



ARTÍCULO ORIGINAL

Importancia de la Pro80 para la interacción con membranas y la formación de poros de la sticholisina I, una toxina de *Stichodactyla helianthus* (Anthozoa: Stichodactylidae)

Relevance of Pro80 for membrane interaction and pore formation by Sticholysin I, a toxin from Stichodactyla helianthus (Anthozoa: Stichodactylidae)

Yadira de la Patria Hervis Valdés*, Aisel Valle Garay, Liem Canet Santos, Carlos Manuel Álvarez Valcárcel, María Eliana Lanio Ruiz e Isabel Fabiola Pazos Santos

Departamento Bioquímica-CEP,
Facultad de Biología, Universidad
de La Habana, La Habana, Cuba

* Autor para correspondencia:
patria@fbio.uh.cu

RESUMEN

La sticholisina I (StI) es una actinoporina producida por la anémona de mar *Stichodactyla helianthus*. Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo molecular de formación de poros de las actinoporinas se plantea que transcurre por varias etapas: la unión inicial a la membrana, la oligomerización, el despliegue del segmento del extremo amino y la formación final del poro transmembrana. La estructura tridimensional de las actinoporinas se caracteriza por un núcleo central de hojas- β intercaladas flanqueado por dos hélices- α , un sitio de unión interfacial mediante el cual interactúan con los lípidos de las membranas, y lazos que interconectan las fibras b. La región estructural de las actinoporinas menos estudiada es la de los lazos localizados hacia el sitio de interacción con la membrana. El lazo β 4- β 5, que comprende los residuos 76 al 84 de StI, es uno de los de mayor flexibilidad conformacional de la proteína. Con el objetivo de evaluar la contribución de esta región al mecanismo de formación de poros se diseñó y obtuvo el mutante StI P80C. El residuo de Pro⁸⁰ es el más expuesto dentro del lazo β 4- β 5 y se encuentra conservado en la familia de las actinoporinas. La proteína mutante StI P80C se expresó en el sistema de *Escherichia coli* y se purificó en un solo paso mediante cromatografía de intercambio catiónico. La introducción de un residuo de cisteína en la posición 80, no alteró los rasgos conformacionales de la toxina según los estudios de espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular. Esta sustitución aminoacídica no afectó la capacidad de unión de StI a membranas modelo, sin embargo, modificó su actividad permeabilizante frente a eritrocitos humanos y liposomas. Los resultados sugieren que la Pro⁸⁰ de StI pudiera participar en un evento o etapa posterior a la unión inicial a las membranas y previa a la formación del poro funcional.

Palabras clave: citolisinas, fluorescencia, dicroísmo circular, proteína formadora de poros, permeabilización de membranas, mutantes de Cys

Recibido: 2014-02-14

Aceptado: 2014-07-11

ABSTRACT

Sticholysin I (StI) is an actiporin produced by the sea anemone Stichodactyla helianthus. The mechanism of pore formation by actinoporins is a multistep process, involving binding of the water-soluble monomer to the membrane and subsequent oligomerization on membrane surface, leading to the functional pore formation. However, the molecular details of the mechanism of membrane insertion and oligomerization have not been completely clarified yet. The tridimensional structure of actinoporins display a common fold characterized by a β -sandwich core flanked by two α -helices, a membrane recognition site and loops interconnecting all β -sheets. The less studied structural regions of actinoporins include the loops located at the protein-membrane interaction face. The loop that connects $\beta 4$ and $\beta 5$ strands, comprising residues 76–84 of StI, displays the highest conformational flexibility of the whole protein in solution. In order to get insights into the contribution of this region to the actinoporins pore forming mechanism, we devised and obtained the mutant StI P80C. Pro⁸⁰ is the most solvent-exposed residue in the $\beta 4$ - $\beta 5$ loop and is well conserved along the actinoporin protein family. StI P80C was expressed in a bacterial system and purified in a single step by cation exchange chromatography. The conformational characterization derived from fluorescence and CD spectroscopic studies of StI P80C revealed that replacement of Pro⁸⁰ by Cys in StI did not noticeably change the conformation of the protein in solution. Interestingly, this amino acid substitution did not affected StI binding to membrane, whereas provoked noticeable changes in its permeabilizing activity both in erythrocytes and liposomes. These results suggest that StI Pro⁸⁰ could be involved in step after that of membrane initial binding and prior to the functional pore formation.

Keywords: *cytolysins, fluorescence, circular dichroism, pore-forming protein, membrane permeability, Cys mutants*

INTRODUCCIÓN

Las sticholisinas I (StI) y II (StII) son proteínas formadoras de poros purificadas a partir de la anémona *Stichodactyla helianthus*. Estas toxinas pertenecen al grupo de las actinoporinas (Kem, 1988) y poseen una elevada actividad hemolítica (Tejuca *et al.*, 1994; Lanio *et al.*, 2001) que puede ser inhibida por la presencia de esfingomielina (EM) (Bernheimer y Avigad, 1976). La actividad permeabilizante de estas toxinas depende fuertemente de la composición lipídica de la membrana y se favorece por la presencia de esfingomielina y lípidos no formadores de bicapa (Álvarez *et al.*, 2001). StI es una proteína básica, de 20 kDa de masa molecular, no posee residuos de cisteína en su composición aminoacídica e incrementa la permeabilidad iónica de las membranas al formar poros que resultan de la asociación de tres o cuatro monómeros (Anderluh y Maček, 2002). La estructura tridimensional (3D) de cuatro actinoporinas ha sido determinada: equinotoxina II (EqII) de *Actinia equina* (Athanasiadis *et al.*, 2001; Hinds *et al.*, 2002), StII (Mancheño *et al.*, 2003) y StI (Castrillo *et al.*, 2009; Castrillo *et al.*, 2010) y fragaceatoxina C de *Actinia fragacea* (Mechaly *et al.*, 2011). La comparación de las estructuras 3D muestra características comunes en la familia de las actinoporinas: un núcleo central de hojas- β intercaladas, flanqueado por dos hélices- α (Mancheño *et al.*, 2003;

García-Linares *et al.*, 2013) y un sitio de unión interfacial (SUI) mediante el cual interactúan con las membranas (Bakrač *et al.*, 2008). La hélice- α localizada hacia el segmento del extremo amino (hélice- $\alpha 1$) es anfipática y se ha sugerido que puede separarse del núcleo central de hojas- β para formar las paredes del poro (Mancheño *et al.*, 2003). A partir del análisis de la estructura 3D de StII en complejo con fosforilcolina, determinada por Mancheño *et al.*, (2003), Bakrač *et al.*, (2008) definieron el SUI como un conjunto estructural compuesto por el sitio de unión a fosforilcolina y una agrupación de aminoácidos aromáticos que comprende la hélice- $\alpha 2$.

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo molecular por el cual las actinoporinas forman poros en las membranas, existe consenso sobre un proceso que transita por varias etapas (Alegre-Cebollada *et al.*, 2007; Kristan *et al.*, 2009): unión de los monómeros a la membrana a través del SUI (Bakrač *et al.*, 2008), oligomerización de los monómeros (Malovrh *et al.*, 2003; Mancheño *et al.*, 2003; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2004), despliegue del segmento del extremo amino de cada uno sobre la superficie de la membrana (Malovrh *et al.*, 2003; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2004) para formar finalmente el poro al penetrar en la membrana en una conformación helicoidal (Álvarez *et al.*,

al., 2001 y 2003; Anderluh *et al.*, 2003; Mechaly *et al.*, 2011). Actualmente existen dos propuestas para la arquitectura del poro funcional: el poro toroidal (Álvarez *et al.*, 2009; Kristan *et al.*, 2009) y el poro cónico (Mechaly *et al.*, 2011). En el modelo de poro toroidal las paredes están compuestas por las hélices- α de tres o cuatro monómeros y las cabezas polares de los lípidos de la membrana en curvatura positiva (Álvarez *et al.*, 2009). En el modelo de poro cónico las paredes la forman las hélices- α de nueve monómeros y ha sido propuesto solo para la fragaceatoxina C (Mechaly *et al.*, 2011).

