



ARTÍCULO ORIGINAL

StIIR124C: un nuevo mutante para la caracterización del mecanismo de formación de poros de Sticholisina II en células

StIIR124C: a new mutant to characterize the mechanism of pore formation by Sticholysin II in cells

Aymé Castillo Martínez, Haydeé Mesa Galloso, Sheila Cabezas Falcón, Pedro Alberto Valiente Flores, Isabel Fabiola Pazos Santos, Carlos Manuel Álvarez Valcárcel, María Eliana Lanio Ruiz, Uris Lianne Ros Quincoces*

Centro de Estudio de Proteínas,
Facultad de Biología, Universidad
de La Habana (UH), Cuba

Autor para correspondencia:
urislianne@gmail.com

RESUMEN

La Sticholisina II (StII) es una actinoporina producida por la anémona de mar *Stichodactyla helianthus* (Anthozoa: Stichodactylidae). Su estructura tridimensional se caracteriza por un núcleo central de hojas- β intercaladas flanqueado por dos hélices- α , un sitio de unión interfacial y lazos que interconectan las fibras β . El mecanismo de formación de poros de las actinoporinas transcurre mediante varias etapas dentro la que se encuentra: la unión a la membrana, la oligomerización, el despliegue del extremo amino y finalmente la formación del poro. Dicho mecanismo no ha sido completamente dilucidado, fundamentalmente las bases moleculares de la etapa de oligomerización. En general, las actinoporinas no poseen residuos de cisteínas en su estructura primaria. La obtención de mutantes de cisteína permite el marcaje con numerosas sondas fluorescentes o de espín específicas a los grupos sulfidrilos (SH) para el estudio de la interacción proteína-membrana. Esto impone la necesidad de obtener variantes mutadas de la proteína que incorporen la cisteína a su estructura. En este trabajo, se obtuvo el mutante StII R124C en el que se sustituyó el aminoácido Arg¹²⁴, localizado hacia el extremo carboxilo de StII, por un residuo de cisteína. StII R124C se expresó en el sistema de *Escherichia coli* y se purificó en un solo paso mediante cromatografía de intercambio catiónico. La actividad biológica de StII R124C evaluada mediante la lisis de células eritrocitarias no mostró variación, lo que sugiere que la sustitución de Arg¹²⁴ por cisteína en StII recombinante no afecta la capacidad formadora de poros de la proteína. Así, el mutante StII R124C constituye una alternativa para la realización de estudios de relación estructura-función.

Palabras clave: citolisinas, proteína formadora de poros, mutantes de Cys, actividad hemolítica

Recibido: 2017-09-19

Aceptado: 2018-03-20

ABSTRACT

AYMÉ CASTILLO MARTÍNEZ ET AL.

Sticholysin II (StII) is an actinoporin produced by the sea anemone *Stichodactyla helianthus* (Anthozoa: Stichodactylidae). 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. Experimental evidence shows that 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 the membrane surface, leading to the formation of a functional pore. However, the molecular details of the mechanism of oligomerization are not clear. Actinoporins do not have cysteine residues in their primary structure. Cysteine mutants allow the labeling of the proteins with different dyes as fluorescent or spin probes specifically to sulfhydryl groups (SH). They can be used for the study of the interaction of these proteins with membrane. This imposes the need to obtain mutated variants of the protein that incorporate cysteine into its structure. In this work, we obtained a mutant of StII in which the residue Arg¹²⁴, located near the C-terminus, was replaced by cysteine (StII R124C). StII R124C was expressed in a bacterial *Escherichia coli* system and purified in a single step by cation exchange chromatography. StII R124C mutant showed the same pore-forming activity as the native protein suggesting that the substitution of Arg¹²⁴ for cysteine in recombinant StII does not affect the pore-forming capacity of the protein. Thus, the mutant StII R124C constitutes an alternative for the performance of studies of structure-function relationship.

Keywords: cytolysins, pore-forming protein, Cys mutants, hemolytic activity

INTRODUCCIÓN

Stichodactyla helianthus (Anthozoa: Stichodactylidae) es una anémona que se encuentra en relativa abundancia en las costas del Mar Caribe, a partir de la cual se han aislado y caracterizado dos citolisinas denominadas Sticholisina I y II (StI y StII) (Lanio *et al.*, 2001). La StII es una proteína de aproximadamente 20 kDa de masa molecular, presenta un punto isoeléctrico superior a 9, no posee residuos de Cys en su estructura primaria, incrementa la permeabilidad iónica de las membranas al formar poros y su actividad hemolítica es mayor que la de la StI (Lanio *et al.*, 2001). Hasta el momento se conocen las estructuras tridimensionales (3D) de cuatro actinoporinas (AP): la equinotoxina II (EqtII) producida por la anémona *Actinia equina* (Anthozoa: Actiniidae) (Hinds *et al.*, 2002), la StII (Mancheño *et al.*, 2003), la fragaceatoxina C (FraC) de *Actiniafragacea* (Anthozoa: Actiniidae) (Mechaly *et al.*, 2011) y la StI (García-Linares *et al.*, 2013). La comparación de las estructuras 3D de estas proteínas 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, Mechaly *et al.*, 2011, García-Linares *et al.*, 2013). La hélice- α localizada hacia el segmento del extremo amino (hélice- α 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, Mechaly *et al.*, 2011). La determinación de la estructura 3D de un complejo StII-fosforilcolina (POC) permitió identificar un sitio de unión a POC

