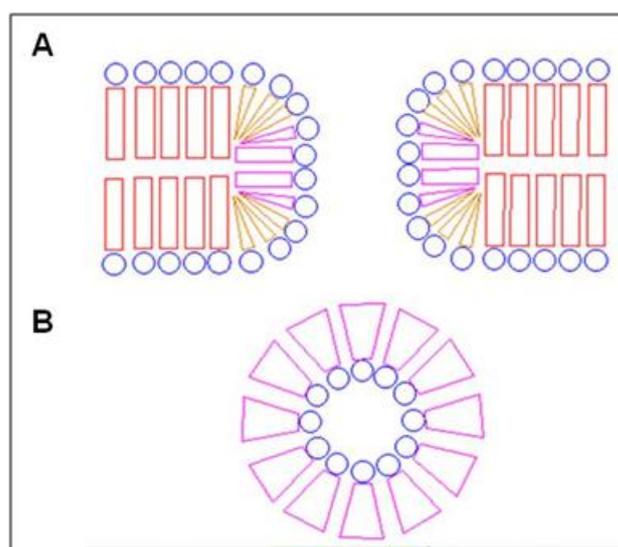


Figura 1.9. (A) Esquema de la localización de diferentes lípidos en el poro proteolipídico formado por HlyA. (B) Sección transversal de la parte media del poro en el plano de la membrana. Los lípidos lamelares se encuentran representados como cilindros rojos, los lípidos con curvatura intrínseca positiva como conos corales y lípidos con curvatura negativa como conos o cilindros rosa. Adaptado de Bakas et al., 2006.

Otro aspecto interesante encontrado en la interacción de HlyA con bicapas planas, es el incremento en la estabilidad de BLMs conteniendo lisofosfatidilcolina (LPC) frente a la acción de la toxina (Bakas et al., 2006). Usualmente, LPC es un

agente desestabilizante de membranas que favorece la formación de poros toroidales. Una posible explicación de esta paradoja en términos de la forma molecular y de la curvatura puede estar relacionada con el incremento de espesor de la bicapa inducido por HlyA. Generalmente, la expansión del poro y la ruptura de la membrana está facilitada por la presencia de moléculas que inducen una curvatura positiva (como lisofosfolípidos), ya que existe una disminución en la energía por unidad de longitud (tensión lineal) requerida para formar los bordes del poro en una membrana donde la curvatura de la monocapa es positiva, mientras que la presencia de lípidos inductores de curvatura negativa (como diacilglicerol, PE y Col), incrementan la energía libre (por unidad de longitud) para la creación del poro. En un poro proteolipídico, la curvatura positiva se encuentra perpendicular al plano de la membrana, mientras que la curvatura negativa está presente en el plano de la membrana alrededor del poro (Gilbert et al., 2014). Sin embargo, como fue descrito para HlyA, a medida que incrementa la longitud del poro la curvatura se desplaza hacia valores negativos, haciendo que la formación de dicho poro esté energéticamente menos favorecida en membranas que contienen lípidos con curvatura espontánea positiva. Así, LPC previene la formación de partes del toroide que son predominantemente de curvatura negativa, estabilizando en consecuencia la membrana.

6. Objetivos

Como se ha mencionado anteriormente, la interacción toxina- membrana es un paso obligado en el mecanismo de acción de HlyA. Dada la complejidad que presenta la membrana plasmática y siendo HlyA una proteína de gran tamaño que debe incorporarse en ella, queda claro que múltiples factores, tanto de la membrana como de la proteína, tendrán notable participación en el proceso.

Al día de la fecha, el mecanismo preciso por el cual HlyA ejerce su efecto lítico se desconoce. El objetivo general de este trabajo de tesis es profundizar en el conocimiento de este mecanismo de acción, principalmente en la interacción toxina-membrana y toxina-lípidos de membrana.

Para esto se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la influencia del estado de fase y la presencia de segregación de fases en la interacción de HlyA con membranas, tratando de establecer si existe partición preferencial de la toxina en fases *Ld* o *Lo*.
- Estudiar la existencia de interacciones específicas de HlyA con los lípidos mayoritarios de la hemicapa externa de la membrana celular.
- Analizar la existencia de determinantes moleculares de HlyA que participen en la interacción con lípidos de membrana.

Capítulo 2

Materiales y métodos generales

Capítulo 2: Materiales y métodos generales

1. Purificación de HlyA

La purificación de HlyA se realizó a partir de cepas superproductoras de *E.coli* WAM 1824 (pSF4000 en cepas JM15) (Moayeri & Welch, 1997). Esta cepa fue cedida por el Dr. Rodney Welch de la Universidad de Madison, Wisconsin.

Las bacterias fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB) sólido (NaCl 10 g/l, extracto de levadura 5g/l, triptona 10g/l, cloranfenicol 20 µg/ml y agar 20 g/l) (Maniatis et al., 1989) durante una noche a 37°C. Luego fueron repicadas en medio de cultivo LB líquido conteniendo 20 µg/ml de cloranfenicol, donde crecieron con agitación continua a 37 °C hasta fase logarítmica caracterizada por una $DO_{600\text{ nm}} = 0.9-1$. Se separaron las bacterias por centrifugación a 6000 rpm (centrífuga Avanti JE, rotor JLA 16.250) durante 15 min a 4 °C. Se colectaron los sobrenadantes y se llevó a pH 4.5 (el punto isoeléctrico de HlyA). La proteína se precipitó mediante el agregado de etanol frío hasta alcanzar una concentración final de 20% (v/v) de etanol. Luego de 48 h, se colectó la proteína precipitada mediante centrifugación a 10000 rpm durante 1 h a 4°C y se resuspendió en buffer TCCIGn (Tris.HCl 20 mM, NaCl 150mM, Cloruro de guanidinio 6M, pH= 7.4). Las muestras así obtenidas se almacenaron a -20 °C.

En un segundo paso de purificación se sometieron las muestras obtenidas a cromatografía de exclusión molecular a través de una columna Superdex 200 (Amersham Biosciences) utilizando Buffer TCCIGn como buffer de elución. Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Aquellas fracciones conteniendo toxina fueron colectadas formando un *pool* que se almacenó a -20°C.

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

La pureza de las muestras se comprobó mediante SDS-PAGE según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras fueron pretratadas durante 5 min a 100°C con Buffer muestra conteniendo SDS y β-mercaptoetanol como agente reductor. Posteriormente se sembraron en geles de doble desarrollo, el primer gel de apilamiento o gel *stacking* de menor concentración de acrilamida permite la concentración o apilamiento de las proteínas en el límite con el segundo gel de corrida o *resolving* donde las proteínas son separadas de acuerdo a su masa molecular, dado que el tratamiento con SDS brinda a todas las proteínas la misma relación

carga/masa. Se utilizaron geles 8% de 0.75 mm de espesor para la separación de las muestras y los mismos se corrieron a 140 Volts. El equipo empleado fue un *MiniProtean III* (BioRad). Una vez terminada la corrida electroforética los geles se tiñeron con una solución 0.1 % (p/v) de *Coomassie Blue* R-250 en Metanol: Ácido acético: Agua (4.5:0.5:5.0 [v/v]) y posterior decoloración con mezcla Metanol: Ácido acético: Agua (4.5:0.5:5.0 [v/v]). En cada corrida se incluyó el patrón de pesos moleculares *Precision Plus Protein dual color standards* de BioRad.

En la Figura 2.1 se puede observar un gel obtenido de una purificación de HlyA.

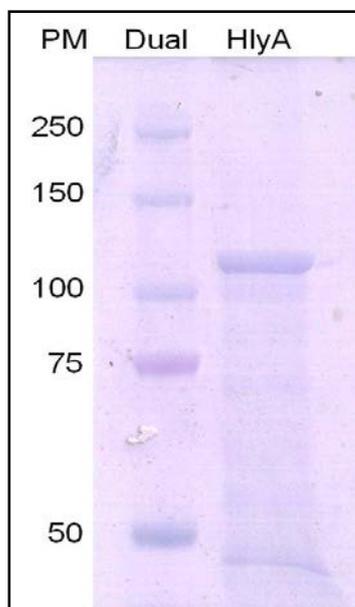


Figura 2.1. SDS-PAGE de HlyA. Se sembraron 10 μ g de HlyA en geles 8% junto con un patrón de pesos moleculares y se sometieron a electroforesis a 140 Volts. El gel se tiñó con *Coomassie Blue* y se decoloró posteriormente evidenciando la banda de HlyA a la altura de 110 kDa.

Antes de realizar los ensayos las proteínas fueron dializadas contra Buffer TC (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150mM, pH=7.4) por 4 h a 4°C para eliminar el Cloruro de guanidinio.

2. Ensayos de actividad hemolítica

Los ensayos se realizaron con sangre fresca estéril y desfibrinada de carnero provista por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Previo a cada ensayo se realizó la estandarización de la sangre a utilizar. Para lograr esto se tomó una alícuota de sangre y se hicieron lavados sucesivos con una solución de NaCl 0.9 % (p/v) hasta obtener un sobrenadante claro, libre de hemoglobina. Luego se preparó una suspensión de glóbulos rojos en NaCl 0.9% (p/v) y se estandarizó su concentración de manera tal que al agregar 12.5 μ l de esta suspensión a 1 ml de agua destilada, la absorbancia medida a 412 nm fuera de 0.6 UA (unidades arbitrarias).

Los ensayos se realizaron en placas de hemólisis por dilución seriada de 100 μ l de toxina en 100 μ l de Buffer de hemólisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150mM, CaCl₂ 10 mM pH= 7.4). Se añadieron 100 μ l de sangre estandarizada en cada pocillo de manera que el volumen final de todos los pocillos fuera de 200 μ l. Las placas se incubaron a 37 °C durante 30 min y luego se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min a 4 °C (Avanti JE, rotor JS5.3). El porcentaje de hemólisis se calculó en base al porcentaje de hemoglobina liberada. Para esto se diluyeron 10 μ l del sobrenadante de cada pocillo en 200 μ l de agua destilada y se midió la Absorbancia a 405 nm utilizando un lector de placas *Multimode Detector* DTX 880 (Beckman Coulter).

El porcentaje de hemólisis se calculó para cada pocillo comparando la absorbancia obtenida con la de un pocillo control donde se produce la lisis osmótica de los eritrocitos mediante el agregado de agua. La ecuación utilizada es la siguiente:

$$\% \text{ de lisis en el pocillo X} = (A_X - A_0) / (A_{H_2O} - A_0) \times 100$$

Donde A_x es la absorbancia en el pocillo X, A_0 la absorbancia medida en un pocillo control sin toxina y A_{H_2O} corresponde a la absorbancia obtenida luego de la lisis de los eritrocitos en agua destilada, correspondiente al 100% de hemólisis.

3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

En presencia de proteínas, la absorbancia máxima de una solución ácida del colorante *Coomassie Blue* aumenta de 465 a 595 nm debido a la estabilización de la forma aniónica del colorante tanto por interacciones iónicas como hidrofóbicas con los residuos de la proteína. El colorante reacciona principalmente con los residuos de

arginina (R) y en menor extensión con histidina (H), K, tirosina (Y), triptófano (W), y fenilalanina (F) (Bradford, 1976).

El reactivo de Bradford se preparó con 50 ml de etanol (95% [v/v]), 100 ml de ácido fosfórico (85%) y 100 mg de *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Sigma) en un volumen final de 1l. Se filtró antes de cada uso para eliminar los residuos sólidos no disueltos.

En los ensayos se mezclaron 5 μ l de muestra con 200 μ l de reactivo Bradford. Después de 10 min se midió la absorbancia a 595 nm en lector de placas *Multimode Detector* DTX 880 (Beckman Coulter).

En cada determinación se realizó una curva patrón con cantidades conocidas de seroalbúmina bovina (Sigma) disueltas en el mismo buffer que la muestra.

4. Preparación de sistemas modelo de membrana

Los liposomas son sistemas modelo de membranas comúnmente utilizados en el estudio de diversos procesos que ocurren a nivel de membrana como fusión, adhesión, interacción de biomoléculas, etc. Estas vesículas lipídicas se producen a partir de la dispersión de determinados lípidos en solución acuosa donde éstos se autoensamblan formando bicapas en un proceso gobernado por interacciones hidrofóbicas, de manera tal que las cabezas polares quedan en contacto con el medio acuoso y las cadenas hidrofóbicas permanecen secuestradas en el interior no polar.

De acuerdo al método utilizado para su preparación se pueden obtener distintas estructuras formadas por bicapas lipídicas. Cuando una película de lípidos se hidrata a una temperatura por encima de su temperatura de transición de fases, se forman vesículas multilamelares (MLVs de sus siglas en inglés *Multilamellar Lipid Vesicles*). Estas vesículas están formadas por varias bicapas lipídicas dispuestas de manera concéntrica que se encuentran separadas por la fase acuosa en la que fueron resuspendidas y generalmente presentan un tamaño que oscila entre 0.5 y 10 μ m. En el método de extrusión las MLVs son forzadas a pasar a través de una membrana de poro variable lo que origina la formación de vesículas unilamelares grandes (LUVs de sus siglas en inglés *Large Unilamellar Vesicles*). Estas vesículas se caracterizan por presentar una única bicapa lipídica que rodea un interior acuoso y su tamaño puede variar entre 100 y 400 nm, aproximadamente. De la misma manera, las vesículas unilamelares pequeñas (SUVs de sus siglas en inglés *Small Unilamellar Vesicles*) se obtienen por sonicación de las MLVs y poseen un diámetro generalmente inferior a 50 nm. Los GUVs (de sus siglas en inglés *Giant Unilamellar Vesicles*) son también

vesículas unilamelares pero, a diferencia de las anteriores, presentan un tamaño mayor a $1 \mu\text{m}$ (Figura 2.2). Estos se pueden obtener por hidratación de una película de lípidos a temperaturas por encima de la temperatura de transición de fases, hidratando ya sea por largos períodos de tiempo (método de hidratación) o mediante aplicación de un campo eléctrico externo (método de electroformación) (Walde et al., 2010) (Méléard et al., 2009).

Para la preparación de los LUVs utilizados en este trabajo de tesis se depositó la cantidad necesaria de lípidos (Avanti Polar Lipids) disueltos en cloroformo en un tubo de ensayo. Luego, se evaporó el solvente bajo una corriente de N_2 generando una película de lípidos en el fondo del tubo y se colocó 2 h en vacío para evaporar los restos de cloroformo. Finalmente, se agregó un buffer adecuado agitando enérgicamente para resuspender los lípidos y formar las MLVs, siempre trabajando por encima de la temperatura de transición de fases de la mezcla utilizada. Una vez formadas las MLVs, se obtuvieron los LUVs por el método de extrusión, forzando el pasaje de las MLVs a través de membranas de poro $0.1 \mu\text{m}$ (Nucleopore) utilizando un extrusor Avestín.

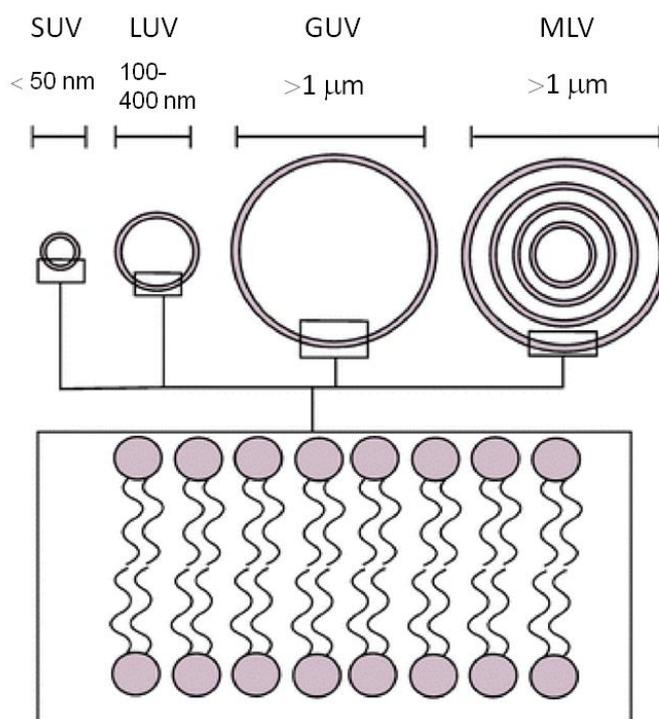


Figura 2.2. Esquema de los distintos sistemas modelo de membrana y sus tamaños relativos. Adaptado de Voskuhl and Ravoo, 2009.

Capítulo 3

Efecto de la segregación de
fases en la interacción de HlyA
con membranas

Capítulo 3: Efecto de la segregación de fases en la interacción de HlyA con membranas

1. Introducción

La coexistencia de fases *Lo-Ld* en el plano de la membrana y la distribución lateral de proteínas sin lugar a dudas tiene un papel importante en muchos procesos biológicos, como transporte de proteínas y lípidos durante la exo y endocitosis, cascadas de señalización, apoptosis, fusión de membrana, adhesión celular, entre otras (Brown & London, 1998) (Simons & Toomre, 2000). Los microdominios de membrana o *rafts* han sido descritos como sitios preferenciales de ataque de muchos patógenos y de sus toxinas (van der Goot & Harder, 2001) (Duncan et al., 2002) (Manes et al., 2003). Se cree que actúan como plataformas que permiten concentrar receptores necesarios para la unión de los patógenos a la membrana y/o para la oligomerización de sus toxinas, favoreciendo su acción.

Una característica distintiva de estos microdominios es su composición lipídica, ya que presentan un alto contenido de Col y esfingolípidos, dando lugar a la formación de dominios en fase *Lo*, caracterizados por la presencia de cadenas hidrocarbonadas estrechamente empaquetadas y extendidas pero donde los lípidos conservan una difusión lateral similar a la de una fase *Ld*. Al igual que en sistemas modelo de membranas donde, dependiendo de la composición, se puede observar coexistencia de fases *Lo-Ld*, se postula que en las membranas celulares podrían formarse microdominios (dominios *Lo*) que coexistirían con el resto de la membrana que presentaría características *Ld* (Hancock, 2006) (Lagerholm et al., 2005) (Pike, 2003). Uno de los resultados que apoya la existencia de estos microdominios es que las membranas celulares no se solubilizan completamente cuando son tratadas con detergentes no iónicos, como el Tritón X-100, a bajas temperaturas. Una fracción permanece insoluble y puede ser aislada en un gradiente de sacarosa (London & Brown, 2000). Estas fracciones se denominan *DRMs*. Estudios en sistemas modelo de membrana han permitido explicar la naturaleza de este comportamiento, demostrando que el alto grado de empaquetamiento que presentan los lípidos en la fase *Lo* previene la incorporación del detergente en la membrana (London & Brown, 2000). Asimismo, la obtención de *DRMs* a partir de sistemas modelo sólo se da en aquellos sistemas que presentan fases *Lo* antes del tratamiento con detergente (Ahmed et al., 1997). Esto sugiere que las *DRMs* aisladas a partir de las células derivan de dominios

preexistentes en la membrana celular y que los mismos efectivamente presentarían estructura *Lo*.

En estudios previos se analizó la implicancia de los microdominios de membrana en el proceso hemolítico de HlyA (Herlax et al., 2009). Los resultados demostraron que HlyA se asocia a *DRMs* y que la disrupción de los microdominios por extracción de Col con metil- β -ciclodextrina previene la oligomerización al mismo tiempo que disminuye la actividad lítica de la toxina. Se postuló entonces que HlyA interacciona con microdominios de membrana enriquecidos en SM y Col y que la interacción con estos microdominios sería necesaria para alcanzar una concentración local de toxina lo suficientemente alta como para facilitar su oligomerización (Herlax et al., 2009).

Por otro lado, se ha encontrado que la interacción de HlyA con la membrana depende de las propiedades físicas de la misma, pudiendo unirse de manera reversible o irreversible de acuerdo al grado de interacción (Bakas et al., 1996). La adsorción inicial a la membrana es un proceso reversible y sólo cuando la toxina se inserta dentro de la membrana su unión se vuelve irreversible. En este sentido, en estudios utilizando liposomas que presentaban distintos estados de fase de acuerdo a su composición y a la temperatura de trabajo, se vio que la inserción irreversible de HlyA en las membranas se ve favorecida en aquellas que presentan fase *Ld* sobre la fase gel o *Lo* (Bakas et al., 1996). La inserción preferencial de péptidos en las fases más fluidas parecería ser un fenómeno general y que encuentra cierto sentido si se piensa en las características propias de estas fases que las hacen más propensas a presentar defectos que favorecerían la inserción de la toxina. En el mismo sentido, al estar menos empaquetadas presentarían menos resistencia a la inserción y podrían responder más fácilmente reorganizándose liberando el exceso de presión generado por la toxina con un menor costo energético.

Considerando los resultados previos recién mencionados (Bakas et al., 1996) (Herlax et al., 2009), la asociación de HlyA con *DRMs* enriquecidas en SM y Col parecería contradecir la preferencia en la inserción irreversible de HlyA en membranas en fase *Ld*.

Este capítulo tiene como objetivo analizar la influencia de la segregación de fases en la interacción de HlyA con membranas, tratando de establecer si existe partición preferencial de la toxina en alguna de las fases de modo de poder aclarar los resultados contradictorios encontrados hasta el momento.

Capítulo 3: Efecto de la segregación de fases en la interacción de HlyA con membranas

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Los lípidos utilizados: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC), N-palmitoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina (16:0 SM), N-nervonoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina (24:1 SM), y colesterol (Col) fueron obtenidos en Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA).

2.2. Métodos

2.2.1. Ensayos empleando monocapas lipídicas como sistema modelo de membrana

Las monocapas lipídicas constituyen un modelo simple que permite simular membranas biológicas y evaluar la inserción de compuestos anfipáticos en la misma (Brockman, 1999) (Maget-Dana, 1999). Estos *films* monomoleculares insolubles son también llamados monocapas de Langmuir y se forman sembrando moléculas anfifílicas insolubles sobre la superficie de una fase acuosa.

Las monocapas lipídicas pueden ser consideradas como análogos de una de las hemicapas que compone una membrana biológica ya que los anfifilos se ubican en la interfase con sus cabezas polares en contacto con la subfase acuosa mientras que las cadenas hidrocarbonadas se despliegan hacia el aire de manera de evitar el contacto con el medio acuoso. Estos sistemas bidimensionales presentan muchas ventajas respecto de otros sistemas modelo de membranas y son ampliamente utilizados en el estudio biofísico de la interacción de proteínas, fármacos, etc, con membranas biológicas, permitiendo así caracterizar la influencia de muchas moléculas relevantes desde el punto de vista biológico sobre la estructura de la capa de fosfolípidos (Brezesinski & Möhwald, 2003) (Maget-Dana, 1999).

La formación de las monocapas es un proceso simple. Se coloca sobre una superficie acuosa (la *subfase*) un pequeño volumen de un anfifilo (en nuestro caso lípidos) disuelto en un solvente orgánico volátil y no miscible con la fase acuosa. El

solvente rápidamente se evapora y los anfifilos, insolubles en el medio acuoso, irán reorganizándose formando una capa monomolecular en la interfase aire/agua.

La adición de los anfifilos a la interfase aire/agua disminuye la tensión superficial del líquido. Si se considera una interfase aire/agua limpia, y se analizan las fuerzas de interacción que operan sobre una molécula de agua en el seno del líquido y una presente en la interfase, se encuentra que aquellas moléculas que están en la interfase, al no estar completamente rodeadas de moléculas vecinas, sufren un desbalance de las fuerzas de interacción y presentan una fuerza neta de atracción hacia el seno del líquido. Esto hace que el líquido tienda a disminuir el área expuesta y haya que entregar trabajo para aumentar el área del líquido. La fuerza que actúa sobre las moléculas en la superficie es la tensión superficial (γ). Cuando se forma una monocapa de anfifilos en la interfase, los mismos interaccionan con las moléculas de agua de la interfase y la aparición de estas nuevas fuerzas hace que disminuya la tensión superficial del líquido. El valor absoluto de este descenso corresponde a la fuerza por unidad de longitud con la cual la monocapa del surfactante tiende a expandirse en relación a la superficie del líquido puro y se conoce como presión superficial (π) (Brockman, 1999).

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

π presión superficial, γ_0 tensión superficial del líquido puro, γ tensión superficial en presencia de la monocapa.

El área disponible por molécula inicialmente dependerá de la superficie de la subfase acuosa y del número de moléculas sembradas en la superficie de la misma así como de la estructura de la molécula en cuestión. Se puede utilizar una barrera móvil para ajustar el área por molécula. El registro continuo de la tensión superficial durante la compresión y descompresión de la monocapa permite obtener isotermas de presión superficial (π)- Área por molécula.

2.2.1.1. Caracterización de las monocapas lipídicas mediante isotermas de compresión

Las isotermas de π en función del área permiten caracterizar las propiedades físicas de las monocapas y se obtienen por compresión continua de la monocapa mientras se registra la presión superficial. Como los anfifilos son prácticamente insolubles en la subfase, el número de moléculas de la monocapa permanece constante durante la compresión lo que permite calcular el área promedio por

molécula. Esto se logra dividiendo el área de la monocapa por el número total de moléculas sembradas en la superficie.

Análogos a los estados sólido, líquido y gaseoso en tres dimensiones, en monocapas se pueden observar distintos estados de fase: gaseoso (G), líquido-expandido (Le), líquido-condensado (Lc) y sólido (S) y sus correspondientes transiciones (Figura 3.2.1).

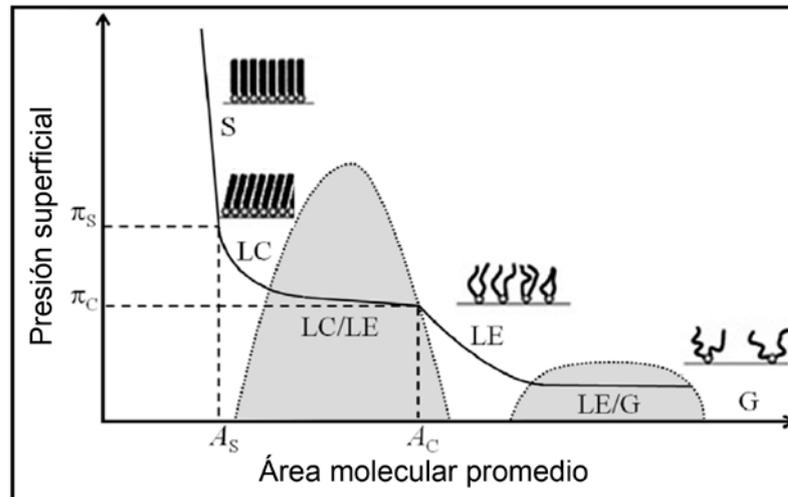


Figura 3.2.1: Representación de una isoterma Presión superficial (π) vs. Área molecular promedio ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$) para un fosfolípido. Las áreas grises representan zonas de coexistencia de fases (LC-LE y LE-G). S: Región con estructura tipo sólido bidimensional; LC: región líquido condensado; LE: región líquido expandido; G: región gaseosa. π_s y A_s corresponden a la presión y área de transición, respectivamente, entre fases líquidas y sólidas. π_c y A_c corresponden a la presión y área críticas, respectivamente, entre las regiones de coexistencia de fases LE and LC-LE. Adaptado de Pichot et al., 2013.

Al sembrar los anfifilos en la superficie del líquido, inicialmente estarán lo suficientemente alejados entre sí, de modo que habrá muy poca interacción entre ellos, condición que puede considerarse como una fase gaseosa bidimensional. A medida que las barreras avanzan y reducen el área de la monocapa, los anfifilos se van acercando entre sí y comienzan a interactuar, esto lleva a una transición de fase gas-líquido y aparece una fase líquida. Las interacciones entre las moléculas modifican la tensión superficial y π comienza a aumentar, lo que se conoce como punto de despegue en la isoterma. Así, durante la compresión de la monocapa, los anfifilos se irán autoorganizando y esto llevará a distintos cambios de fase, los cuales se observan como discontinuidades en la isoterma. Cuando las barreras han avanzado lo suficiente, los anfifilos están organizados en arreglos muy compactos, llegando a formar un sólido bidimensional. Llegado este punto, si se continúa comprimiendo, se

produce el colapso de la monocapa, lo que implica que los anfifilos ya no pueden organizarse más y por lo tanto comienzan a ser expulsados de la monocapa, generando estructuras 3D. El colapso de la monocapa se registra claramente en la isoterma mediante una caída abrupta de la presión superficial.

2.2.1.2. Obtención de las isotermas de compresión

Para la formación de las monocapas, se depositaron los lípidos disueltos en cloroformo sobre la superficie de la subfase constituida por Buffer TC 10 mM CaCl₂, contenida en un compartimento de teflon. Los mismos se dejaron reposar durante 5 min para asegurar la evaporación del solvente y relajación de la monocapa a una $\pi \leq 0.1$ mN/m. Luego se comprimió la monocapa isométricamente a una velocidad de $3 \pm 1 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ hasta el colapso de la misma. Todas las mediciones se llevaron a cabo con un equipo KSV Microtrough (KSV NIMA, Biolin Scientific AB, Västra Frölunda, Suecia). La presión superficial se determinó mediante el uso de una placa de platino empleando el método de Wilhelmy. El método consiste en registrar los cambios de peso de la sonda de platino unida por uno de sus extremos a una electrobalanza, mientras que el otro extremo se encuentra en contacto con la superficie de la disolución cuya presión superficial se desea evaluar. Al inicio de cada experimento, se efectuó la calibración del equipo, lo que permitió establecer la equivalencia entre el peso de la sonda detectado por la electrobalanza y los valores de π .

Los lípidos ensayados fueron Col, DOPC, 16:0SM, 24:1SM y las mezclas ternarias DOPC:16:0SM:Col en relación molar 2:1:1 y DOPC:24:1SM:Col en relación molar 2:1:1. Todas las isotermas de compresión se obtuvieron a 20°C.

El comportamiento elástico de las monocapas se analizó a través del cálculo del módulo de compresibilidad (C_s^{-1}) a partir de los datos de las isotermas de compresión (Ali et al., 1991) (Mohwald et al., 1995) según la fórmula:

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T$$

Donde π y A son la presión superficial y el área de la monocapa, respectivamente. Los datos de $\partial \pi / \partial A$ fueron obtenidos para cada punto π - A de las isotermas de compresión.

Los distintos estados de fase presentan, de acuerdo a sus características, determinados valores de Cs^{-1} (Davies, 1963). A mayor valor de Cs^{-1} , menor la elasticidad interfacial de la monocapa (Marsh, 1996).

Fase	Módulo de compresibilidad (Cs^{-1})
Gaseosa (G)	< 1 mN/m
Líquida expandida (LE)	1-100 mN/m
Líquida condensada (LC)	100-300 mN/m
Sólida (S)	>300 mN/m

Tabla 3.2.1. Valores característicos de los módulos de compresibilidad para monocapas en distintas fases (Davies, 1963).

2.2.1.3. Cinética de inserción de HlyA en monocapas lipídicas

Para el estudio de la cinética de inserción de HlyA en monocapas lipídicas se empleó un equipo NIMA Langmuir-Blodgett Through Modelo 102M (KSV-NIMA, Biolin Scientific, Finlandia), provisto de una placa Wilhelmy de platino como sensor de presión superficial. Las monocapas lipídicas se formaron mediante el agregado de pequeñas cantidades de la mezcla correspondiente, disuelta en cloroformo:metanol (2:1 [v/v]), sobre la superficie de la subfase, constituida por 200 ml de Buffer TC 10 mM $CaCl_2$; hasta alcanzar la presión inicial (π_0) de 12 mN/m. Luego de esperar 5 min para garantizar la evaporación del solvente y la estabilización de la π_0 , se inyectó toxina en la subfase de manera de tener una concentración final de 120 nM de HlyA y se registró el aumento de π en función del tiempo hasta alcanzar una señal estable. Las mezclas lipídicas empleadas fueron mezclas ternarias compuestas de DOPC:16:0SM:Col y DOPC:24:1SM:Col ambas en relación molar 2:1:1. Las mediciones se realizaron a 20 °C con agitación constante.

El proceso de inserción de la toxina en las monocapas se caracterizó analizando el incremento máximo de la presión superficial ($\Delta\pi$) según la ecuación:

$$\Delta\pi = \pi_f - \pi_0$$

Donde π_f es la presión superficial una vez alcanzado el equilibrio luego de que se inyectó la proteína en la subfase y π_0 es la presión superficial de la monocapa antes de añadir la toxina (ambas expresadas en mN/m) (Brockman, 1999) .

2.2.1.4. Microscopía de Ángulo de Brewster

Las monocapas de Langmuir pueden ser caracterizadas *in situ*, en la interfase aire/agua, a través de distintas técnicas experimentales. Tanto la Microscopía de Fluorescencia como la de Ángulo de Brewster permiten la observación microscópica de las monocapas. Sin embargo, a diferencia de la microscopía de Fluorescencia la microscopía de ángulo de Brewster (BAM) presenta la ventaja de no necesitar la incorporación de un análogo fluorescente en la monocapa que podría alterar las características de la misma.