Hasta el momento han sido caracterizados estructural y funcionalmente cuatro mutantes de cisteína de StI en zonas de relevancia funcional para la toxina: StI E2C y StI F15C en la región del extremo amino, StI R52C y StI W111C en la región próxima al SUI (Valle *et al.*, 2011; Pentón *et al.*, 2011). La región estructural de las actinoporinas menos estudiada es la de los lazos localizados hacia la región de interacción con la membrana, que resultan importantes en el proceso de unión y formación del poro (Pardo-Cea *et al.*, 2011; García-Linares *et al.*, 2013). El lazo β 4- β 5 que comprende los residuos 76-84 de StI es uno de los de mayor flexibilidad conformacional y se ubica en una posición intermedia entre el segmento del extremo amino y el SUI (García-Linares *et al.*, 2013, Castilla *et al.*, 2013). Con el objetivo de evaluar la participación de esta región en el mecanismo de interacción con las membranas de StI, se obtuvo y purificó el mutante StI P80C. El residuo Pro⁸⁰ está conservado en la familia de las actinoporinas y es el más expuesto dentro del lazo β 4- β 5. La introducción de un residuo de cisteína en esta posición permitiría su futura conjugación con sondas fluorescentes y de espín para el estudio de su interacción con las membranas mediante espectroscopía de fluorescencia y de resonancia paramagnética

electrónica, respectivamente (Anderluh *et al.*, 1999; Pulagam y Steinhoff, 2013).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La 1-palmitoil-2-oleil fosfatidilcolina (POPC), la EM de cerebro bovino y el colesterol proceden de *Avanti Polar Lipids* (EUA), mientras que la carboxifluoresceína (CF) y el β -mercaptoetanol (BME) provienen de *Sigma-Aldrich* (EUA). El oligonucleótido promotor T7 (# catálogo T 3870) fue suministrado por el kit *pMOSBlue Blunt Ended Cloning*, de *Amersham Pharmacia Biotech* (EUA) y la sticholisina I recombinante (StI_r) fue suministrada por el Laboratorio de Biomembranas del Centro de Estudio de Proteínas (CEP) de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana.

Obtención del mutante StI P80C

La sustitución de Pro por Cys en la posición 80 de StI_r se introdujo mediante tres reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) por solapamiento según Ho *et al.* (1989). En la primera y segunda reacción se usó como molde el vector pET3a-stI_r (Pazos *et al.*, 2006) y la combinación de pares de los oligonucleótidos promotor T7/P80Ca y P80Cs/Ct-BamHI (Tabla 1), respectivamente. En un tercer PCR se utilizaron como molde los productos de PCR purificados de las dos primeras reacciones y los oligonucleótidos promotor T7/Ct-BamHI (Tabla 1). Los oligonucleótidos que introducen la mutación fueron diseñados con el programa *NTI Vector 9.0.0* (*Informax Inc*, EUA). El producto del tercer PCR se purificó a partir del gel y se insertó en el plasmidio pBluescript II SK(+) para su secuenciación. La secuencia nucleotídica del posible gen mutado se realizó con el kit *T7 Sequencing TM* de forma similar a lo descrito por Pazos *et al.* (2006). El gen mutado,

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en la obtención del gen *stIP80C*.

Table 1. Oligonucleotides used for obtaining the *stIP80C* gene.

Nombre	Orientación	Secuencia
promotor T7	sentido	5'-GTAATAGGACTCACTATAGGG-3'
P80Ca	antisentido	5'-AGCGCCTGTTGCAAC GCAGC CCTGA-3'
P80Cs	sentido	5'-TCAGGCT GC GTTGCAACAGGCGCT-3'
Ct-BamHI	antisentido	5'-GGG GGATC CTTAGCGTGAAATCTTAATTGCAT-3'

Leyenda: Los nucleótidos que introducen la sustitución por cisteína, se encuentran resaltados en negrita y en subrayado el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BamHI.

verificado por secuenciación, fue extraído del plasmidio pBluescript II SK(+) mediante doble digestión con las enzimas BamHI y NdeI para ser posteriormente clonado en el vector de expresión pET3a.

Expresión y purificación de StI P80C

El vector pET3a-stIP80C obtenido se utilizó para transformar células de *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS. La expresión del mutante se realizó mediante el método de autoinducción descrito por Studier (2005). La purificación de StI P80C se realizó a partir del sobrenadante del lisado de la bacteria mediante un único paso de cromatografía de intercambio iónico en carboximetil celulosa (CM-52). En el proceso cromatográfico se incluyó un paso de lavado intermedio con 100 mM de BME para eliminar moléculas no deseadas que hubiesen podido enlazarse al grupo SH del residuo de cisteína (Valle *et al.*, 2011). La elución se realizó con un gradiente lineal de fosfato de sodio 0,02 M a pH 7,4 conteniendo desde 0 hasta 0,5 M de NaCl. El flujo lineal del proceso cromatográfico fue de 8,6 cm/h. La homogeneidad de la proteína se comprobó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 % según Laemmli (1970). La concentración proteica se determinó mediante la absorción a 280 nm y el coeficiente de extinción de StI obtenido por Lanio *et al.* (2001).

Preparación de las vesículas liposomales

Una mezcla de POPC:EM (proporción molar 85:15) disuelta en cloroformo: metanol (2:1, v/v) se secó bajo corriente de nitrógeno y la película obtenida se sometió al vacío durante 2 horas. Para los ensayos de incorporación a membranas de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) la película lipídica se hidrató con Tris-HCl 10 mM, pH 8,2, NaCl 300 mM hasta una concentración fosfolipídica de 2,6 mM. La suspensión obtenida se sonicó en un equipo Branson 450 (EUA) durante 10 minutos con ciclos alternos de sonicación y descanso de 30 segundos, a 25°C. Posteriormente, se centrifugó la suspensión a 6000 g durante 10 minutos en una centrífuga Eppendorf 5415 C (Eppendorf, Alemania) para eliminar las vesículas de mayor tamaño. En el caso de los ensayos de permeabilización se prepararon vesículas unilamelares grandes (LUV) de POPC:EM (85:15) cargadas con el fluoróforo CF según Tejuca *et al.* (1996). La película lipídica se resuspendió con una solución de 80 nM de CF en Tris-HCl 10 mM, pH 8,2, NaCl 300 mM hasta obtener una concentración fosfolipídica de 26 mM. La suspensión obtenida

fue sometida a 6 ciclos de congelación-descongelación y posterior extrusión en un extrusor *Liposofast Basic Unit* (Avestin Inc., Canadá) con dos filtros de policarbonato con poros de 100 nm de diámetro (Nucleopore, EUA). Los LUV cargados con CF se separaron del fluoróforo no encapsulado mediante filtración en Sephadex G-50 (Pharmacia-LKB, Suecia). La concentración de fosfolípidos se determinó por el método colorimétrico descrito por Rouser *et al.* (1970).

Medidas de fluorescencia intrínseca

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro F-4500 (Hitachi, Japón) equipado con celdas termostataadas (25°C). Se emplearon cubetas de cuarzo de 1 cm de pazo de luz, agitación y rendijas de 5 nm para la excitación y la emisión. El espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca de 1 μM de proteína disuelta en tampón Tris-HCl 20 mM pH 8,2, NaCl 300 mM se determinó en el intervalo de 300 a 450 nm, en solución y en presencia de SUV de POPC:EM (85:15). La excitación se realizó a 295 nm para obtener la señal exclusiva de los Trp (Lakowicz, 2006a). En todos los casos se realizó la corrección de la línea base de emisión de fluorescencia con las muestras sin proteínas y con vesículas según correspondió. El nivel de exposición promedio de los Trp en la superficie de las proteínas en solución o unidas a membranas de SUV se analizó al adicionar acrilamida (AA) como atenuador hidrosoluble (Lakowicz, 2006a; 2006b). Se determinó la relación entre las intensidades de fluorescencia a 334 nm en ausencia (F_0) y en presencia (F_{AA}) de concentraciones crecientes de AA ([AA]). Como medida de la eficiencia de atenuación de la fluorescencia se calculó el valor de la constante de Stern-Volmer (K_{sv}), a partir de la regresión lineal de los resultados experimentales según la ecuación (Lakowicz, 2006b):

$$F_0 / F_{AA} = 1 + K_{sv} [AA]$$

Espectros de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (DC) se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco J-720 (Jasco Corporation, Japón), a 25°C. Los espectros en el UV-lejano y UV-cercano fueron registrados en el intervalo 195-260 nm y 250-350 nm, en cubetas de cuarzo de 1 y 5 mm de paso óptico, con 4 mM y 16 mM de toxina disuelta en agua, respectivamente. En todos los casos se realizó la corrección de la línea base con soluciones

que no contenían proteína. Los espectros se normalizaron al convertirlos a elipticidad molar [q] empleando el peso molecular determinado para StI_r (19 390 Da) por espectrometría de masas mediante ionización por electro spray (Lanio *et al.*, 2001) y para StI P80C (19 396 Da) a partir de su secuencia aminoacídica en el servidor de Internet ExPASy (<http://expasy.org>). Los espectros se filtraron con la transformada rápida de Fourier en una ventana de 5 puntos para su representación con el programa *Origin* versión 7,0383 (*OriginLab Corporation*, EUA).