(Mancheño *et al.*, 2003). Este sitio, conservado en el resto de las APs (Mancheño *et al.*, 2003, Tanaka *et al.*, 2015), está constituido por los residuos Ser⁵², Val⁸⁵, Ser¹⁰³, Pro¹⁰⁵, Tyr¹¹¹, Tyr¹³¹, Tyr¹³⁵ y Tyr¹³⁶ en la StII. Se destaca una agrupación de aminoácidos aromáticos: Phe¹⁰⁶, Trp¹¹⁰, Tyr¹¹¹, Trp¹¹⁴, Tyr¹³¹, Tyr¹³⁵ y Tyr¹³⁶ que se encuentran cercanos al sitio de unión a POC (Anderluh y Macek 2002). Bakrač *et al.* (2008) definieron al conjunto estructural compuesto por el sitio de unión a POC y la agrupación de aminoácidos aromáticos como el sitio de unión interfacial (SUI). Además, se ha descrito una agrupación de aminoácidos básicos de StII compuesta por: Lys¹¹⁸, Lys¹⁴⁹, Arg¹⁵⁶, Arg¹⁷⁵, Lys¹²³, Arg¹²⁴ y Arg¹²⁵. A estos residuos se les atribuye la función de interactuar con las cargas negativas de los fosfolípidos que conforman las membranas lipídicas (Mancheño *et al.*, 2003).

Hasta el momento, se han propuesto varios modelos para la arquitectura del poro formado en las membranas por las APs: el poro toroidal (Álvarez, 2001), el poro cónico (Mechaly *et al.*, 2011) y el poro híbrido (Tanaka *et al.*, 2015). El modelo de poro toroidal plantea que el poro está formado por 3-4 monómeros de proteínas y lípidos no formadores de bicapa. El modelo del poro cónico plantea que el poro está formado por 9 monómeros de proteína y excluye la participación de lípidos, mientras que el modelo del poro híbrido asume que el poro está formado por 8 monómeros con participación de los lípidos (Tanaka *et al.*, 2015). 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): *i*) unión de los monómeros a la membrana a través del SUI (Bakrac *et al.*, 2008), *ii*) la oligomerización (Malovrh *et al.*, 2003, Mancheño *et al.*, 2003, Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2004) y *iii*) el despliegue e inserción del segmento del extremo amino (Malovrh *et al.*, 2003, Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2004, Rojko *et al.*, 2014). Estas etapas conducen finalmente a la formación del poro al penetrar el extremo amino en la membrana en una conformación helicoidal (Álvarez *et al.*, 2001, Álvarez *et al.*, 2003, Anderluh *et al.*, 2003, Mechaly *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta que las actinoporinas carecen de residuos de cisteína en su secuencia primaria, en los estudios de relación estructura-función, es ampliamente utilizada la obtención de variantes recombinantes en las que se sustituye un aminoácido por un residuo de cisteína (Valle *et al.*, 2011, Subburaj *et al.*, 2015). La introducción de cisteína en la secuencia de las actinoporinas permite enlazar su grupo SH con sondas fluorescentes o de espín específicas. Este marcaje ha resultado útil para el estudio de interacción proteínas-membranas mediante el empleo de técnicas espectroscópicas (Bleicken *et al.*, 2010, Pulagam y Steinhoff 2013). El estudio de proteínas de membrana empleando técnicas de detección de moléculas individuales, posibilita el análisis del número de moléculas de las especies oligoméricas y de la localización preferencial de estas proteínas en regiones específicas de la membrana. Hasta el momento no se han obtenido mutantes de StII, es por ello que el objetivo de este trabajo es la obtención de un mutante de StII que incorporen un residuo de cisteína a su estructura sin afectar sus propiedades líticas. Tomando como antecedentes la obtención del mutante EqtII R126C de la actinoporina EqtII, con capacidad hemolítica similar a la de la proteína nativa y un rendimiento de marcaje de 71%, (Anderluh *et al.*, 1998), la sustitución de la Arg¹²⁴ de la StII (equivalente a la Arg¹²⁶ de la EqtII), por Cys, constituye una propuesta para la obtención de una variante mutada que reproduzca la actividad funcional de la proteína nativa. En este trabajo, se obtuvo el mutante StII R124C el cual se expresó en células de *Escherichia coli* y se purificó mediante un paso de cromatografía de intercambio catiónico, de manera análoga a la variante recombinante de la StII. La mutación por cisteína así como el marcaje con dos sondas fluorescentes no afectó la actividad de la proteína recombinante. Así este nuevo mutante, resulta apropiado para su uso en estudios de relación estructura-función como son