El microscopio de ángulo de Brewster es un microscopio óptico que opera según principios básicos: dados dos medios 1 y 2, de índices de refracción n_1 y n_2 , respectivamente, el ángulo de Brewster (θ_{Brewster}) se define como el ángulo de incidencia bajo el cual radiación polarizada no es reflejada en la interfase entre los medios 1 y 2. El valor del ángulo de Brewster se puede determinar según la ecuación:

$$\tan\theta_{\text{Brewster}} = n_2/n_1$$

Para el caso de la interfase aire($n_1=1$)/agua($n_2=1.33$), el valor del ángulo de Brewster es de 53.1° , esto implica que no ocurrirá reflexión cuando se haga incidir radiación polarizada con un ángulo de 53.1° sobre la interfase aire/agua. Cuando se forma una monocapa de lípidos en la interfase aire/agua dado que la misma posee un índice de refracción distinto al de la fase acuosa, se producirá un cambio en el ángulo de Brewster. Como consecuencia de esto, al hacer incidir la radiación con el ángulo original, parte de la radiación será reflejada desde la región de la interfase cubierta por la monocapa (Figura 3.2.2).

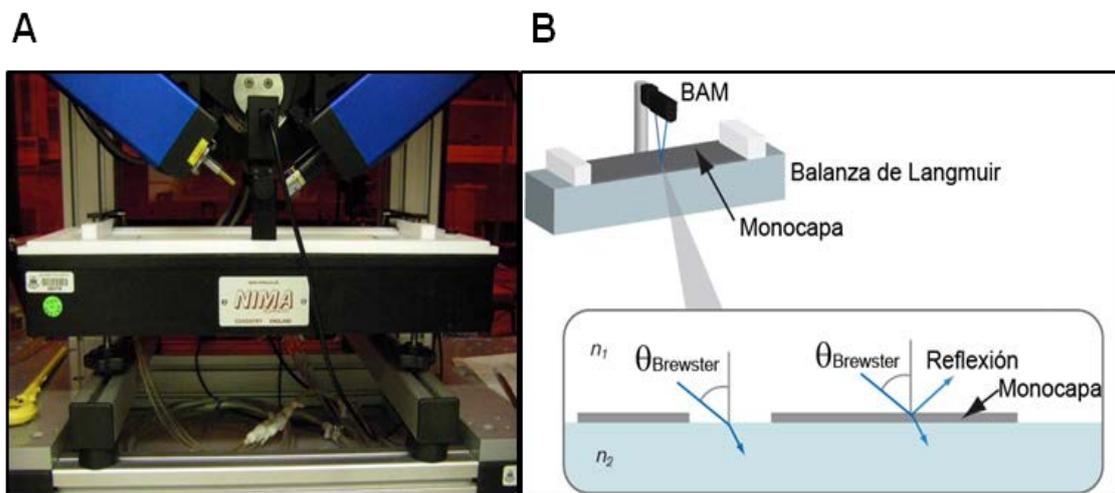


Figura 3.2.2. (A) Foto de un microscopio de Ángulo de Brewster montado sobre una balanza de Langmuir. (B) Esquema del fundamento de la técnica de Microscopía de Ángulo de Brewster. Adaptado de <http://www.biolinscientific.com/ksvnama>

Este método permite discriminar las distintas fases de una monocapa en base a diferencias de espesor y/o índice de refracción (Hoenig & Moebius, 1991). El registro, a través de una cámara, de la radiación reflejada permite la visualización *in situ*, en tiempo real de las monocapas en la interfase aire/agua. La resolución lateral de la mayoría de los Microscopios de Ángulo de Brewster se encuentra en el rango de 1 a 3 micrómetros y la mayoría de los instrumentos utilizan un láser de 532 nm como fuente de radiación (Giner-Casares, 2012).

2.2.1.5. Registro de imágenes por BAM

Para la obtención de imágenes por BAM se utilizó el equipo *KSV minitrough* (KSV-NIMA Biolin Scientific, Finlandia) montado en la plataforma de un elipsómetro de imágenes *Nanofilm EP3* (Accurion-Nanofilm Technology, Alemania) y se usó en el modo BAM. La reflexión se fijó a cero al hacer incidir un láser polarizado a una λ de 532 nm sobre la interfase aire/agua utilizando Buffer TC 10 mM CaCl_2 , lo que permitió determinar el ángulo de Brewster experimental. Durante la compresión de la monocapa lipídica, la luz reflejada en la interfase se colectó con un objetivo de 20X. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara CCD con una resolución de 2 μm .

Para los ensayos de inserción, se limitó el área total de la subfase (200 ml, 7.5 cm x 21.5 cm) a un área más pequeña mediante el uso de un cilindro de vidrio color caramelo. La comunicación del volumen así delimitado (10 ml) con el compartimento mayor se da sólo a través de indentaciones en el extremo superior del cilindro, lo que hace que ambos compartimentos estén comunicados únicamente a nivel superficial, es decir, a nivel de la monocapa la cual puede difundir entre un compartimento y otro. Este arreglo permitió utilizar cantidades menores de toxina, agregándola sólo en el compartimento más pequeño hasta alcanzar la concentración deseada sin riesgo de dilución ya que, en principio, las subfases de ambos compartimentos no se mezclan o lo hacen mínimamente.

Las imágenes de BAM se tomaron en el compartimento cilíndrico. Ambos compartimentos se llenaron con la subfase compuesta de Buffer TC 10 mM CaCl_2 , y se fue agregando la mezcla lipídica en pequeños volúmenes hasta alcanzar la presión superficial buscada, 20 mN/m. Una vez estabilizada la presión superficial, se inyectó la toxina (120nM concentración final) en la subfase del compartimento más pequeño, con agitación continua. Durante la adquisición de las imágenes, el área de la monocapa se ajustó automáticamente para que la presión superficial permaneciera constante a lo

largo de todo el ensayo. Los ensayos se realizaron empleando mezclas ternarias DOPC:16:0SM:Col y DOPC:24:1SM:Col ambas en relación molar 2:1:1.

Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImageJ (*Research Services Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA*). Para cada imagen a cada tiempo se tomaron 10 medidas de valor de gris medio dentro de cada fase.

2.2.2. Utilización de bicapas soportadas como modelos de membrana

Las bicapas soportadas constituyen otro sistema modelo de membranas formado por una bicapa lipídica plana soportada sobre una superficie sólida como mica, vidrio u óxido de silicio. En estos modelos, las cabezas polares de la primer monocapa de lípidos (una hemicapa de la bicapa soportada) interaccionan con el soporte mientras que las cadenas hidrocarbonadas están en contacto con las cadenas de los lípidos de la segunda monocapa (segunda hemicapa de la bicapa soportada). Estos sistemas presentan ciertas ventajas y dado que las bicapas están confinadas a la superficie de un soporte sólido pueden ser caracterizadas más fácilmente mediante distintas técnicas superficiales como microscopía de fuerza atómica (AFM) (Lin et al., 2007) (Mingeot-Leclercq et al., 2008) (Goksu et al., 2009), microscopía de fluorescencia (Crane & Tamm, 2007), reflectividad de rayos-X (Miller et al., 2006), entre otras.

Para la preparación de las bicapas soportadas se utilizó la técnica de fusión de vesículas (Jass et al., 2000). Este es un método simple donde básicamente se obtiene una bicapa calentando una suspensión de SUVs en contacto con la superficie sólida por encima de la temperatura de transición de fase de los lípidos. La Figura 3.2.3 esquematiza el proceso de obtención de bicapas soportadas por esta técnica, que incluye la adsorción de las vesículas a la superficie, seguido de deformación, aplanamiento y ruptura de las mismas. Se generan así zonas de bicapa que se van fusionando a través de interacciones hidrofóbicas dando lugar a una bicapa continua (Richter & Brisson, 2005) (Anderson et al., 2009).

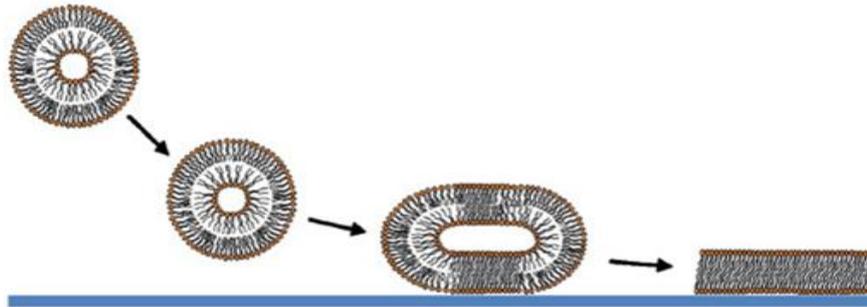


Figura 3.2.3. Esquema de la obtención de una bicapa soportada por la técnica de fusión de vesículas. Se puede observar la adsorción de los SUVs a la superficie del soporte y su posterior deformación para terminar fusionándose formando la bicapa soportada. Adaptada de Mingeot-Leclercq et al., 2008.

2.2.2.1. Preparación de bicapas soportadas sobre mica

Las bicapas soportadas sobre mica fueron obtenidas por la técnica de fusión de vesículas (Jass et al., 2000). MLVs fueron preparadas como fue descrito previamente en el capítulo *Materiales y Métodos Generales* utilizando Buffer TC para resuspender los lípidos y luego fueron introducidas en un baño sonicador FB-15049 (Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) y sonicadas por 1 h a 65°C con el objeto de generar las SUVs. Luego, se colocaron 120 μl de Buffer TC conteniendo 3 mM CaCl_2 sobre la mica (1.2 cm^2) previamente exfoliada y sujeta a un disco de acero de modo de poder colocarla en la celda de líquido para ser usada en la obtención de imágenes por AFM. Posteriormente, 60 μl de SUVs en Buffer TC se depositaron sobre el disco de mica y se incubaron por 1 h a 65°C en baño húmedo para evitar la evaporación de la muestra. Adicionalmente, las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 1 h y las vesículas no adsorbidas fueron eliminadas realizando 10 lavados de la muestra con Buffer TC. Durante los distintos pasos, se procuró siempre dejar una pequeña cantidad de buffer remanente sobre la superficie de la muestra de modo de mantener las bicapas soportadas hidratadas a lo largo de todo el proceso.

2.2.3. Visualización de la interacción de HlyA con bicapas mediante AFM

2.2.3.1. Microscopía de barrido por sondas

Las microscopías por barrido de sondas (SPM, de sus siglas en inglés *Scanning Probe Microscopy*) comprenden un amplio grupo de técnicas que permiten generar imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra a partir del barrido de la superficie por medio de una punta delgada. Dentro de estas técnicas está incluida la microscopía de fuerza atómica (AFM, de sus siglas en inglés *Atomic Force Microscopy*), basada en la medida de la fuerza de interacción entre una punta delgada y la superficie a distancias muy cortas.

2.2.3.2. Microscopía de Fuerza Atómica

AFM es la técnica de barrido por sondas más comúnmente utilizada y constituye una herramienta muy útil para la observación de muestras de origen biológico, ya que permite obtener imágenes de alta resolución de las muestras en condiciones mucho más cercanas a las fisiológicas, que en otro tipo de microscopías de alta resolución no serían posibles.

El tipo de interacción entre la punta y la muestra dependerá del modo de operación del AFM: modo contacto o repulsivo, modo no contacto o atractivo y modo *Tapping* o contacto intermitente. Cada modo de operación presenta ventajas y desventajas que deben ser evaluadas a la hora de su elección en función del tipo de muestra y de los resultados que se desean obtener.

El microscopio de fuerza atómica consta básicamente de una punta delgada montada en el extremo de un *cantilever* flexible, un transductor de fuerza capaz de detectar cambios en la interacción entre la punta y la muestra, un circuito de retroalimentación y un sistema que permite el control preciso de la distancia entre la punta y la superficie de la muestra a través de transductores piezoeléctricos o *scanners* (Figura 3.2.4) (Allison et al., 2010).

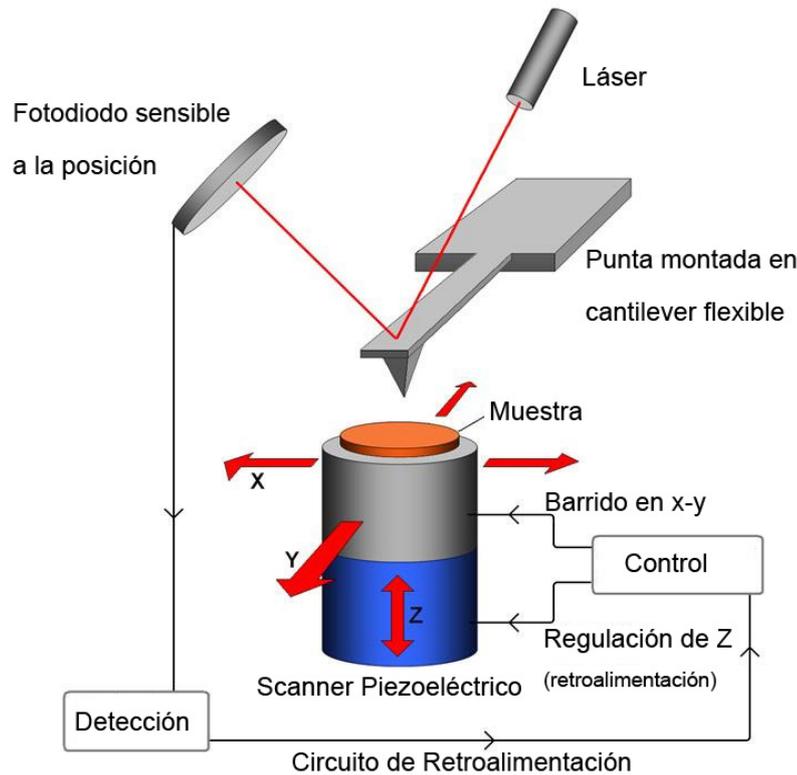


Figura 3.2.4. Esquema básico del funcionamiento de un AFM. Adaptada de <http://pharm.virginia.edu/facilities/atomic-force-microscope-afm/>

En la obtención de imágenes en modo contacto, por ejemplo, la punta barre la superficie de la muestra. La fuerza entre la punta y la muestra es de tipo repulsiva con un valor medio de 10^{-9} N. En el modo contacto se desea mantener la fuerza de interacción constante, para lo cual la mayoría de los AFMs utilizan un sistema de deflexión de rayo láser, donde un láser es reflejado desde la parte posterior del *cantilever* hacia un fotodetector sensible a la posición. Con esta disposición, una pequeña deflexión del *cantilever* inclinará el haz reflejado y cambiará la posición del haz sobre el fotodetector. El control de retroalimentación detecta cambios en la posición del láser. Así, la deflexión del *cantilever* es detectada y comparada por el control de retroalimentación que aplica un voltaje al piezoeléctrico para bajar o subir la muestra en relación al *cantilever* de manera que se restablezca el valor deseado. El voltaje que el amplificador de retroalimentación aplica al piezoeléctrico es una medida de la altura de la superficie de la muestra ya que tiene una correspondencia directa con la deformación sufrida por el piezoeléctrico en Z. Esta altura se almacena en función de la posición lateral de la muestra (x, y) obteniéndose así una imagen topográfica o de alturas de la superficie de la muestra.

2.2.3.3. Obtención de imágenes mediante AFM

Las imágenes de AFM se obtuvieron empleando un microscopio de fuerza atómica Multimode controlado por una unidad Nanoscope-V (Veeco, USA) manteniendo la temperatura a 24°C. Se utilizaron puntas de nitruro de silicio NP10 (Veeco Instruments Inc., USA) de constante de fuerza de 0.12 o 0.35 N/m. Las medidas se realizaron en modo contacto colocando las bicapas soportadas sobre mica en una celda de líquidos, aplicando continuamente la menor fuerza posible. Se colectaron imágenes de resolución 512 x 512 píxeles a una velocidad de escaneo de entre 1 y 1.5 Hz. Se tomaron simultáneamente imágenes de altura y señal de error (deflexión vertical).

En los ensayos de interacción de HlyA con las bicapas, una vez tomadas las imágenes de las bicapas en ausencia de toxina, se agregó 50 µl de una suspensión 1.8 µM de HlyA en Buffer TC conteniendo 3 mM CaCl₂ a la celda, y se tomaron nuevamente las imágenes en función del tiempo con el fin de analizar el efecto del agregado de toxina sobre las diferentes bicapas.

Capítulo 3: Efecto de la segregación de fases en la interacción de HlyA con membranas

3. Resultados y discusión

Dado que el objetivo de este capítulo se centró en distinguir si la interacción de HlyA con membrana ocurre preferencialmente a nivel de los dominios *Lo* o la fase *Ld*, se decidió utilizar un sistema modelo que presentara coexistencia de fases *Lo-Ld*, por lo que se eligió la mezcla ternaria DOPC/16:0SM/Col en relación molar 2:1:1 (de Almeida et al., 2003) (Fanani & Maggio, 2011). Asimismo, para analizar también la influencia de la segregación de fases en la interacción de la toxina con membrana, se realizaron en paralelo medidas utilizando una mezcla que no presenta segregación de fases como la mezcla ternaria DOPC/24:1SM/Col en relación molar 2:1:1. Esta elección particular se debió a la presencia en altas proporciones de la SM insaturada 24:1^{A15} en la membrana del glóbulo rojo de carnero (Mate et al., 2014), célula que ha sido muy utilizada en el estudio de la interacción de HlyA con membranas. Cabe mencionar, que las propiedades físicas de bicapas de DOPC/24:1SM/Col fueron caracterizadas en simultáneo a este trabajo de tesis por el grupo de trabajo. Los resultados obtenidos mediante microscopía confocal de GUVs conteniendo marcadores fluorescentes de fases *Lo* y *Ld* así como por AFM, demostraron que bicapas de esta composición no presentan segregación de fases, debido, al menos en parte, al doble enlace que presenta la 24:1SM, que hace que no pueda empaquetarse bien con el Col. Asimismo, la única fase presente en estas bicapas presenta propiedades nanomecánicas intermedias entre una fase *Lo* y una *Ld*, según medidas realizadas por AFM y espectroscopía de fuerzas (Mate et al., 2014).

En los ensayos realizados en este capítulo se utilizaron entonces estas dos mezclas ternarias y se emplearon distintos sistemas modelo de membrana, monocapas y bicapas, para estudiar la interacción de HlyA con membranas.

3.1. Caracterización de las monocapas lipídicas mediante isotermas de compresión

Como paso previo al estudio de la interacción de HlyA con monocapas se analizaron las propiedades físicas, área molecular promedio, compresibilidad y estado de fases de mezclas ternarias compuestas por DOPC:SM:Col en relación molar 2:1:1 y sus respectivos componentes puros mediante el estudio de sus isotermas de compresión.

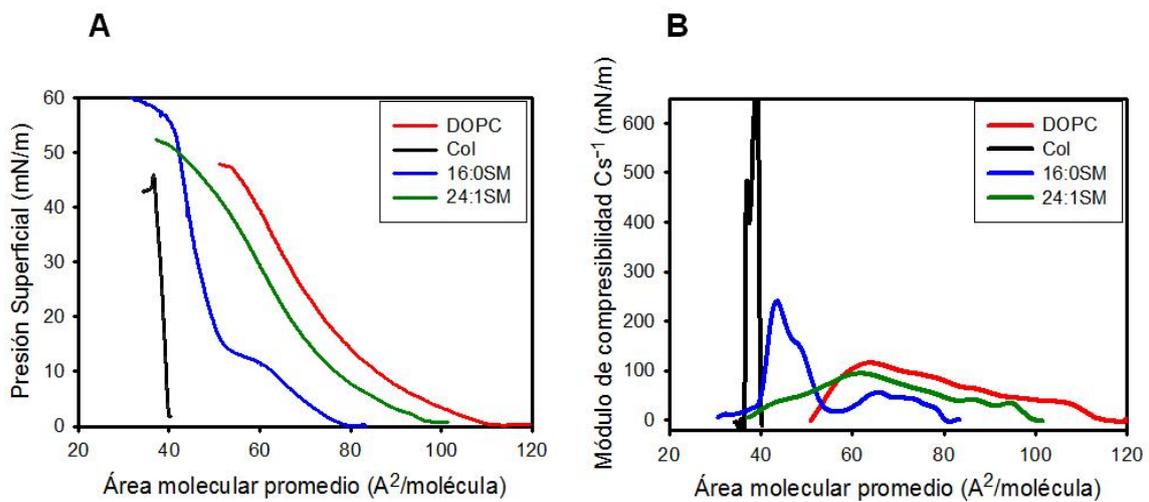


Figura 3.3.1. Caracterización de monocapas de lípidos puros. (A) Isotermas presión superficial-Área correspondientes a monocapas de lípidos puros. (B) Curvas Módulo de compresibilidad (Cs⁻¹)- Área correspondientes a cada isoterma. En todos los casos la subfase estuvo compuesta de Buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.4. Las medidas se realizaron a 20°C a una velocidad de compresión de $3 \pm 1 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Del análisis de las isotermas de compresión y los respectivos módulos de compresibilidad, se observa que las monocapas de DOPC presentaron un estado *Le* (Cs⁻¹ < 100 mN/m) (Davies, 1963), mientras que las de Col presentaron características *Lc* (Cs⁻¹ > 100 mN/m), a lo largo de toda la isoterma. En cuanto a las monocapas de SM, las isotermas correspondientes a la SM saturada 16:0 presentaron una transición de fase *Le-Lc* al alcanzar aproximadamente los 13 mN/m, mientras que en las monocapas formadas por SM24:1 no se observó transición de fases presentando un comportamiento tipo *Le* a lo largo de toda la isoterma hasta llegar a la presión de colapso (Figura 3.3.1 A y B).

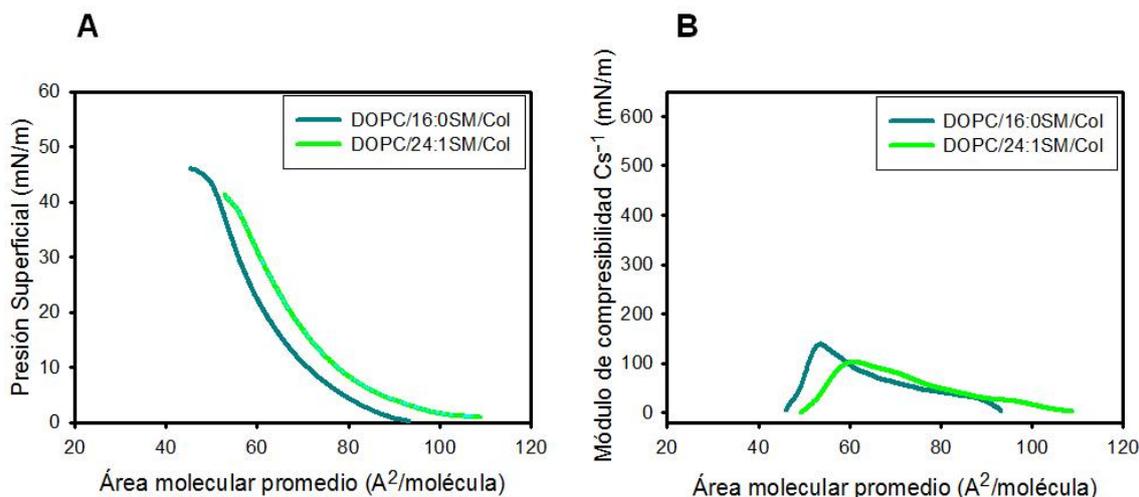


Figura 3.3.2. Caracterización de monocapas de mezclas ternarias. (A) Isothermas presión superficial- Área correspondientes a monocapas de mezclas ternarias DOPC:SM:Col en relación molar 2:1:1. (B) Curvas Módulo de compresibilidad (Cs⁻¹)- Área molecular promedio correspondientes a cada isoterma. Subfase: Buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.4. Las medidas se realizaron a 20°C a una velocidad de compresión de $3 \pm 1 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

A diferencia de lo observado para las monocapas formadas sólo por SM16:0, la mezcla ternaria DOPC/16:0SM/Col 2:1:1 no presentó transiciones de fases y sólo se observó un comportamiento tipo *Le* en todo el rango de la isoterma. Asimismo, la isoterma de compresión de la mezcla ternaria DOPC/24:1SM/Col también presentó un perfil tipo *Le* similar al de la mezcla anterior pero desplazado hacia áreas moleculares promedio mayores a lo largo de todo el rango de presiones superficiales y con valores de módulo de compresibilidad más bajos (Figura 3.3.2. A y B). Este resultado indica un mayor efecto de condensación en la monocapa que contiene 16:0SM respecto de la mezcla con 24:1SM. La mezcla DOPC/16:0SM/Col 2:1:1 ha sido ampliamente estudiada y se ha demostrado que cuando 16:0SM se mezcla con una PC de cadena corta o insaturada y Col, se establece un sistema de dos fases tanto en bicapas (*Lo* y *Ld*) como en monocapas (*Lo-Le*) (Marsh, 2009) (Fanani & Maggio, 2011). Las características *Le* de DOPC hace que éste sea el componente mayoritario de la fase *Le* en la mezcla ternaria, mientras que las propiedades *Lc* que presentan las monocapas de Col (Figura 3.3.1. A y B), se extiende a la fase *Lo* enriquecida en SM y Col en la mezcla ternaria (Fanani & Maggio, 2011).

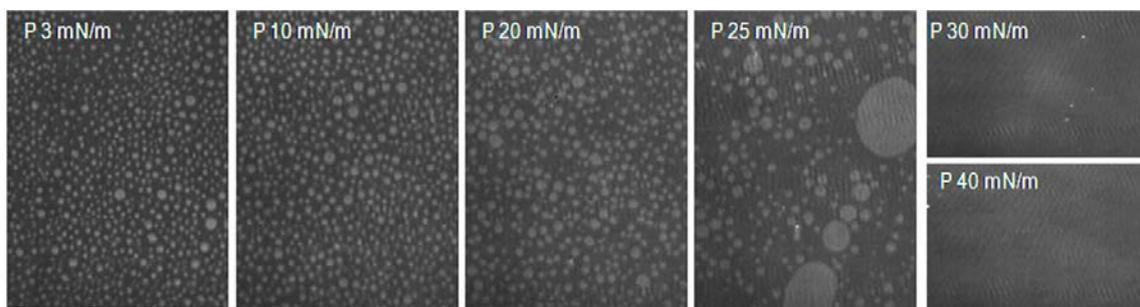
La información obtenida a partir de las isothermas de compresión se corresponde con propiedades promedio de toda la monocapa, como el área promedio por molécula o las propiedades elásticas promedio de la monocapa (Cs⁻¹). Así, si bien las monocapas de ambas mezclas estudiadas presentan en promedio características

Le, se sabe que ambas presentan diferencias significativas en cuanto a su comportamiento de fases (Mate et al., 2014). Para estudiar esto en mayor detalle se realizaron medidas directas visualizando las monocapas mediante BAM.

3.2. Visualización de las monocapas mediante BAM

Se analizó el comportamiento de las monocapas en ausencia de toxina a distintas presiones superficiales tomando imágenes mediante BAM.

A



B

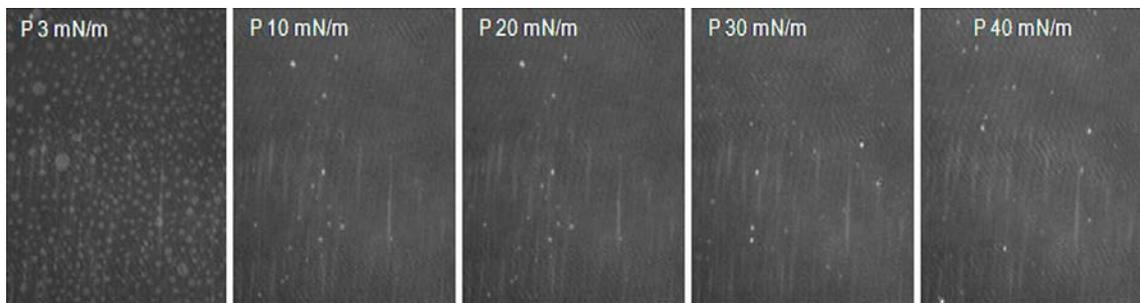


Figura 3.3.3. Imágenes obtenidas mediante BAM durante la compresión de mezclas ternarias de DOPC/16:0SM/Col (A) y DOPC/24:1SM/Col (B), ambas en relación molar 2:1:1. Las imágenes fueron tomadas a las presiones superficiales que se indican. La subfase en ambos casos fue Buffer Tris-HCl 20 mM, ClNa 150 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.4 y la temperatura de trabajo 20°C.

Como se mencionó anteriormente en la sección correspondiente a *Métodos* de este capítulo, mediante BAM se puede detectar diferencias de espesor y/o índice de refracción (Hoenig & Moebius, 1991), por lo que la visualización de las monocapas por esta técnica permitió comprobar la existencia o no de distintas fases en las mezclas ternarias estudiadas.

Como puede observarse en la Figura 3.3.3.A, las monocapas de DOPC/16:0SM/Col 2:1:1 presentaron segregación de fases a presiones laterales menores de 25 mN/m, visualizándose dominios más claros de forma redondeada inmersos en una fase más oscura. La forma redondeada de los dominios se corresponde con la existencia de dos fases líquidas inmiscibles. La forma de los dominios líquidos es controlado por un balance de dos fuerzas que se contraponen, la repulsión dipolar dentro de los dominios que tiende a separar los lípidos y por tanto a aumentar la superficie de los dominios y la tensión lineal que se genera en las zonas de contacto entre ambas fases debido a las diferencias de espesor que se presentan y que resultan en la exposición de zonas hidrofóbicas en la interfase. La tensión lineal tiende a minimizar la superficie de contacto entre las fases, por lo que tiende a disminuir el área de los dominios (McConnell, 1991) (Lehtonen et al., 1996). Si ambas fases presentan propiedades dipolares similares, entonces esta fuerza no será una determinante y en la forma de los dominios prevalecerá la acción de la tensión lineal, por lo que los mismos serán redondeados, como ocurre en este caso.

Se puede distinguir entonces en la monocapa de DOPC/16:0SM/Col 2:1:1 dos fases líquidas inmiscibles, una fase *Lo* (enriquecida en SM y Col) donde las cadenas hidrocarbonadas están más ordenadas y por lo tanto la monocapa presenta mayor espesor y que se corresponde con los dominios más claros de la imagen y una fase *Le* (enriquecida en DOPC) que rodea a los dominios *Lo* donde la monocapa es más delgada y aparece como una zona más oscura. Cuando las monocapas fueron sometidas a presiones laterales superiores a 25 mN/m ambas fases se mezclaron desapareciendo los dominios más claros en la imagen (Figura 3.3.3.A). Este mezclado lipídico puede deberse a que, a medida que la monocapa se comprime, los lípidos se van reorganizando y pueden redistribuirse entre las distintas fases. Así, las fases se van haciendo más similares en composición y esto disminuye la tensión de línea entre ellas hasta que llega un punto en el cual la tensión de línea se ve superada por la energía térmica, los bordes de los dominios se vuelven inestables y las fases llegan a mezclarse completamente (Fanani & Maggio, 2011).

En las monocapas compuestas de DOPC/24:1SM/Col 2:1:1, se observó separación de fases con presencia de dominios *Lo* sólo a presiones superficiales por debajo de 4 mN/m; por encima de este valor se observó una única fase de características *Le* encontrándose también algunos defectos de empaquetamiento en algunas zonas que se evidencian como zonas más claras en las imágenes (Figura 3.3.3.B). La existencia de dominios *Lo* sólo a presiones bajas implica que la interacción de 24:1SM con Col en estos dominios no es tan fuerte como en el caso de

16:0SM, por lo tanto, los dominios están menos estabilizados y al aplicar una fuerza moderada se produce el mezclado de los lípidos y la coalescencia de fases.

A partir de la visualización de las monocapas de ambas mezclas ternarias a las distintas presiones superficiales se comprobó que en el rango de presiones comprendido entre 10 y 25 mN/m, sólo aquellas monocapas conteniendo 16:0SM presentan segregación de fases con coexistencia de fases *Lo* y *Le*, mientras que aquellas con 24:1SM en su composición sólo presentan una única fase de tipo *Le*. Teniendo en cuenta esto, y dado que el objetivo era investigar la influencia de la segregación de fases en la interacción de HlyA con membranas, se trabajó en este rango de presiones superficiales para todos los ensayos en monocapas.

3.3. Inserción de HlyA en monocapas

Se estudió la interacción de HlyA con los modelos de membrana caracterizados previamente. Como paso previo a los ensayos de inserción, se realizaron medidas de adsorción de HlyA a superficies limpias aire/agua con el fin de corroborar las propiedades surfactantes de la misma y determinar la concentración de toxina a utilizar en los siguientes experimentos.

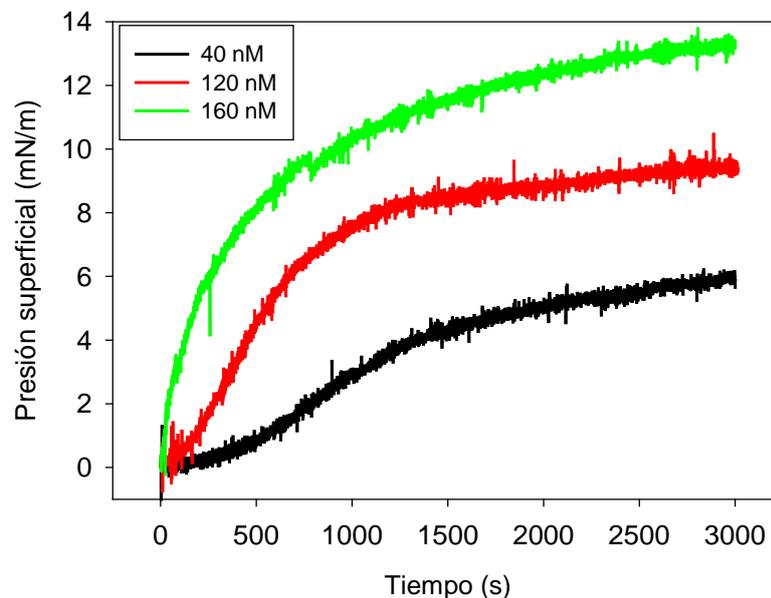


Figura 3.3.4. Cinética de adsorción de HlyA en la interfase aire/agua para distintas concentraciones de toxina. Subfase: Buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.4.