Medidas de presión superficial

La interacción de las toxinas con monocapas lipídicas se evaluó utilizando un equipo μ -Through-S, (*Kibron*, Finlandia). Las monocapas fueron preparadas depositando una mezcla lipídica de POPC:EM (85:15) a 0,2 μ M de concentración, sobre la superficie de 300 μ L de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 145 mM (TBS), hasta alcanzar la presión inicial (p_0) deseada. En la subfase se añadió la toxina a 0,7 μ M final, previamente incubada con BME 15 mM. Los cambios de presión superficial (p) se registraron en el tiempo, a 25°C y con agitación constante hasta obtener una señal estable (10 minutos). La extensión del proceso de inserción de la proteína en la monocapa se caracterizó a través del incremento máximo de la presión superficial (Δp), según la expresión:

$$\Delta p = p_f - p_0$$

Los valores de Δp se graficaron en función de p_0 y los datos experimentales se ajustaron a una línea recta. El valor del intercepto con el eje de las abscisas se corresponde con el parámetro denominado presión crítica (p_c). La p_c representa la presión que debe aplicarse para que no ocurra incorporación de la toxina en la monocapa y está directamente relacionada con la afinidad de la toxina por los lípidos que la componen (Brockman, 1999).

Incorporación a membranas lipídicas

La unión de las toxinas a SUV de POPC:EM (85:15) se determinó a partir de la relación de emisiones de fluorescencia a 334 nm de la toxina en solución (F_0) y al adicionar cantidades crecientes de vesículas (F). La muestra de 1,5 μ M de toxina previamente incubada con BME 15 mM y disuelta en Tris-HCl 20 mM pH 8,2, NaCl 300 mM, se excitó a 295 nm. Los experimentos fueron realizados a 25°C con rendijas de 5 nm para la

excitación y la emisión. Las correcciones de la intensidad de la línea base de la fluorescencia y la contribución de los SUV se sustrajo de las mediciones con el uso de controles. Para cada proteína se graficó la relación de intensidades de fluorescencia (F/F_0) en función de la cantidad de fosfolípidos totales adicionados en forma de vesículas SUV. Los resultados experimentales se ajustaron a la función de Boltzman, a partir de la cual se determinaron los parámetros $F/F_{0\text{máx}}$ y $\text{Lip}_{50} \cdot F/F_{0\text{máx}}$ representa la máxima relación de intensidad de fluorescencia en el ensayo y Lip_{50} la concentración de lípido necesaria para unir la mitad de las proteínas totales.

Ensayos de permeabilización

La capacidad permeabilizante de las toxinas se evaluó en LUV de POPC:EM (85:15) cargados con el fluoróforo CF según el procedimiento descrito por Valle *et al.* (2011), en solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM, pH 8,2, NaCl 300 mM. La emisión de fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro F-4500 (*Hitachi*, Japón) a 25°C de temperatura. Las muestras fueron excitadas a 490 nm y se registró la emisión de fluorescencia de la CF a 520 nm. Se emplearon cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, rendijas nominales de 5 nm para la excitación y la emisión, y agitación constante. El incremento de la fluorescencia de la CF se registró en el tiempo durante 7 minutos a partir de añadir la toxina, previamente incubada con BME 15mM, a una solución de vesículas ($\approx 10 \mu$ M de fosfolípidos). La liberación total del fluoróforo se alcanzó al adicionar un exceso del detergente Tritón X-100 (*Sigma*, EUA). La fracción de vesículas que contienen al menos un poro (f), es equivalente a la proporción de fluoróforo liberado para cada tiempo, asumiendo que la salida del fluoróforo es simultánea a la formación del poro (Tejuca *et al.*, 1996). El parámetro f se calculó según la ecuación:

$$f = (F_i - F_0) / (F_{\text{total}} - F_0)$$

donde F_i es la intensidad de fluorescencia registrada a cada tiempo, F_0 es la fluorescencia antes de la adición de la toxina y F_{total} es la fluorescencia cuando todas las vesículas han sido disueltas por la adición de un exceso de detergente. Los valores de f se graficaron en función del logaritmo de la relación de cantidades molares proteína/fosfolípidos y se ajustaron a la función sigmoidea de Hill. A partir del ajuste se determinó la relación molar proteína/fosfolípidos necesaria

para permeabilizar la mitad de las vesículas que poseen al menos un poro, parámetro denominado k.

Determinación de la actividad hemolítica

La actividad hemolítica se determinó mediante la disminución del valor de absorbancia de la luz dispersada a 600 nm de una suspensión eritrocitaria (Harshman y Sugg, 1985) producto de la lisis celular causada por las toxinas. El ensayo hemolítico se realizó en un lector *Multiscan EX* (Labsystems, Finlandia) en placas *Costar* (EUA) de 96 pozos de fondo plano. La suspensión eritrocitaria se preparó a partir de eritrocitos obtenidos de un donante sano. La concentración de la suspensión eritrocitaria se ajustó por dilución con solución amortiguadora TBS hasta obtener un valor de absorbancia a 600 nm de 0,1 en las condiciones del ensayo. A las toxinas previamente incubadas con BME 15mM se les realizó diluciones doble seriadas con TBS en la placa de 96 pozos para un volumen final de 0,1 mL. La cinética de hemólisis inducida por las proteínas a temperatura ambiente (25°C) se inició con la adición de 0,1 mL del estándar eritrocitario en cada pozo y se registró durante 15 minutos, con agitación a intervalos de lectura de 10 segundos. Los valores de hemólisis expresados en porcentaje (% de hemólisis) se determinaron en función de las concentraciones de proteína en el ensayo según la ecuación:

$$\% \text{ de hemólisis} = 100 * (A_0 - A_f) / (A_0 - A_T)$$

... donde A_0 y A_f son los valores de absorbancia inicial (0 minutos) y final (15 minutos) del ensayo hemolítico, respectivamente. A_T es la absorbancia que corresponde a la lisis total de los eritrocitos en presencia de un exceso de toxina (10 nM). Los valores de porcentaje de hemólisis se graficaron en función del logaritmo de la concentración de toxina y se ajustaron a la función sigmoidea de Hill. A partir del ajuste se determinó el parámetro HC_{50} que representa la concentración de proteínas a la cual se alcanza la lisis del 50 % de los eritrocitos en el ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño de StI P80C

Para seleccionar el residuo a sustituir dentro del lazo $\beta 4-\beta 5$ primeramente se realizó un alineamiento de las secuencias de este lazo para las actinoporinas determinadas hasta el presente. Solo cuatro residuos

del lazo $\beta 4-\beta 5$ están conservados en la familia, indicativo de su importancia evolutiva: Lys⁷⁶, Gly⁷⁹, Pro⁸⁰ y Gly⁸⁴, mientras que el resto de los residuos presenta sustituciones conservativas y semiconservativas. De forma similar al diseño realizado por Valle *et al.* (2011), se tuvo en consideración además el grado de exposición al solvente del residuo a mutar con el objetivo de garantizar la futura conjugación del grupo sulfhidrido. A partir de la estructura 3D de los 20 modelos depositados para StI (Castrillo *et al.*, 2009) (Fig. 1), se calculó el área accesible a la superficie (ASA) en el servidor web *WHAT IF* (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>) con la opción "Accessibility-Buried surface" (Vriend, 1990). De los cuatros resi-