los estudios de detección de moléculas individuales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La Sticholisina II nativa obtenida a partir de la anémona *Stichodactyla helianthus* se obtuvo en el Laboratorio de Biomembranas del Centro de Estudio de Proteínas (CEP) de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La purificación de estas proteínas se llevó a cabo según el protocolo descritos por Lanio *et al.* (2001).

Diseño de StII R124C

La construcción del modelo 3D de StII R124C se realizó reemplazando la Arg¹²⁴ por cisteína en el modelo 3D de la StII. El área accesible a la superficie (ASA) de este residuo se calculó a partir de la estructura 3D de la StII (Fig. 1) en el servidor web *WHAT IF* (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>) con la opción "Accessibility-Buried surface" (Vriend, 1990).

Obtención del mutante StII R124C

El gen que codifica para la StII se extrajo del vector comercial pUC-57 que contiene este gen sintético (GenScript, EUA). Para ello se amplificó la secuencia que codifica para StII por RCP (reacción en cadena de la polimerasa). Se utilizó el juego de reactivos Promega Access PCR System (Promega, EUA) y un termociclador PTC150 (MJ Research, EUA). Se utilizaron dos oligonucleótidos cebadores específicos (A y B) que son complementarios con las regiones que flanquean al gen que codifica para StII en el vector pUC-57 y que introducen los sitios de corte para las enzimas NdeI y XhoI (Tabla 1).

El producto de la RCP se digirió con las enzimas de restricción NdeI y XhoI, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega, EUA), con el fin de crear compatibilidad de unión de los extremos del gen y del vector pET-21a optimizado para la expresión y producción de proteínas en citoplasma. Las bandas digeridas se purificaron nuevamente y se ligaron con el vector pET-21a empleando la enzima T4 ADN ligasa (Promega, EUA). La obtención del plasmidio pET-21a-StII R124C se realizó por mutagénesis sitio-dirigida a partir del plasmidio pET-21a-StIIr. La RCP inversa se realizó utilizando la polimerasa *Master Mix High Fusion*, el plasmidio pET-21a-StIIr como molde y los oligonucleótidos C y D (Tabla 1) mediante el esquema de ciclos que se muestran en la Tabla 2. La mezcla de reacción se digirió con la enzima DpnI durante 2 horas a 37 °C.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en la obtención del gen StII R124C.**Table 1.** Oligonucleotides used for obtaining the StII R124C gene.

Nombre	Secuencia
A	5'-GGGAATTCATATGGCACTGGCTGGCACGATC-3'
B	5'-CCGCTCGAGACGGCTGATTTTGATTG-3'
C	5'-AAATCTATTCAGGTAATGCCGCGCCGATCAGGGCA-3'
D	5'-TGCCTGATCGGCGCGCATTACCTGAATAGATTT-3'

Los nucleótidos que introducen la sustitución por Cys, se encuentran resaltados en negrita. Se subrayan los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción NdeI (A) y XhoI (B), respectivamente.

El plasmidio que contenía la mutación se purificó mediante el estuche comercial Mini Preps (Promega, EUA). Posteriormente, se realizó un chequeo de restricción a los plasmidios purificados con las enzimas NdeI y XhoI para determinar la presencia del gen StII R124C. Los

clones que resultaron positivos al análisis de digestión se secuenciaron (Macrogen, Corea) para comprobar la integridad del gen y la presencia del marco de lectura correcto. La secuenciación (Macrogen, Corea) resultó en un solo clon con la secuencia correcta.

Tabla 2. Ciclos térmicos para amplificar el gen StII R124C.**Table 2.** Thermal cycles to amplify the StII R124C gene.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	No. de ciclos
Desnaturalización	98	2	1
Desnaturalización	98	0,3	40
Hibridación	62	0,4	40
Extensión	72	5	40

Expresión, purificación y marcaje de StII R124C

El plasmidio pET-21a-StII o el pET-21a-StII R124C se introdujo en células competentes BL-21(DE3) de *E. coli* mediante shock térmico según instrucciones del proveedor (Novagen, EUA). Para su expresión y producción se empleó 1 mmol/L de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor durante 5 horas en 1L de cultivo en medio LB a 30°C con agitación. La purificación de la StII R124C 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 una columna de 15 mL de volumen con una solución de 0,05 mol/L de Acetato de sodio, pH 5,0. La elución se realizó con 1L de un gradiente lineal de fuerza iónica 0-1 mol/L de NaCl. El flujo lineal del proceso cromatográfico fue de 9,6 cm/h. En el proceso cromatográfico, se incluyó un paso de lavado intermedio con 100 mmol/L de β-mercaptoetanol (BME) para eliminar moléculas no deseadas que hubiesen podido enlazarse al grupo SH del residuo de Cys (Valle *et al.*, 2011). La homogeneidad de la proteína se comprobó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 % según Laemmli (1970). Se determinó el porcentaje de proteína obtenido en forma de cuerpos de inclusión y en forma soluble mediante densitometría digital