Al ser HlyA una toxina anfipática, presenta propiedades surfactantes como ha sido reportado previamente (Sanchez-Magraner et al., 2006). La Figura 3.3.4. muestra la cinética de adsorción de HlyA en la interfase aire/agua. Como se observa, la inyección de HlyA en la subfase generó en todos los casos un incremento en la presión superficial lo que se interpreta como la adsorción de la toxina a la interfase aire/agua. El incremento total en la presión superficial así como la cinética de dicho incremento variaron con la concentración de toxina inyectada en la subfase. A 40 nM de HlyA se observó una fase lag previo al incremento de la presión de superficie y un incremento menos pronunciado de la presión superficial. A medida que aumenta la concentración de HlyA, la velocidad de aumento de la presión superficial es mayor y desaparece la fase lag, es decir que más moléculas de toxina se adsorben en la interfase y con mayor velocidad. En el mismo sentido, cuanto mayor fue la concentración de toxina ensayada, mayor fue el incremento de presión superficial total registrado luego de 50 minutos (3000 s), obteniéndose incrementos totales de 6, 9 y 13 mN/m aproximadamente para 40, 120 y 160 nM de HlyA, respectivamente. Para los sucesivos ensayos de inserción en monocapas se utilizó una concentración de 120 nM de HlyA.

Se midió la cinética de inserción de HlyA en monocapas de DOPC/16:0SM/Col o DOPC/24:1SM/Col 2:1:1 (Figura 3.3.5).

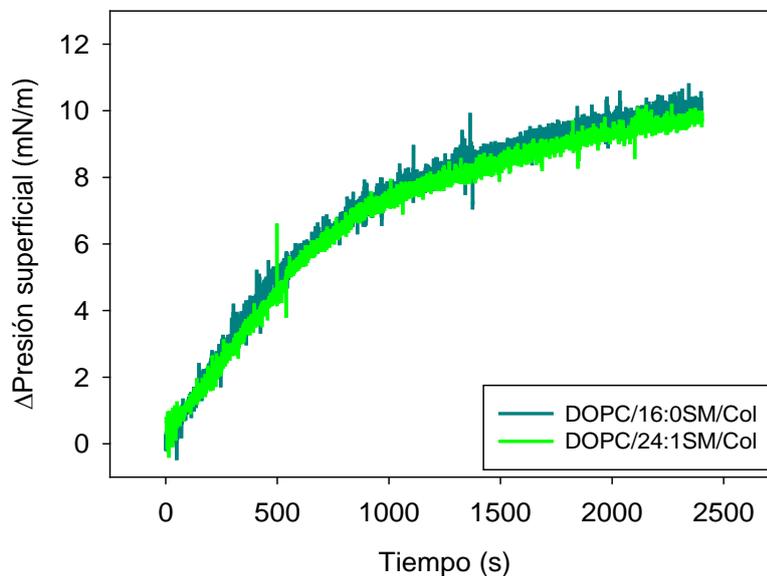


Figura 3.3.5. Inserción de HlyA en monocapas de DOPC/SM/Col. Cinética de inserción de HlyA en monocapas de distinta composición a una presión lateral inicial de 12 mN/m. Ambas mezclas de relación molar fue 2:1:1. La concentración de HlyA inicial en la subfase fue 120 nM. La subfase estuvo constituida por Buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.4. Las medidas se realizaron a 20°C.

Para monocapas que se mantienen a un área superficial constante, se encuentra que la inserción de anfifilos produce una compresión de los lípidos en la monocapa lo que produce un aumento de la presión superficial. Por lo tanto, el incremento en la presión superficial generado por el agregado de un anfifilo puede utilizarse como una medida de su grado de inserción y, a baja concentración, guarda una relación lineal con la fracción molar del anfifilo inserto (Marsh, 1996). Tanto la cinética de inserción como el incremento total de 10 mN/m en la presión de superficie obtenido luego de 40 min (2400 s) para ambas mezclas ternarias fue muy similar (Figura 3.3.5). Esto indicaría que, a diferencia de otras toxinas formadoras de poro como Equinotoxina II, cuya inserción y actividad es altamente dependiente de la presencia de segregación de fases (Barlic et al., 2004), HlyA presentaría el mismo grado de inserción en membranas que presentan coexistencia de fases como en aquellas que no lo hacen. Por lo tanto, la presencia de coexistencia de fases no tendría efecto alguno sobre la inserción de HlyA en monocapas, al menos para las mezclas estudiadas.

3.4. Visualización de la interacción de HlyA con monocapas mediante BAM

Con el fin de visualizar los efectos de la presencia de segregación de fases en la interacción de la toxina con membrana, se siguió, mediante la toma de imágenes por BAM, el curso temporal de la interacción de HlyA con monocapas de las dos mezclas ternarias a una presión superficial constante de 20 mN/m, donde la mezcla DOPC/16:0SM/Col 2:1:1 presenta segregación de fases, mientras que la mezcla DOPC/24:1SM/Col 2:1:1 se organiza en una única fase.

En la Figura 3.3.6.A se observan las imágenes tomadas por BAM de una monocapa de DOPC/16:0SM/Col 2:1:1 a una presión superficial constante de 20 mN/m antes y después del agregado de 120 nM de HlyA. Como se observó previamente a esta presión superficial, se comprobó la presencia de dos fases, con dominios *Lo* redondeados rodeados de una fase *Le*. Durante 10 min luego del agregado de toxina, se observó el mismo patrón de distribución de las fases *Lo* y *Le*, no apreciándose cambios en la morfología de los dominios.

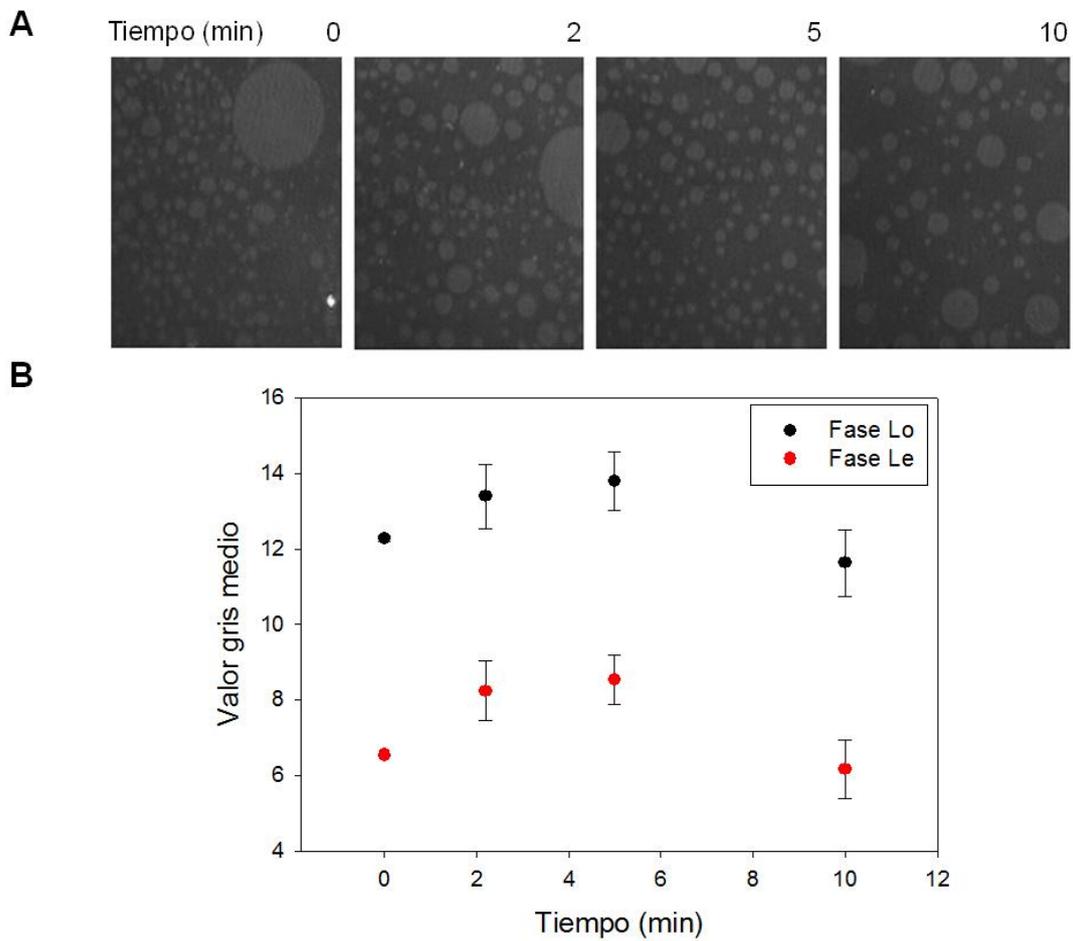


Figura 3.3.6. Interacción de HlyA con monocapas de DOPC/16:0SM/Col 2:1:1. (A) Imágenes obtenidas mediante BAM durante la interacción de HlyA (120nM) con monocapas de DOPC/16:0SM/Col 2:1:1 a una presión superficial de 20 mN/m. Las imágenes fueron tomadas a los tiempos que se indican en las figuras, siendo $t=0$ la imagen previa al agregado de toxina. La subfase utilizada fue Buffer Tris.HCl 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 10 mM, pH 7.4 y la temperatura de trabajo 20°C. (B) Cambios en el valor gris medio correspondiente a ambas fases a lo largo del tiempo. Los datos corresponden al valor medio \pm SEM de tres experimentos independientes donde en cada uno de ellos se analizaron al menos 10 regiones diferentes dentro de cada fase para cada imagen.

Al analizar los cambios en el valor gris medio en ambas fases, se observa un incremento del valor gris medio tanto en la fase *Lo* como en la *Le* (Figura 3.3.6.B). Como se dijo anteriormente, los cambios en la intensidad de luz reflejada en BAM se deben a un cambio en el índice de refracción y/o un aumento en el espesor de la

monocapa, por lo tanto la inserción de la toxina generó uno y/u otro efecto. Se ha reportado previamente que la inserción de HlyA en bicapas lipídicas planas genera un aumento del espesor de la membrana (Bakas et al., 2006), con lo que podría postularse que ésta podría ser la causa del aumento de la intensidad de gris, sin embargo al tratarse en un caso de bicapas y en otro de monocapas, debe considerarse que el comportamiento puede no ser el mismo.

Cabe destacar que los resultados indican que la inserción de HlyA en la monocapa produjo cambios en ambas fases, tanto la fase *Lo*, más ordenada, como la *Le*, más fluida. Esto podría deberse a que efectivamente la toxina se insertó en ambas fases. Sin embargo, también debe tenerse en cuenta que la inserción de la toxina en cualquiera de las fases producirá una perturbación de la monocapa que conducirá a una reorganización de los lípidos, por lo que los cambios generados en una fase por la inserción de la toxina podrían repercutir en cambios estructurales en la otra fase. Es importante mencionar, sin embargo, que a pesar de detectarse cambios en la intensidad de grises, no se produjeron cambios apreciables en la forma y distribución de los dominios.

La observación de las monocapas de DOPC/24:1SM/Col mediante BAM comprobó la existencia de una única fase antes y después del agregado de toxina, no observándose la aparición de dominios (Figura 3.3.7.A). Como se comentó anteriormente, la inserción de moléculas en la monocapa, en este caso una proteína, implica que ésta debe interactuar con los lípidos presentes, si la proteína tiene una interacción preferencial con alguno de los lípidos de la monocapa puede generar reordenamientos de lípidos a su alrededor y generar nuevos dominios, esto se ha visto por ejemplo en el caso de la interacción de algunos péptidos antimicrobianos con membranas y se cree que la inducción de separación de fases, y la consecuente aparición de defectos en la membrana podría tener un rol importante en el mecanismo de acción de muchos de estos agentes (Epand R.F. et al., 2008) (Jean-Francois et al., 2008) (Epand R.M. et al., 2008) (Epand & Epand, 2009). En el caso de HlyA, esto no se observa y el análisis del valor de gris medio para la única fase presente indica un aumento del nivel de gris luego de la inserción de la toxina (Figura 3.3.7.B).

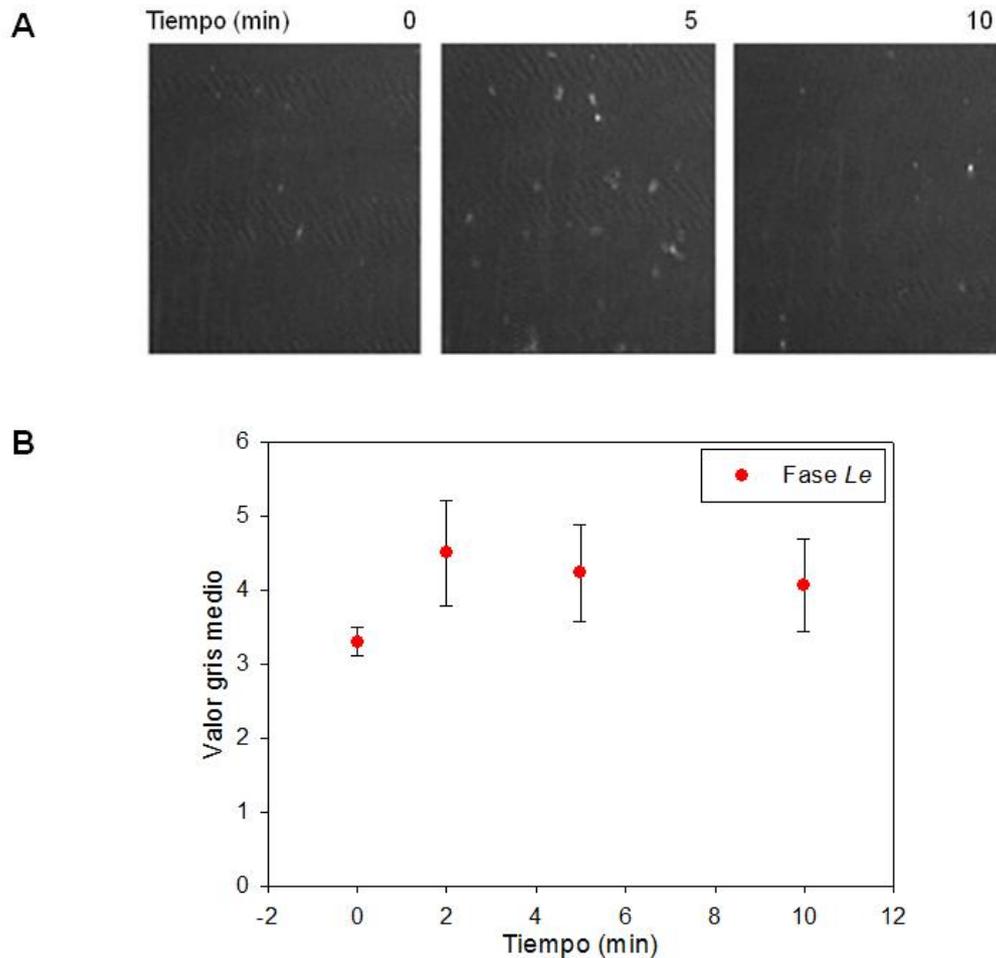


Figura 3.3.7. Interacción de HlyA con monocapas de DOPC/24:1/Col 2:1:1. (A) Imágenes obtenidas mediante BAM durante la interacción de HlyA (120nM) con monocapas de DOPC/24:1/Col 2:1:1 a una presión superficial de 20 mN/m. Las imágenes fueron tomadas a los tiempos que se indican en las figuras, siendo $t=0$ la imagen previa al agregado de toxina. La subfase utilizada fue Buffer Tris.HCl 20 mM, ClNa 150 mM, CaCl_2 10 mM, pH 7.4 y la temperatura de trabajo 20°C. (B) Cambios en el valor gris medio correspondiente a la única fase presente a lo largo del tiempo. Los datos corresponden al valor medio \pm SEM de tres experimentos independientes donde en cada uno de ellos se analizaron al menos 10 regiones diferentes dentro de cada fase para cada imagen.

La tabla 3.3.1 resume los cambios en los valores de gris medio para las fases *Lo* y *Le* presentes en las monocapas de DOPC/16:0SM/Col 2:1:1 y la fase *Le* presente en las monocapas de DOPC/24:1/Col 2:1:1. Se puede observar que en la mezcla con coexistencia de fases *Lo-Le*, la inserción de la toxina produjo un cambio mayor en el índice de refracción y/o espesor de la monocapa en la fase *Le* que en la fase *Lo*. Esto

podría indicar una mayor inserción de la toxina en la fase *Le*, hecho que podría deberse a las características más fluidas que presenta esta fase. Este resultado coincide con lo reportado previamente, donde se vio que HlyA presenta mayor inserción en liposomas que presentan fases *Ld* (Bakas et al., 1996). Se puede apreciar también que el efecto sobre el valor gris medio de la fase *Le* fue de igual magnitud en el caso de ambas mezclas ternarias, independientemente de la presencia o no de segregación de fases.

Mezcla ternaria	Fase	Valor Gris Medio Inicial	Valor Gris Medio a los 2 min	% de aumento
DOPC/16:0SM/Col	Lo	12.3 ± 0.1	14.0 ± 0.9	14
	Le	6.5 ± 0.1	8.9 ± 0.7	36
DOPC/24:1SM/Col	Le	3.3 ± 0.2	4.5 ± 0.7	36

Tabla 3.3.1. Valor de gris medio para las distintas fases antes y dos minutos después del agregado de toxina. Los valores corresponden a la media ± SEM (n=30). El % de aumento refleja el cambio del valor gris medio a los 2 minutos respecto del valor gris medio a tiempo 0. Se observa una diferencia significativa en el nivel de gris de las fases *Lo* y *Le* en la mezcla DOPC/16:0SM/Col y se produce un cambio significativo en el nivel de gris para todas las fases luego de dos minutos de interacción con HlyA ($p < 0.001$ mediante análisis de los datos obtenidos aplicando el *Test t de student*).

3.5. Visualización de la interacción de HlyA con bicapas mediante AFM

Con el objetivo de profundizar el estudio de la interacción de HlyA con membranas se utilizaron bicapas como sistema modelo y se analizó la interacción *in situ* en tiempo real mediante AFM lo que permitió, además de trabajar con un modelo más cercano a las condiciones fisiológicas, aumentar la resolución a escala nanométrica.

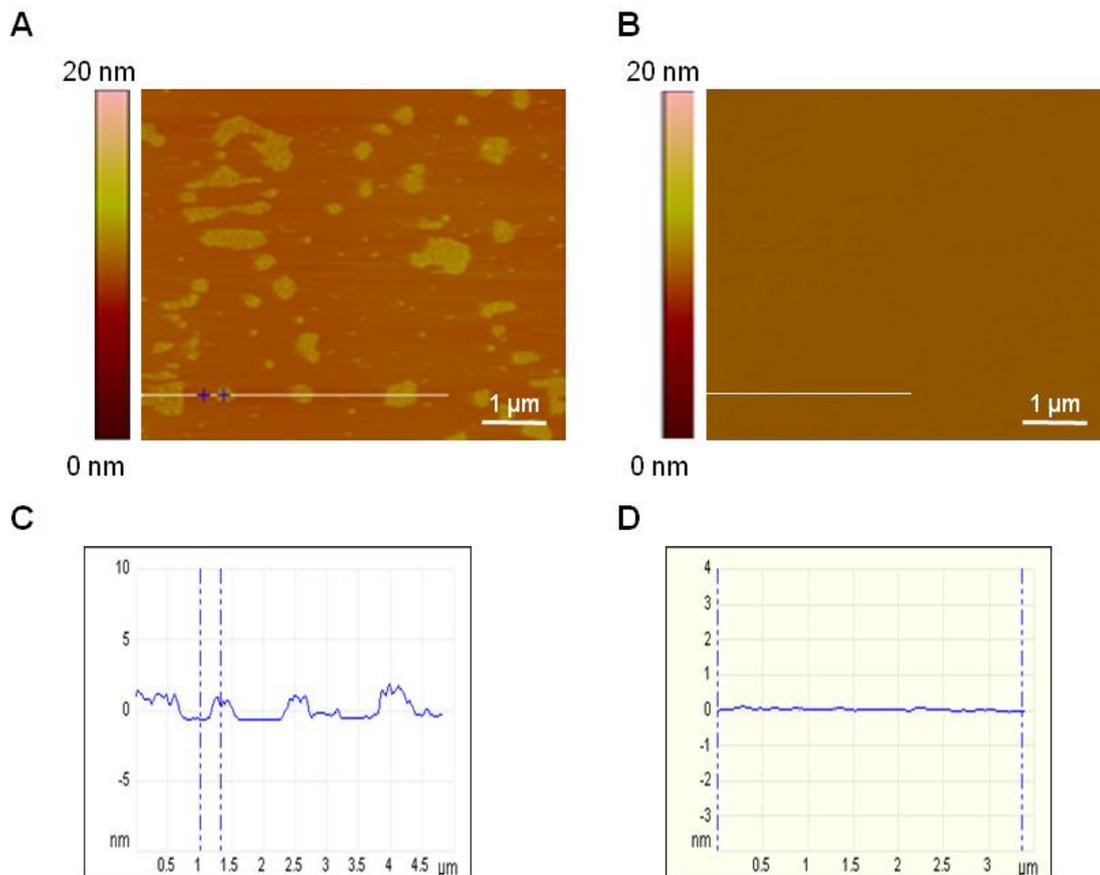


Figura 3.3.8. Imágenes obtenidas mediante AFM de bicapas soportadas sobre mica compuestas de (A) DOPC/16:0SM/Col 2:1:1 y (B) DOPC/24:1SM/Col 2:1:1 en Buffer Hepes 25 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 3 mM, pH 7.4 a 24°C. (C y D) Perfil de alturas de la sección transversal marcada por la línea blanca en las figuras A y B, respectivamente.

Las bicapas soportadas sobre mica compuestas de DOPC/16:0SM/Col 2:1:1 observadas por AFM presentaron segregación de fases, con dominios *Lo* (enriquecidos en SM y Col) que se corresponden con las zonas más claras en la imagen rodeados de una fase *Ld* (enriquecida en DOPC) más oscura (Figura 3.3.8.A). Esta diferencia de color indica una diferencia de altura, siendo los dominios *Lo* más altos que los *Ld*, lo cual es esperable al estar las cadenas hidrocarbonadas más extendidas. La diferencia de altura encontrada entre los dominios *Lo* y *Ld* resultó de 1.06 ± 0.06 nm, valor que está dentro del rango esperado de acuerdo a estudios realizados por otros autores (Sullan et al., 2010). La Figura 3.3.8.C muestra el perfil de altura de una sección transversal trazada en la Figura 3.3.8.A donde se observa la diferencia de altura al pasar de la fase *Ld* a la *Lo*.

La Figura 3.3.8.B muestra una imagen de una bicapa de DOPC/24:1SM/Col 2:1:1. A diferencia de lo observado para la bicapa que contiene 16:0SM, y en concordancia con lo observado por BAM para monocapas de esta mezcla ternaria, no

se observa segregación de fases sino que se puede apreciar una superficie lisa y homogénea y que queda evidenciado en el perfil de alturas de la sección transversal analizada (Figura 3.3.8.D). Esto corrobora la baja tendencia a asociarse con Col para formar dominios que tiene esta SM larga e insaturada comparada con la gran tendencia que tiene la 16:0SM (Mate et al., 2014).

Interacción de HlyA con bicapas de DOPC/16:0SM/Col

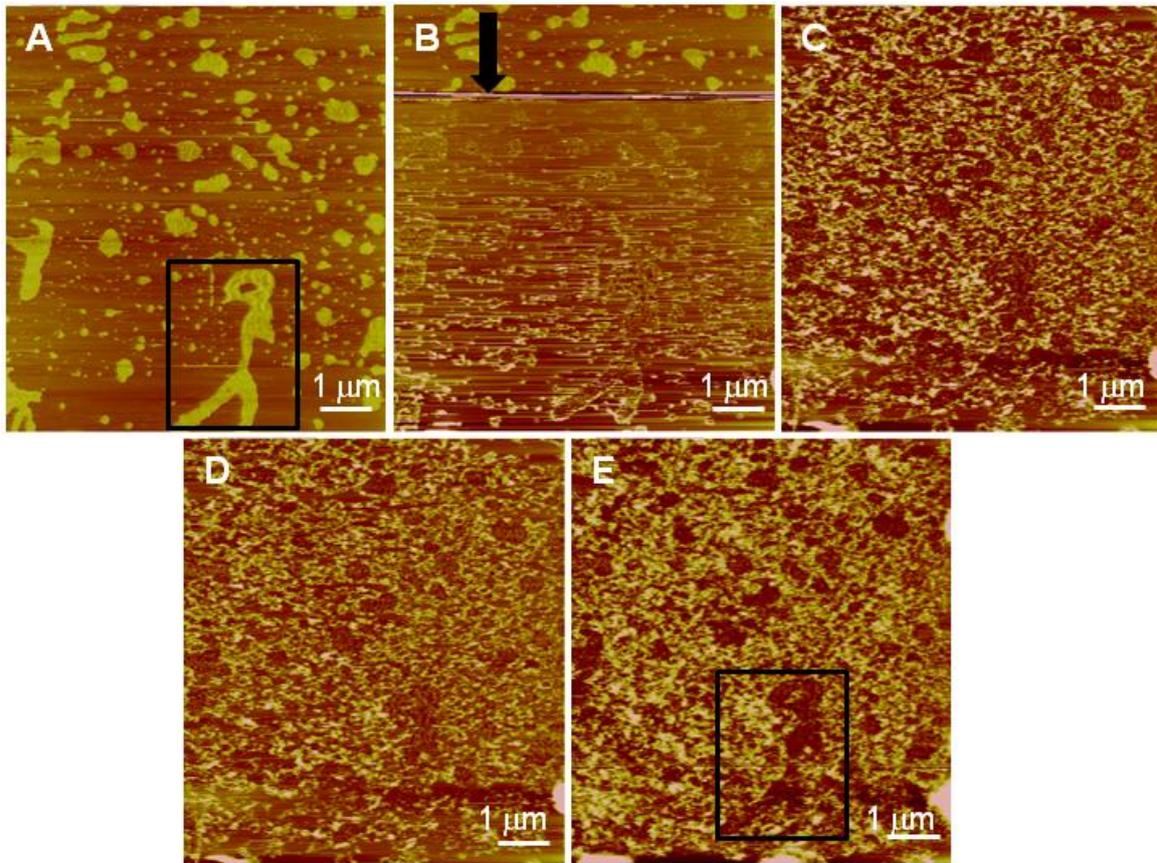


Figura 3.3.9. Efecto del agregado de HlyA a bicapas de DOPC/16:0SM/Col (en relación molar 2:1:1) soportadas sobre mica. Se tomaron imágenes durante 45 min luego del agregado de toxina (1.8 μ M) mediante escaneos secuenciales sobre la misma área de muestra. (A) Bicapa soportada antes del agregado de toxina. (B-E) Misma bicapa luego del agregado de toxina. El momento del agregado de toxina se indica con una flecha en B. El tiempo transcurrido al finalizar cada escaneo fue de (C) 15 min, (D) 30 min, y (E) 45 min.

La Figura 3.3.9 muestra una bicapa soportada sobre mica compuesta de DOPC/16:0SM/Col (2:1:1) antes del agregado de HlyA (Figura 3.3.9.A) y, en tiempo real, la misma bicapa durante su interacción con HlyA (Figura 3.3.9. B-E). Como se observa en las imágenes, al igual que lo visto para esta mezcla en la Figura 3.3.8.A, la

bicapa presenta una clara separación de fases. La flecha en la Figura 3.3.9.B, indica el momento del agregado de HlyA a la bicapa. En esta secuencia de imágenes se observa que la interacción de HlyA con la bicapa se produjo inicialmente en la periferia de los dominios *Lo* y, a medida que transcurrió el tiempo, se vio una unión/inserción preferencial en la fase *Ld*, acumulándose la toxina en esta fase (Figura 3.3.9.C-E). No se observó interacción de HlyA con los dominios *Lo*, ni tampoco cambio de forma de los mismos. El recuadro de la Figura 3.3.9.A muestra un dominio *Lo* rodeado de fase *Ld* antes del agregado de toxina. El mismo recuadro luego de 45 min de interacción con la toxina (Figura 3.3.9.E), muestra un cambio en el patrón de alturas, presentando la fase *Ld* mayor altura que los dominios *Lo* debido a la presencia de toxina. Esto indica la unión preferencial de la toxina en la fase *Ld*.

La ampliación de una zona de la imagen 3.3.9.A permite observar en mayor detalle el cambio en el patrón de alturas luego del agregado de toxina (Figura 3.3.10).

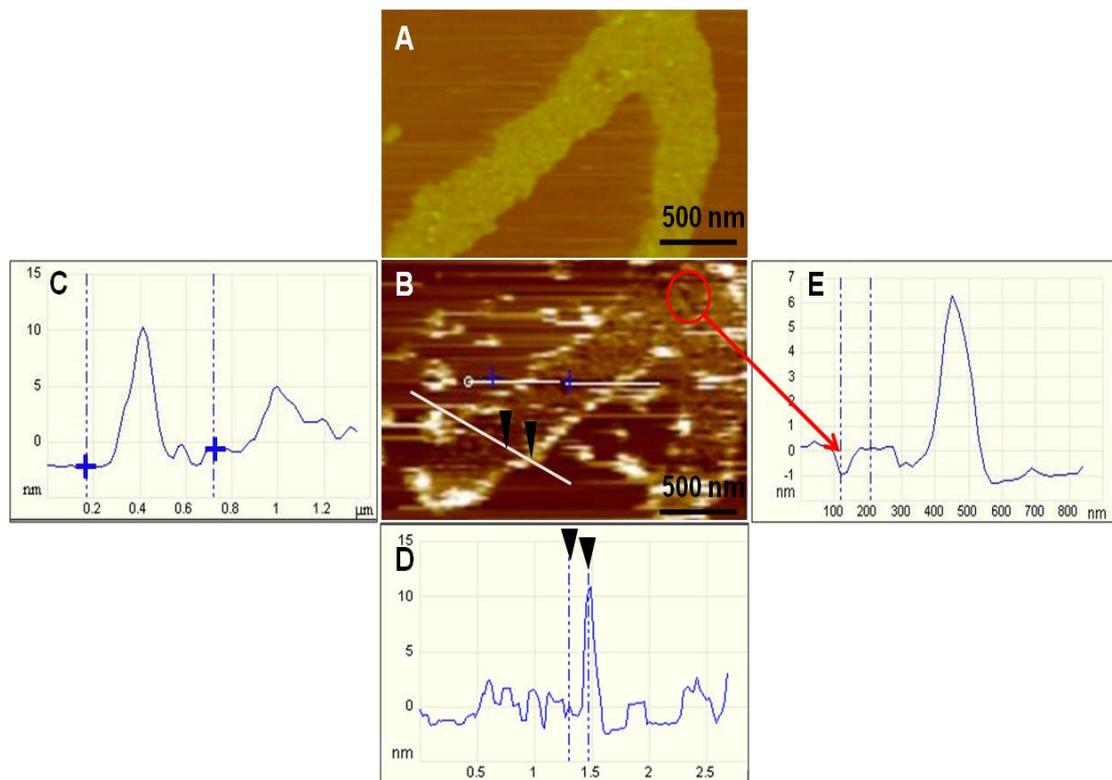


Figura 3.3.10. Inserción de HlyA en los bordes de los dominios *Lo* en bicapas soportadas de DOPC/16:0SM/Col 2:1:1. Imagen ampliada del recuadro de Figura 3.3.9.A. Esta zona muestra dominios *Lo* y *Ld* de la bicapa antes del agregado de HlyA (A) y luego del agregado de HlyA (B). (C) Diferencia de altura entre dominios *Ld* y *Lo*, indicados por las cruces azules. (D) Diferencia de altura en el borde del dominio *Lo*, una vez que se inserta la toxina, indicado por las flechas negras. (E) Perfil de altura de la sección transversal de un defecto indicado por el círculo rojo en (B).

La zona de los bordes de los dominios *Lo* adquiere una mayor altura respecto del resto de la bicapa, hecho que puede atribuirse a la unión/inserción de la toxina en esta zona de bordes que se evidencia por la aparición de elementos que se observan más brillantes en esta región de la imagen. El análisis del perfil de alturas de una sección transversal permitió estimar la diferencia de altura entre la superficie de la bicapa y el extremo de la proteína, dando un valor de 10 ± 0.7 nm (Figura 3.3.10.D). No se observó unión de la toxina a la fase *Lo*, sin embargo, se observó la aparición de defectos dentro de estos dominios que podrían deberse a un rearrreglo de lípidos como consecuencia de la interacción de la toxina con la bicapa (ésto podría indicar también que el aumento del valor gris medio de la fase *Lo* en monocapas se debe a un rearrreglo de lípidos y no a la inserción de toxina en esta fase). Estos defectos se observan como zonas más oscuras dentro de los dominios *Lo* (uno de estos defectos se señala con un círculo en Figura 3.3.10.B). El análisis del perfil de alturas a lo largo de estos defectos permitió estimar una diferencia de altura de aproximadamente 1 nm entre la base de la depresión y la superficie del dominio *Lo* (Figura 3.3.10.E). Independientemente de la unión de la toxina a la bicapa y de los rearrreglos lipídicos que pudieron ocurrir como consecuencia de ello, se vio que la diferencia de alturas entre los dominios *Lo* y la fase *Ld* se mantuvo y continuó siendo de aproximadamente 1 nm luego del agregado de toxina (Figura 3.3.10.C).