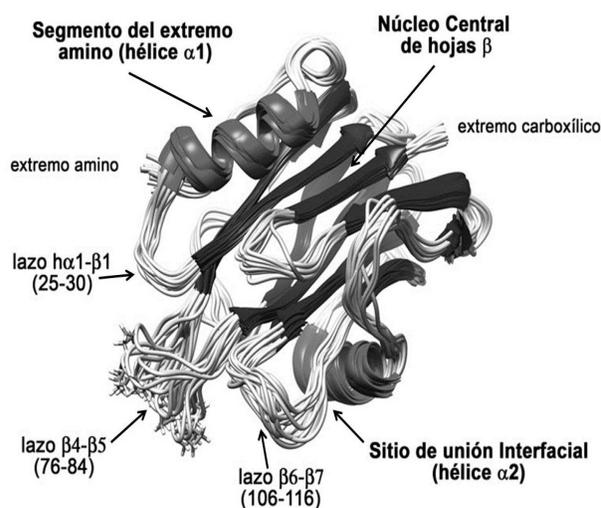


Figura 1. Superposición de los 20 modelos estructurales determinados por resonancia magnética nuclear para StI (PDB: 2KS4) (Castrillo *et al.*, 2009). Se especifican los elementos estructurales y el intervalo de residuos que forman los lazos de la zona de interacción con la membrana (García-Linares *et al.*, 2013). La cadena lateral de la Pro⁸⁰ se representa con varillas. La figura se realizó con el programa *UCSF Chimera* para Windows (Pettersen *et al.*, 2004).

Figure 1. Superposition of 20 nuclear magnetic resonance models of StI (PDB: 2KS4) (Castrillo *et al.*, 2009). The different elements of secondary structure, as well as the N- and C-terminal ends, are labeled. The residues of the membrane interaction loops (García-Linares *et al.*, 2013) are also indicated. Pro⁸⁰ is represented as stick model. Image was generated by the *UCSF Chimera* program for Windows (Pettersen *et al.*, 2004).

duos conservados del lazo β 4- β 5, el residuo Pro⁸⁰ resultó el de mayor nivel de exposición, con un valor de ASA de 82 ± 5 %. Según Gromiha *et al.* (1999), los residuos con más de un 50 % de ASA se consideran expuestos.

Obtención de StI P80C

Mediante el método de autoinducción empleado se expresó un 67 % de StI P80C en cuerpos de inclusión y un 33 % en la fracción soluble. La proteína mutante se purificó a partir de la fracción soluble, en un solo paso cromatográfico de intercambio catiónico (Fig. 2). La evaluación de la actividad hemolítica en las fracciones del perfil mostró un pico de actividad coincidente con el pico IV (resultado no mostrado). El análisis por SDS-PAGE (inserto Figura 2) sugiere que el pico IV se corresponde con la toxina mutada. StI P80C eluye aproximadamente a 0,23 M de NaCl con una homogeneidad superior al 95 % y un rendimiento de 3,3 mg de proteína por litro de cultivo. Este último valor es menor al alcanzado por Pazos *et al.*, (2006) durante la obtención de StI_r (10 mg/L de cultivo), pero se encuentra dentro del rango variable de rendimiento

obtenido para el resto de los mutantes de StI (2,5-9,6 mg/L de cultivo) (Valle *et al.*, 2011). StI P80C fue capaz de formar espontáneamente dímeros enlazados por puentes disulfuro (datos no mostrados), de forma similar a otras proteínas mutantes de Cys de StI (Valle *et al.*, 2011; Pentón *et al.*, 2011) y de EqtlI (Anderluh *et al.*, 1999). Los experimentos de caracterización estructural y funcional se realizaron preincubando la proteína con BME, para asegurar la presencia solo de la forma monomérica.

Caracterización conformacional de StI P80C

La caracterización conformacional de la proteína se realizó mediante técnicas espectroscópicas. La Figura 3 muestra los espectros de fluorescencia intrínseca de StI_r y StI P80C en solución y en presencia de SUV de POPC:EM (85:15). Los espectros de ambas proteínas en solución son similares y presentan un máximo de emisión de fluorescencia ($I_{m\acute{a}x}$) alrededor de los 333 nm (Tabla 2). En presencia de SUV de POPC:EM (85:15) se observa un desplazamiento de la $I_{m\acute{a}x}$ hacia los 328 nm (Tabla 2), característico de la localización de residuos triptofanos en ambientes más hidrofóbicos

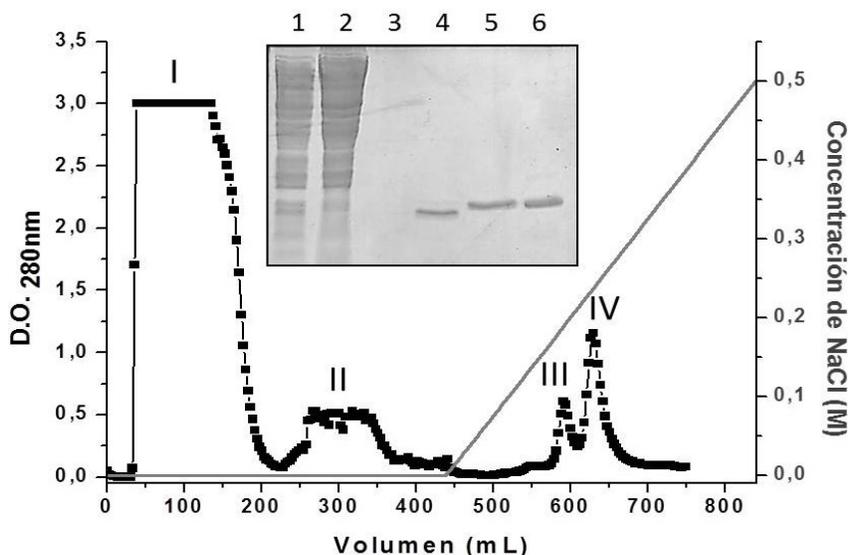


Figura 2. Perfil cromatográfico de intercambio catiónico de StI P80C donde se observan los valores de densidad óptica a 280 nm ($D.O._{280nm}$) (■) de cada fracción y el gradiente lineal de NaCl empleado en la elución (línea gris). I: muestra no fijada a la matriz, II: lavado con BME 100 mM, III y IV: picos de elución. Inserto: análisis mediante SDS-PAGE al 15 % (Laemmli, 1970), carril 1, muestra aplicada; carril 2, pico I; carril 3, pico II; carril 4, pico III; carril 5, pico IV; carril 6, StI_r.

Figure 2. Cation exchange chromatography of StI P80C. Optical density of fractions at 280 nm ($D.O._{280nm}$) (■), NaCl elution gradient (gray line). I: unbound sample, II: washed step with 100 mM BME, III and IV: elution peaks. Insert: SDS-PAGE 15 % (Laemmli, 1970), lane 1, applied sample; lane 2, peak I; lane 3, peak II; lane 4, peak III; lane 5, peak IV, lane 6, StI_r.

(Lakowicz, 2006a). Los espectros de emisión de StI_r y StI P80C en solución, atenuados con acrilamida, mostraron una disminución en la intensidad de fluorescencia y en los valores de $I_{m\acute{a}x}$ de emisión (~5 nm) con respecto a los espectros en ausencia del atenuador (Tabla 2). Los valores de Ksv de ambas toxinas en solución fueron muy similares y muestran también una disminución cuando se atenúa la fluorescencia de StI_r y StI P80C en presencia de SUV (Tabla 2).