(programa *ImageJ* versión 1.46r) a partir de las bandas electroforéticas. La movilidad electroforética relativa de la StII R124C purificada se analizó de forma comparativa con la StII mediante electroforesis nativa al 9% según Pentón *et al.* (2011) a concentraciones de 10 μmol/L de ambas proteínas, además permitió evaluar la existencia de estructuras diméricas en la muestra de la StII R124C. La concentración proteica se determinó mediante la absorción a 280 nm y el coeficiente de extinción de la StII obtenido por Lanio *et al.* (2001). La StII R1246C se marcó con Alexa Fluor 488 maleimida (StII-AI488) o Alexa Fluor 555 maleimida (StII-AI555) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Alemania). La proteína marcada se separó del exceso de la sonda a partir de una cromatografía de filtración en gel en columna PD-10 (Bio-Rad). La eficiencia de marcaje fue cercana al 100% y se determinó por espectroscopía de absorbancia (Specord S 100, Analytik Jena, Alemania) siguiendo el método empleado por Bleicken *et al.* (2010).

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 al menos tres donantes sanos y su concentración se ajustó por dilución, con solución amortiguadora TBS, hasta obtener un valor de absorbancia de 0,1 a 600 nm, en las condiciones del ensayo. A las toxinas previamente o no incubadas con BME 15 mmol/L se les realizaron, diluciones dobles seriadas con TBS, a partir de una concentración inicial de 20×10^{-9} mol/L, 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. A_T es la absorbancia que corresponde a la lisis total de los eritrocitos en presencia de un exceso de toxina (10 nmol/L). 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 según la siguiente ecuación:

$$\% AH = \frac{AH_{max} * C^n}{HC_{50} + C^n}$$

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. Los datos se procesaron en el programa Origin Lab versión 8.0.

Microscopía de campo claro y confocal

Las imágenes de microscopía se obtuvieron con el microscopio confocal comercial LSM 710 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemania) a 37°C. Las células BHK se sembraron a una concentración de 4×10^4 células/mL en cámaras de 8 pocillos IBIDI (Ibidi, Martinsried Alemania) durante 24 horas previas al experimento para lograr un 70 % de confluencia. Las imágenes de campo se obtuvieron en células tratadas con la StII (15 nmol/L) en 250 μ L de solución DMEM Medium sin rojo de fenol. (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania). Para los estudios de microscopía de fluorescencia las células se preincubaron con yoduro de propidio (PI) (2 μ g/mL concentración final) en 250 mL de DMEM y posteriormente

tratadas con 15 nmol/L de StII marcada (StII R124C-Alexa488) considerando el número de células por mL. Las células y la toxina marcada se visualizaron con el empleo de un microscopio confocal de fluorescencia. Las imágenes de fluorescencia de transmisión se obtuvieron mediante un Zeiss C-Apochromat 40X, con un objetivo de inmersión sobre la muestra NA =1,2; las longitudes de onda de excitación fueron de 488 y 535 nm. La obtención de las imágenes se realizó antes y después de la adición de la toxina y la mejor posición de enfoque se seleccionó manualmente.

RESULTADOS

Diseño de StII R124C

La elección del sitio de la mutación en la StII se realizó utilizando como antecedente el mutante EqII R126C (Anderluh *et al.*, 1998), equivalente a la StII R124C, que reproduce la actividad hemolítica de la proteína nativa. La conservación de la actividad es una condición necesaria para su utilización en estudios de marcaje que permitan profundizar en el mecanismo de acción de estas toxinas.

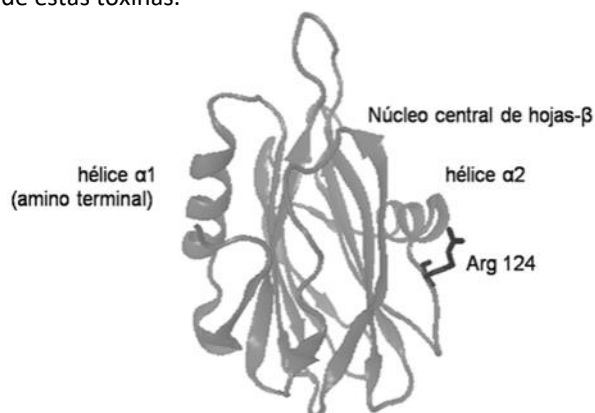


Figura 1. Estructura tridimensional de la StII (PDB: 1o72) (Mancheño *et al.*, 2003). Se especifican los elementos estructurales principales. La cadena lateral de la Arg¹²⁴ se representa con varillas en color negro. La figura se realizó con el programa VMD versión 1.9.1 (Humphrey *et al.*, 1996).