Interacción de HlyA con bicapas de DOPC/24:1SM/Col

Las imágenes obtenidas mediante AFM mostraron una única fase presente en bicapas de DOPC/24:1SM/Col 2:1:1 antes del agregado de toxina, como se puede observar en la Figura 3.3.11.

Con el agregado de HlyA se observó unión/inserción de la toxina en toda la bicapa de manera homogénea, sin producirse ningún efecto de segregación de fases, al igual que lo observado en monocapas de la misma composición. Se pudo estimar que en esta mezcla ternaria la toxina protruye 7.0 ± 0.7 nm de la superficie de la bicapa, una altura algo menor que lo observado para la mezcla DOPC/16:0SM/Col, lo que podría indicar que la toxina presenta distinto grado de inserción o que adopta distintas conformaciones en las dos bicapas estudiadas.

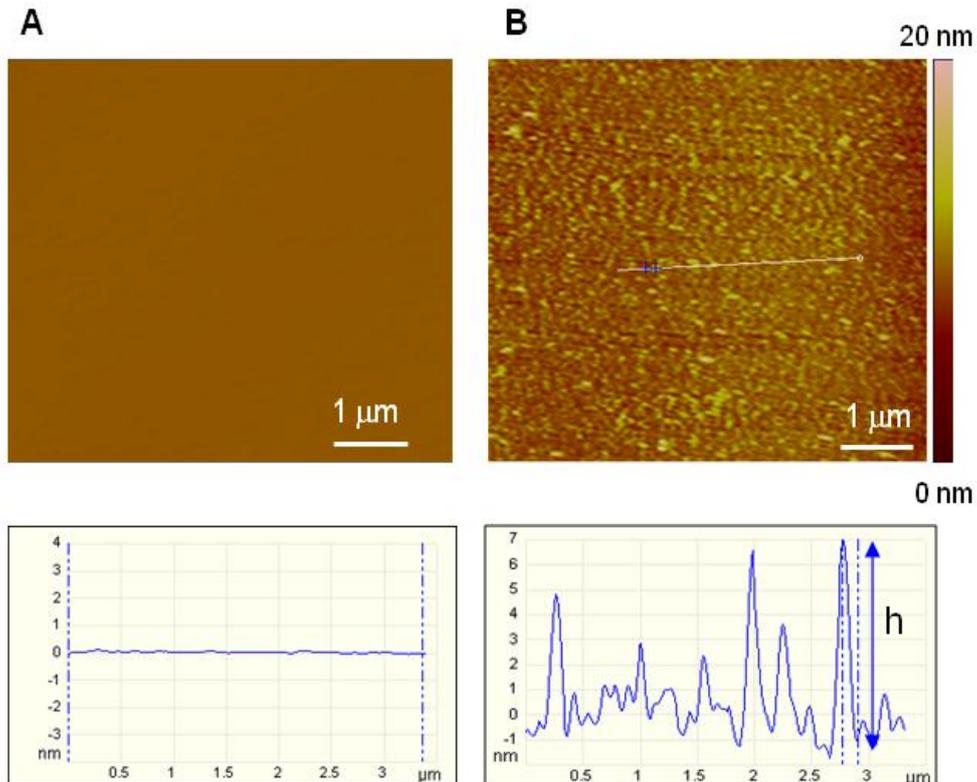


Figura 3.3.11. Efecto del agregado de HlyA a bicapas de DOP/24:1SM/Col (2:1:1). Imágenes de AFM obtenidas de bicapas de DOPC/24:1SM/Col 2:1:1 soportadas sobre mica antes del agregado de HlyA (A) y después de 45 min de interacción con la toxina (B). Los perfiles de altura de secciones transversales se muestran debajo de cada imagen.

Como control de esta experiencia, para comprobar que se estaba registrando la interacción con la bicapa y no simplemente con la mica, se analizó la interacción de HlyA con la superficie limpia de mica en ausencia de lípidos. Para esto se trató la mica con 3 mM de CaCl_2 al igual que se hizo en el procedimiento para la obtención de bicapas y luego se colocó en la celda donde se agregó 1.8 μM de HlyA en Buffer TC 3 mM CaCl_2 . Se tomaron imágenes antes y 15 min después del agregado de toxina.

En la imagen 3.3.12.A se puede observar el aspecto de la superficie limpia de mica, una imagen ligeramente distinta a la que se observa cuando está presente la bicapa de DOPC/24:1SM/Col 2:1:1 (Figura 3.3.11.A) que presenta un aspecto más homogéneo. En la Figura 3.3.12.B se puede apreciar que luego de 15 min de barrido de la superficie en presencia de HlyA se obtienen estructuras de características fibrilares que no se observan cuando HlyA interacciona con la bicapa de DOPC/24:1SM/Col 2:1:1. Esto se debe a la escasa interacción que presenta HlyA con la mica que hace que sea arrastrada por la punta a lo largo del escaneo, generando este efecto.

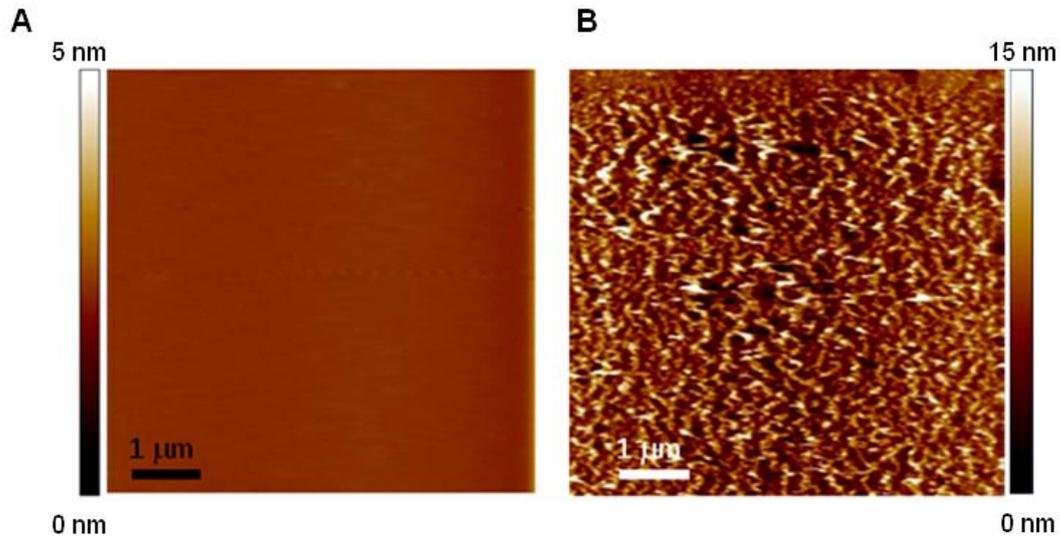


Figura 3.3.12. Efecto del agregado de HlyA a superficies de mica en ausencia de bicapa. (A) Imagen de la superficie de mica pretratada con 3 mM de CaCl_2 , en ausencia de bicapa. (B) Misma región de la superficie de mica luego de 15 min de la interacción con $1.8 \mu\text{M}$ de HlyA.

Las imágenes obtenidas por AFM demuestran que la interacción de HlyA con aquellas mezclas que presentan segregación de fases se produce inicialmente en los bordes de los dominios *Lo*. Las diferencias de espesor de la membrana y los defectos de empaquetamiento de los lípidos que surgen en esta zona de borde entre las fases *Lo* y *Ld* (Lehtonen et al., 1996) pueden servir como sitios iniciales de unión favoreciendo la interacción de la toxina con los lípidos de la membrana. Muchos ejemplos de proteínas que se unen a los bordes de dominios han sido reportados en la literatura incluyendo canales iónico (Alessandrini & Facci, 2011) (Cannon et al., 2003), péptidos antimicrobianos (Guo et al., 2011), N-Ras (Nicolini et al., 2006) (Weise et al., 2010), proteínas formadoras de poros como Equinotoxina-II (Schön et al., 2008) y proteínas proapoptóticas como Bax (García-Sáez et al., 2007). La diferencia de altura de las fases o *mismatch* hidrofóbico que existe en la zona de borde hace que la adsorción de moléculas que no tienen mucha afinidad por ninguna fase en particular sea energéticamente favorable en esta zona, ya que producirá una disminución del área de contacto entre las fases, reduciendo así la tensión lineal. Otro aspecto a tener en cuenta es que los lípidos en la interfase presentarán mayor desorden, ofreciendo menos resistencia a la inserción de la toxina. Se ha propuesto que la asociación con interfases podría constituir también una estrategia de concentración de las moléculas, incluso más eficiente que la asociación con microdominios, dado que confina a la toxina a un espacio lineal donde pueden ocurrir la oligomerización y formación de poro, como se reportó para Equinotoxina-II (Schön et al., 2008).

Sin embargo, más allá de su interacción inicial en la zona de los bordes de los dominios *Lo*, a tiempos más largos se evidencia una acumulación preferencial de HlyA en la fase *Ld*. La interacción con fase *Ld* se observa también en el caso de la mezcla DOPC/24:1SM/Col donde HlyA se inserta en forma homogénea en toda la superficie de la bicapa.

La baja resolución temporal del AFM, no permite seguir en mayor detalle la dinámica de la toxina una vez que interacciona con la membrana. Una posibilidad es que la toxina inicialmente se una a los bordes de los dominios *Lo* como se ha visto y luego difunda a la fase *Ld*, sin embargo esto es algo que no podemos determinar a partir de nuestros estudios. Si bien se sabe que en bicapas soportadas las proteínas pueden difundir, aunque con coeficientes de difusión más bajos que los que se observan en membranas no soportadas (Müller et al., 2003), el tiempo que transcurre entre la toma de imágenes consecutivas no hace posible la visualización de este fenómeno, si es que ocurre.

La partición de una proteína en una bicapa implica varios procesos: adsorción a la superficie, cambios conformacionales de la proteína, cambios en la estructura de la bicapa y finalmente la inserción de la proteína en la bicapa. La energía global del proceso tendrá por tanto distintas contribuciones, una de las cuales tendrá en cuenta el efecto de la bicapa en el proceso de partición (White & Wimley, 1999). La inserción de una proteína implica que tiene que producirse un aumento de la superficie de la bicapa para poder acomodar la proteína que se está incorporando, por lo que las propiedades elásticas de la bicapa serán de gran importancia a la hora de determinar el grado de partición de la proteína. El desorden de las cadenas, las fuerzas de cohesión entre las cadenas y el espesor contribuyen a las propiedades elásticas de una bicapa. Por lo tanto, la mayor elasticidad que presentan las fases *Ld* debería favorecer la partición preferencial en estas fases en lugar de las *Lo* (Almeida et al., 2005). Así, la asociación con fases *Ld* parece ser la regla, tanto para péptidos y proteínas hidrofóbicos que se insertan en la bicapa como para péptidos anfipáticos que interaccionan a nivel superficial y HlyA parece no ser la excepción.

Por el contrario, la alta energía de cohesión que existe en la fase *Lo*, rica en SM y Col, hará que sea energéticamente menos favorable la partición en esta fase. A pesar de esto, HlyA, al igual que otras proteínas, ha sido descrita como proteína asociada a microdominios de membrana, que presentan características *Lo*.

La técnica más utilizada para estudiar la asociación de una proteína a microdominios de membrana es la de purificación de *DRMs* con Tritón X-100. Resultados previos demostraron la presencia de HlyA en *DRMs* de eritrocitos. Por otro lado, también se detectó una inhibición de la oligomerización de la toxina y ausencia

de actividad lítica al extraer Col de la membrana. Todos estos resultados llevaron a postular que HlyA necesita interaccionar con microdominios de membrana para oligomerizar y formar el poro lítico (Herlax et al., 2009). Sin embargo, los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que la interacción de la toxina con bicapas que presentan coexistencia de fases *Lo-Ld* se da exclusivamente en la fase *Ld*, coincidiendo con los resultados obtenidos utilizando liposomas como sistema modelo de membrana (Bakas et al., 1996).

Al igual que lo encontrado para HlyA, muchas de las proteínas que han sido asociadas a *rafts* a partir de su presencia en *DRMs* han sido estudiadas en sistemas modelo de membrana (Vidal & McIntosh, 2005) (Bacia et al., 2004) (Fastenberg et al., 2003) (Nikolaus et al., 2010) (Janosch et al., 2004). De todas ellas ninguna mostró preferencia por la fase *Lo* y en cambio todas particionan preferencialmente en la fase *Ld*. Lo mismo se ha encontrado para péptidos anfipáticos que se asocian superficialmente a la membrana (McIntosh et al., 2003) (Pokorny & Almeida, 2005).

Los resultados presentados en este capítulo indican que HlyA sería excluida de los microdominios de membrana. Sin embargo, no se puede descartar que esto ocurra *in vivo*, teniendo en cuenta que los sistemas modelo de membrana distan mucho de reproducir la complejidad de la membrana plasmática. Por otro lado, la técnica de las *DRMs* constituye una técnica muy discutida como herramienta para determinar la asociación de una proteína a microdominios, ya que puede generar artefactos que indican que estas proteínas están asociadas a microdominios cuando realmente no lo están. En este sentido, se debe tener en cuenta que las fracciones *DRMs* que se aíslan de las células no se correlacionan directamente con los microdominios que pudieran existir en la membrana. Esto es claro si se considera que el aislamiento de fracciones *DRMs* con TritónX-100 requiere la extracción a bajas temperaturas (4°C). Si se tiene en cuenta que el comportamiento de fases es muy dependiente de la temperatura, resulta lógico que si los microdominios existen en la membrana celular, al disminuir la temperatura cambiará la composición de los mismos y distintas proteínas y lípidos podrían ser incorporados por lo que la composición de las *DRMs* no será reflejo de la composición que presentaban los microdominios en condiciones fisiológicas. Por otro lado, la disminución de la temperatura puede inducir una separación de fases y conducir a la formación de nuevos microdominios. También se ha encontrado que el TritónX-100 puede inducir la formación de dominios *Lo* en membranas modelo al modificar los contenidos de SM y Col en la fase *Ld* (Heerklotz, 2002). Por lo tanto, queda claro que difícilmente las *DRMs* reflejen la composición y organización de los lípidos y las proteínas en los microdominios de membrana (Lichtenberg et al., 2005).

Por lo tanto, la aparición de HlyA en las *DRMs* reportada anteriormente pudo haberse generado como un artefacto de la técnica o, si se tiene en cuenta que la proteína se une inicialmente a los bordes de los dominios, puede que quede incluida en las *DRMs* durante el proceso de solubilización.

Capítulo 4

Interacción de HlyA con lípidos de membrana

Capítulo 4: Interacción de HlyA con lípidos de membrana

1. Introducción

Las PFTs constituyen un grupo muy particular de proteínas ya que son secretadas como formas solubles en medio acuoso y tienen como blanco la membrana plasmática de distintos tipos celulares donde deben unirse e insertarse para ejercer su efecto lítico. Esto supone que las regiones hidrofóbicas de la proteína estarán inicialmente resguardadas del medio acuoso y una vez en contacto con la membrana deberán desplegarse para permitir la inserción de la toxina y posterior formación del poro, lo que implica grandes cambios conformacionales en el entorno de la membrana (Parker & Feil, 2005). La membrana se verá perturbada a lo largo del proceso y su participación no se limitará a ser un mero soporte para la proteína sino que los lípidos de membrana influirán en todo el proceso que lleva a la formación del poro así como a la modulación de su actividad (Escriba et al., 2008).

Los efectos que ejercen los lípidos sobre una proteína en membrana pueden ser divididos en dos grupos. Por un lado, desde el punto de vista de las propiedades biofísicas de la membrana, los lípidos modulan la fluidez, determinan la presencia de segregación de fases y formación de microdominios, y estas características afectan los procesos que ocurren en la membrana por lo que la composición lipídica afectará de manera indirecta la función de las proteínas (Janmey & Kinnunen, 2006). Por otro lado, los lípidos pueden tener un efecto directo sobre la estructura y función de las proteínas de membrana a través de interacciones específicas lípido-proteína (Escriba et al., 2007).

En este sentido, se ha descrito que numerosas PFTs que actúan sobre células de mamíferos presentan interacciones, con mayor o menor grado de especificidad, con los lípidos de la hemicapa externa de la membrana celular. Así, por ejemplo, las CDCs, constituyen una amplia familia de toxinas producidas por microorganismos Gram positivos que poseen en su estructura un sitio de unión a Col y requieren de su presencia en la membrana para ejercer su efecto lítico (Gilbert, 2010). Las toxinas CDT (de sus siglas en inglés *cytolethal distending toxin*), son una familia de toxinas producidas por diversos microorganismos Gram negativos como *Campylobacter jejuni* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Se ha reportado que estas toxinas interactúan específicamente con Col y esta interacción juega un rol

importante en la unión de las toxinas a la membrana (Lin et al., 2011) (Lai et al., 2013) (Boesze-Battaglia et al., 2009).

Diversas toxinas, en cambio, interaccionan con los fosfolípidos de la membrana, particularmente con SM. Así, α -toxina de *Staphylococcus aureus* interacciona con la porción fosfocolina de la SM en dominios enriquecidos en SM y Col, favoreciendo la oligomerización de la toxina (Valeva et al., 2006). Otras, como las actinoporinas Equinotoxina-II y Sticolisina-II que son producidas por las anémonas marinas *Actinia equina* y *Stichodactyla helianthus*, respectivamente, reconocen específicamente SM y la presencia de este fosfolípido en la membrana aumenta la unión y la actividad lítica de las toxinas (Bakrac et al., 2008). Lo mismo ocurre en el caso de Lisenina, una toxina formadora de poro producida por el gusano *Eisenia faetida* (De Colibus et al., 2012).

El mecanismo lítico de HlyA requiere que la toxina interaccione con los lípidos presentes en la membrana. De hecho, si se considera que el poro formado por la toxina es de naturaleza proteolípídica (Bakas et al., 2006), resulta claro que la composición de la membrana constituirá un factor determinante en el mecanismo de acción.

Resultados previos indican que el Col y la SM presentes en la hemicapa externa de la membrana celular podrían tener un papel relevante en el mecanismo de acción de HlyA. Experimentos de liberación del contenido de liposomas por acción de la toxina evidenciaron que si bien se produce la liberación del contenido de liposomas compuestos sólo de PC, este porcentaje aumenta cuando en la composición de los liposomas se incluye también SM y Col (Ostolaza et al., 1993). También se ha observado que luego de la extracción de Col de la membrana de glóbulos rojos, la actividad hemolítica disminuye como consecuencia de una disminución en el grado de oligomerización de la toxina, así como su asociación a DRMs (Herlax et al., 2009). Todos estos resultados han sido analizados en función de las modificaciones de las propiedades de membrana que estos lípidos, en particular el Col, pueden inducir; como cambios en la fluidez de la membrana y/o segregación de fases y formación de microdominios. Sin embargo, no se ha investigado hasta el momento, la posible existencia de interacciones específicas entre HlyA y los lípidos presentes en la membrana celular.

Los resultados del capítulo 3 indican que inicialmente HlyA interacciona con los bordes de los dominios *Lo* en aquellas membranas que presentan coexistencia de fases, luego la toxina se une preferencialmente a las membranas en fases *Ld*. En la zona de borde existen defectos de empaquetamiento y los lípidos están más expuestos al medio acuoso. De la misma manera, las fases *Ld* son más propensas a

presentar defectos transitorios que dejan al descubierto las zonas hidrofóbicas de los lípidos de membrana.

Teniendo en cuenta estas consideraciones el presente capítulo tiene como objeto estudiar la existencia de interacciones específicas de HlyA con los lípidos mayoritarios de la hemicapa externa de la membrana -PC, SM y Col-.

Capítulo 4: Interacción de HlyA con lípidos de membrana

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Los lípidos utilizados: DOPC, 16:0 SM, Col y PE de huevo fueron obtenidos en Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA).

La fosforilcolina (Pcol), glicoforina A, esfingomielinasa (SMasa) de *Bacillus cereus* y demás reactivos utilizados fueron obtenidos en Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)

Los anticuerpos de cabra anti- IgG de conejo y los de ratón anti- IgG de conejo fueron obtenidos en Pierce (IL, USA) y Abcam (CA, USA), respectivamente. Los anticuerpos policlonales de conejo anti-HlyA fueron obtenidos en el laboratorio siguiendo el protocolo descrito por Cortajarena *et. al.* (A. L. Cortajarena et al., 2001).

El péptido RFKKLGYDGDSL fue sintetizado, purificado y caracterizado en el Núcleo Biotecnológico de Curauma, de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. La síntesis se realizó siguiendo la técnica de síntesis en fase sólida (Guzmán et al., 2007). La purificación y análisis del péptido sintetizado se realizó mediante HPLC de fase reversa, basado en la hidrofobicidad diferencial de los residuos aminoacídicos, empleando gradientes de fase móvil con acetonitrilo. La masa molecular se determinó mediante espectrometría de masa y su estructura se analizó mediante dicroísmo circular.

2.2. Métodos

2.2.1. Cinética de inserción de HlyA en monocapas lipídicas

Se utilizó la técnica de monocapas descrita en la sección *Materiales y métodos* del capítulo 3, para estudiar el proceso de inserción de la toxina. Para las medidas de presión superficial se utilizó una balanza de Langmuir NIMA Modelo 102M (KSV-NIMA, Biolin Scientific, Finlandia), provista de una placa Wilhelmy de platino como sensor de presión superficial.

Las monocapas se formaron agregando pequeñas cantidades de la mezcla lipídica a ensayar (DOPC o DOPC/16:0SM/Col 2:1:1), disuelta en cloroformo:metanol 2:1 (v/v), sobre la superficie de la subfase acuosa, constituida por 200 ml de Buffer TC 10 mM CaCl₂ pH 7.4 hasta alcanzar la presión inicial (π_0) de 20 mN/m. Luego de esperar 5 minutos para garantizar la evaporación del solvente y la estabilización de la π_0 , se inyectó la toxina en la subfase (120 nM final) y se registró el aumento de la π en función del tiempo hasta alcanzar una señal estable. Las mediciones se realizaron a 25 °C con agitación constante. El proceso de inserción de la proteína en las distintas monocapas lipídicas se caracterizó a través del incremento máximo de la presión superficial ($\Delta\pi$) (Brockman, 1999).

Para caracterizar la cinética de inserción de la toxina en las monocapas, las curvas de π vs tiempo se ajustaron, según la ecuación:

$$\pi - \pi_0 = (\pi_\infty - \pi_0)(1 - e^{-bt}) \text{ Ecuación 4.2.1}$$

Donde π es la presión superficial de la monocapa al tiempo t , π_0 la presión superficial inicial antes de inyectar la toxina en la subfase, y π_∞ la presión superficial máxima alcanzada una vez estabilizada la señal. El parámetro b se corresponde con la constante de velocidad de inserción de la toxina en la monocapa de lípidos.

2.2.2. Ensayos de inhibición de la lisis de glóbulos rojos de carnero

HlyA se preincubó en microplacas de hemólisis con concentraciones crecientes de Col o fosforilcolina (Pcol) en un volumen total de 100 μ l de Buffer TC 10 mM CaCl₂ pH 7.4 por 30 minutos a 22°C.

Posteriormente se adicionaron 100 μ l de una suspensión estandarizada de glóbulos rojos de carnero a cada pocillo y se incubó a 37°C por 30 minutos con agitación continua. Finalmente el porcentaje de hemólisis en cada pocillo se determinó siguiendo el protocolo descrito en el capítulo *Materiales y métodos generales*.

Los *stocks* de Col para estos ensayos se prepararon en etanol absoluto procurando que la concentración final máxima de etanol a utilizar en las medidas fuera siempre menor al 2% (v/v). Se realizaron controles para comprobar que las cantidades de etanol utilizadas en los ensayos no afectaran la actividad de la toxina ni la integridad de los glóbulos rojos. Para realizar los controles de actividad de toxina, se incubó la toxina con diluciones seriadas a partir del mismo volumen de etanol que el

utilizado en los ensayos de inhibición con Col, así en cada pocillo la concentración de etanol fue equivalente a la utilizada en los ensayos en presencia de Col. Luego se agregaron 100 μ l de la suspensión estandarizada de glóbulos rojos de carnero a cada pocillo, y se midió la actividad hemolítica como fue descrito previamente para los ensayos de inhibición. De la misma forma, para controlar que el etanol o el Col disuelto en etanol no produjera hemólisis de los glóbulos rojos, se hicieron diluciones seriadas de etanol o del *stock* de Col en etanol en Buffer TC 10 mM CaCl₂ pH 7.4 partiendo de las mismas cantidades utilizadas en los ensayos de inhibición y se procedió luego de igual manera que con las muestras.

Las concentraciones de Col utilizadas en los ensayos se mantuvieron siempre por debajo del límite de solubilidad reportado para el Col en soluciones acuosas (4.7 μ M) para evitar artefactos debido a la aparición de cristales de Col (Haberland & Reynolds, 1973).

Se definió la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) como la concentración de Col que produjo 50% de inhibición de la hemólisis en las condiciones del ensayo y se calculó ajustando los datos a una función logística de 4 parámetros mediante el programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc; CA, USA).

2.2.3. Tratamiento de glóbulos rojos con SMasa

Se trataron glóbulos rojos de carnero con 0.7 unidades/ml de SMasa de *Bacillus cereus* por una hora a 37°C (Kwiatkowska et al., 2007). Transcurrido este tiempo, se lavaron los glóbulos rojos con Buffer TC, centrifugando la muestra a 1500xg. Finalmente los glóbulos rojos se resuspendieron en Buffer TC.

La cuantificación del contenido de SM en la membrana de los glóbulos rojos control y tratados con SMasa se realizó por cromatografía en capa fina (TLC). Previamente se obtuvieron fantasmas de los glóbulos rojos control y tratados con la enzima. Para esto, se lavaron 5 ml de glóbulos rojos con Buffer TC y se resuspendieron en Buffer lisis (Tris.HCl 10 mM, pH 7.4) a 4°C por 30 minutos. Las membranas fueron obtenidas por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se realizaron lavados sucesivos hasta obtener un sobrenadante claro, libre de hemoglobina. El pellet de membranas se resuspendió en 1 ml de Buffer TC. Se extrajeron los lípidos totales de membrana de los fantasmas de glóbulos rojos utilizando el método de Folch (Folch et al., 1957). Se cuantificaron los lípidos totales por el método de pesada constante en microbalanza. Luego se separaron los lípidos polares por TLC utilizando placas de alta performance (HPTLC) (Whatman, GE

Healthcare, Fairfield, CT, USA) utilizando como solvente de desarrollo la mezcla cloroformo/metanol/agua 25:10:1 (v/v). La placa se reveló con 5% (v/v) de ácido sulfúrico en etanol y posterior calentamiento de la placa a 120°C. La identificación de las bandas se realizó por comparación de los Rf (factor de relación de frente) de las bandas correspondientes a los distintos lípidos con los Rf correspondientes a estándares comerciales de SM, PE y Col sembrados en la misma placa.

Para calcular el porcentaje de disminución del contenido de SM en los glóbulos rojos tratados con SMasa, se midieron las DO de las bandas correspondientes a SM y PE utilizando el software ImageJ (*Research Services Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA*). Para poder realizar la comparación entre el contenido de SM de los glóbulos rojos tratados y sin tratar y que el análisis no se vea afectado por pequeñas diferencias en la cantidad de lípidos totales sembrados, se calculó el contenido de SM en relación al contenido de PE (lípidos que no varía durante el tratamiento con SMasa).

2.2.4. Ensayos de hemólisis con glóbulos rojos tratados con SMasa

Se determinó el grado de hemólisis en glóbulos rojos de carnero control y tratados con SMasa de *B. cereus*. Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 2 *Materiales y métodos generales* para los ensayos de actividad hemolítica.

2.2.5. Ensayos de Dot-Blot de lípidos

El *Dot-Blot* de lípidos permite evaluar la interacción entre proteínas y distintos lípidos que se depositan sobre una membrana; es una técnica simple que permite un rápido *screening* de posibles ligandos lipídicos de una proteína.

Para realizar estos ensayos se depositaron cantidades crecientes de Col, PC o SM (todos en un volumen final de 1 µl) en la superficie de membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare) a partir de *stocks* preparados en cloroformo. Se dejaron las membranas a temperatura ambiente por 1 h para asegurar la evaporación total del solvente. Las membranas luego se bloquearon por 2 h con 3% (p/v) de leche descremada en Buffer 10 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4 (Buffer TBS). Luego se incubaron con 30 nM de HlyA en una suspensión de leche en TBS adicionada de 10 mM CaCl₂, necesario para asegurar que la toxina se encuentre activa, a temperatura

ambiente con agitación continua durante 3 h. Se realizaron 5 lavados de 5 min cada uno con Buffer TBS para eliminar la toxina no unida y luego se incubaron las membranas con anticuerpos policlonales anti-HlyA (1:500) en leche 3% (p/v) en Buffer TBS por 2 h. Las membranas se lavaron como fue descrito anteriormente y se incubaron con anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano (1:1000) por 2 h. Finalmente, las membranas se lavaron con Buffer TBS y los *dot-blots* fueron revelados por quimioluminiscencia.

Con el fin de descartar una unión inespecífica de los anticuerpos a los lípidos depositados en la membrana, se realizó el mismo procedimiento incubando las membranas en ausencia de toxina.

2.2.6. Medidas empleando Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)

La resonancia de plasmones superficiales (SPR, de sus siglas en inglés *Surface Plasmon Resonance*) constituye una valiosa herramienta para el estudio de interacciones entre macromoléculas. Permite la determinación de forma rápida y directa de las velocidades de asociación y disociación en procesos de unión, ya sea proteína-proteína, proteína-lípido, proteína-ligando, etc, sin la necesidad del marcado con sondas específicas, y presenta una alta sensibilidad de detección, lo que permite trabajar con bajas concentraciones de muestra (en el rango nM).

Las interacciones entre las macromoléculas se estudian en la superficie de un chip. Estos son dispositivos de vidrio cubiertos de una fina película de oro, donde se produce la resonancia de plasmones superficiales, fenómeno que ocurre en condiciones de reflexión interna total en la superficie de películas delgadas de ciertos metales. Si se hace incidir un haz de luz polarizada a través de un medio de alto índice de refracción, usualmente un prisma, sobre la superficie de una lámina de oro en contacto con un medio de menor índice refracción, por encima de un cierto ángulo crítico, habrá reflexión interna total y la luz será completamente reflejada. Si se hace incidir luz con un ángulo ligeramente mayor, a un ángulo específico (el ángulo de SPR), ocurrirá resonancia entre la onda evanescente de la luz incidente y la onda asociada a los plasmones superficiales de la lámina de oro; este fenómeno de resonancia de plasmones superficiales absorbe parte de la luz, lo que se observa como una disminución en la intensidad de luz reflejada. La frecuencia a la que entrarán en resonancia los plasmones depende del índice de refracción del medio en contacto con la lámina metálica, en un espesor de unos cientos de nanómetros, por lo que el ángulo de la luz incidente al cual se produce la resonancia con los plasmones

también dependerá del índice de refracción del medio. Cuando las moléculas se unen a la superficie de la lámina de oro se produce un aumento de índice de refracción y por lo tanto cambiará el ángulo al cual se observa el mínimo de reflexión (Figura 4.2.1.A y B). Esto es detectado por el equipo y traducido a unidades de resonancia o respuesta (RU) y así se obtienen los gráficos de RU en función del tiempo o *sensorgramas* (Figura 4.2.1.C). Esto permite medir la unión de analitos en tiempo real y calcular su velocidad de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) así como determinar constantes de afinidad K_D , ya sea a partir de los datos cinéticos o en estado estacionario (Ritzefeld & Sewald, 2012).