En la Figura 4A se muestran los espectros de DC UV-lejano de StI_r y StI P80C como la variación de la elipticidad molar ([θ]) en función de la longitud de onda. Ambos espectros son similares y muestran una banda positiva centrada en los 195 nm y un mínimo alrededor de los 217 nm, típico de proteínas estructuradas básicamente en hoja- β (Venjaminov y Yang, 1996). Las señales espectrales en el UV-cercano de StI_r y StI P80C son iguales (Fig. 4B). Estos espectros se caracterizan por presentar bandas de absorción negativas a 266 y 270 nm que se corresponden con la zona de absorción de los residuos de Phe (Kelly *et al.*, 2005). A los 284 nm los espectros muestran una banda de absorción positiva correspondiente a los residuos de Tyr

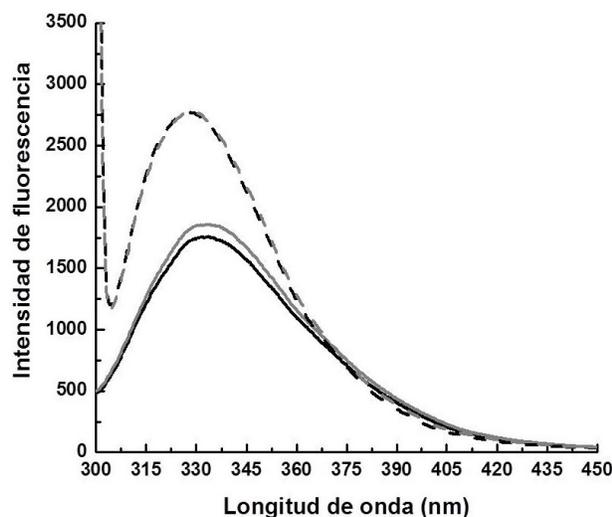


Figura 3. Espectros de emisión de fluorescencia de residuos Trp de StI_r (negro) y StI P80C (gris) a 25°C, en solución (línea continua) y en presencia (línea discontinua) de $\approx 100 \mu\text{M}$ de fosfolípidos en forma de SUV (POPC:EM, 85:15).

Figure 3. Fluorescence spectra of tryptophanyl residues of rStI (black) and StI P80C (gray) at 25°C, without (solid line) and with (dashed line) $\approx 100 \mu\text{M}$ phospholipids as 85:15 POPC:EM SUV.

Tabla 2. Parámetros conformacionales y funcionales de StI P80C y StI_r.

Table 2. Conformational and functional parameters of StI P80C and rStI.

Parámetros	StI _r	StI P80C
$I_{m\acute{a}x}$ (nm) en solución ^a	332,5 ± 1,6	333 ± 0,0
$I_{m\acute{a}x}$ (nm) en presencia de SUV ^{a,b}	327,2 ± 0,3	328 ± 0,8
Ksv (M^{-1}) en solución	3,27 ± 0,10	3,22 ± 0,08
Ksv (M^{-1}) en presencia de	2,29 ± 0,06	2,29 ± 0,05
p_c (mN/m)	44,96	42,65
F/ $F_{0\text{ máx}}$	1,60 ± 0,06	1,51 ± 0,07
Lip ₅₀	14,79 ± 1,07	14,33 ± 1,15
k ($\times 10^{-4}$)	8,4 ± 0,3	23,6 ± 1,8
HC ₅₀ (nM)	0,23 ± 0,02	2,01 ± 0,16

Leyenda: Los valores mostrados son el resultado de 3-4 determinaciones experimentales independientes. ^a La longitud de onda del máximo de emisión ($I_{m\acute{a}x}$) se determinó a partir de la integración del espectro. ^b SUV de POPC:EM (85:15).

y un máximo de absorción a los 292 nm correspondiente a los residuos de Trp (Fig. 4B) (Kelly *et al.*, 2005). En el caso de StI P80C se observa un desplazamiento del espectro de DC UV-cercano hacia valores positivos de elipticidad molar.

Unión de StI P80C a membranas lipídicas modelos

La capacidad de interacción de StI P80C a membranas se determinó en monocapas y en SUV. El incremento de la presión superficial (Δp), es indicativo de la asociación de la proteína a una monocapa lipídica, por lo que se utiliza para caracterizar su capacidad de interacción con este sistema de membrana (Martínez *et al.*, 2007). Al graficar los valores Δp alcanzados por StI_r y StI P80C en función de diferentes presiones iniciales (p_0) de la monocapa de POPC:EM 85:15 se observó una disminución de los valores de Δp al aumentar la presión de partida (Fig. 5A). El cálculo del parámetro p_c rindió valores similares entre ambas proteínas (Tabla 2), con una diferencia de 2,3 mN/m.

El incremento en la relación de intensidades de fluorescencia en presencia de cantidades crecientes de SUV permitió caracterizar la interacción de las proteínas con las membranas (Fig. 5B). Al aumentar la cantidad de SUV en el ensayo se observó un incremento en

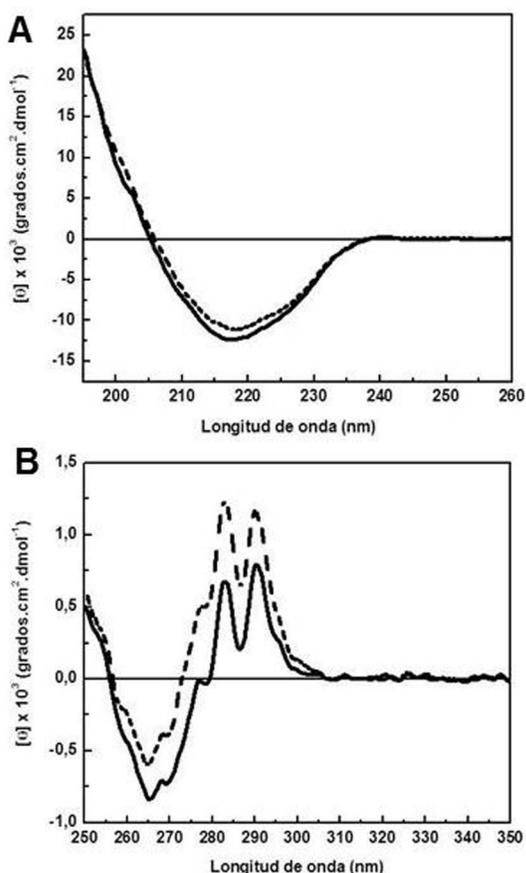


Figura 4. Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano (A) y UV-cercano (B) de StI r (–) y StI P80C (---) en agua, a 25°C. Los espectros mostrados son el promedio de 6 y 12 barridos de lectura para UV-lejano y UV-cercano, respectivamente. [q]: elipticidad molar.

Figure 4. Circular dichroism spectra of rStI (–) and StI P80C (---) in water, at 25°C. The far UV spectra (panel A) and near UV spectra (panel B) are an average of 6 and 12 scans, respectively. [q]: molar ellipticity.

la relación F/F_0 hasta llegar a un valor saturante de concentración fosfolipídica. La totalidad de las moléculas de toxina se unieron a las vesículas, aproximadamente a partir de los 60 μM de fosfolípidos. Las curvas de unión a SUV obtenidas para StI r y StI P80C muestran un comportamiento similar (Fig. 5B). El cálculo de los parámetros Lip_{50} y $F/F_{0 \text{ máx}}$ rindió valores similares para ambas toxinas (Tabla 2).

Capacidad formadora de poros de StI P80C.