Figure 1. Three-dimensional structure of StII (PDB: 1o72) (Mancheño *et al.*, 2003). The main structural elements are specified. The side chain of Arg¹²⁴ is represented with black bonds. Image was generated by VMD version 1.9.1 (Humphrey *et al.*, 1996).

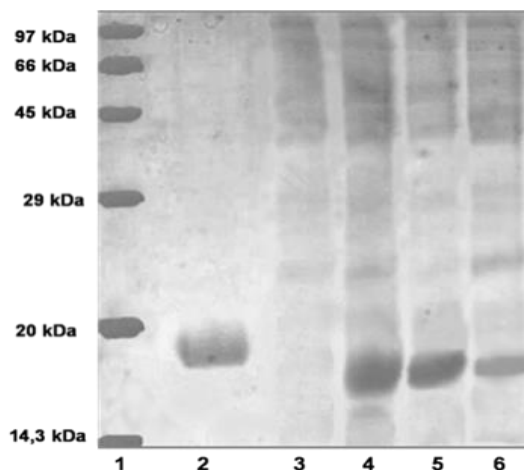
El análisis de la exposición del residuo al solvente mostro que la Arg¹²⁴ presenta un valor de ASA de 67 ± 5 %. Según Gromiha *et al.* (1999) los residuos con más de un 50 % de ASA se consideran expuestos.

Obtención de StII R124C

Mediante el método de inducción con IPTG se expresó un 80 % de la StII R124C en cuerpos de inclusión y un 20 % en la fracción soluble (Fig. 2).

Figura 2. Análisis de la expresión de la StII R124C mediante SDS-PAGE (15%) (Laemmli, 1970). El plasmidio pET-21a-StII R124C se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3). En la expresión de la StII R124C se empleó IPTG (1mmol/L) como inductor durante 5 horas. Carril 1, patrones de peso molecular; carril 2, StII nativa; carril 3, biomasa no inducida; carril 4, biomasa inducida; carril 5, sedimento después de la centrifugación; carril 6, fracción soluble después de la centrifugación.

Figure 2. Assessment of expression of StII R124C by SDS-PAGE (15%) (Laemmli, 1970). The plasmid pET-21a-StII R124C were used to transform the *E. coli* BL21 (DE3). Expression of the StII R124C was induced with IPTG (1 mmol/L) for 5 h. Lane 1, molecular weight patrons; lane 2, StII native; lane 3, non-induced cells; lane 4, induced cells; lane 5, sediment after centrifugation; lane 6, soluble fraction after centrifugation.



La proteína mutante se purificó a partir de la fracción soluble, en un solo paso cromatográfico de intercambio catiónico. La evaluación de la actividad hemolítica en las fracciones del perfil mostró un único pico de actividad coincidente con el pico III (Fig. 3A).

El análisis por SDS-PAGE (Fig. 3B) sugiere que el pico III se corresponde con la toxina mutada. La StII R124C eluye aproximadamente a 0.6 mol/L de NaCl con una homogeneidad superior al 95 % y un rendimiento de

la purificación de 5,2 mg de proteína por litro de cultivo.

La StII R124C en la concentración empleada (10 μ mol/L) no fue capaz de formar espontáneamente dímeros enlazados por puentes disulfuro (Fig. 4) a diferencia de otras proteínas mutantes de Cys de la StI (Penton *et al.*, 2011, Valle *et al.*, 2011) y de la EqtII (Anderluh *et al.*, 1999).

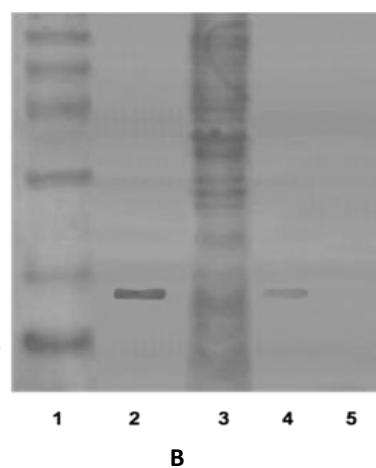
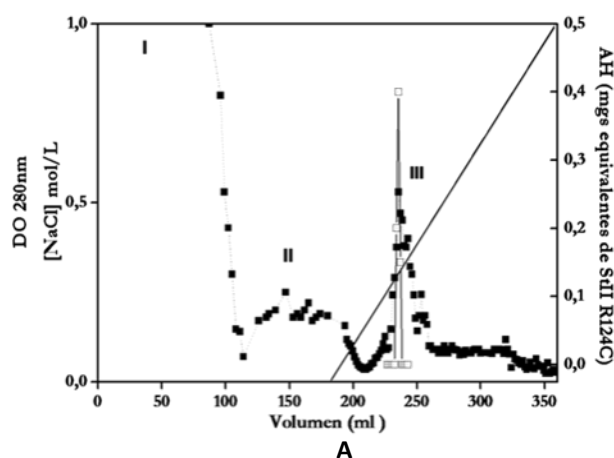