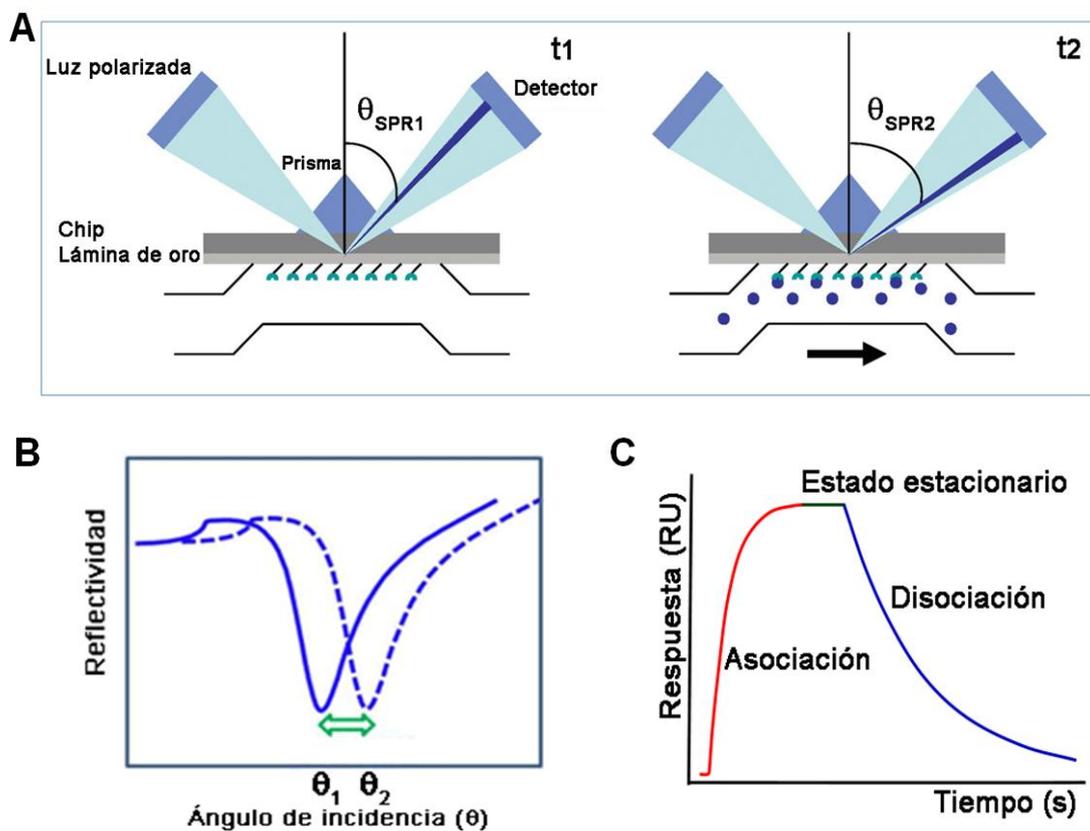


Figura 4.2.1. Resonancia de plasmones de superficie. (A) Esquema que muestra el principio en el que se basan las mediciones mediante SPR. Se hace incidir un haz de luz polarizada a través de un prisma en condiciones de reflexión interna total. La intensidad de la luz reflejada es captada por un detector. A determinado ángulo, θ_{SPR} , se produce el fenómeno de resonancia de los plasmones superficiales de la lámina de oro, esto absorbe energía y se observa una disminución en la intensidad de luz reflejada. Al unirse un analito a la superficie del chip, aumenta el índice de refracción del medio y por tanto la frecuencia a la que se produce el fenómeno de resonancia, por lo que el θ_{SPR} cambia. (B) El equipo mide la intensidad de luz reflejada y permite detectar los cambios en el θ_{SPR} lo que luego traduce en unidades de respuesta (RU). (C) Sensorgrama que se obtiene al graficar la respuesta obtenida en función del tiempo. Adaptado de Madeira et al., 2009.

Para realizar las medidas de interacción entre dos sustancias, una de ellas, el *ligando*, se fija a la superficie del chip mientras que la otra, el *analito*, se hace fluir sobre la superficie. Si ocurre interacción entre el ligando y el analito, cambiará el índice de refracción en la superficie del chip y esto se ve como un aumento de la señal. El sistema Biacore utiliza unidades de resonancia (que equivalen a un cambio de ángulo de 10^{-4} grados) para describir el aumento de la señal. Existe una relación lineal entre la cantidad de sustancia unida a la superficie del chip y las RU, $1RU = 1 \text{ pg/mm}^2$ (Stenberg et al., 1991).

Muchos chips presentan una capa de dextranos sobre la superficie de la lámina de oro lo que permite funcionalizar la superficie para unir covalentemente distintos ligandos. El chip CM5, por ejemplo, se halla carboximetilado y esto permite unir a su superficie distintos ligandos a través de sus grupos aminos, tioles, aldehídos o carboxilos. Al mismo tiempo la capa de dextranos confiere una mayor flexibilidad de movimiento a los ligandos unidos por lo que tendrán un comportamiento más similar al que presentan en solución (Besenicar et al., 2006).

2.2.6.1. Medidas de la interacción HlyA-lípidos mediante SPR

Las medidas de SPR se realizaron empleando un equipo Biacore T100 (GE, Piscataway, NY, USA). HlyA fue previamente dializada contra Buffer Ac/AcH pH 4 y posteriormente inmovilizada sobre la superficie de un chip CM5 previamente activada con una mezcla de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) (Fernandez et al., 2006) (Johnsson et al., 1991) (Fernandez et al., 2007). La toxina se inmovilizó hasta alcanzar 450 RU y posteriormente, el resto de los sitios en la superficie del chip fueron bloqueados con 1M etanolamina.

Los analitos usados en los ensayos fueron liposomas de DOPC y DOPC/Col en relación molar 4:1 para las medidas de interacción de HlyA con los distintos lípidos o glicoforina, glicoproteína que ha sido descrita como posible receptor de HlyA y que fue utilizada como control de los ensayos. Todos los analitos fueron preparados en Buffer TC 10 mM CaCl_2 , pH 7.4; que se utilizó como Buffer de corrida en los ensayos. Diluciones seriadas de estos analitos se aplicaron sobre HlyA inmovilizada sobre el chip. Luego de cada ciclo, la superficie fue regenerada por pasaje de Buffer Glicina-HCl 10 mM pH 3 hasta alcanzar nuevamente la línea base.

Todos los ensayos se realizaron a 25°C y se repitieron al menos tres veces.

El análisis de los datos se realizó empleando el programa BIAevaluation 3.2 (BIAcore). Los datos se ajustaron a un modelo cinético de unión 1:1 y, en aquellos

casos en los cuales los parámetros cinéticos cayeron fuera de los límites de detección del equipo, se determinó la constante de disociación (K_D) del sistema en condiciones de equilibrio.

2.2.7. Ensayos de liberación del contenido de liposomas

Se midió la liberación del contenido de liposomas cargados con ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico/ Bromuro de N,N'-p-xilen-bispiridinio (ANTS/DPX). En este par de reactivos, el DPX actúa como *quencher* apagando la fluorescencia del ANTS. Al estar encapsulados ambos reactivos en el interior del liposoma, inicialmente la fluorescencia del ANTS estará apagada por el DPX. El DPX es un *quencher* colisional por lo que al producirse la disrupción de la membrana del liposoma y liberarse su contenido, se producirá una dilución de la solución, lo que llevará a un aumento en la fluorescencia del ANTS.

Para los ensayos de liberación del contenido de vesículas se prepararon MLVs de distinta composición lipídica conteniendo 12.5 mM ANTS, 45 mM DPX, 20 mM Tris-HCl, 70 mM NaCl, pH 7.4 mediante 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento, favoreciendo así la incorporación de las sondas. Las MLVs obtenidas fueron convertidas en LUVs por pasaje a través de membranas de policarbonato de tamaño de poro 0.1 μm . El ANTS/DPX no incorporado fue separado de los liposomas cargados por cromatografía de exclusión molecular, utilizando columnas Sephadex G-75 (Sigma) y Buffer TC como buffer de elución.

La concentración final de lípidos de los LUVs, luego del pasaje por columna, fue determinado a través de medidas del contenido de fosfolípidos por el método colorimétrico de Fósforo (Chen et al., 1956) y posterior corrección teniendo en cuenta la composición de lípidos totales de cada muestra (relación fosfolípidos:Col). Los ensayos se realizaron con LUVs de DOPC, o mezclas binarias DOPC/Col en relación molar 2:1, 4:1 y 9:1.

Los ensayos se realizaron en microplacas, para lo cual se realizaron diluciones seriadas de HlyA en Buffer TC 10 mM CaCl_2 pH 7.4 en un volumen final de 100 μl . En cada pocillo se agregaron 100 μl de LUVs 200 μM en Buffer TC. El ensayo de liberación consistió en medir el aumento de la fluorescencia del ANTS durante 20 minutos a 37°C, incubando en lector de placas *Multimode Detector* DTX 880 (Beckman Coulter). La longitud de onda de excitación fue 355 nm y se midió la intensidad de emisión de fluorescencia a 525 nm.

Como control de liberación espontánea del contenido de liposomas, se midió la fluorescencia a muestras preparadas de la misma manera pero sin la adición de toxina.

Luego de los 20 minutos, la intensidad correspondiente al 100% de liberación se determinó para cada pocillo mediante la adición de 10 μ l de Tritón X-100 10% (v/v) (0.25% final).

El porcentaje de liberación se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\%L = 100 (F_p - F_0) / (F_{100} - F_0) \text{ Ecuación 4.2.2}$$

Donde F_p es la intensidad de fluorescencia final luego de la adición de toxina (20 min), y F_0 y F_{100} , las intensidades de fluorescencia antes del agregado de proteína y luego del agregado de Tritón X-100 respectivamente, este último valor previamente se corrigió por efecto de dilución por el agregado del Tritón.

2.2.8. Medidas de conductancia en bicapas lipídicas planas en presencia de HlyA

2.2.8.1. Técnica de bicapas lipídicas planas

La técnica de bicapas lipídicas planas (BLM, de sus siglas en inglés *Black lipid membranes*) permite el estudio de la apertura de canales únicos en membrana en tiempo real. La técnica se basa en el registro de corrientes iónicas que se producen a través de un canal incorporado en una bicapa lipídica estable de composición controlada. Típicamente la bicapa se forma en un pequeño orificio (de 100 μ m de diámetro aproximadamente) que se encuentra en un *septum* fino de teflon que separa dos cámaras o compartimentos. En ellos se coloca una solución iónica y se conectan ambos a un sistema electrónico mediante dos electrodos de Ag/AgCl lo que permite la aplicación de un potencial eléctrico estable y el registro de la corriente iónica que atraviesa la membrana. Si se agrega una proteína formadora de poro en uno de los compartimentos, esta puede insertarse en la bicapa, oligomerizar y formar poros. Típicamente, cada poro es detectado en tiempo real como un aumento abrupto en la corriente. La inserción de poros sucesivos produce aumentos de corriente en forma de escalones que son característicos de la formación de poros proteicos (Figura 4.2.2). BLM constituye una técnica de canal único dado que cada salto en la corriente se corresponde con la apertura de un poro activo.

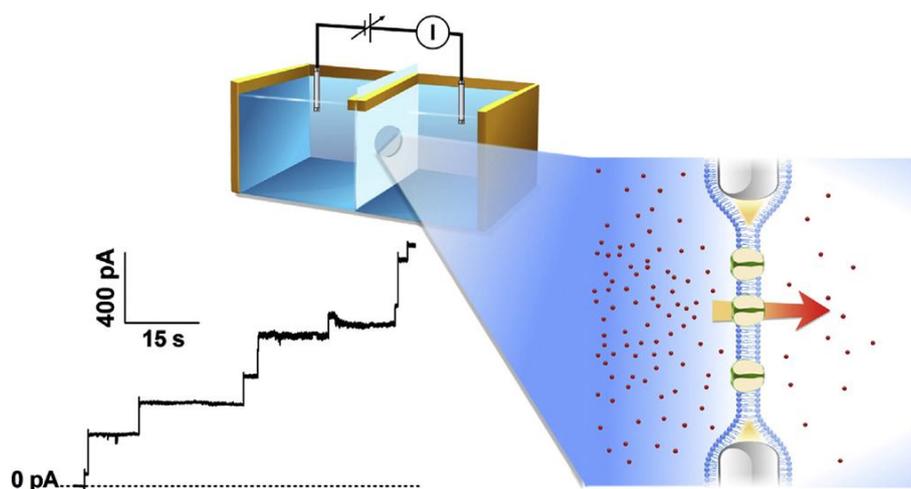


Figura 4.2.2. Esquema del arreglo utilizado en un ensayo de BLM. Se pueden observar los dos compartimentos separados por un septum donde se encuentra el orificio donde se forma la bicapa de composición lipídica conocida. Un electrodo de Ag/AgCl se coloca en cada compartimento, uno en el *cis* donde se agrega la toxina y otro en el *trans*, de manera de poder aplicar el voltaje deseado y poder medir la corriente generada. La formación de poros en la bicapa, permitirá el pasaje de iones y se producirá una corriente iónica a través de la bicapa que se registrará como un aumento en la corriente. Adaptado de Marchioretto et al., 2013.

2.2.8.2. Obtención de bicapas lipídicas planas

Se utilizaron soluciones *stock* de los lípidos disueltos en cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y almacenados a -20°C . Las mezclas binarias fueron preparadas inmediatamente previo a su uso. Se colocó la cantidad de lípidos necesaria en un tubo, se evaporó el solvente en corriente de nitrógeno y posteriormente se dejó en vacío durante 2 h. Los lípidos utilizados, DOPC o mezclas binarias DOPC/Col en relación molar 2:1, fueron luego resuspendidos en n-decano hasta alcanzar una concentración final de lípidos totales de 25 mg/ml.

Las BLMs compuestas de DOPC o DOPC/Col 2:1 se prepararon por la técnica de Mueller-Rudin (Mueller et al., 1962). Utilizando un capilar sellado en un extremo, se pintó con la solución de lípidos sobre un orificio circular de $150\ \mu\text{m}$ de diámetro ubicado en una cubeta de poliestireno de una cámara para bicapas modelo BCH-13A (Warner Instruments Inc., Hamden, CT). La cubeta se colocó en un soporte de cloruro de polivinilo definiendo así una pared y dos compartimentos acuosos separados por la bicapa. Previo a la formación de la bicapa, con el fin de facilitar su formación, el orificio se cubrió con una pequeña cantidad de los lípidos a ensayar del lado *cis* de la pared de la cubeta y se dejó secar antes del agregado del buffer.

En ambos compartimentos, *cis* y *trans*, se agregó de manera simétrica 1 ml de Buffer 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , pH 7.4 como solución electrolítica.

Las conexiones eléctricas se realizaron a través de puentes salinos de 2% (p/v) (agar en 200 mM NaCl) conectando cada compartimento con un reservorio externo conteniendo el mismo buffer y donde se colocaron los electrodos de Ag/AgCl cerrando el circuito eléctrico. Para evitar vibraciones mecánicas e interferencias por campos eléctricos externos durante las medidas, la cámara con los electrodos de Ag/AgCl en el compartimento *cis* y *trans* se colocó en una jaula de Faraday en un soporte mecánicamente aislado.

2.2.8.3. Registros de corriente

Las mediciones eléctricas se realizaron utilizando un amplificador BC-525D (Warner Instruments, Inc., Hamden, CT), con un resistor de retroalimentación de 10 G Ω . Las ganancias utilizadas variaron entre 1 a 10 mV/pA según el experimento. Las señales de corriente de salida analógicas fueron filtradas a 10 kHz (-3 dB) aplicando un filtro tipo Bessel y digitalizada mediante un convertidor analógico-digital (Interfase de adquisición de datos InstruTECH ITC-18, HEKA Instruments, Inc.). Las corrientes fueron adquiridas utilizando el programa PATCHMASTER (HEKA Instruments, Inc.). Los datos fueron analizados utilizando el programa ClampFit 9.2 (Axon Instruments, Inc.). Los datos fueron tratados aplicando previamente un filtro de 100 Hz de tipo Gaussiano. Las corrientes obtenidas fueron corregidas por los valores de filtro de salida y ganancia utilizados y a partir de estos datos se calculó la conductancia como $G(\text{nS}) = i(\text{pA})/V(\text{mV})$.

Se realizaron registros utilizando bicapas de DOPC y de la mezcla DOPC/Col 2:1 en ausencia de toxina como control de estabilidad de las bicapas. Para los ensayos en presencia de toxina se agregó HlyA en el compartimento *cis* hasta alcanzar una concentración de 10 nM y se comenzó con el registro de corriente.

Todos los experimentos se realizaron a 23°C al menos 5 veces para cada composición lipídica ensayada y cada potencial aplicado.

Para la obtención de los histogramas, se analizó la amplitud de la corriente correspondiente a cada salto en los registros *i* vs *t* (correspondientes a la apertura de un poro), considerando sólo aquellos saltos de corriente de más de 0.1 s de duración. Se graficó la frecuencia de aparición de saltos de una determinada conductancia, considerando el total de registros obtenidos en esas condiciones.

2.2.9. Búsqueda de sitios CRAC/CARC (Cholesterol recognition/interaction aminoacid consensus region) en la secuencia de HlyA

El análisis estructural de muchas proteínas que interaccionan con Col como el receptor de benzodiazepina y otros receptores acoplados a proteínas G (Li & Papadopoulos, 1998) (Jafurulla et al., 2011), ha permitido identificar una secuencia consenso implicada en esta interacción, de la forma L/V-(X₁₋₅)-Y-(X₁₋₅)-R/K constituido por una leucina (L) o valina (V), una tirosina (Y), y una arginina (R) o lisina (K), separadas por regiones variables que comprenden de 1 a 5 aminoácidos. Este motivo se ha denominado CRAC (de sus siglas en inglés *cholesterol recognition/interaction aminoacid consensus region*).

Recientemente se ha identificado un sitio de unión a Col análogo a los sitios CRAC pero que presentan exactamente la orientación contraria en cuanto a la disposición de sus aminoácidos. Estos motivos se han denominado CARC, precisamente por esa característica y están constituidos por la secuencia consenso K/R-(X₁₋₅)-Y/F-(X₁₋₅)-L/V, que admite ya sea un residuo de Y o de fenilalanina (F) como aminoácido central (Baier et al., 2011).

La búsqueda de los motivos de unión a Col mencionados se realizó mediante el uso del servidor ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>) (Sigrist et al., 2002).

2.2.10. Alineamiento de secuencias

Los alineamientos de secuencia entre las distintas toxinas RTX se realizó mediante el uso del servidor CLUSTALW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) (Larkin et al., 2007).

Las secuencias de las distintas toxinas se obtuvieron del banco de datos de proteínas PDB (de sus siglas en inglés *Protein Data Bank*). Los números de acceso de las secuencias utilizadas para cada toxina se detallan en la tabla 4.2.1.

Toxina	Bacteria	Nº Acceso PDB
HlyA	<i>Escherichia coli</i>	P09983
EhxA	<i>Escherichia coli enterohemorrágica</i>	A8QWG3
LtxA	<i>Aggregatibacter actynomicetemcomitans</i>	P16462
CyaA	<i>Bordetella pertussis</i>	P15318
ApxIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	P55128
ApxIIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	P15377
ApxIIIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	P55131
LktA	<i>Mannheimia haemolytica</i>	P16535
PaxA	<i>Pasteurella aerogenes</i>	Q9RCG8
AqxA	<i>Actinobacillus equuli</i>	Q8KWZ6
MbxA	<i>Moraxella bovis</i>	Q93GI2
RtxA	<i>Kingella kingae</i>	A1YKW7

Tabla 4.2.1. Número de acceso utilizado para la obtención de las secuencias de las proteínas a partir del banco de datos de proteínas PDB. Estas secuencias fueron utilizadas para hacer la búsqueda de dominios y los alineamientos de secuencias.

2.2.11. Predicción de estructura secundaria

La predicción de estructura secundaria se realizó mediante el uso del servidor JPred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) (Cole et al., 2008).

Capítulo 4: Interacción de HlyA con lípidos de membrana

3. Resultados y discusión

3.1. Inserción de HlyA en monocapas

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Capítulo 3 que indican que HlyA interacciona preferencialmente con fases *L_d*, se midió la inserción de HlyA en monocapas compuestas de DOPC y monocapas compuestas por la mezcla DOPC/16:0SM/Col en relación molar 2:1:1 que fue caracterizada en el capítulo anterior y que presenta coexistencia de fases *L_o-L_d* en el rango de 10-25 mN/m.

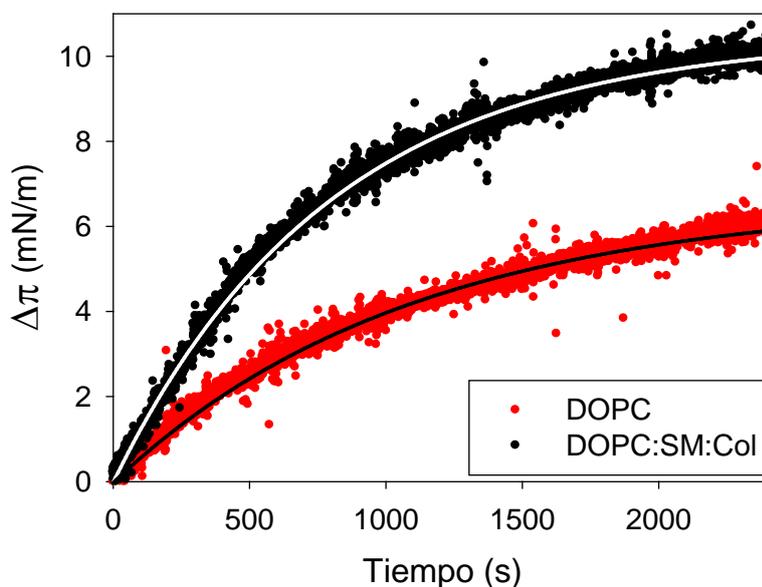


Figura 4.3.1 Cinética de inserción de HlyA en monocapas lipídicas. Los ensayos se realizaron a una presión superficial inicial de 20 mN/m. La subfase estuvo compuesta de Buffer TC, 10 mM CaCl_2 , pH 7.4. La concentración inicial de HlyA en la subfase fue de 120 nM. Las medidas se realizaron a 20°C. La figura muestra uno de dos experimentos independientes muy similares entre sí.

En la Figura 4.3.1 se puede observar que la inserción de HlyA en monocapas de DOPC lleva a un incremento total en la presión superficial ($\Delta\pi$) de 6 mN/m. En cambio, la inserción en monocapas de DOPC:16:0SM:Col (2:1:1) produce un incremento mayor, de 10 mN/m. Cabe recordar que tanto la cinética de inserción como el incremento máximo alcanzado para la inserción de HlyA en mezclas ternarias

DOPC/SM/Col 2:1:1 resultó independiente de la presencia de coexistencia de fases, según los resultados obtenidos en el Capítulo 3, por lo que la diferencia encontrada entre la inserción en monocapas de DOPC y DOPC/16:0SM/Col no se debería a la presencia de distintas fases en esta última. Sin embargo, lo que se observó en este caso es que la inserción de la toxina se vio favorecida en aquellas membranas que contienen tanto SM como Col, respecto de aquellas que contienen sólo DOPC.

Para comparar las cinéticas de inserción de HlyA en las monocapas de ambas composiciones ensayadas se ajustaron las curvas obtenidas según la ecuación 4.2.1, lo que permitió determinar la constante de velocidad de inserción de HlyA en cada mezcla, obteniéndose una constante de $9.14 \text{ e-}4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ para DOPC y $1.25 \text{ e-}3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ para la monocapa de DOPC:SM 16:0:Col 2:1:1. Estos resultados indican que HlyA no sólo se insertó en mayor medida en aquellas monocapas conteniendo SM y Col sino que lo hizo más rápidamente.

Mediante el estudio del comportamiento de proteínas con distinta estructura terciaria, se ha postulado que el incremento en la presión superficial de una monocapa depende del grado de inserción de las proteínas, así como también del estado conformacional de las proteínas en la monocapa (Graham, 1980). Por lo tanto, los resultados obtenidos se pueden interpretar en términos de un mayor grado de inserción de la toxina en la mezcla ternaria pero no se puede descartar la posibilidad de que la toxina presente un arreglo conformacional diferente en las monocapas que contienen SM y Col respecto de aquellas que presentan sólo DOPC en su composición.

Estos resultados correlacionan con los resultados de actividad lítica obtenidos por Ostolaza *et al.*, donde se observa un mayor porcentaje de liberación del contenido de liposomas en aquellos que poseen PC/SM/Col en su constitución respecto de los que sólo poseen PC (Ostolaza *et al.*, 1993).

3.2. Ensayos de Inhibición con Col y Pcol

De acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos en monocapas, tanto la presencia de SM como de Col favorecerían la inserción de la toxina en la membrana. Para explorar la existencia de interacciones directas de HlyA con alguno de estos lípidos, se midió la actividad hemolítica de HlyA, previa incubación de la toxina con Col y Pcol, cabeza polar de SM y PC.

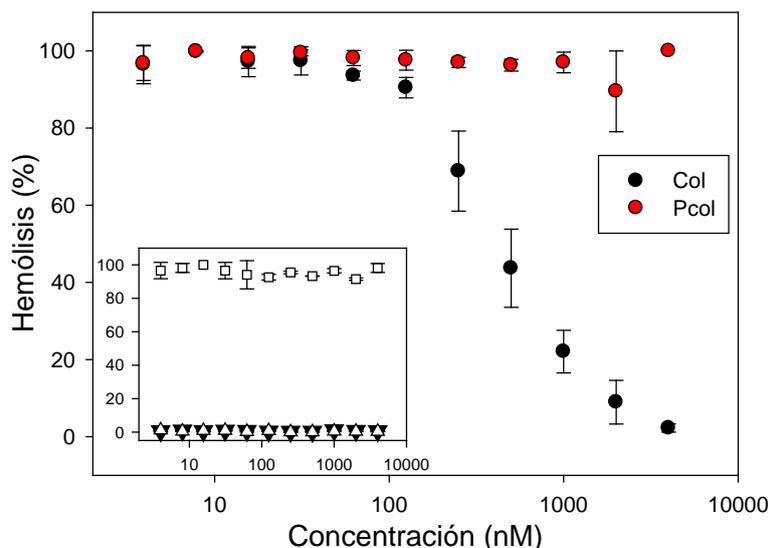


Figura 4.3.2. Se realizaron ensayos de hemólisis en presencia de 0.25 nM HlyA previamente incubada con Col (●) o Pcol (●) a las concentraciones indicadas. Luego de 30 min a 37°C se determinó el porcentaje de hemólisis midiendo el porcentaje de liberación de hemoglobina. El *inset* muestra los controles donde los eritrocitos fueron tratados con los mismos volúmenes de etanol (△) o Col en etanol (▼) que los utilizados en los ensayos de inhibición. Asimismo se chequeó la actividad de HlyA en presencia de etanol (□). Los datos representan la media \pm SD, n=3.

En la Figura 4.3.2 se puede observar que la preincubación de HlyA con Col produjo una inhibición marcada de la hemólisis, observándose una inhibición completa a concentraciones de Col cercanas a 4 μ M. Los datos permitieron el cálculo de la IC50 para la inhibición de la hemólisis por Col dando un valor de 440 ± 40 nM. Estos resultados señalan que existiría una interacción de HlyA con Col y que esta asociación le impediría ejercer su efecto lítico.

Se realizaron controles para asegurar que la utilización de etanol como solvente, aunque en pequeñas cantidades, no afectara los ensayos. Los controles permitieron corroborar que ni las cantidades de etanol, ni las de Col en etanol utilizadas, afectaron la estabilidad de los glóbulos rojos. De la misma manera se comprobó que la actividad de la toxina no se vio afectada por la cantidad de etanol que se utilizó en los ensayos (Figura 4.3.2 *inset*).

Por el contrario, a diferencia de la preincubación con Col, no se produjo inhibición de la hemólisis cuando HlyA fue preincubada con Pcol en el rango de concentraciones de Pcol estudiadas. Pcol constituye la cabeza polar de SM y PC. Si bien en este caso no se produjo inhibición por la preincubación con Pcol, no se puede descartar una interacción con estos fosfolípidos ya que, por ejemplo, se ha encontrado

que Equinotoxina-II, una toxina que reconoce específicamente SM, no une Pcol ni PC (Bakrac et al., 2008). En el mismo sentido, se ha reportado que Lisenina, una toxina aislada del gusano *Eisenia foetida*, une específicamente SM en la membrana de varios tipos celulares pero no es capaz de unir otros esfingolípidos ni ceramida, esfingosina, esfingosina-1-P, esfingosilfosforilcolina o galactoceramida, sino que reconoce la estructura molecular de la SM (requiere de la presencia tanto de Pcol, junto con la esfingosina y el ácido graso para unirse) (Yamaji et al., 1998).

3.3. Actividad hemolítica de HlyA en glóbulos rojos tratados con SMasa

Para estudiar la relación entre el contenido de SM en la membrana de los glóbulos rojos y la actividad hemolítica de HlyA, se midió el grado de hemólisis de glóbulos rojos control y tratados con SMasa de *Bacillus cereus*, que cataliza la hidrólisis de SM en ceramida y Pcol, reduciendo así el contenido de SM de la membrana. En estos ensayos se utilizaron glóbulos rojos de carnero, los cuales particularmente presentan un alto contenido de SM en sus membranas (Mate et al., 2014).

Los glóbulos rojos de carnero se trataron con SMasa de *B. cereus* por una hora a 37°C y luego se comprobó la disminución del contenido de SM entre glóbulos rojos control y tratados con SMasa mediante HPTLC.

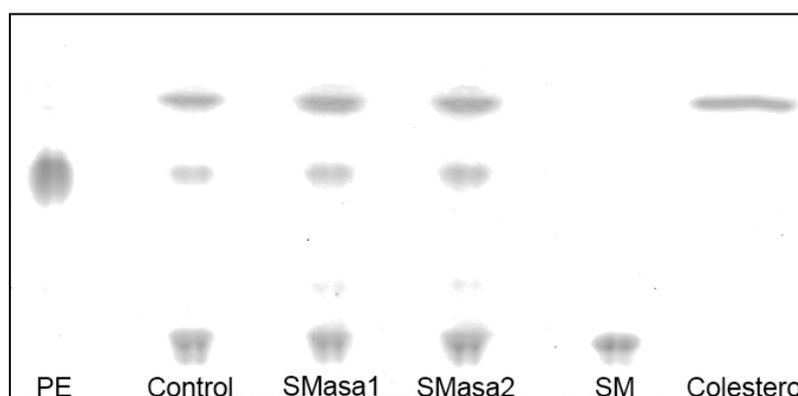


Figura 4.3.3. Placa de HPTLC que muestra la separación de los lípidos totales extraídos a partir de fantasmas de glóbulos rojos de carnero sin tratar (indicados como Control) y tratados con 0.7 unidades/ml SMasa (indicados como SMasa 1 y 2) por 1h a 37°C. Los lípidos totales se extrajeron por el método de Folch (Folch et al., 1957) y posteriormente se separaron mediante HPTLC utilizando cloroformo/metanol/agua 25:10:1 (v/v) como solvente de desarrollo. Se sembraron en la misma placa estándares comerciales de PE, SM y Col. Las bandas de lípidos se detectaron tratando la placa con 5% (v/v) de Ácido sulfúrico en etanol y posterior calentamiento de la placa a 120°C.

	Control	SMasa
SM/PE	2.8 ± 0.1	1.85 ± 0.05
% SM	100	66 ± 3

Tabla 4.3.1. Análisis densitométrico de las bandas de SM y PE obtenidas en la Figura 4.3. SM/PE: relación de DO de la banda de SM y PE. %SM: %SM remanente en glóbulos rojos tratados calculado como $(SM/PE)_{SMasa}/(SM/PE)_{control} \times 100$. Los datos representan la media ± el desvío, n=2.

Como puede observarse en la Figura 4.3.3 y Tabla 4.3.1 el tratamiento con SMasa efectivamente produjo una disminución del contenido de SM y pudo estimarse que los glóbulos rojos tratados presentaron un 34 ± 3 % menos de SM respecto de los glóbulos rojos sin tratar.

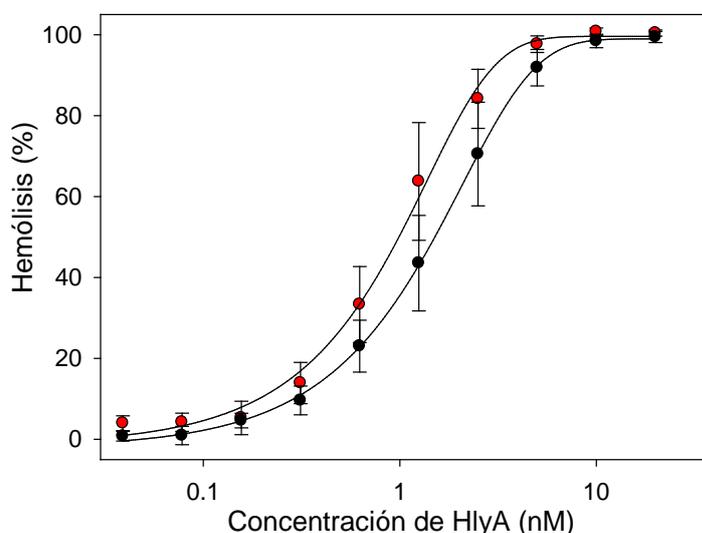


Figura 4.3.4. Actividad hemolítica de HlyA en glóbulos rojos de carnero control (●) y tratados con SMasa (●). Se realizaron diluciones seriadas de HlyA en 100 μ l de Buffer TC, 10 mM $CaCl_2$, pH 7.4 y se agregó a cada pocillo 100 μ l de una suspensión estandarizada de glóbulos rojos sin tratar o tratados con SMasa. Luego se incubó 30 minutos a 37 $^{\circ}C$ y se midió el grado de hemólisis como porcentaje de liberación de hemoglobina. Los valores indicados representan la media \pm SD, n= 4.

Como se observa en la Figura 4.3.4, la disminución del contenido de SM en la membrana de los glóbulos rojos de carnero no afectó la actividad hemolítica de HlyA,

ya que no se observaron diferencias significativas respecto de la actividad hemolítica en glóbulos rojos sin tratar. De hecho, se observó un pequeño aumento, aunque no significativo, en el porcentaje de hemólisis en los glóbulos rojos tratados con SMasa. En este sentido, se ha reportado que el tratamiento con SMasa de *B. cereus* puede producir hemólisis de glóbulos rojos de carnero debido a la aparición de interfases en la membrana por la formación de dominios ricos en ceramida como consecuencia de la actividad enzimática, por lo que el tratamiento con la enzima pudo causar una mayor inestabilidad de los glóbulos rojos en estos ensayos (Oda et al., 2010).

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de hemólisis indican que una disminución en el contenido de SM en la membrana no modifica la actividad hemolítica por lo que refuerzan los resultados obtenidos previamente indicando que HlyA no interaccionaría con SM en la membrana.