La capacidad formadora de poros de StI P80C se evaluó al determinar su actividad permeabilizante en

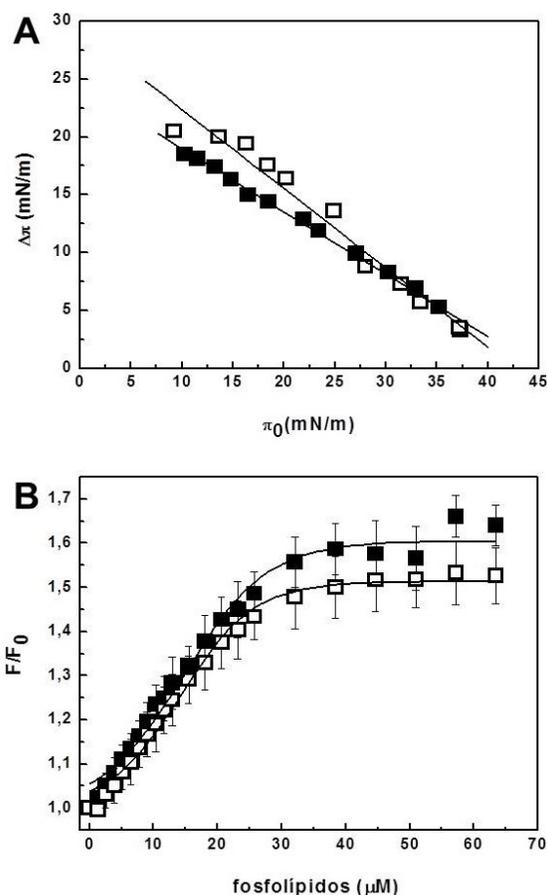


Figura 5. Interacción de StI r y StI P80C con membranas modelo. (A) Variación de la presión superficial (D_p) de monocapas lipídicas de POPC:EM (85:15) al añadir toxina, a 25°C. (B) Variación de la intensidad de fluorescencia intrínseca de las toxinas al añadir cantidades crecientes de SUV de POPC:EM (85:15), a 25°C. F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en solución y en presencia de vesículas, respectivamente. Los valores representan el promedio de tres determinaciones experimentales independientes, las barras verticales la desviación estándar de cada valor y la línea continua el mejor ajuste a la función de Boltzman. StI r (■) y StI P80C (□).

Figure 5. Interaction of rStI and StI P80C with model membranes. (A) Changes in the surface pressure (D_p) of a POPC:EM (85:15) monolayer upon addition of toxin, at 25°C. (B) Changes in the intrinsic fluorescence intensity of toxins upon addition of increasing quantities of 85:15 POPC:EM SUV, at 25°C. F_0 and F are the fluorescence intensities without and with vesicles, respectively. The mean of three experimental determinations is reported. The standard deviations of the mean value are represented by vertical bars and the best fitting to Boltzman function by a solid line. StI r (■) and StI P80C (□).

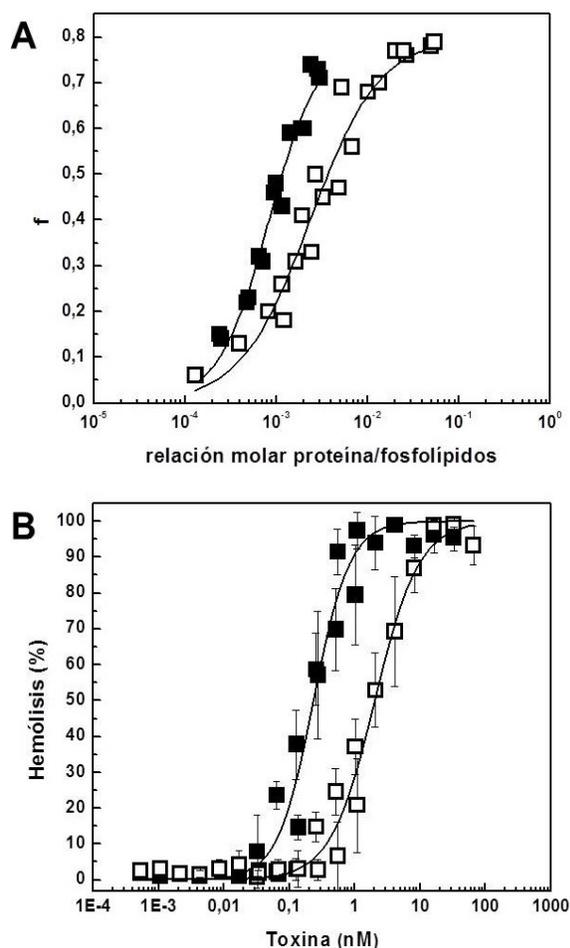


Figura 6. Capacidad de Stl y Stl P80C de formar poros en sistemas de membranas modelo. (A) Permeabilización de LUV de POPC:EM (85:15) por la adición de cantidades crecientes de toxina, a 25°C. *f*, fracción de vesículas que poseen al menos un poro funcional determinada a partir de dos experimentos independientes; línea continua, mejor ajuste a la función sigmoidea de Hill. (B) Actividad hemolítica de las toxinas frente a eritrocitos humanos. Los valores representan el promedio de cuatro determinaciones experimentales independientes, las barras verticales la desviación estándar y la línea continua el mejor ajuste a la función sigmoidea de Hill. Stl (■) y Stl P80C (□).

Figure 6. Capacity of rStl and Stl P80C to form pores in model membranes. (A) Changes in the fraction of vesicles of POPC:EM (85:15) where at least one pore was formed (*f*) upon addition of increasing quantities of toxin, at 25°C. The results from two individual experiments are reported. The best fitting to Hill sigmoidal function is represented as a solid line. (B) Changes in the human erythrocytes disruption upon addition of increasing quantities of toxin, at 25°C. The mean of four experimental determinations is reported. The standard deviations of the mean value are represented by vertical bars and the best fitting to Hill sigmoidal function by a solid line. Stl (■) and Stl P80C (□).

membranas modelos y su actividad hemolítica frente a eritrocitos humanos. La actividad permeabilizante se determinó a partir de la habilidad de la toxina de provocar la salida del fluoróforo CF encapsulado en LUV de POPC:EM (85:15). La velocidad y la extensión del proceso pueden caracterizarse por el incremento de la fluorescencia asociado a la liberación del fluoróforo (Kayalar y Duzgunes, 1986). Según se ilustra en la Figura 6A, a medida que aumenta la concentración de toxina se produce un incremento en el número de vesículas que contienen al menos un poro hasta alcanzar el valor de $f_{\text{máx}}$ dentro de las condiciones del ensayo. El valor de *k* determinado para Stl P80C es tres veces superior al de Stl (Tabla 2), indicativo de una menor capacidad permeabilizante.

Resultados similares se obtuvieron al determinar la actividad hemolítica de las toxinas frente a eritrocitos humanos. En la Figura 6B se representan los porcentajes de hemólisis alcanzados por Stl y Stl P80C a diferentes concentraciones de toxina. Los valores de HC_{50} calculados (Tabla 2) indicaron que en este modelo de membrana Stl P80C resultó nueve veces menos hemolítica que Stl, con un valor de HC_{50} de 2,01 nM.

Discusión

Una característica de las actinoporinas es la ausencia de residuos de cisteína en su estructura primaria lo cual ha sido utilizado para estudiar la relación estructura-función de estas proteínas. La introducción de cisteína en regiones funcionalmente importantes de las actinoporinas permite la unión de sondas fluorescentes o de espín para el estudio, mediante espectroscopía de fluorescencia o de resonancia paramagnética electrónica, de la interacción de estas toxinas con las membranas. La sustitución de diferentes aminoácidos por cisteína en EqtlI permitió evaluar la importancia de estos residuos en su capacidad de unión a las membranas y en su actividad formadora de poros (Malovrh *et al.*, 2003; Kristan *et al.*, 2004). Malovrh *et al.* (2003) marcaron diferentes posiciones de Cys de EqtlI con la sonda fluorescente N-(2-(iodoacetoxi)etil)-N-metilamino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol y propusieron una topología de inserción del segmento del extremo amino en la membrana. En el caso de Stl, se han caracterizado cuatro mutantes de Cys (Stl E2C, Stl F15C, Stl R52C y Stl W111C) y se evaluó la importancia funcional de estas posiciones (Valle *et al.*, 2011; Pentón *et al.*, 2011).

Con el propósito de profundizar en el mecanismo de formación de poros de las sticholisinas se diseñó el

mutante StI P80C. El residuo Pro⁸⁰ se encuentra altamente conservado en la estructura primaria de las actinoporinas descritas hasta el momento y es el aminoácido más expuesto en la superficie de la proteína de los que conforman el lazo que une los residuos 76-84 de StI (Fig. 1). StI P80C se expresó en las células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS tanto en la fracción soluble como en cuerpos de inclusión como ha sido informado para otras actinoporinas y mutantes de StI (Valle *et al.*, 2011). Debido a que en las renaturalizaciones se pueden originar poblaciones de moléculas conformacionalmente diferentes a la nativa, como fue evidenciado para StII por Mancheño *et al.* (2001), el proceso de purificación de StI P80C se desarrolló a partir de la fracción soluble.