Figura 3. A) Perfil cromatográfico de intercambio catiónico de la StII R124C donde se observan los valores de densidad óptica a 280 nm (■) de cada fracción; el gradiente lineal de NaCl (mol/L) empleado en la elución (línea negra) y la actividad hemolítica del pico III (□). Pico I: muestra no fijada a la matriz, pico II: lavado con BME 100 mmol/L, pico III: pico de elución. B) Análisis mediante SDS-PAGE al 15 % (Laemmli, 1970), carril 1, patrones de peso molecular; carril 2, StII nativa; carril 3, pico I; carril 4, pico III; carril 5, pico II.

Figure 3. A) Cation exchange chromatography of StII R124C where it is observed optical density values of fractions at 280 nm (D_{280}) (■), NaCl (mol/L) elution gradient (black line); hemolytic activity of peak III (□). Peak I: unbound sample, peak II: washed step with 100 mmol/L BME, peak III: elution peak. B) SDS-PAGE 15 % (Laemmli, 1970), lane 1, molecular weight patrons; lane 2, StII native; lane 3, peak I; lane 4, peak III; lane 5, peak II.

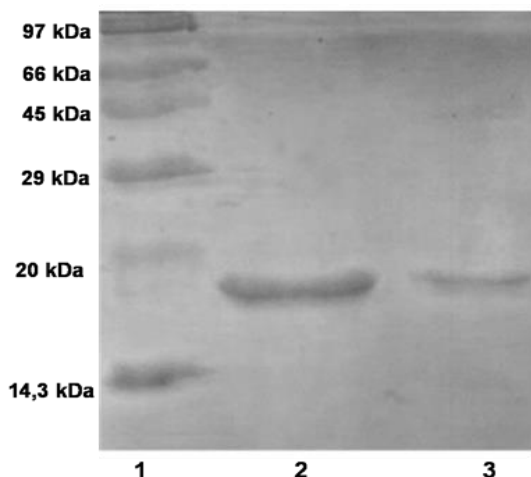


Figura 4. Análisis mediante PAGE nativa al 9 % (Penton *et al.*, 2011), carril 1, patrones de peso molecular; carril 2, StII nativa (10 $\mu\text{mol/L}$); carril 3, StII R124C (10 $\mu\text{mol/L}$).

Figure 4. Analysis by Native PAGE 9% (Penton *et al.*, 2011), lane 1, molecular weight patrons; lane 2, StII native (10 $\mu\text{mol/L}$); lane 3, StII R124 (10 $\mu\text{mol/L}$).

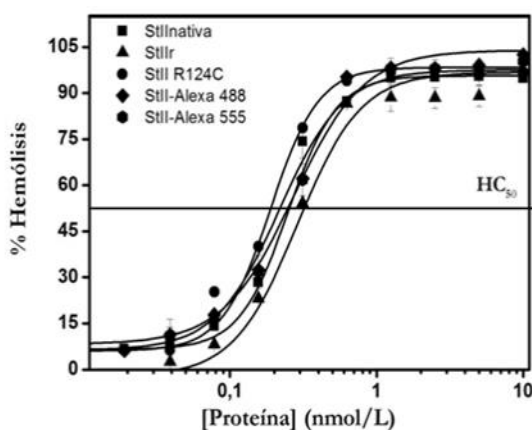


Figura 5. Actividad hemolítica de StII nativa, StIIr y StII R124C en función de la concentración de proteínas durante 30 minutos en una suspensión de eritrocitos humanos a 25°C. Los valores representan el promedio de tres determinaciones experimentales independientes, las barras verticales la desviación estándar y la línea continua el mejor ajuste a la función sigmoidea de Hill. En algunos experimentos la desviación estándar es más pequeña que los símbolos.

Figure 5. Hemolytic activity of StII, StIIr and StII R124C was measured as a function of protein concentration during 30 minutes in human erythrocyte suspensions at 25°C. 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 Hill sigmoidal function by a solid line. In some experiments the standard deviation is smaller than the symbols.