3.4. Ensayos de Dot-Blot de lípidos

Los resultados obtenidos hasta este punto dan indicios de la existencia de una interacción de HlyA con Col, no así con SM o PC. Con el fin de analizar interacciones directas entre los distintos lípidos y HlyA se realizaron ensayos de *Dot-Blot* de lípidos.

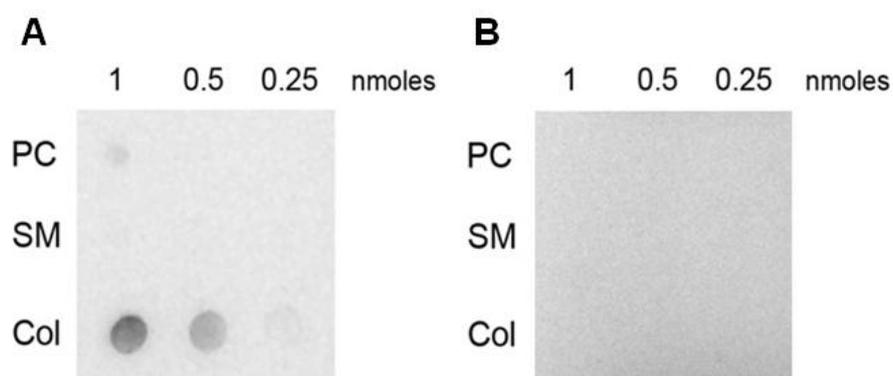


Figura 4.3.5. *Dot-Blot* de lípidos. Se sembró 1 μ l de diluciones seriadas de PC, SM y Col en membranas de nitrocelulosa. La cantidad total de lípido depositada en cada caso se indica en la figura. Las membranas fueron bloqueadas en 3% (p/v) de leche descremada en Buffer TC. (A) Las membranas fueron incubadas con 30 nM HlyA en presencia de 10 mM CaCl_2 . La toxina unida a los distintos lípidos fue revelada usando anticuerpos policlonales anti-HlyA y revelando por quimioluminiscencia. (B) Se realizó el mismo procedimiento pero en ausencia de HlyA. Las figuras corresponden a uno de tres experimentos independientes.

En la Figura 4.3.5.A se puede observar que HlyA se unió preferencialmente a Col. Al comparar la intensidad de los distintos puntos se observó que con el aumento de la cantidad de Col sembrada también aumentó la cantidad de HlyA unida a la membrana. En cambio, no se observó interacción de HlyA con SM para las cantidades de lípidos ensayadas y, en el caso de PC, sólo se observó asociación de HlyA en presencia de 1 nmol de lípido, pero no en presencia de cantidades menores. En este último caso, la unión a 1 nmol de PC fue mucho menor que la correspondiente a la misma cantidad de Col, según se evidencia por la menor intensidad de señal quimioluminiscente que se obtuvo. El control en ausencia de toxina indica que los puntos observados se corresponden a la unión de la toxina y no a una unión inespecífica de los anticuerpos utilizados durante el revelado (Figura 4.3.5.B).

Estos resultados indican que existiría una interacción directa y preferencial de HlyA con Col.

3.5. Ensayos de SPR

SPR permite caracterizar interacciones lípido-proteína, pudiendo analizar tanto la cinética de la interacción como la especificidad de la unión. Para confirmar los resultados obtenidos por *Dot-Blot* de lípidos y poder caracterizar la interacción HlyA-Col se realizaron medidas de SPR, utilizando liposomas de distinta composición lipídica. Para esto se usó la toxina como ligando fijándola a la superficie de chips CM5 a través de sus grupos amino a pH 4 y se estudió su interacción con liposomas de DOPC y DOPC/Col 4:1.

La forma de los sensorgramas en SPR es altamente dependiente de la velocidad de disociación. Inicialmente al inyectar el analito, se produce la unión del mismo a su ligando en la superficie del chip. La asociación tiene una cinética exponencial y la magnitud de la respuesta es proporcional a la concentración de analito. Cuando se inyecta durante un tiempo suficiente el analito, se alcanza el estado estacionario, lo que implica que la velocidad de asociación y disociación del analito se han igualado, y la curva se vuelve horizontal. Así, cuanto menor sea la velocidad de disociación se requerirán tiempos mayores de inyección para alcanzar el estado estacionario. La disociación también sigue una cinética exponencial.

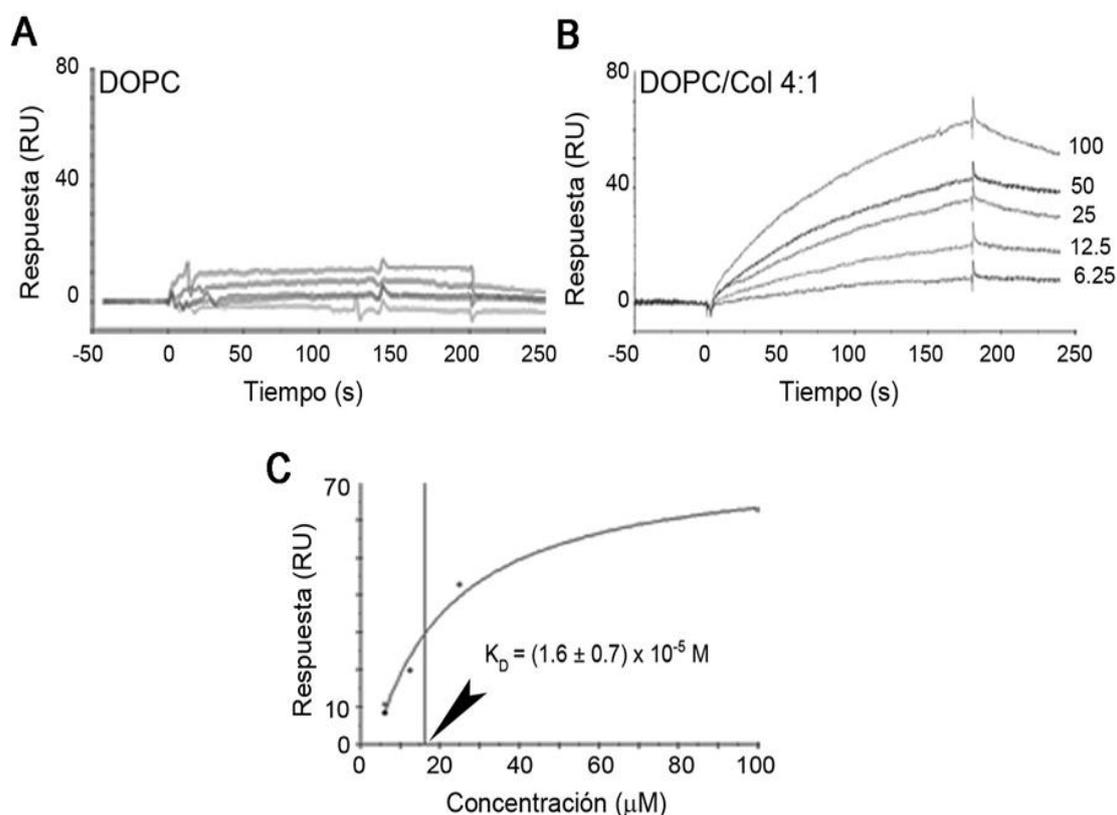


Figura 4.3.6. Interacción de HlyA con liposomas de distinta composición lipídica determinada por SPR. LUVs de DOPC (A) o DOPC/Col 4:1 (B) fueron inyectados sobre HlyA inmovilizada (450 RU) sobre Chips CM5. Las concentraciones de liposomas utilizadas (μM) se indican en el sensorgrama correspondiente a DOPC/Col 4:1 (B) y fueron las mismas para DOPC. Las curvas muestran unión específica para el caso de DOPC/Col 4:1 (B) e inespecífica para el caso de DOPC (A) luego de corregir los valores obtenidos por el control de superficie sin proteína inmovilizada. (C) La K_D para la interacción de HlyA con liposomas de DOPC:Col 4:1 se determinó por análisis no lineal.

En la Figura 4.3.6.B se observa que HlyA interaccionó específicamente con liposomas de DOPC:Col 4:1, presentando sensorgramas como los descriptos. La constante de velocidad de asociación (k_{on}) obtenida para estos liposomas fue muy baja cayendo por debajo del límite de medida del equipo, por lo que no se pudo hacer un análisis cinético sino que se determinó la constante de afinidad en condiciones de equilibrio. Se obtuvo así una constante de afinidad K_D de $(1.6 \pm 0.7) \times 10^{-5} \text{ M}$ para la interacción de HlyA con los liposomas de DOPC/Col 4:1 (Figura 4.3.6. C). Por el contrario, no se observó interacción de HlyA con liposomas de DOPC (Figura 4.3.6.A), en este caso se ve claramente que la velocidad de disociación fue muy alta y se alcanzó rápidamente el estado estacionario. La falta de interacción específica con liposomas de DOPC indica que la interacción con los liposomas de DOPC/Col 4:1 se debería exclusivamente a la presencia de Col.

Como se mencionó anteriormente, para realizar estas medidas la toxina se unió covalentemente a la superficie del chip lo que podría modificar su conformación y afectar su función. Para garantizar que la toxina se encontraba funcional al momento de hacer los ensayos con liposomas, una vez finalizados los mismos, se regeneró la superficie del chip y se realizó como control un ensayo de unión inyectando glicoforina, glicoproteína de membrana del eritrocito que ha sido descrita como posible receptor de HlyA en estas células (Cortajarena et al., 2001).

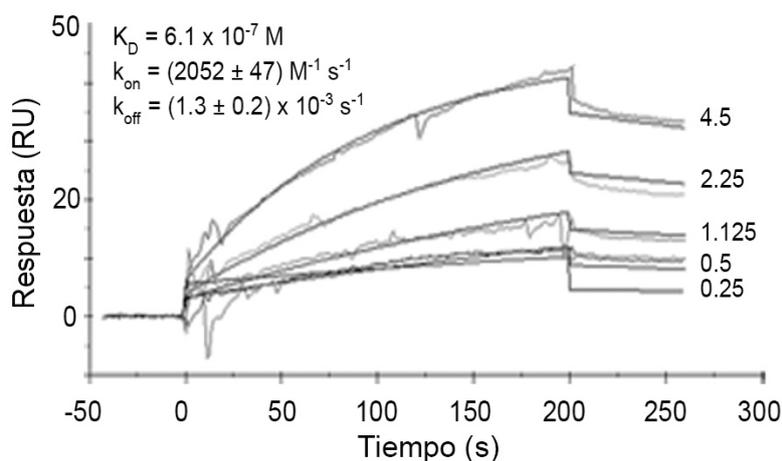


Figura 4.3.7. Sensorgramas obtenidos para la interacción de HlyA con glicoforina. La superficie del chip utilizado en los ensayos con liposomas se regeneró por tratamiento con Buffer glicina-HCl 10 mM pH 3 y posteriormente se inyectó glicoforina en las concentraciones que se indican en la figura (μM). Los sensorgramas se ajustaron a un modelo de unión 1:1 y se determinaron los parámetros cinéticos k_{on} y k_{off} .

Como se observa en la Figura 4.3.7 los sensorgramas obtenidos muestran que hubo interacción específica entre HlyA y glicoforina, lo que evidencia que la toxina se encontraba funcional al momento de probar su interacción con los liposomas. En el caso de la interacción HlyA-glicoforina se pudo realizar un análisis cinético de la unión que permitió calcular una constante de velocidad de asociación (k_{on}) de $2052 \pm 47 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, una constante de velocidad de disociación (k_{off}) de $(1.3 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y a partir de estos datos se calculó una constante de afinidad K_D de $6.1 \times 10^{-7} \text{ M}$. Los trabajos que han postulado a glicoforina como receptor de HlyA reportan una K_D de $1.5 \pm 0.8 \times 10^{-9} \text{ M}$ (Cortajarena et al., 2001). A partir de medidas del porcentaje de unión de distintas concentraciones de HlyA a glóbulos rojos, estos autores encontraron una relación lineal entre el porcentaje de unión y la concentración de toxina por debajo de 10 nM, por lo que asumieron que a bajas concentraciones la interacción de la toxina debía ser con el receptor propuesto de mayor afinidad y que se podía despreciar la unión a

lípidos y otros componentes de membrana. El valor así obtenido por Cortajarena *et al.* probablemente es mayor al real dado que considera que toda la toxina unida al glóbulo rojo se encontraba unida a glicoforina. Esto puede verse si se compara el valor reportado y el encontrado en los ensayos de SPR, donde se analizó específicamente la interacción entre HlyA y glicoforina. Por lo tanto este control permitió no sólo comprobar que HlyA se encontraba activa unida al chip, sino que también permitió calcular una constante de afinidad de HlyA por glicoforina.

3.6. Ensayos de liberación del contenido de liposomas

Con el objeto de estudiar la relación entre la actividad lítica de la toxina y la presencia de Col en las membranas, se analizó la liberación del contenido de vesículas conteniendo distintas cantidades de Col en la composición de sus membranas. Para ello se midió la liberación del contenido de LUVs de DOPC y mezclas DOPC:Col en relación molar 9:1, 4:1 y 2:1, en presencia de distintas cantidades de HlyA.

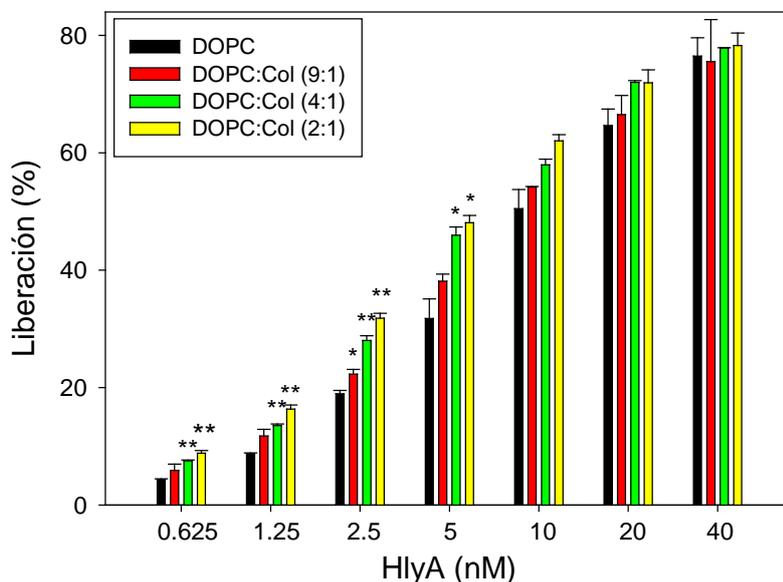


Figura 4.3.8. Liberación del contenido de liposomas de distinta composición lipídica. DOPC (■), DOPC:Col (9:1) (■), DOPC:Col (4:1) (■), DOPC:Col (2:1) (■). Se midió la liberación del contenido de los liposomas luego del tratamiento de los LUVs con distintas concentraciones de HlyA. λ_{exc} 355 nm, λ_{em} 525 nm. Los valores representan la media \pm SD, $n=3$. Los asteriscos indican diferencias significativas en el porcentaje de liberación respecto de los liposomas de DOPC analizados aplicando el Test de Student, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

En la Figura 4.3.8 se puede observar que al aumentar la concentración de toxina aumentó el porcentaje de liberación del contenido de liposomas. Esto concuerda con resultados previamente descritos en los que se observa una dependencia tanto con la concentración de HlyA como con el tiempo de exposición (Moayeri & Welch, 1994). Un porcentaje máximo de liberación, cercano al 80%, se alcanzó a 40 nM de HlyA, independientemente de la composición lipídica de los liposomas. Este hecho podría deberse a una desestabilización inespecífica de la membrana, producido por altas concentraciones de la toxina. Sin embargo, a bajas concentraciones de toxina, por debajo de 10 nM, se puede observar que el porcentaje de liberación aumenta con el aumento del contenido de Col en las membranas para todas las concentraciones de HlyA en este rango.

Se calculó el porcentaje relativo de liberación para cada composición conteniendo Col respecto del porcentaje de liberación obtenido para liposomas que contenían sólo DOPC, para cada concentración de toxina ensayada.

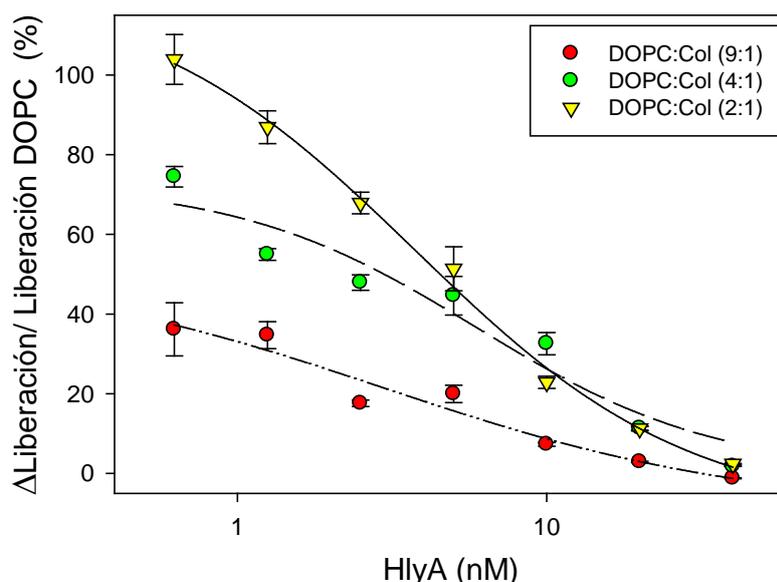


Figura 4.3.9. Incremento relativo de la liberación del contenido de liposomas conteniendo Col respecto de los liposomas de DOPC. DOPC:Col (9:1) (●), DOPC:Col (4:1) (●), DOPC:Col (2:1) (▼). El incremento relativo se calculó según la ecuación: $[\%Liberación\ DOPC:Col\ (X:1) - \%Liberación\ DOPC] / \%Liberación\ DOPC$; para cada composición y cada concentración de HlyA ensayada. Los valores representan la media \pm SD, n=3.

En la Figura 4.3.9 se muestra el incremento relativo que presentan los liposomas que contienen distintas cantidades de Col respecto de los liposomas compuestos sólo de DOPC. Se puede observar que a una concentración 40 nM de

HlyA se produjo la liberación del contenido de todos los liposomas empleados prácticamente con la misma eficiencia, independientemente de su contenido relativo de Col. Se puede apreciar también que para concentraciones entre 5 y 20 nM, la actividad es mayor para los liposomas conteniendo 20 y 33% de Col comparada con la obtenida en liposomas conteniendo sólo 10% de Col, presentando aquellos con mayor contenido de Col un comportamiento muy similar entre sí. A concentraciones de toxina menores a 5 nM la presencia de Col en las membranas produjo un marcado aumento de la actividad lítica de la toxina, siendo más marcado el efecto cuánto más bajas fueron las concentraciones de toxina ensayadas.

Las mezclas DOPC/Col son completamente miscibles en todas proporciones hasta llegar al límite de solubilidad del Col, que es de aproximadamente 66%, por encima de esa concentración, el Col precipita como cristales monohidratados que coexisten con la membrana de DOPC/Col (Huang et al., 1999). Por lo tanto, las mezclas utilizadas en estos ensayos que poseen 10% (DOPC/Col 9:1), 20% (DOPC/Col 4:1) y 33% (DOPC/Col 2:1) de Col, presentan una única fase, de tipo *Ld*.

La introducción de Col en las bicapas de DOPC produce un efecto de condensación, generando un ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos y un aumento del espesor de la membrana (Hung et al., 2007) (Alwarawrah et al., 2010). Por lo que, al ir incrementando el contenido de Col en los liposomas de DOPC/Col, la membrana adquiere mayor orden, y se podría esperar que la toxina encontrara una mayor resistencia para su inserción en la bicapa. Sin embargo, contrariamente a esto, cuanto mayor fue la cantidad de Col presente en el liposoma, mayor fue la actividad lítica encontrada. Se ha descrito que en las mezclas DOPC/Col al ir aumentando el contenido de Col se llega a un punto límite donde se produce un aumento del potencial químico del Col lo que se conoce como "activación del Col" o aumento del "Col libre" en la membrana. En este punto el Col se vuelve más accesible ya que se encuentra más expuesto en la membrana (Olsen et al., 2013). La perfringolisina O, una citolisina dependiente de Col producida por *Clostridium perfringes*, es altamente dependiente de la presencia de Col libre y sólo se une a liposomas cuando el contenido de Col se encuentra por encima de este umbral, por lo que se la utiliza como marcador de Col libre en membrana. Esta toxina se ha utilizado en ensayos con el fin de evaluar la presencia de Col libre en distintas mezclas DOPC/Col y se encontró que el porcentaje de Col a partir del cual perfringolisina O se une a estas membranas se encuentra entre 26 y 30%. Los mismos resultados se obtuvieron mediante estudios de simulación, postulando entonces que la activación del Col se produciría en este rango de concentraciones para estas mezclas (Olsen et al., 2013).

Los liposomas compuestos de DOPC/Col utilizados en los ensayos de liberación presentan 10, 20 y 33% de Col, con lo cual los liposomas con 33% presentarían Col más accesible y esto podría contribuir a la mayor actividad lítica que se observó en estos liposomas. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con perfringolisina O, la relación entre la actividad lítica de HlyA y la presencia de Col no parece basarse en la presencia de Col libre ya que apenas un 10% de Col en la membrana produce un aumento de la actividad lítica comparada con la observada para DOPC. Por lo que la sola presencia de Col parece favorecer la actividad lítica.

Las toxinas CDC constituye la familia de toxinas que interaccionan con Col mejor caracterizadas hasta el momento. Estas toxinas tienen en su estructura un dominio de unión a Col con el que interaccionan específicamente. Si bien el rol del Col en el mecanismo de acción de estas toxinas no está del todo claro, todas ellas requieren la presencia de Col en la membrana para ejercer su acción. Así, la unión de perfringolisina O a la membrana, como se mencionó anteriormente, depende de la disponibilidad de Col libre en la superficie de la membrana (Flanagan et al., 2009). Por el contrario, Intermedilisina de *Streptococcus intermedius* no requiere Col para unirse a la membrana pero la formación de poro es completamente dependiente de la presencia de Col (Giddings et al., 2004) (Giddings et al., 2003). Se ha visto que tanto perfringolisina O, Intermedilisina como Streptolisina O de *Streptococcus pyogenes*, sufren un bloqueo en el paso de preporo a poro cuando disminuye el contenido de Col en la membrana, por lo que se postula que la interacción de estas toxinas con Col tiene un rol fundamental en la inserción del preporo en la membrana (Giddings et al., 2003).

En el caso de HlyA, trabajos previos del grupo mostraron que la disminución del contenido de Col en la membranas de glóbulos rojos de carnero no afecta el porcentaje de unión de toxina a membrana, sin embargo se produce una disminución marcada de la oligomerización y al mismo tiempo de la actividad hemolítica (Herlax et al., 2009). En el mismo sentido, otros estudios han reportado que el porcentaje de unión de HlyA a liposomas de PC permanece constante cuando se incorporan pequeñas cantidades de Col pero se observa en cambio un aumento del porcentaje de toxina que se inserta irreversiblemente en la membrana (Bakas et al., 1996). De estos estudios se desprende que la interacción de HlyA con Col no favorece la unión de la toxina a la membrana pero, como se vio en este capítulo, dicha interacción favorece la inserción de la toxina en la membrana y la formación de poro, aumentando la eficiencia del proceso lítico. La irreversibilidad de la unión de HlyA a membrana ha sido atribuida a la oligomerización de la toxina, por lo que la interacción con Col

supone que la toxina no sólo se está insertando en mayor medida sino que lo hace en un estado competente que favorece su oligomerización.

Recientemente se ha reportado que otra toxina de la familia RTX, la leucotoxina LtxA de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, interacciona con Col. Se encontró que esta interacción no tiene efecto sobre la velocidad de asociación a liposomas que contienen Col pero en cambio reduce significativamente la velocidad de disociación, por lo que, una vez inserta la toxina en membrana, la interacción con Col vuelve la unión irreversible (Brown et al., 2013). Los resultados descritos en este capítulo para HlyA la constituyen como el segundo miembro de la familia RTX que se ha reportado que interacciona con Col y, al igual que sucede para LtxA, esta interacción sería la que conduce a la unión irreversible a la membrana.

Establecer con precisión cuál es el paso específico en el mecanismo lítico de HlyA donde la interacción con Col tendría mayor relevancia resulta complejo ya que, probablemente, más de un paso se vea favorecido. Si se considera el proceso de manera global, queda claro que múltiples cambios conformacionales deben ocurrir en la toxina para que finalmente quede integrada en la membrana. En este sentido, se ha visto que, cuando existe una especificidad suficientemente alta en la interacción proteína-lípido, la unión de lípidos a sitios específicos en la porción transmembrana de la proteína puede ejercer efectos directos en la modulación de la estructura y función de las proteínas, lo que ha llevado a postular la participación de ciertos lípidos como reguladores alostéricos de las proteínas con las que interaccionan (Fernandez-Ballester et al., 1994) (Robinson et al., 2014). Particularmente en el caso de HlyA, dadas las características proteolipídicas de los poros formados, la interacción con Col podría jugar un papel importante en la estabilización del poro lítico.

3.7. Medidas de conductancia en bicapas lipídicas planas en presencia de HlyA

El análisis de la corriente generada en bicapas lipídicas planas de distinta composición luego de la aplicación de una PFT permite estudiar el efecto de la composición lipídica en las características del poro formado. Así, con el fin de analizar una posible estabilización del poro formado por HlyA a partir de su interacción con Col, se realizaron ensayos de BLM en bicapas de DOPC y mezclas binarias DOPC/Col en relación molar 2:1.

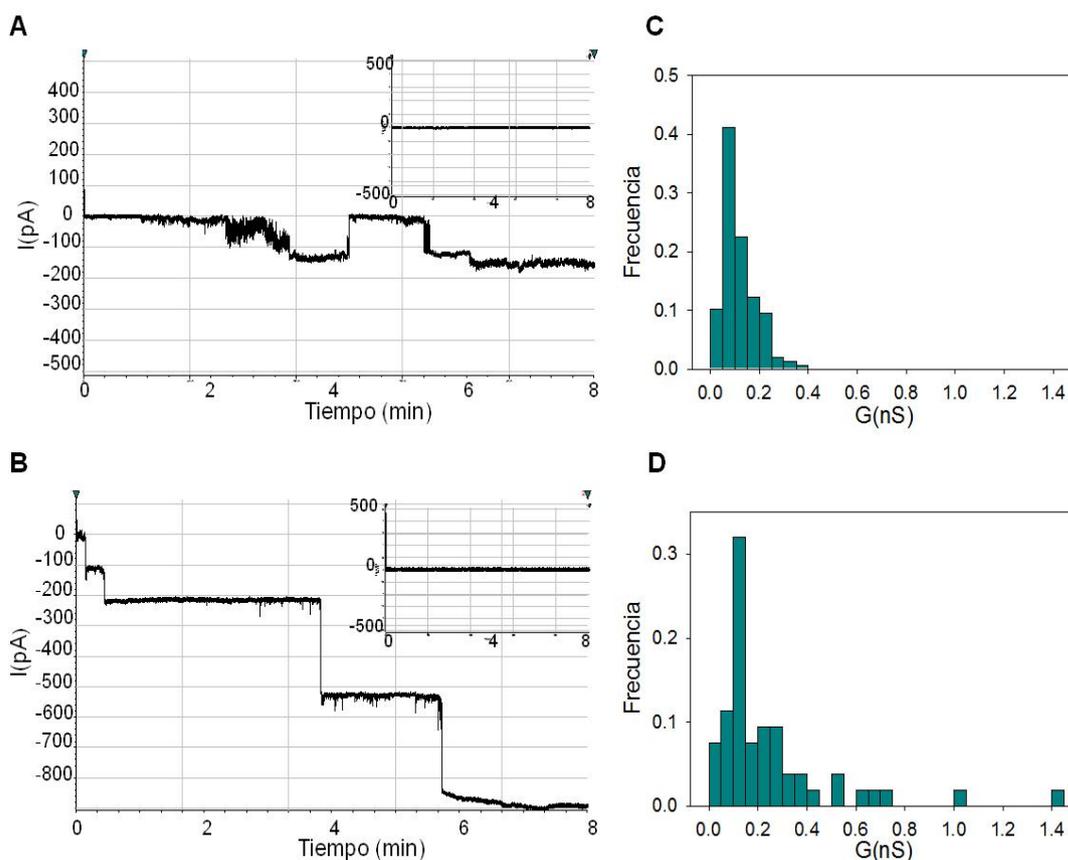


Figura 4.3.10. Registros de corriente en bicapas lipídicas planas de (A) DOPC y (B) DOPC/Col en relación molar 2:1 durante 8 min luego del agregado de 10 nM de HlyA al compartimento *cis*. Los *insets* en cada figura muestran los controles donde se registró la corriente en ausencia de toxina para las mismas bicapas. El buffer en ambos casos fue Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.4 y los registros se realizaron a 23°C. El potencial aplicado fue de -150 mV. Se analizó la conductancia de los canales abiertos para todos los registros tomados a -150 mV. Los histogramas muestran la frecuencia de aparición de eventos de una determinada conductancia para bicapas de (C) DOPC y (D) DOPC/Col 2:1. Los saltos de corriente de más de 0.1 s de duración fueron considerados como eventos para el análisis (N=146 para DOPC y 65 para DOPC/Col 2:1).

En la Figura 4.3.10 se presenta un ejemplo de los registros obtenidos aplicando un voltaje de -150 mV y 10 nM de toxina a bicapas que contienen sólo DOPC y bicapas de DOPC/Col 2:1. Se puede observar que el agregado de HlyA generó una corriente a través de la membrana tanto en bicapas de DOPC (Figura 4.3.10.A) como en bicapas de DOPC/Col 2:1 (Figura 4.3.10.B). Esto se atribuye a la formación de canales en presencia de la toxina dado que no se observó este comportamiento en los controles realizados donde las bicapas fueron sometidas al mismo potencial en ausencia de toxina (*insets* Figura 4.3.10 A y B). El análisis cualitativo de los registros permite observar que en presencia de Col en la bicapa se produjeron saltos de

corriente de forma escalonada (Figura 4.3.10.B), que son característicos de la formación de poros proteicos, que se caracterizan por poseer una estructura definida. En este tipo de registros se considera que cada escalón es generado por la apertura de un poro individual. En las bicapas de DOPC/Col 2:1, una vez que se produjo la apertura de un poro, rara vez se observó su cierre, lo que indica una estabilización del estado abierto del poro. En cambio en bicapas de DOPC, los registros obtenidos fueron más ruidosos y si bien se produjeron algunos saltos con forma de escalón, el estado abierto de los canales parece no ser tan estable, observándose un mayor número de eventos pero que pueden atribuirse a la apertura y cierre de los mismos canales. Este tipo de registro, es típico de poros proteolipídicos. Al analizar la conductancia de los canales individuales se observó que en presencia de Col se obtuvo una distribución más amplia de conductancias (Figura 4.3.10. C y D).

En experimentos de BLM empleando las proteínas formadoras de poro perforina y listeriolisina O se han identificado dos tipos de poros formados por estas proteínas, un poro bien definido, con aumento de corriente en forma de escalón compatible con una estructura de tipo anillo y otro, de mayor ruido y que genera escalones más pequeños de aumento de corriente, que no se puede atribuir a la estructura proteica en anillo que forman estas proteínas sino a la formación de poros proteolipídicos tipo arcos formados por las proteínas junto con los lípidos de la bicapa (Bavdek et al., 2012) (Praper et al., 2011). En diversas toxinas de la familia CDC también se ha observado la formación de distintos tipos de poros, arcos y anillos (Czajkowsky et al., 2004) (Korchev et al., 1998).

HlyA forma poros proteolipídicos en la membrana (Bakas et al., 2006). Al estar los lípidos formando parte de la estructura del poro, las características de los poros dependerán de la composición de la membrana. En función de la forma de los registros $I(pA)$ vs $t(min)$ (Figura 4.3.10. A y B) podría postularse la formación de distintos tipos de poros según esté presente Col en la bicapa o no. Así, en bicapas de DOPC parecerían formarse poros de características más semejantes a los poros proteolipídicos mientras que en presencia de Col las características de los poros formados se asemejarían más a las de los poros proteicos.

Por otro lado, la presencia de Col en la membrana favorecería la formación de poros de mayor tamaño, como puede observarse en el histograma de conductancias para las bicapas de DOPC/Col 2:1 (Figura 4.3.10.D) respecto del correspondiente a las bicapas de DOPC (Figura 4.3.10.C). Un efecto similar se encontró en estudios previos para bicapas de DOPE respecto de bicapas de DOPC (Bakas et al., 2006). En ese trabajo se concluyó que al ser PE un lípido que induce curvatura negativa en la membrana, favorece el crecimiento del poro. Si recordamos la forma de los poros

toroidales, lípidos con curvatura positiva se localizan en los bordes del poro en un plano perpendicular a la membrana y lípidos con curvatura negativa se ubican en el plano de la membrana a lo largo de todo el perímetro central del poro. Así, a medida que el poro crece, la curvatura total se desplaza hacia valores negativos, haciendo que la formación se vea favorecida por la presencia de lípidos inductores de curvatura negativa (Gilbert et al., 2014). Tanto PE como Col presentan una geometría molecular con una cabeza polar pequeña comparada con el resto de la molécula, por lo que se comportan como inductores de curvatura negativa en la membrana y esto puede constituir una característica importante para la estabilización de la formación de poros de mayor tamaño por HlyA. Esto concuerda con resultados previos donde se observó que la presencia de PE y Col produce un aumento en la liberación del contenido de liposomas (Ostolaza et al., 1993).