La comparación funcional entre StI y StI P80C es válida solo si el mutante retiene las características conformacionales de la proteína recombinante al ser sustituida la Pro⁸⁰ por Cys. Por tal motivo se determinaron las características conformacionales de StI P80C con respecto a StI mediante técnicas espectroscópicas de baja resolución como DC y emisión de fluorescencia. StI P80C conserva la estructura predominante de hoja- β observada para StI, para los mutantes de Cys de StI (Valle *et al.*, 2011) y para el resto de las actinoporinas (Mancheño *et al.*, 2003; García-Linares *et al.*, 2013). La similitud de los espectros de DC en el UV-cercano de StI y StI P80C (Fig. 4B), indica que las disposiciones conformacionales de ambas proteínas son parecidas entre sí. En el caso de StI P80C, se observa un desplazamiento del espectro hacia valores positivos, lo cual pudiera deberse a la presencia de entidades dimericas enlazadas mediante enlace disulfuro entre sus cisteínas. Debido a que el BME interfería con las señales de DC, los ensayos se realizaron en agua, conteniendo la muestra casi un 50 % de dímeros en solución (datos no mostrados). La presencia de cistina genera una señal ancha y centrada alrededor de los 260 nm en los espectros de DC (Kelly *et al.*, 2005). La forma y magnitud de los espectros de DC en la región del UV-cercano va a depender del número de aminoácidos aromáticos y cistina, su movilidad, la naturaleza de su microentorno, accesibilidad al solvente, así como de la disposición espacial de los mismos en la estructura de la proteína (Kelly *et al.*, 2005). Los resultados de la caracterización conformacional de StI P80C mediante DC y emisión de fluorescencia demostraron que no se producen cambios en las estructuras conformacionales de StI en solución producto

de este cambio aminoacídico. No se descarta que pueda haber cambios en la disposición espacial del lazo β 4- β 5 producto de la mutación introducida, los cuales no fueron detectados con las técnicas espectroscópicas empleadas. La Pro es un iminoácido que posee limitaciones conformacionales impuestas por la naturaleza cíclica de su cadena lateral pirrolidina, por lo que frecuentemente se encuentra en las regiones de los lazos o giros β de la estructura 3D de las proteínas (Enemark *et al.*, 2012). El lazo β 4- β 5 de StI posee una elevada flexibilidad estructural (García-Linares *et al.*, 2013) (Fig. 1), que pudiera garantizar un reacomodo de los residuos aminoacídicos una vez introducida la mutación, sin afectar la conformación global de la toxina.

La caracterización funcional permitió evaluar la participación de la Pro⁸⁰ de StI en la unión a las membranas y la formación de poros. Los resultados demostraron que StI P80C se une a monocapas de POPC:EM (85:15) con similar afinidad que StI (Fig. 5A). La disminución de los valores de Δp al aumentar la presión de partida (p_0) se debe a un mayor grado de empaquetamiento de los lípidos que limita el número de moléculas de toxina que pueden insertarse en la monocapa. La similitud entre los valores de p_c calculados para StI y StI P80C demuestran que ambas proteínas se asocian y penetran en la monocapa de POPC:EM (85:15) con la misma afinidad. Resultados similares se encontraron al evaluar la capacidad de interacción de StI y StI P80C con SUV de igual composición lipídica. La similitud en los parámetros Lip_{50} y $F/F_{0 \text{ máx}}$ para ambas toxinas indican que las afinidades aparentes de StI y StI P80C por los lípidos en los SUV de POPC:EM (85:15) son similares. Estos resultados están en correspondencia con los valores de p_c obtenidos. Por tanto, ambas proteínas presentan la misma capacidad de interacción con membranas modelo de composición POPC:EM (85:15). Aunque la Pro⁸⁰ se encuentra en un lazo ubicado hacia la cara de interacción con la membrana, parece no estar implicada directamente en el reconocimiento lipídico de StI. Sin embargo, la disminución de la actividad permeabilizante de vesículas y la acción lítica frente a eritrocitos humanos, al sustituir la Pro⁸⁰ por Cys, es indicativo de la importancia de este residuo en la formación de poros. Estos resultados son similares a los descritos para StI R52C por Valle *et al.* (2011) y para los mutantes de Cys de EqII que involucran los residuos Ser⁵⁴, Lys⁷⁷, Arg³¹, Ser¹¹⁴ y Ser¹⁶⁷ (Anderluh *et al.*, 1999). Todos estos

residuos aminoacídicos se encuentran ubicados en los lazos de interacción con la membrana (β 4- β 5, β 6- β 7 y β 9- β 10) o en posiciones cercanas a estos (Fig. 1). La conservación de las regiones involucradas en el reconocimiento lipídico y la reducida actividad permeabilizante indican que estos residuos pudieran ser relevantes en los cambios conformacionales que tienen lugar luego de la unión inicial a las membranas o durante el proceso de oligomerización. Pardo-Cea *et al.* (2011) y Castilla *et al.* (2013) resaltaron la importancia de estos lazos para la funcionalidad de las sticholisinas a partir de estudios de dinámica conformacional y flexibilidad mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Por tanto, la disminución en la capacidad formadora de poros de StI P80C pudiera relacionarse con una afectación en un evento o etapa posterior a su unión inicial a las membranas y previa a la formación del poro funcional. Esta idea está en correspondencia con la posición intermedia del lazo β 4- β 5 entre el SUI y el segmento del extremo amino, implicado en la formación del poro.

Ha sido demostrado que la flexibilidad de las proteínas es importante para los eventos de interacción proteína-proteína, así como proteína-membrana (Medeiros *et al.*, 2010). En el caso de las actinoporinas se ha estudiado la dinámica de dos miembros de la familia, EqtlI y StI, y de dos mutantes de StII en solución sin datos concluyentes acerca del papel de la flexibilidad para la unión a la membrana. Recientemente, Castilla *et al.* (2013) al analizar el comportamiento dinámico de StI en presencia de micelas de dihexanoilfosfatidilcolina por resonancia magnética nuclear demostraron que el lazo β 4- β 5 es un segmento flexible de la molécula que se encuentra involucrado en el proceso de unión de la proteína a estas micelas. Nuestros resultados constituyen la primera evidencia experimental que sugiere que el residuo Pro⁸⁰ no es esencial para la unión de la sticholisina I a las membranas pero sí para la formación del poro.

Agradecimientos: A Camilo Ayra, de la División de Plantas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), por su apoyo en la obtención del mutante StI P80C. Esta investigación fue financiada por el programa de intercambio Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) (Brasil) – MES (Cuba) y por la *International Foundation for Science* (IFS), Suecia, con los proyectos F/4574-1 y F/4574-2.