Capacidad formadora de poros de StII R124C y de sus variantes marcadas

La capacidad formadora de poros de la StII R124C y de dos variantes marcadas con las sondas fluorescentes Alexa 488 y Alexa 555 se evaluó al determinar su actividad hemolítica frente a eritrocitos humanos. En la Figura 5 se representan los porcentajes de hemólisis alcanzados por StIIr, StII R124C y StII nativa a diferentes concentraciones de toxina una vez transcurridos los 30 minutos del ensayo. El ajuste de los resultados experimentales a la función de Hill, permitió calcular las concentraciones de toxinas necesarias para producir la lisis del 50% de los eritrocitos en el ensayo (HC₅₀). Los valores de HC₅₀ calculados (Tabla 3) indicaron que en este modelo de membrana la StII R124C y sus variantes marcadas no muestran diferencias con respecto a la StIIr y la StII nativa.

Las imágenes de células vivas tomadas por microscopía confocal (Fig. 6) demuestran que la proteína marcada es capaz de unirse a la membrana plasmática (canal verde) y causar la lisis celular. Dicha unión trajo como consecuencia la ruptura de la membrana plasmática debido a la formación de poros, tal como se evidenció por el incremento de la señal intracelular del marcador fluorescente PI (canal magenta).

DISCUSIÓN

La obtención de variantes de actinoporinas en las cuales se sustituye un aminoácido por Cys permite la utilización de numerosas sondas fluorescentes o de espín específicas a los grupos SH y así el estudio de la interacción de dichas proteínas con la membrana mediante espectroscopía de fluorescencia o de resonancia paramagnética electrónica. Por ejemplo, tal sustitución en la EqII ha permitido 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). A su vez, a partir de la StI se han obtenido y caracterizado cinco mutantes de Cys (StI E2C, StI F15C, StI R52C, StI P80C y StI W111C), lo cual ha permitido evaluar la importancia funcional de estas posiciones (Penton *et al.*, 2011, Valle *et al.*, 2011, Hervis-Valdés *et al.*, 2014), además de su utilización para el marcaje con sondas de espín (Hervis-Valdés, 2013) y la obtención de inmunotoxinas (Tejuca *et al.*, 2009).

Tabla 3. Valores de HC_{50} de StII, StIIr y StII R124C.**Table 3.** Values of HC_{50} of StII, StIIr and StII R124C.

Proteína	$HC_{50} \pm DE$ (nmol/L)
StII nativa	$0,22 \pm 0,007$
StII r	$0,19 \pm 0,012$
StII R124C	$0,26 \pm 0,013$
StII-Alexa 488	$0,25 \pm 0,010$
StII-Alexa 555	$0,20 \pm 0,015$

Los valores de ASA del residuo Arg124 de la StII muestran que este se encuentra expuesto al solvente (Fig. 1), resultado que sugiere que este residuo constituye un buen candidato para estudios de marcaje de estas proteínas. La obtención del mutante StII R124C y la ausencia de dímeros en las condiciones ensayadas (Fig. 4) difiere al resultado obtenido por Valle *et al.*, (2011). Estos autores observaron la formación de dímeros para StI E2C y StI R52C a concentraciones similares de la toxina, y con valores

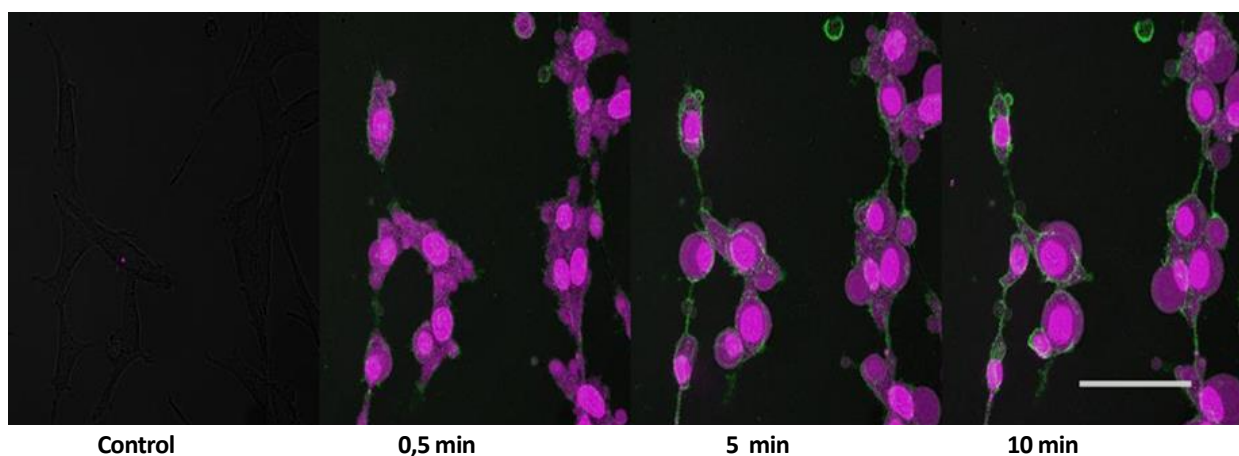


Figura 6. Imágenes de células vivas obtenidas por microscopía confocal a diferentes tiempos después del tratamiento con la StII (10 nmol/L) marcada con Alexa 488, barra escala 500 μ m, PI (2 μ g/ml). Nótese la unión de la proteína a la membrana plasmática (canal verde), así como el incremento paulatino del tamaño celular y la entrada del marcador fluorescente PI (canal magenta). Los ensayos se realizaron en medios en ausencia de Suero Fetal Bovino para evitar la interacción de la toxina con componentes del suero: las imágenes representan al menos tres experimentos independientes.