Los resultados obtenidos por BLM, si bien constituyen resultados preliminares, apuntan hacia un efecto estabilizador ejercido por el Col sobre el poro formado por HlyA, induciendo la formación de poros más estructurados, que una vez formados tienen menor probabilidad de cierre y que presentarían un comportamiento más semejante al de los poros proteicos. De la misma manera la presencia de Col favorecería la formación de poros de mayor tamaño.

3.8. Búsqueda de sitios de unión a Col en la secuencia de HlyA

Recientemente se ha reportado la existencia de sitios CRAC y su participación en la interacción con Col en distintas toxinas provenientes de microorganismos Gram negativos, entre ellas, la toxina CDT de *Campylobacter jejuni* y la leucotoxina LtxA de *A. actinomycetemcomitans* (Lai et al., 2013) (Brown et al., 2013).

La capacidad de estos sitios de unirse al Col vendría dada por las características estructurales propias del Col. El Col es una molécula anfipática derivada del esqueleto carbonado del esteareno. Su región polar está limitada a un solo grupo -OH que puede formar puentes de H, actuando ya sea como aceptor o como donador. La sección apolar del Col posee una estructura asimétrica con dos caras distintas, denominadas α y β , de acuerdo al sistema de numeración de compuestos con anillos propuesto por Rose et al. (Rose et al., 1980). La cara α presenta una superficie plana, a diferencia de la β que presenta una superficie mucho más rugosa debido a la presencia de los grupos alifáticos (dos grupos metilos y la cadena terminal isoocilo) unidos al anillo de esteareno (Fantini & Barrantes, 2009).

Los sitios CRAC (de secuencia consenso L/V-(X₁₋₅)-Y-(X₁₋₅)-R/K) presentan características que les permiten interactuar con el Col de las membranas. La cadena lateral de los aminoácidos ramificados como isoleucina (I), V o L pueden interpenetrar estas cadenas alifáticas presentes en la cara rugosa del Col y por lo tanto son particularmente adecuadas para asociarse con la cara β del Col a través de interacciones de van der Waals. Por otro lado, las cadenas laterales aromáticas pueden apilarse en la cara α del Col a través de interacciones CH-π (Nishio et al., 2014).

Considerando que HlyA interactúa específicamente con Col se realizó la búsqueda de estos sitios dentro de la secuencia de la toxina.

Posición	Motivo CRAC de unión a colesterol
74 - 83	LgievqYde...K
117 - 127	Llqk..YqkagnK
459 - 464	Lsq...Yn....K
601 - 610	Vgnnq.Yrei..R
639 - 644	Vvy...Yd....K
840 - 851	Llkgg.YgndiyR
942 - 954	LkkaleYqqsnK

Tabla 4.3.2. Posibles motivos de unión a Col en la secuencia de HlyA. Sitios CRAC (L/V-(X₁₋₅)-Y-(X₁₋₅)-R/K) fueron identificados en la secuencia de HlyA utilizando el servidor ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>).

Los motivos CRAC se encuentran con frecuencia en la secuencia primaria de las proteínas en general y su presencia no necesariamente implica que la proteína se una a Col. Sin embargo, la existencia de estos sitios en zonas que interactúan con la membrana puede ser un determinante para que la interacción con Col ocurra (Epan, 2006). Por ejemplo, se ha reportado que un sitio CRAC es el responsable de regular la sensibilidad al Col del receptor de cannabinoides tipo I y este CRAC se encuentra en el extremo de un dominio transmembrana (Oddi et al., 2011). La proteína de fusión gp41 del virus HIV-1 posee un motivo CRAC que interactúa con Col y, al igual que en el caso anterior, este motivo se encuentra inmediatamente adyacente al dominio transmembrana (Vincent et al., 2002).

En el análisis de la secuencia de HlyA se encontraron siete sitios CRAC (Tabla 4.3.2). A partir de los resultados obtenidos, el Col tendría un rol importante en la estabilización del poro lítico, por lo tanto tendrían importancia aquellos sitios CRAC ubicados en el dominio de inserción de la toxina (177-411) (Hyland et al., 2001). De los siete sitios CRAC encontrados, ninguno se encuentra en esta región de la toxina.

Como se mencionó previamente en la sección de *Métodos* de este capítulo, se ha identificado un sitio de unión a Col, muy similar a los sitios CRAC pero que presenta exactamente la orientación contraria en cuanto a la disposición de sus aminoácidos. Estos motivos se han denominado CARC, precisamente por esa característica y están constituidos por la secuencia consenso K/R-(X₁₋₅)-Y/F-(X₁₋₅)-L/V (Baier et al., 2011). Esta secuencia parecería ser más apropiada para la interacción con el Col, dadas las características que presentan los segmentos α -hélice transmembrana. Un segmento transmembrana usualmente consiste en un segmento α -hélice de entre 20 y 25 residuos de aminoácidos no polares presentando en ambos extremos residuos más polares los cuales se ubican en la región interfacial de la membrana estabilizando la hélice en el interior de la misma (Lee, 2003). Estos aminoácidos interfaciales deben acomodarse en la zona de transición entre un ambiente polar y uno no polar. Es por esto que los residuos más frecuentemente encontrados en estas regiones de interfase son K, R, Y y triptófano (W). Los residuos de K y R poseen una larga cadena no polar capaz de insertarse en la membrana mientras que su grupo básico cargado positivamente se ubica en la superficie de la membrana (Strandberg & Killian, 2003). Los residuos de W y Y poseen un anillo aromático compatible con la membrana no polar y contienen ya sea un grupo -OH (Y) o un átomo de N (W) capaz de formar puentes de H con los grupos polares (Lee, 2003).

Los residuos de R y K se encuentran frecuentemente hacia el extremo N-terminal de la porción α -hélice transmembrana lo que implica que los residuos Y/F y L/V deben formar parte de un segmento transmembrana y esto concuerda con la naturaleza de estos residuos que los ubicaría en la región apolar de la membrana (Fantini & Barrantes, 2013). Por lo tanto, la disposición en la membrana de los residuos que constituyen los CARC sería más adecuada para la interacción con Col.

Teniendo en cuenta esto, se realizó la búsqueda de sitios CARC en la secuencia de HlyA. La Tabla 4.3.3 enumera los sitios CARC que se encontraron en la secuencia de HlyA.

Posición	Motivo CARC de unión a colesterol
90 - 99	Kqv...FgtaekL
105 - 114	Rgvti.Fapq..L
341 - 353	RfkklgYdgdsIL
413 - 420	Kqam..Feh...V
457 - 468	Kilsq.YnkeysV
464 - 472	Ke....YsversV
500 - 512	KsyidyYeegkrL
514 - 523	Kkpde.Fqkq..V
521 - 527	Kqv...Fdp...L
558 - 570	RrqsgkYeyitelL
563 - 572	Kye...YitelIV
586 - 595	KgsvydYsn...L
954 - 964	Kasyv.Ygnda.L

Tabla 4.3.3. Posibles motivos de unión a Col en la secuencia de HlyA. Sitios CARC (K/R-(X₁₋₅)-Y/F-(X₁₋₅)-L/V) fueron identificados en la secuencia de HlyA utilizando el servidor ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>).

Se encontraron 13 sitios CARC en la secuencia primaria de HlyA, uno de los cuales se encuentra ubicado en el dominio de inserción de la toxina (CARC 341-353). Utilizando un servidor para predicción de estructura secundaria (JPred), se encontró que en la región donde se localiza este sitio CARC se encontrarían 2 α -hélices transmembrana, y el segmento RFKK correspondiente a los primeros residuos de este motivo (residuos 341-344), se localizaría en el extremo N-terminal de una de las α -hélices transmembranas predichas, lo cual lo convierte en un potencial dominio que podría interactuar con Col y de esta manera estabilizar las hélices.

Se realizó entonces un alineamiento de las secuencias primarias de distintas toxinas de la familia RTX y se encontró que este sitio es altamente conservado dentro de la familia (Figura 4.3.11).

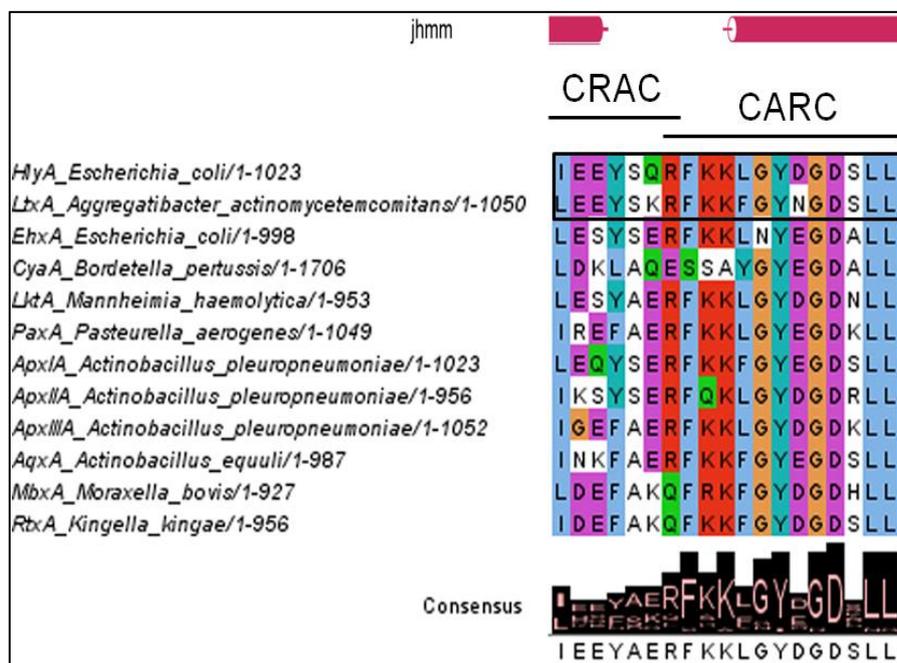


Figura 4.3.11. Alineamiento de secuencias de distintas toxinas RTX en el sitio CARC 341-353 de HlyA y las secuencias correspondientes a otros miembros de la familia RTX. El recuadro señala las similitudes entre HlyA y LtxA de *A. actinomycetemcomitans* donde se detecta la presencia de un sitio CARC seguido del CRAC 333-339 (de secuencia LEEYSKR) que ha sido reportado como responsable de la interacción con Col de esta toxina. En la parte superior de la figura puede observarse las dos α -hélices predichas en esta zona para HlyA según el servidor JPred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>). Los histogramas en la parte inferior del gráfico indican el grado de consenso en cada posición. Se utilizó el servidor CLUSTALW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) para realizar los alineamientos.

A partir de este análisis se sintetizó el péptido correspondiente al CARC 341-353 (CARC) y se midió su actividad hemolítica comparándola con la de HlyA.

Como se observa en la Figura 4.3.12, el péptido CARC presentó actividad hemolítica aunque a concentraciones mucho mayores que las requeridas para HlyA, lo cual es esperable si se considera que el péptido sólo posee ese sitio de interacción mientras que HlyA posee diversos dominios que intervienen en la interacción con la membrana y que potencian su actividad. El péptido CARC fue capaz de desestabilizar la membrana con lo cual estos resultados postulan al CARC 341-353 como un posible sitio de unión a Col en HlyA.

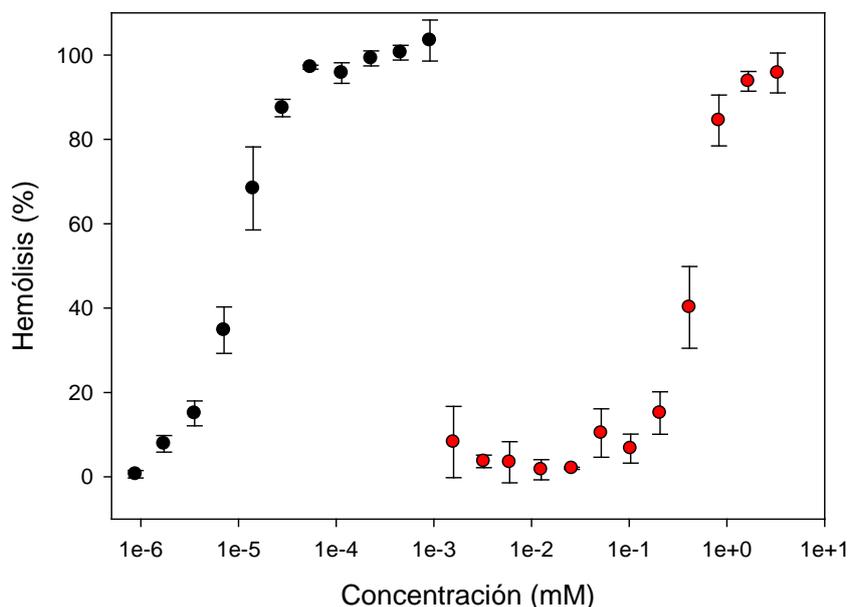


Figura 4.3.12. Actividad hemolítica de HlyA y péptido CARC en glóbulos rojos humanos. Se midió el porcentaje de hemólisis producido por HlyA (●) y el péptido CARC (●) en glóbulos rojos humanos luego de incubar 30 min a 37°C a las concentraciones indicadas. El porcentaje de hemólisis se calculó por medidas de liberación de hemoglobina. Los valores representan la media \pm SD, n=3.

Un motivo similar a este CARC de HlyA se encuentra presente en LtxA de *A. actinomycetemcomitans*, muy cerca del sitio CRAC que ha sido reportado como sitio de interacción con Col (Brown et al., 2013). De hecho, un sitio CRAC similar al encontrado en LtxA se encuentra presente en HlyA con la diferencia que este último posee un residuo de I en vez de una L en el extremo N-terminal (residuo 335) (Figura 4.3.11). Esto lleva a pensar que los sitios CRAC y CARC en la región comprendida entre los residuos 335 y 353, podrían constituir el dominio responsable de la interacción de HlyA con Col, lo que permitiría la estabilización de las α -hélices transmembrana predichas a ambos lados de estos motivos.

Discusión final y conclusiones

Discusión final y conclusiones

HlyA, al igual que cualquier PFT, interacciona con la membrana de la célula blanco donde finalmente genera poros produciendo un desbalance iónico en la célula. Como se pudo ver en el capítulo 3, los contactos iniciales de HlyA en bicapas con coexistencia de fases *Lo-Ld* se da a nivel de los bordes entre ambas fases. La concentración de defectos de empaquetamiento en estas zonas debido a las diferencias de alturas que existen entre las fases hace energéticamente favorable la interacción de HlyA con la membrana en esta región. Asimismo se ha reportado que el grado de hidratación en estas zonas es menor al del resto de la membrana lo cual también favorecería el proceso de interacción (Sheikh & Jarvis, 2011). HlyA no es la única toxina que presenta esta preferencia en cuanto a su interacción inicial con la membrana, se ha reportado que otras toxinas se localizan también en los bordes de los dominios. Sin embargo, en el caso de las actinoporinas por ejemplo, la unión de las toxinas a la interfase *Lo-Ld* produce una reducción de la tensión lineal entre las fases, que queda evidenciado tanto por una disminución en la diferencia de altura entre las fases como por cambios en la forma de dominios visualizados por AFM (Ros et al., 2013). Resultados similares se han encontrado para la interacción de la proteína proapoptótica Bax con membrana, lo que ha llevado a postular que una disminución en la tensión lineal podría ser una estrategia general en el mecanismo de interacción de las proteínas formadoras de poro con la membrana de sus células blanco (García-Saez et al., 2007). Sin embargo, los resultados obtenidos mediante AFM en este trabajo de tesis indican que la unión de HlyA a la zona de borde no produce cambios en la morfología de los dominios *Lo* ni modifica la diferencia de alturas entre las fases *Lo* y *Ld*. Esta diferencia encontrada en los efectos que genera la unión de HlyA respecto de lo que ocurre con otras PFTs podría deberse, al menos en parte, a su gran tamaño (110kDa) comparado, por ejemplo, con las actinoporinas (20kDa) o Bax (21kDa). Sin embargo, al analizar la inserción preferencial en una determinada fase, se observa que HlyA, al igual que muchas otras proteínas formadoras de poros, interacciona exclusivamente con membranas en fase *Ld*.

Los resultados obtenidos en el capítulo 4 indican que una vez en contacto con una membrana que contiene Col, HlyA es capaz de interactuar específicamente con el Col presentando en su secuencia potenciales sitios CRAC y CARC que podrían participar en dicha interacción. En este sentido, el Col en la membrana puede encontrarse formando complejos más o menos estables con los fosfolípidos. Como se mencionó, la interacción preferencial de HlyA ocurre con bicapas en fases *Ld*, que son

más fluidas y presentan mayor probabilidad de aparición de defectos transitorios, por lo que el Col estará más accesible en estas fases. Asimismo, el Col estará expuesto en las zonas de defectos entre las fases, lo que también puede contribuir a los primeros contactos con la membrana como se vio por AFM. Se comprobó que la interacción con Col aumenta la eficiencia de la actividad lítica de HlyA, probablemente a través de la estabilización del poro formado, generándose poros más estructurados, con menor probabilidad de cierre y de mayor tamaño en membranas con Col. Se ha reportado que la oligomerización de HlyA es un proceso progresivo donde inicialmente se forman preporos en la membrana y sería la fusión de estos preporos lo que daría lugar a la formación del poro lítico (Herlax et al., 2009). En dicho trabajo se encontró que la disminución del contenido de Col de la membrana de eritrocitos de carnero produce una alteración de la cinética de oligomerización, afectando la etapa de fusión de los preporos y, en consecuencia, la actividad lítica. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por BLM que indican que la presencia de Col conduce a la formación de poros de mayor diámetro y mayor estabilidad. Por lo que, similar a lo encontrado para las toxinas CDCs (Giddings et al., 2003), la interacción de HlyA con Col favorecería la inserción y fusión de preporos generando el poro lítico. Así, el Col, un componente obligado de las membranas de las células de mamíferos proporcionaría una vía de modulación y potenciación de la actividad lítica de la toxina.

Conclusiones:

- HlyA se inserta exclusivamente en las fases *Ld*
- Inicialmente, HlyA se inserta en la zona de defectos en los bordes de los dominios *Lo*, en aquellas membranas que presentan coexistencia de fases *Lo-Ld*
- Existe una interacción específica entre HlyA y el Col de las membranas
- La interacción HlyA- Col favorece el proceso lítico al estabilizar el poro formado por HlyA
- HlyA presenta en su secuencia primaria sitios CRAC y CARC potencialmente capaces de interactuar con Col
- El CARC 341-353 se postula como un posible candidato para la interacción de HlyA con Col.

Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

- Ahmed, S. N., Brown, D. A., & London, E. (1997). On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry*. 36(36): 10944-10953.
- Akatsuka, H., Kawai, E., Omori, K., Komatsubara, S., Shibatani, T., & Tosa, T. (1994). The lipA gene of *Serratia marcescens* which encodes an extracellular lipase having no N-terminal signal peptide. *J Bacteriol*. 176(7): 1949-1956.
- Alessandrini, A., & Facci, P. (2011). Unraveling lipid/protein interaction in model lipid bilayers by Atomic Force Microscopy. *J Mol Recognit*. 24(3): 387-396.
- Ali, S., Brockman, H. L., & Brown, R. E. (1991). Structural determinants of miscibility in surface films of galactosylceramide and phosphatidylcholine: effect of unsaturation in the galactosylceramide acyl chain. *Biochemistry*. 30(47): 11198-11205.
- Almeida, P.F.F., Pokorny, A. , & Hinderliter, A. (2005). Thermodynamics of membrane domains. *Biochim Biophys Acta*. 1720: 1-13.
- Alouf, J. E. (2000). Bacterial Protein Toxins. In O. Holst (Ed.), *Bacterial Toxins: Methods and Protocols* (Vol. 145, pp. 1-26): Humana Press.
- Alwarawrah, M., Dai, J., & Huang, J. (2010). A molecular view of the cholesterol condensing effect in DOPC lipid bilayers. *J Phys Chem B*. 114(22): 7516-7523.
- Allison, D. P., Mortensen, N. P., Sullivan, C. J., & Doktycz, M. J. (2010). Atomic force microscopy of biological samples. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2(6): 618-634.
- Anderluh, G., & Lakey, J. H. (2008). Disparate proteins use similar architectures to damage membranes. *Trends Biochem Sci*. 33(10): 482-490.
- Andersen, C., Koronakis, E., Bokma, E., Eswaran, J., Humphreys, D., Hughes, C., & Koronakis, V. (2002). Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(17): 11103-11108.
- Anderson, Travers H., Min, Younjin, Weirich, Kim L., Zeng, Hongbo, Fygenon, Deborah, & Israelachvili, Jacob N. (2009). Formation of Supported Bilayers on Silica Substrates. *Langmuir*. 25(12): 6997-7005.

- Bacia, K., Schuette, C. G., Kahya, N., Jahn, R., & Schwille, P. (2004). SNAREs prefer liquid-disordered over "raft" (liquid-ordered) domains when reconstituted into giant unilamellar vesicles. *J Biol Chem.* 279(36): 37951-37955.
- Bagatolli, L. A., & Mouritsen, O. G. (2013). Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing? *Front Plant Sci.* 4: 457.
- Baier, C. J., Fantini, J., & Barrantes, F. J. (2011). Disclosure of cholesterol recognition motifs in transmembrane domains of the human nicotinic acetylcholine receptor. *Sci Rep.* 1: 69.
- Bakás, L., Veiga, MP, Soloaga, A, Ostolaza, H, & Goñi, FM. (1998). Calcium-dependent conformation of E. coli alpha-haemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis. *Biochim Biophys Acta.* 1368(2): 225-234.
- Bakas, L., Chanturiya, A., Herlax, V., & Zimmerberg, J. (2006). Paradoxical lipid dependence of pores formed by the Escherichia coli alpha-hemolysin in planar phospholipid bilayer membranes. *Biophys J.* 91(10): 3748-3755.
- Bakas, L., Ostolaza, H., Vaz, W. L., & Goñi, F. M. (1996). Reversible adsorption and nonreversible insertion of Escherichia coli alpha-hemolysin into lipid bilayers. *Biophys J.* 71(4): 1869-1876.
- Bakrac, B., Gutierrez-Aguirre, I., Podlesek, Z., Sonnen, A. F., Gilbert, R. J., Macek, P., Anderluh, G. (2008). Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin. *J Biol Chem.* 283(27): 18665-18677.
- Balsalobre, C., Silvan, J.M., Berglund, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B.E., & Wai, S.N. (2006). Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 59: 99-112.
- Barlic, A. , Gutiérrez-Aguirre, I. , Caaveiro, J.M. , Cruz, A. , Ruiz-Argüello, M.B. , Pérez-Gil, J. , & González-Mañas, J.M. (2004). Lipid phase coexistence favors membrane insertion of equinatoxin-II, a pore-forming toxin from *Actinia equina*. *J Biol Chem.* 279(33): 34209-34216.
- Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K. M., & McKay, D. B. (1993). Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *EMBO J.* 12(9): 3357-3364.
- Bavdek, A., Kostanjsek, R., Antonini, V., Lakey, J. H., Dalla Serra, M., Gilbert, R. J., & Anderluh, G. (2012). pH dependence of listeriolysin O aggregation and pore-forming ability. *FEBS J.* 279(1): 126-141.

- Benz, R., Dobereiner, A., Ludwig, A., & Goebel, W. (1992). Haemolysin of *Escherichia coli*: comparison of pore-forming properties between chromosome and plasmid-encoded haemolysins. *FEMS Microbiol Immunol.* 5(1-3): 55-62.
- Bernheimer, A. W., & Rudy, B. (1986). Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochim Biophys Acta.* 864(1): 123-141.
- Besenicar, M., Macek, P., Lakey, J. H., & Anderluh, G. (2006). Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chem Phys Lipids.* 141(1-2): 169-178.
- Bhakdi, S., Muhly, M, Korom, S, & 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.
- Bhakdi, S., Greulich, S., Muhly, M., Eberspacher, B., Becker, H., Thiele, A., & Hugo, F. (1989). Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. *J Exp Med.* 169(3): 737-754.
- Boesze-Battaglia, K., Brown, A., Walker, L., Besack, D., Zekavat, A., Wrenn, S., Shenker, B. J. (2009). Cytotoxic distending toxin-induced cell cycle arrest of lymphocytes is dependent upon recognition and binding to cholesterol. *J Biol Chem.* 284(16): 10650-10658.
- Bowen, D. J., Rocheleau, T. A., Grutzmacher, C. K., Meslet, L., Valens, M., Marble, D., Blight, M. A. (2003). Genetic and biochemical characterization of PrtA, an RTX-like metalloprotease from *Photobacterium*. *Microbiology.* 149(Pt 6): 1581-1591.
- 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.
- Brahamsha, B. (1996). An abundant cell-surface polypeptide is required for swimming by the nonflagellated marine cyanobacterium *Synechococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(13): 6504-6509.
- Bretscher, M. S. (1972). Phosphatidyl-ethanolamine: differential labelling in intact cells and cell ghosts of human erythrocytes by a membrane-impermeable reagent. *J Mol Biol.* 71(3): 523-528.
- Brezesinski, Gerald, & Möhwald, Helmuth. (2003). Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science.* 100–102(0): 563-584.
- Brockman, H. (1999). Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr Opin Struct Biol.* 9(4): 438-443.

- Brown, A. C., Balashova, N. V., Epand, R. M., Epand, R. F., Bragin, A., Kachlany, S. C., Lally, E. T. (2013). Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin utilizes a cholesterol recognition/amino acid consensus site for membrane association. *J Biol Chem.* 288(32): 23607-23621.
- Brown, D. A., & London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14: 111-136.
- Cannon, Brian, Hermansson, Martin, Györke, Sandor, Somerharju, Pentti, Virtanen, Jorma A., & Cheng, Kwan Hon. (2003). Regulation of Calcium Channel Activity by Lipid Domain Formation in Planar Lipid Bilayers. *Biophys J.* 85(2): 933-942.
- Cavaliere, S. J., & Snyder, I. S. (1982). Effect of Escherichia coli alpha-hemolysin on human peripheral leukocyte viability in vitro. *Infect Immun.* 36(2): 455-461.
- Cole, Christian, Barber, Jonathan D., & Barton, Geoffrey J. (2008). The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research.* 36(2): 197-201.
- Cortajarena, A. L., Goñi, F. M., & Ostolaza, H. (2001). Glycophorin as a receptor for Escherichia coli alpha-hemolysin in erythrocytes. *J Biol Chem.* 276(16): 12513-12519.
- Cortajarena, A.L, Goñi, F.M., & Ostolaza, H. (2003). A receptor- binding region in Escherichia coli a-haemolysin. *J Biol Chem.* 278(21): 19159-19163.
- Crane, JonathanM, & Tamm, Lukask. (2007). Fluorescence Microscopy to Study Domains in Supported Lipid Bilayers. In A. Dopico (Ed.), *Methods in Membrane Lipids* (Vol. 400, pp. 481-488): Humana Press.
- Czajkowsky, D. M., Hotze, E. M., Shao, Z., & Tweten, R. K. (2004). Vertical collapse of a cytolysin prepore moves its transmembrane beta-hairpins to the membrane. *EMBO J.* 23(16): 3206-3215.
- Chaturvedi, U. C., Mathur, A., Khan, A. M., & Mehrotra, R. M. (1969). Cytotoxicity of filtrates of haemolytic Escherichia coli. *J Med Microbiol.* 2(3): 211-218.
- Chen, P., Toribara, T., & Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Anal Chem.* 28: 1756-1758.
- Cherif, A., Rezgui, W., Raddadi, N., Daffonchio, D., & Boudabous, A. (2008). Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from Bacillus thuringiensis subsp. Entomocidus HD110. *Microbiol Res.* 163(6): 684-692.
- Dahler, G. S., Barras, F., & Keen, N. T. (1990). Cloning of genes encoding extracellular metalloproteases from Erwinia chrysanthemi EC16. *J Bacteriol.* 172(10): 5803-5815.

- Daleke, D. L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res.* 44(2): 233-242.
- Davies, J. T.; Rideal, E. K. (1963). *Interfacial Phenomena.* Academic Press, New York.
- de Almeida, R.F., Fedorov, A. , & Prieto, M. (2003). Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys J.* 85: 2406-2416.
- De Colibus, L., Sonnen, A. F., Morris, K. J., Siebert, C. A., Abrusci, P., Plitzko, J., Gilbert, R. J. (2012). Structures of lysenin reveal a shared evolutionary origin for pore-forming proteins and its mode of sphingomyelin recognition. *Structure.* 20(9): 1498-1507.
- DeBoy, J. M., 2nd, Wachsmuth, I. K., & Davis, B. R. (1980). Hemolytic activity in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 12(2): 193-198.
- Dhakal, B. K., & Mulvey, M. A. (2012). The UPEC pore-forming toxin alpha-hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host Microbe.* 11(1): 58-69.
- Duncan, M. J., Shin, J. S., & Abraham, S. N. (2002). Microbial entry through caveolae: variations on a theme. *Cell Microbiol.* 4(12): 783-791.
- Duong, F., Soscia, C., Lazdunski, A., & Murgier, M. (1994). The *Pseudomonas fluorescens* lipase has a C-terminal secretion signal and is secreted by a three-component bacterial ABC-exporter system. *Mol Microbiol.* 11(6): 1117-1126.
- Epand, R. F., Mowery, B. P., Lee, S. E., Stahl, S. S., Lehrer, R. I., Gellman, S. H., & Epand, R. M. (2008). Dual mechanism of bacterial lethality for a cationic sequence-random copolymer that mimics host-defense antimicrobial peptides. *J Mol Biol.* 379(1): 38-50.
- Epand, R. M. (2006). Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains. *Prog Lipid Res.* 45(4): 279-294.
- Epand, R. M., & Epand, R. F. (2009). Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochim Biophys Acta.* 1788(1): 289-294.
- Epand, R. M., Rotem, S., Mor, A., Berno, B., & Epand, R. F. (2008). Bacterial membranes as predictors of antimicrobial potency. *J Am Chem Soc.* 130(43): 14346-14352.
- Escriba, P. V., Gonzalez-Ros, J. M., Goñi, F. M., Kinnunen, P. K., Vigh, L., Sanchez-Magraner, L., Barcelo-Coblijn, G. (2008). Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell Mol Med.* 12(3): 829-875.

- Escriba, P. V., Wedegaertner, P. B., Goñi, F. M., & Vogler, O. (2007). Lipid-protein interactions in GPCR-associated signaling. *Biochim Biophys Acta*. 1768(4): 836-852.
- Fanani, M. L., & Maggio, B. (2011). Liquid-liquid domain miscibility driven by composition and domain thickness mismatch in ternary lipid monolayers. *J Phys Chem B*. 115(1): 41-49.
- Fantini, J., & Barrantes, F. J. (2009). Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function. *Biochim Biophys Acta*. 1788(11): 2345-2361.
- Fantini, J., & Barrantes, F. J. (2013). How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Front Physiol*. 4: 31.
- Fastenberg, M. E., Shogomori, H., Xu, X., Brown, D. A., & London, E. (2003). Exclusion of a transmembrane-type peptide from ordered-lipid domains (rafts) detected by fluorescence quenching: extension of quenching analysis to account for the effects of domain size and domain boundaries. *Biochemistry*. 42(42): 12376-12390.
- Felmlee, T., Pellett, S., Lee, E. Y., & Welch, R. A. (1985). Escherichia coli hemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide. *J Bacteriol*. 163(1): 88-93.
- Felmlee, T., & Welch, R. A. (1988). Alterations of amino acid repeats in the Escherichia coli hemolysin affect cytolytic activity and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(14): 5269-5273.
- Fernandez-Ballester, G., Castresana, J., Fernandez, A. M., Arrondo, J. L., Ferragut, J. A., & Gonzalez-Ros, J. M. (1994). Role of cholesterol as a structural and functional effector of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem Soc Trans*. 22(3): 776-780.
- Fernandez, M. M., Bhattacharya, S., De Marzi, M. C., Brown, P. H., Kerzic, M., Schuck, P., Malchiodi, E. L. (2007). Superantigen natural affinity maturation revealed by the crystal structure of staphylococcal enterotoxin G and its binding to T-cell receptor Vbeta8.2. *Proteins*. 68(1): 389-402.
- Fernandez, M. M., De Marzi, M. C., Berguer, P., Burzyn, D., Langley, R. J., Piazzon, I., Malchiodi, E. L. (2006). Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. *Mol Immunol*. 43(7): 927-938.
- Flanagan, J. J., Tweten, R. K., Johnson, A. E., & Heuck, A. P. (2009). Cholesterol exposure at the membrane surface is necessary and sufficient to trigger perfringolysin O binding. *Biochemistry*. 48(18): 3977-3987.