LITERATURA CITADA

- Alegre-Cebollada, J., M. Oñaderra, J.G. Gavilanes, A. Martínez del Pozo (2007) Sea anemone actinoporins: The transition from a folded soluble state to a functionally active membrane-bound oligomeric pore. *Curr. Prot. & Peptide Sci.* 8: 558-572.
- Álvarez, C., J.M. Mancheño, D. Martínez, M. Tejuca *et al.* (2009) Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. *Toxicon* 54:1135-1147.
- Álvarez, C., F. Casallanovo, C.S. Shida, L.V. Nogueira *et al.* (2003) Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces. Modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction. *Chem. Physics Lipids* 122: 97-105.
- Álvarez, C., I.F. Pazos, M.E. Lanio, D. Martínez *et al.* (2001) Effect of pH on the conformation, interaction with membranes and hemolytic activity of sticholysin II, a pore forming cytotoxin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 39:539-553.
- Anderluh, G. y P. Maček (2002) Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (*Anthozoa: Actiniaria*). *Toxicon* 40:111-124.
- Anderluh, G., A. Barlič, Z. Podlesek, K. Podlesek *et al.* (1999) Cysteine-scanning mutagenesis of a eukaryotic pore-forming toxin from sea anemone. *Europ. J. Biochem.* 263: 128-136.
- Anderluh, G., I. Gökçe y J.H. Lakey (2003) Expression of proteins using the third domain of the *Escherichia coli* periplasmic-protein TolA as a fusion partner. *Protein Expression and Purification* 28:173-181.
- Athanasiadis, A., G. Anderluh, P. Maček y D. Turk (2001) Crystal structure of the soluble form of equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *Structure* 9: 341-346.
- Bakrač, B., I. Gutiérrez-Aguirre, Z. Podlesek, A. Sonnen *et al.* (2008) Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin. *J. Biol. Chem.* 283:18665-18677.
- Bernheimer, A.W. y L.S. Avigad (1976) Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichacis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73: 467-471.
- Brockman, H. (1999) Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 438-443.
- Castilla, A.L., F.P. Santos, S. Schreier y J.R. Pires (2013) Solution NMR analysis of the interaction between the actinoporin Sticholysin I and DHPC micelles. Correlation with backbone dynamics. *Proteins*. doi: 10.1002/prot.24475.

- Castrillo, I. J. Alegre-Cebollada, A.M. del Pozo, J.G. Gavilanes *et al.* (2009) ^1H , ^{13}C , and ^{15}N NMR assignments of the actinoporin sticholysin I. *Biomol. NMR Assign* 3(1):5-7.
- Castrillo, I., N.A. Araujo, J. Alegre-Cebollada, J.G. Gavilanes *et al.* (2010) Specific interactions of sticholysin I with model membranes: An NMR study. *Proteins* 78: 1959–1970.
- Enemark, S., N.A. Kurniawan, R. Rajagopalan (2012) β -hairpin forms by rolling up from C-terminal: Topological guidance of early folding dynamics. *Sci. Reports* 2:649.
- García-Linares, S., I. Castrillo, M. Bruix, M. Menéndez *et al.* (2013) Three-dimensional structure of the actinoporin sticholysin I. Influence of long-distance effects on protein function. *Arch. Biochem. Biophysics* 532: 39-45.
- Gromiha, M., J. An, H. Kono, M. Oobatake *et al.* (1999) ProTherm: Thermodynamic Database for Proteins and Mutants. *Nucleic Acids Res.* 27(1): 286-288.
- Guex, N. y M.C. Peitsch (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714-2723.
- Gutiérrez-Aguirre, I.; A. Barlič; Z. Podlesek; P. Maček *et al.* (2004) Membrane insertion of the N-terminal alpha-helix of equinatoxin II, a sea anemone cytolytic toxin. *Biochem. J.* 384:421-428.
- Harshman, S. y N. Sugg (1985) Effect of calcium ions on staphylococcal alpha-toxin-induced hemolysis of rabbit erythrocytes. *Infection and Immunity* 47:37-40.
- Hinds, M.G.; W. Zhang; G. Anderluh; P.E. Hansen *et al.* (2002) Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytolytic equinatoxin II: implications for pore formation. *J. Molec. Biol.* 315: 1219-1229.
- Ho, S.N.; H.D. Hunt; R.M. Horton; J.K. Pullen *et al.* (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77(1):51-59.
- Kayalar, C. y N. Duzgunes (1986) Membrane action of colicin E1: detection by the release of carboxyfluorescein and calcein from liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 860:51–56.
- Kelly, S.; T. Jess y N. Price (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1751:119-139.
- Kem, W.R. (1988) Sea anemone Toxins: structure and action. En: Kem W.R. (Ed.), *The biology of the nematocyst*, New York: Academic Press. pp. 375-405.
- Kristan, K., Z. Podlesek, V. Hojnik, I. Gutiérrez-Aguirre *et al.* (2004) Pore formation by Equinatoxin, a Eukaryotic Pore-forming Toxin, Requires a Flexible N-terminal Region and a Stable β -Sandwich. *J. Biol. Chem.* 45(279): 46509-46517.
- Kristan, K.C., G. Viero, M. Dalla Serra, P. Maček *et al.* (2009) Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon* 54(8): 1125-1134.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lakowicz, J.R. (2006a) Protein Fluorescence. En: Lakowicz J.R. (Ed.) *Principles of Fluorescence spectroscopy* (3era Edición), New York: Springer. pp. 529-575.
- Lakowicz, J.R. (2006b) Quenching Fluorescence. En: Lakowicz J.R. (Ed.) *Principles of Fluorescence spectroscopy* (3ra Edición), New York: Springer. pp. 277-330.
- Lanio, M.E., V. Morera, C. Álvarez, M. Tejuca *et al.* (2001) Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 39:187-194.
- Malovrh, P., G. Viero, M. Dalla Serra, Z. Podlesek *et al.* (2003) A novel mechanism of pore-formation: Membrane penetration by the N-terminal amphipathic region of Equinatoxin. *J. Biol. Chem.* 278: 22678-22685.
- Mancheño, J.M., J. Martín-Benito, M. Martínez-Ripoll, J.G. Gavilanes *et al.* (2003) Crystal and electron microscopy structures of Sticholysin II actinoporin reveal insight into the mechanism of membrane pore formation. *Structure* 11: 1319-1328.
- Martínez, D., A. Otero, C. Álvarez, F. Pazos *et al.* (2007) Effect of sphingomyelin and cholesterol on the interaction of St II with lipidic interfaces. *Toxicon* 49(1): 68-81.
- Mechaly, A.E., A. Bellomio, D. Gil-Cartón, K. Morante *et al.* (2011) Structural Insights into the Oligomerization and Architecture of Eukaryotic Membrane Pore-Forming Toxins. *Structure* 19: 181-191.
- Pardo-Cea, M.A., I. Castrillo, J. Alegre-Cebollada, A. Martínez-del-Pozo *et al.* (2011) Intrinsic local disorder and a network of charge-charge interactions are key to actinoporin membrane disruption and cytotoxicity. *Biomolecular NMR Assignment* 4: 69-72.
- Pazos, F., A. Valle, D. Martínez, A. Ramírez *et al.* (2006) Structural and functional characterization of a recombinant sticholysin I (rSt I) from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 48: 1083-1094.
- Pentón, D., V. Pérez-Barzaga, I. Díaz, M. Reytor *et al.* (2011) Validation of a mutant of the pore-forming toxin sticholysin-I for the construction of proteinase-activated immunotoxins. *Protein Engineering, Design & Selection* 24(6): 485-493.
- Pettersen, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch *et al.* (2004) UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comp. Chem.* 25 (13): 1605-1612.

- Pulagam, L.P. y H.J. Steinhoff (2013) Acidic pH-induced membrane insertion of colicin A into *E. coli* natural lipids probed by site-directed spin labeling. *J. Mol. Biol.* 425: 1782-1794.
- Rouser, G., S. Fkeischer y A. Yamamoto (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separations of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5(5): 494-496.
- Studier, F.W. (2005) Protein production by autoinduction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 41: 207-234.
- Tejuca, M., C. Alvarez, M.E. Lanio y I.F. Pazos (1994) Effect of different factors on the hemolytic activity of a cytolysin from *Stichodactyla helianthus*. *Biología* 8: 1-5.
- Tejuca, M., M. Dalla, M. Ferreras, M.E. Lanio *et al.* (1996) Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolysin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 35:14947-14957.
- Valle, A.; A. López-Castilla; L. Pedrera; D. Martínez *et al.* (2011) Cys mutants in functional regions of Sticholysin I clarify the participation of these residues in pore formation. *Toxicon* 58:8-17.
- Venjaminov, S.Y. y J.T. Yang (1996) Determination of Protein Secondary Structure. En: Fasman G.D. (Ed.), *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, New York: Plenum Press. pp. 69-107.
- Vriend, G. (1990) WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graphics* 8:52-56.

• • •

Editor para correspondencia: Dra. Maday Alonso

REVISTA CUBANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

RNPS: 2362 • ISSN: 2307-695X • VOL. 3 • N.º 2 • MAYO— JULIO • 2014 • pp. 27-40