- Folch, J., Lees, M., Sloan, E., & Standley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 226: 497-509.
- Gadeberg, O. V., Orskov, I., & Rhodes, J. M. (1983). Cytotoxic effect of an alpha-hemolytic *Escherichia coli* strain on human blood monocytes and granulocytes in vitro. *Infect Immun.* 41(1): 358-364.
- Gangola, P., & Rosen, B. P. (1987). Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 262(26): 12570-12574.
- Garcia-Saez, A. J., Chiantia, S., Salgado, J., & Schwille, P. (2007). Pore formation by a Bax-derived peptide: effect on the line tension of the membrane probed by AFM. *Biophys J.* 93(1): 103-112.
- Gascard, P., Tran, D., Sauvage, M., Sulpice, J. C., Fukami, K., Takenawa, T., Giraud, F. (1991). Asymmetric distribution of phosphoinositides and phosphatidic acid in the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1069(1): 27-36.
- Giddings, K. S., Johnson, A. E., & Tweten, R. K. (2003). Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolysins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(20): 11315-11320.
- Giddings, K. S., Zhao, J., Sims, P. J., & Tweten, R. K. (2004). Human CD59 is a receptor for the cholesterol-dependent cytolysin intermedilysin. *Nat Struct Mol Biol.* 11(12): 1173-1178.
- Gilbert, R. J. (2010). Cholesterol-dependent cytolysins. *Adv Exp Med Biol.* 677: 56-66.
- Gilbert, R. J., Dalla Serra, M., Froelich, C. J., Wallace, M. I., & Anderluh, G. (2014). Membrane pore formation at protein-lipid interfaces. *Trends Biochem Sci.* 39(11), 510-516.
- Giner-Casares, J.J. and Brezesinski, G. (2012). Brewster Angle Microscopy (BAM) for in situ characterization of ultrathin films at air/liquid interfaces. In M.-V. A. (Ed.), *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology*: Formatex.
- Goksu, E. I., Vanegas, J. M., Blanchette, C. D., Lin, W. C., & Longo, M. L. (2009). AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochim Biophys Acta.* 1788(1): 254-266.
- Gorter, E., & Grendel, F. (1925). On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med.* 41(4): 439-443.
- Graham DE, Phillips MC (1980). Proteins at liquid interfaces.IV. Dilatational properties. *J. Colloid Interface Sci.* 76: 227-239.

- Gray, L., Baker, K., Kenny, B., Mackman, N., Haigh, R., & Holland, I. B. (1989). A novel C-terminal signal sequence targets Escherichia coli haemolysin directly to the medium. *J Cell Sci Suppl.* 11: 45-57.
- Gray, L., Mackman, N., Nicaud, J. M., & Holland, I. B. (1986). The carboxy-terminal region of haemolysin 2001 is required for secretion of the toxin from Escherichia coli. *Mol Gen Genet.* 205(1): 127-133.
- Grimminger, F., Scholz, C., Bhakdi, S., & Seeger, W. (1991). Subhemolytic doses of Escherichia coli hemolysin evoke large quantities of lipoxygenase products in human neutrophils. *J Biol Chem.* 266(22): 14262-14269.
- Guo, L., Smith-Dupont, K. B., & Gai, F. (2011). Diffusion as a probe of peptide-induced membrane domain formation. *Biochemistry.* 50(12): 2291-2297.
- Guzmán, Fanny, Barberis, Sonia, & Illanes, Andrés. (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology.* 10(2)
- Haberland, M. E., & Reynolds, J. A. (1973). Self-association of cholesterol in aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70(8): 2313-2316.
- Hamilton, J. A. (2003). Fast flip-flop of cholesterol and fatty acids in membranes: implications for membrane transport proteins. *Curr Opin Lipidol.* 14(3): 263-271.
- Hancock, John F. (2006). Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(6): 456-462.
- Hardie, K. R., Issartel, J. P., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (1991). In vitro activation of Escherichia coli prohaemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and a low molecular-weight cytosolic polypeptide. *Mol Microbiol.* 5(7): 1669-1679.
- Heerklotz, H. (2002). Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys J.* 83(5): 2693-2701.
- Herlax V, Henning MF, Bernasconi AM, Goñi FM, Bakás L. (2010). The lytic mechanism of Escherichia coli α -hemolysin associated to outer membrane vesicles. *Health.* 2(5): 484-492.
- Herlax, V., & Bakas, L. (2003). Acyl chains are responsible for the irreversibility in the Escherichia coli alpha-hemolysin binding to membranes. *Chem Phys Lipids.* 122(1-2): 185-190.
- Herlax, V., & Bakas, L. (2007). Fatty acids covalently bound to alpha-hemolysin of Escherichia coli are involved in the molten globule conformation: implication of disordered regions in binding promiscuity. *Biochemistry.* 46(17): 5177-5184.

- Herlax, V., Mate, S., Rimoldi, O., & Bakas, L. (2009). Relevance of fatty acid covalently bound to Escherichia coli alpha-hemolysin and membrane microdomains in the oligomerization process. *J Biol Chem.* 284(37): 25199-25210.
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.* 8: 67-113.
- Hoening, Dirk, & Moebius, Dietmar. (1991). Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. *J Phys Chem.* 95(12): 4590-4592.
- Holland, I. B., Blight, M. A., & Kenny, B. (1990). The mechanism of secretion of hemolysin and other polypeptides from gram-negative bacteria. *J Bioenerg Biomembr.* 22(3): 473-491.
- Huang, J., Buboltz, J. T., & Feigenson, G. W. (1999). Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 1417(1): 89-100.
- Hui, D., Morden, C., Zhang, F., & Ling, V. (2000). Combinatorial analysis of the structural requirements of the Escherichia coli hemolysin signal sequence. *J Biol Chem.* 275(4): 2713-2720.
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 14(1): 33-38, 27-38.
- Hung, W. C., Lee, M. T., Chen, F. Y., & Huang, H. W. (2007). The condensing effect of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys J.* 92(11): 3960-3967.
- Hyland, C., Vuillard, L., Hughes, C., & Koronakis, V. (2001). Membrane interaction of Escherichia coli hemolysin: flotation and insertion-dependent labeling by phospholipid vesicles. *J Bacteriol.* 183(18): 5364-5370.
- Ipsen, J. H., Karlstrom, G., Mouritsen, O. G., Wennerstrom, H., & Zuckermann, M. J. (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta.* 905(1): 162-172.
- Israelachvili, Jacob N. (Ed.). (1992). *Intermolecular and Surface Forces* (2nd edition ed.). London: Academic Press.
- Issartel, J. P., Koronakis, V., & Hughes, C. (1991). Activation of Escherichia coli prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature.* 351(6329): 759-761.
- Jafurulla, M., Tiwari, S., & Chattopadhyay, A. (2011). Identification of cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) motif in G-protein coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 404(1): 569-573.

- Janmey, P. A., & Kinnunen, P. K. (2006). Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol.* 16(10): 538-546.
- Janosch, Sascha, Nicolini, Chiara, Ludolph, Björn, Peters, Carsten, Völkert, Martin, Hazlet, Theodore L., Winter, Roland. (2004). Partitioning of Dual-Lipidated Peptides into Membrane Microdomains: Lipid Sorting vs Peptide Aggregation. *J Am Chem Soc.* 126(24): 7496-7503.
- Jass, J., Tjarnhage, T., & Puu, G. (2000). From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys J.* 79(6): 3153-3163.
- Jean-Francois, F., Castano, S., Desbat, B., Odaert, B., Roux, M., Metz-Boutigue, M. H., & Dufourc, E. J. (2008). Aggregation of cateslytin beta-sheets on negatively charged lipids promotes rigid membrane domains. A new mode of action for antimicrobial peptides? *Biochemistry.* 47(24): 6394-6402.
- Johnsson, B., Lofas, S., & Lindquist, G. (1991). Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem.* 198(2): 268-277.
- Keane, W. F., Welch, R., Gekker, G., & Peterson, P. K. (1987). Mechanism of *Escherichia coli* alpha-hemolysin-induced injury to isolated renal tubular cells. *Am J Pathol.* 126(2): 350-357.
- Kenny, B., Chervaux, C., & Holland, I. B. (1994). Evidence that residues -15 to -46 of the haemolysin secretion signal are involved in early steps in secretion, leading to recognition of the translocator. *Mol Microbiol.* 11(1): 99-109.
- Kenny, B., Taylor, S., & Holland, I. B. (1992). Identification of individual amino acids required for secretion within the haemolysin (HlyA) C-terminal targeting region. *Mol Microbiol.* 6(11): 1477-1489.
- Khalid, Mohammed Awad Ali. (2013). *Membrane Electrochemistry: Electrochemical Processes in Bilayer Lipid Membrane*. Electrochemistry, Dr. Khalid (Ed), Intech. DOI: 10.5772/55507.
- Korchev, Y. E., Bashford, C. L., Pederzoli, C., Pasternak, C. A., Morgan, P. J., Andrew, P. W., & Mitchell, T. J. (1998). A conserved tryptophan in pneumolysin is a determinant of the characteristics of channels formed by pneumolysin in cells and planar lipid bilayers. *Biochem J.* 329(3): 571-577.
- Koronakis, V. (2003). TolC- the bacterial exit duct for proteins and drugs. *FEBS Lett.* 555(1): 66-71.
- Koronakis, V., Koronakis, E., & Hughes, C. (1989). Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes. *EMBO J.* 8(2): 595-605.

- Koronakis, V., Li, J., Koronakis, E., & Stauffer, K. (1997). Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. *Mol Microbiol.* 23: 617-626.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., & Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature.* 405(6789): 914-919.
- Kudryashov, D. S., Durer, Z. A., Ytterberg, A. J., Sawaya, M. R., Pashkov, I., Prochazkova, K., Reisler, E. (2008). Connecting actin monomers by iso-peptide bond is a toxicity mechanism of the *Vibrio cholerae* MARTX toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(47): 18537-18542.
- Kwiatkowska, K., Hordejuk, R., Szymczyk, P., Kulma, M., Abdel-Shakor, A. B., Plucienniczak, A., Sobota, A. (2007). Lysenin-His, a sphingomyelin-recognizing toxin, requires tryptophan 20 for cation-selective channel assembly but not for membrane binding. *Mol Membr Biol.* 24(2): 121-134.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259): 680-685.
- Lagerholm, B. C., Weinreb, G. E., Jacobson, K., & Thompson, N. L. (2005). Detecting microdomains in intact cell membranes. *Annu Rev Phys Chem.* 56: 309-336.
- Lai, C. H., Lai, C. K., Lin, Y. J., Hung, C. L., Chu, C. H., Feng, C. L., Su, H. L. (2013). Characterization of putative cholesterol recognition/interaction amino acid consensus-like motif of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin C. *PLoS One.* 8(6): e66202.
- Lally, E. T., Kieba, I. R., Sato, A., Green, C. L., Rosenbloom, J., Korostoff, J., Billings, P. C. (1997). RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol Chem.* 272(48): 30463-30469.
- Langston, K. G., Worsham, L. M., Earls, L., & Ernst-Fonberg, M. L. (2004). Activation of hemolysin toxin: relationship between two internal protein sites of acylation. *Biochemistry.* 43(14): 4338-4346.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23(21): 2947-2948.
- Lee, A. G. (2003). Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta.* 1612(1): 1-40.
- Lee, M., Jun, S. Y., Yoon, B. Y., Song, S., Lee, K., & Ha, N. C. (2012). Membrane fusion proteins of type I secretion system and tripartite efflux pumps share a binding motif for TolC in gram-negative bacteria. *PLoS One.* 7(7): e40460.

- Lehtonen, J. Y., Holopainen, J. M., & Kinnunen, P. K. (1996). Evidence for the formation of microdomains in liquid crystalline large unilamellar vesicles caused by hydrophobic mismatch of the constituent phospholipids. *Biophys J.* 70(4): 1753-1760.
- Levental, I., Grzybek, M., & Simons, K. (2010). Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry.* 49(30): 6305-6316.
- Li, H., & Papadopoulos, V. (1998). Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology.* 139(12): 4991-4997.
- Liao, C. H., & McCallus, D. E. (1998). Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Appl Environ Microbiol.* 64(3): 914-921.
- Lichtenberg, D., Goñi, F.M. , & Heerklotz, H. (2005). Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci.* 30: 430-436.
- Lim, K. B., Walker, C. R., Guo, L., Pellett, S., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Hackett, M. (2000). Escherichia coli alpha-hemolysin (HlyA) is heterogeneously acylated in vivo with 14-, 15-, and 17-carbon fatty acids. *J Biol Chem.* 275(47): 36698-36702.
- Lin, C. D., Lai, C. K., Lin, Y. H., Hsieh, J. T., Sing, Y. T., Chang, Y. C., Lai, C. H. (2011). Cholesterol depletion reduces entry of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin and attenuates intoxication of host cells. *Infect Immun.* 79(9): 3563-3575.
- Lin, W. C., Blanchette, C. D., Ratto, T. V., & Longo, M. L. (2007). Lipid domains in supported lipid bilayer for atomic force microscopy. *Methods Mol Biol.* 400: 503-513.
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 327(5961): 46-50.
- Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Sebo, P. (2010). RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev.* 34(6): 1076-1112.
- London, E., & Brown, D. A. (2000). Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta.* 1508(1-2): 182-195.

- Ludwig, A., Benz, R., & Goebel, W. (1993). Oligomerization of Escherichia coli haemolysin (HlyA) is involved in pore formation. *Mol Gen Genet.* 241(1-2): 89-96.
- Ludwig, A., Garcia, F., Bauer, S., Jarchau, T., Benz, R., Hoppe, J., & Goebel, W. (1996). Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from Escherichia coli. *J Bacteriol.* 178(18): 5422-5430.
- Ludwig, A., Jarchau, T., Benz, R., & Goebel, W. (1988). The repeat domain of Escherichia coli haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca²⁺-dependent binding to erythrocytes. *Mol Gen Genet.* 214(3): 553-561.
- Ludwig, A., Vogel, M., & Goebel, W. (1987). Mutations affecting activity and transport of haemolysin in Escherichia coli. *Mol Gen Genet.* 206(2): 238-245.
- Mabrey, S., Mateo, P. L., & Sturtevant, J. M. (1978). High-sensitivity scanning calorimetric study of mixtures of cholesterol with dimyristoyl- and dipalmitoylphosphatidylcholines. *Biochemistry.* 17(12): 2464-2468.
- Madeira, A., Ohman, E., Nilsson, A., Sjögren, B., Andrén, P. E. & Svenningsson, P. (2009). Coupling surface plasmon resonance to mass spectrometry to discover novel protein-protein interactions. *Nat. Protocols.* 4(7): 1023-1037.
- Maget-Dana, R. (1999). The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1462(1-2): 109-140.
- Manes, S., del Real, G., & Martinez, A. C. (2003). Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol.* 3(7): 557-568.
- Maniatis, T., Fritsch, E., & Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning.* New York.: Cold Spring Harbor laboratory Press.
- Marchioretto, M., Podobnik, M., Dalla Serra, M., & Anderluh, G. (2013). What planar lipid membranes tell us about the pore-forming activity of cholesterol-dependent cytolysins. *Biophys Chem.* 182: 64-70.
- Marguet, D., Lenne, P. F., Rigneault, H., & He, H. T. (2006). Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *EMBO J.* 25(15): 3446-3457.
- Marsh, D. (1996). Lateral pressure in membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1286(3): 183-223.
- Marsh, D. (2009). Cholesterol-induced fluid membrane domains: a compendium of lipid-raft ternary phase diagrams. *Biochim Biophys Acta.* 1788(10): 2114-2123.

- Mate, S., Busto, J. V., Garcia-Arribas, A. B., Sot, J., Vazquez, R., Herlax, V., Goñi, F. M. (2014). N-nervonoylsphingomyelin (c24:1) prevents lateral heterogeneity in cholesterol-containing membranes. *Biophys J.* 106(12): 2606-2616.
- McCarren, J., Heuser, J., Roth, R., Yamada, N., Martone, M., & Brahamsha, B. (2005). Inactivation of swmA results in the loss of an outer cell layer in a swimming synechococcus strain. *J Bacteriol.* 187(1): 224-230.
- McConnell, H M. (1991). Structures and Transitions in Lipid Monolayers at the Air-Water Interface. *Annu Rev Phys Chem.* 42(1): 171-195.
- McIntosh, T. J., Vidal, A., & Simon, S. A. (2003). Sorting of lipids and transmembrane peptides between detergent-soluble bilayers and detergent-resistant rafts. *Biophys J.* 85(3): 1656-1666.
- Méléard, Philippe, Bagatolli, Luis A., & Pott, Tanja. (2009). Chapter 9 - Giant Unilamellar Vesicle Electroformation: From Lipid Mixtures to Native Membranes Under Physiological Conditions. In D. Nejat (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 465, pp. 161-176): Academic Press.
- Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Roth, M. G., & Brown, D. A. (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(6): 3910-3917.
- Menestrina, G., DallaSerra, M., Pederzoli, C., Bregante, M., & Gambale, F. (1995). Bacterial hemolysins and leukotoxins affect target cells by forming large exogenous pores into their plasma: *Escherichia coli* hemolysin A as a case example. *Biosci. Rep.* 15: 543-551.
- Menestrina, G., Pederzoli, C., Dalla Serra, M., Bregante, M., & Gambale, F. (1996). Permeability increase induced by *Escherichia coli* hemolysin A in human macrophages is due to the formation of ionic pores: a patch clamp characterization. *J Membr Biol.* 149(2): 113-121.
- Menestrina, G., & Ropele, M. (1989). Voltage-dependent gating properties of the channel formed by *E. coli* hemolysin in planar lipid membranes. *Biosci Rep.* 9(4): 465-473.
- Miller, C. E., Majewski, J., & Kuhl, T. L. (2006). Characterization of single biological membranes at the solid-liquid interface by X-ray reflectivity. *Colloids Surf., A.* 284-285(0), 434-439.
- Mingeot-Leclercq, Marie-Paule, Deleu, Magali, Brasseur, Robert, & Dufrene, Yves F. (2008). Atomic force microscopy of supported lipid bilayers. *Nat. Protocols.* 3(10): 1654-1659.

- Moayeri, M., & Welch, R. A. (1994). Effects of temperature, time, and toxin concentration on lesion formation by the *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun.* 62(10): 4124-4134.
- Moayeri, M., & Welch, R. A. (1997). Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun.* 65(6): 2233-2239.
- Mohwald, H., Dietrich, A., Bohm, C., Brezesinski, G., & Thoma, M. (1995). Domain formation in monolayers. *Mol Membr Biol.* 12(1): 29-38.
- Morova, J., Osicka, R., Masin, J., & Sebo, P. (2008). RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(14): 5355-5360.
- Mouritsen, O. G. (2011). Lipids, curvature, and nano-medicine. *Eur J Lipid Sci Technol.* 113(10): 1174-1187.
- Mouritsen, O. G., & Zuckermann, M. J. (2004). What's so special about cholesterol? *Lipids.* 39(11): 1101-1113.
- Mouritsen, Ole G. (Ed.). (2005). *Life - As a Matter of Fat*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., & Wescott, W. C. (1962). Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature.* 194: 979-980.
- Müller, Daniel J., Engel, Andreas, Matthey, Ulrich, Meier, Thomas, Dimroth, Peter, & Suda, Kitaru. (2003). Observing Membrane Protein Diffusion at Subnanometer Resolution. *J Mol Biol.* 327(5): 925-930.
- Nagamatsu, K., Hannan, T. J., Guest, R. L., Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Binkley, J., Hultgren, S. J. (2015). Dysregulation of *Escherichia coli* alpha-hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(8): 871-880.
- Nicaud, J. M., Mackman, N., Gray, L., & Holland, I. B. (1986). The C-terminal, 23 kDa peptide of *E. coli* haemolysin 2001 contains all the information necessary for its secretion by the haemolysin (Hly) export machinery. *FEBS Lett.* 204(2): 331-335.
- Nicolini, C., Baranski, J., Schlummer, S., Palomo, J., Lumbierres-Burgues, M., Kahms, M., Winter, R. (2006). Visualizing association of N-ras in lipid microdomains: influence of domain structure and interfacial adsorption. *J Am Chem Soc.* 128(1): 192-201.

- Nieto, J., Hughes, C., Bailey, M., & 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.
- Nikolaus, J., Scolari, S., Bayraktarov, E., Jungnick, N., Engel, S., Pia Plazzo, A., Herrmann, A. (2010). Hemagglutinin of influenza virus partitions into the nonraft domain of model membranes. *Biophys J.* 99(2): 489-498.
- Nishio, Motohiro, Umezawa, Yoji, Fantini, Jacques, Weiss, Manfred S., & Chakrabarti, Pinak. (2014). CH-[small pi] hydrogen bonds in biological macromolecules. *Phys Chem Chem Phys.* 16(25): 12648-12683.
- Oda, M., Takahashi, M., Matsuno, T., Uoo, K., Nagahama, M., & Sakurai, J. (2010). Hemolysis induced by Bacillus cereus sphingomyelinase. *Biochim Biophys Acta.* 1798(6): 1073-1080.
- Oddi, S., Dainese, E., Fezza, F., Lanuti, M., Barcaroli, D., De Laurenzi, V., Maccarrone, M. (2011). Functional characterization of putative cholesterol binding sequence (CRAC) in human type-1 cannabinoid receptor. *J Neurochem.* 116(5): 858-865.
- Olsen, B. N., Bielska, A. A., Lee, T., Daily, M. D., Covey, D. F., Schlesinger, P. H., Ory, D. S. (2013). The Structural Basis of Cholesterol Accessibility in Membranes. *Biophys J.* 105(8): 1838-1847.
- Op den Kamp, J. A. (1979). Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem.* 48: 47-71.
- Oresnik, I. J., Twelker, S., & Hynes, M. F. (1999). Cloning and characterization of a Rhizobium leguminosarum gene encoding a bacteriocin with similarities to RTX toxins. *Appl Environ Microbiol.* 65(7): 2833-2840.
- Ostolaza, H., Bartolome, B., Ortiz de Zarate, I., de la Cruz, F., & Goñi, F. M. (1993). Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin alpha-haemolysin. *Biochim Biophys Acta.* 1147(1): 81-88.
- Ostolaza, H., & 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(3): 303-306.
- Parker, M. W., & Feil, S. C. (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol.* 88(1): 91-142.
- Pellett, S., & Welch, R. A. (1996). Escherichia coli hemolysin mutants with altered target cell specificity. *Infect Immun.* 64(8): 3081-3087.
- Pichot, R., Watson, R. L., & Norton, I. T. (2013). Phospholipids at the interface: current trends and challenges. *Int J Mol Sci.* 14(6): 11767-11794.

- Pike, L. J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res.* 44(4): 655-667.
- Pokorny, A., Birkbeck, T. H., & Almeida, P. F. (2002). Mechanism and kinetics of delta-lysine interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry.* 41(36): 11044-11056.
- Pokorny, Antje, & Almeida, Paulo F. F. (2005). Permeabilization of Raft-Containing Lipid Vesicles by δ -Lysine: A Mechanism for Cell Sensitivity to Cytotoxic Peptides. *Biochemistry.* 44(27): 9538-9544.
- Praper, T., Sonnen, A., Viero, G., Kladnik, A., Froelich, C. J., Anderluh, G., Gilbert, R. J. (2011). Human perforin employs different avenues to damage membranes. *J Biol Chem.* 286(4): 2946-2955.
- Richter, Ralf P., & Brisson, Alain R. (2005). Following the Formation of Supported Lipid Bilayers on Mica: A Study Combining AFM, QCM-D, and Ellipsometry. *Biophys J.* 88(5): 3422-3433.
- Ritzefeld, M., & Sewald, N. (2012). Real-Time Analysis of Specific Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance. *J Amino Acids.* 2012: 816032.
- Robinson, L. E., Shridar, M., Smith, P., & Murrell-Lagnado, R. D. (2014). Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization. *J Biol Chem.* 289(46): 31983-31994.
- Ros, U., Edwards, M. A., Epand, R. F., Lanio, M. E., Schreier, S., Yip, C. M., Epand, R. M. (2013). The sticholysin family of pore-forming toxins induces the mixing of lipids in membrane domains. *Biochim Biophys Acta.* 1828(11): 2757-2762.
- Rose, I. A., Hanson, K. R., Wilkinson, K. D., & Wimmer, M. J. (1980). A suggestion for naming faces of ring compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(5): 2439-2441.
- Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J., & Ladant, D. (1995). Interaction of calcium with Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem.* 270(44): 26370-26376.
- Sanchez-Magraner, L., Cortajarena, A. L., Goñi, F. M., & Ostolaza, H. (2006). Membrane insertion of Escherichia coli alpha-hemolysin is independent from membrane lysis. *J Biol Chem.* 281(9): 5461-5467.
- Sanchez-Magraner, L., Viguera, A. R., Garcia-Pacios, M., Garcillan, M. P., Arrondo, J. L., de la Cruz, F., Ostolaza, H. (2007). The calcium-binding C-terminal domain of Escherichia coli alpha-hemolysin is a major determinant in the surface-active properties of the protein. *J Biol Chem.* 282(16): 11827-11835.
- Satchell, K. J. (2007). MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins. *Infect Immun.* 75(11): 5079-5084.

- Satchell, K. J. (2011). Structure and function of MARTX toxins and other large repetitive RTX proteins. *Annu Rev Microbiol.* 65: 71-90.
- Schön, Peter, García-Sáez, Ana J., Malovrh, Petra, Bacia, Kirsten, Anderluh, Gregor, & Schulle, Petra. (2008). Equinatoxin II Permeabilizing Activity Depends on the Presence of Sphingomyelin and Lipid Phase Coexistence. *Biophys J.* 95(2): 691-698.
- Schulein, R., Gentschev, I., Mollenkopf, H. J., & Goebel, W. (1992). A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Mol Gen Genet.* 234(1): 155-163.
- Sheikh, K. H., & Jarvis, S. P. (2011). Crystalline hydration structure at the membrane-fluid interface of model lipid rafts indicates a highly reactive boundary region. *J Am Chem Soc.* 133(45): 18296-18303.
- Sigrist, C. J., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P. (2002). PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform.* 3(3): 265-274.
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(1): 31-39.
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175(4023): 720-731.
- Soloaga A, Ostolaza H, Goñi F, de la Cruz F. (1996). Purification of Escherichia coli pro-haemolysin, and a comparison with the properties of mature alpha-haemolysin. *Eur J Biochem.* 238(2): 418-422.
- Soloaga, A., Veiga, M. P., Garcia-Segura, L. M., Ostolaza, H., Brasseur, R., & Goñi, F. M. (1999). Insertion of Escherichia coli alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol.* 31(4): 1013-1024.
- Songer, J. G. (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol,* 5(4), 156-161.
- Sotomayor-Perez, A. C., Ladant, D., & Chenal, A. (2011). Calcium-induced folding of intrinsically disordered repeat-in-toxin (RTX) motifs via changes of protein charges and oligomerization states. *J Biol Chem.* 286(19): 16997-17004.
- Sotomayor-Perez, A. C., Subrini, O., Hessel, A., Ladant, D., & Chenal, A. (2013). Molecular crowding stabilizes both the intrinsically disordered calcium-free state and the folded calcium-bound state of a repeat in toxin (RTX) protein. *J Am Chem Soc.* 135(32): 11929-11934.

- Stanley, P., Hyland, C., Koronakis, V., & Hughes, C. (1999). An ordered reaction mechanism for bacterial toxin acylation by the specialized acyltransferase HlyC: formation of a ternary complex with acylACP and protoxin substrates. *Mol Microbiol.* 34(5): 887-901.
- Stanley, P., Koronakis, V., Hardie, K., & Hughes, C. (1996). Independent interaction of the acyltransferase HlyC with two maturation domains of the Escherichia coli toxin HlyA. *Mol Microbiol.* 20(4): 813-822.
- Stanley, P., Koronakis, V., & Hughes, C. (1991). Mutational analysis supports a role for multiple structural features in the C-terminal secretion signal of Escherichia coli haemolysin. *Mol Microbiol.* 5(10): 2391-2403.
- Stanley, P., Koronakis, V., & Hughes, C. (1998). Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: A unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 309-333.
- Stanley, P., Packman, L. C., Koronakis, V., & Hughes, C. (1994). Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of Escherichia coli hemolysin. *Science.* 266(5193): 1992-1996.
- Steck, T. L., & Lange, Y. (2012). How slow is the transbilayer diffusion (flip-flop) of cholesterol? *Biophys J.* 102(4): 945-946.
- Steck, Theodore L., Ye, Jin, & Lange, Yvonne. (2002). Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin. *Biophys J.* 83(4): 2118-2125.
- Stenberg, Esa, Persson, Björn, Roos, Håkan, & Urbaniczky, Csaba. (1991). Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *Journal of Colloid and Interface Science.* 143(2): 513-526.
- Stonehouse, M. J., Cota-Gomez, A., Parker, S. K., Martin, W. E., Hankin, J. A., Murphy, R. C., Vasil, M. L. (2002). A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol Microbiol.* 46(3): 661-676.
- Strandberg, E., & Killian, J. A. (2003). Snorkeling of lysine side chains in transmembrane helices: how easy can it get? *FEBS Lett.* 544(1-3): 69-73.
- Sugawara, M., Haramaki, R., Nonaka, S., Ezura, H., Okazaki, S., Eda, S., Minamisawa, K. (2007). Rhizobitoxine production in *Agrobacterium tumefaciens* C58 by *Bradyrhizobium elkanii* rtxACDEFG genes. *FEMS Microbiol Lett.* 269(1): 29-35.
- Sullan, R. M., Li, J. K., Hao, C., Walker, G. C., & Zou, S. (2010). Cholesterol-dependent nanomechanical stability of phase-segregated multicomponent lipid bilayers. *Biophys J.* 99(2): 507-516.

- Suttorp, N., Floer, B., Schnittler, H., Seeger, W., & Bhakdi, S. (1990). Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect Immun.* 58(11): 3796-3801.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C., & 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. *EMBO J.* 17(22): 6487-6496.
- Thomas, S., Bakkes, P. J., Smits, S. H., & Schmitt, L. (2014). Equilibrium folding of pro-HlyA from *Escherichia coli* reveals a stable calcium ion dependent folding intermediate. *Biochim Biophys Acta.* 1844(9): 1500-1510.
- Trent, M. S., Worsham, L. M., & Ernst-Fonberg, M. L. (1998). The biochemistry of hemolysin toxin activation: characterization of HlyC, an internal protein acyltransferase. *Biochemistry.* 37(13): 4644-4652.
- Valeva, A., Hellmann, N., Walev, I., Strand, D., Plate, M., Boukhallouk, F., 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(36): 26014-26021.
- Valeva, A., Walev, I., Kemmer, H., Weis, S., Siegel, I, Boukhallouk, F., Bhakdi, S. (2005). Binding of *Escherichia coli* Hemolysin and Activation of the Target Cells is Not Receptor-dependent. *J Biol Chem.* 280: 36657-36663.
- van der Goot, F. G., & Harder, T. (2001). Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol.* 13(2): 89-97.
- Vázquez-Boland, José A., Kuhn, Michael, Berche, Patrick, Chakraborty, Trinad, Domínguez-Bernal, Gustavo, Goebel, Werner, Kreft, Jürgen. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev.* 14(3): 584-640.
- Vereb, G., Szollosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Damjanovich, S. (2003). Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(14): 8053-8058.
- Verkleij, A. J., Zwaal, R. F., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D., & van Deenen, L. L. (1973). The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta.* 323(2): 178-193.
- Vidal, Adriana, & McIntosh, Thomas J. (2005). Transbilayer Peptide Sorting between Raft and Nonraft Bilayers: Comparisons of Detergent Extraction and Confocal Microscopy. *Biophys J.* 89(2): 1102-1108.

- Vincent, N., Genin, C., & Malvoisin, E. (2002). Identification of a conserved domain of the HIV-1 transmembrane protein gp41 which interacts with cholesteryl groups. *Biochim Biophys Acta*. 1567(1-2): 157-164.
- Wagner, W., Vogel, M., & Goebel, W. (1983). Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions. *J Bacteriol*. 154(1): 200-210.
- Walde, P., Cosentino, K., Engel, H., & Stano, P. (2010). Giant vesicles: preparations and applications. *Chembiochem*. 11(7): 848-865.
- Weise, K., Triola, G., Janosch, S., Waldmann, H., & Winter, R. (2010). Visualizing association of lipidated signaling proteins in heterogeneous membranes-partitioning into subdomains, lipid sorting, interfacial adsorption, and protein association. *Biochim Biophys Acta*. 1798(7): 1409-1417.
- 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. A. (1991). Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol*. 5(3): 521-528.
- White, S. H., & Wimley, W. C. (1999). Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 28: 319-365.
- Wiles, T. J., Bower, J. M., Redd, M. J., & Mulvey, M. A. (2009). Use of zebrafish to probe the divergent virulence potentials and toxin requirements of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog*. 5(12): e1000697.
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*. 85(1): 11-19.
- Woods, R. G., Burger, M., Beven, C. A., & Beacham, I. R. (2001). The aprX-lipA operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: a molecular analysis of metalloprotease and lipase production. *Microbiology*. 147(2): 345-354.
- Worsham, L. M., Langston, K. G., & Ernst-Fonberg, M. L. (2005). Thermodynamics of a protein acylation: activation of *Escherichia coli* hemolysin toxin. *Biochemistry*. 44(4): 1329-1337.
- Worsham, L. M., Trent, M. S., Earls, L., Jolly, C., & Ernst-Fonberg, M. L. (2001). Insights into the catalytic mechanism of HlyC, the internal protein acyltransferase that activates *Escherichia coli* hemolysin toxin. *Biochemistry*. 40(45): 13607-13616.

- Yamaji, A., Sekizawa, Y., Emoto, K., Sakuraba, H., Inoue, K., Kobayashi, H., & Umeda, M. (1998). Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *J Biol Chem.* 273(9): 5300-5306.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods.* 12(1): 7-8.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Wiedenmann, A., Benabdelhak, H., Holland, I. B., & Schmitt, L. (2005). Functional characterization and ATP-induced dimerization of the isolated ABC-domain of the haemolysin B transporter. *Biochemistry.* 44(28): 9680-9690.