Figure 6. Images of live cells obtained by confocal microscopy at different times after treatment with StII (10 nmol / L) labeled with Alexa 488, bar scale 500 μ m, PI (2 μ g / ml). Note the binding of the protein to the plasma membrane (green channel), as well as the gradual increase in cell size and the entrance of the PI fluorescent marker (magenta channel). Experiments were done in media without FBS to avoid interaction of the toxin with serum components. Pictures are representative of at least three independent experiments.

de ASA de estos residuos superiores al 50 %. La StII R124C constituye un buen candidato para estudios de marcaje con sondas fluorescentes o de espín ya que el residuo de Cys¹²⁴, a pesar de presentar a una alta exposición al solvente, no es capaz de formar dímeros.

La StII R124C se expresó en las células de *E. coli* BL21 (DE3) tanto en la fracción soluble como en cuerpos de inclusión (Fig. 2) como se ha informado para otras actinoporinas y mutantes de StIIr (Valle *et al.*, 2011). A pesar de que la proteína se expresó mayoritariamente como cuerpos de inclusión (80%), el proceso de purificación de la StII R124C se desarrolló a partir de la fracción soluble (Fig. 3), debido a que en el

proceso de renaturalización se pueden originar poblaciones de moléculas conformacionalmente diferentes a la nativa, como fue evidenciado para la StII por Mancheño *et al.* (2003). El rendimiento alcanzado (5,2 mg/L) es menor al obtenido por Pazos *et al.* (2006) durante la obtención de la StIIr (10 mg/L de cultivo) y superior al alcanzado por Hervis-Valdés *et al.* (2014), pero se encuentra dentro del rango variable de rendimiento obtenido para el resto de los mutantes de la StI (2,5-9,6 mg/L de cultivo) (Valle *et al.* 2011).

Las tres toxinas mostraron un comportamiento similar en su capacidad hemolítica (Fig. 5). El valor

de HC_{50} de la StII R124C y sus variantes marcadas no mostró diferencias con respecto a la StII y la StIIr, resultado similar al obtenido por Anderluh *et al.* (1998) en la caracterización del mutante EqtII R126C. Resultados similares se obtuvieron con variantes de la StII marcadas con los fluoróforos Alexa 488 y Alexa 555 (Tabla 1). Las variantes marcadas StII-Alexa 488 (Fig. 6) y StII-Alexa 555 (resultados no mostrados, similares a Alexa 488) retienen la capacidad de unirse a las membranas y causar la lisis celular (Fig. 6).

La obtención, mediante un único paso de purificación en CM-52, del mutante StII R124C constituye el primer informe en la literatura de la obtención de un simple mutante de Cys de la StII que además reproduce la actividad hemolítica de la proteína nativa. Esta molécula constituye una herramienta valiosa para la realización de estudios de relación estructura-función en los cuales sea necesario el marcaje de las proteínas con sondas fluorescentes o de espín. Esto permitirá, además, abordar el estudio del mecanismo lítico de esta toxina mediante metodologías como la espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica o la detección de moléculas individuales a partir de estudios de fluorescencia.

AGRADECIMIENTOS

A Belinda Sánchez, División de Biología Tumoral del Centro de Inmunología Molecular (CIM), por su apoyo en la obtención del mutante StII R124C. A Ana J. García Saez, del laboratorio de Biofísica de Membranas del Instituto Bioquant de la Universidad de Heidelberg por donar los oligos y suministrar los materiales y equipos necesarios para el proceso de clonaje. Esta investigación fue financiada por con el proyecto F/4616 de la *International Foundation for Science* (IFS), Suecia.

LITERATURA CITADA

- Alegre-Cebollada, J., M. Onaderra, J. G. Gavilanes y A. M. del Pozo (2007) Sea anemone actinoporins: the transition from a folded soluble state to a functionally active membrane-bound oligomeric pore. *Curr. Protein. Pept.Sci.* 8(6): 558-572
- Álvarez, C., M. Dalla Serra, C. Potrich, I. Bernhart, *et al.* (2001) Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolytic toxins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys. J.* 80(6): 2761-2774
- 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. Phys. Lipids.* 122(1-2): 97-105
- Anderluh, G. y P. Macek (2002) Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon.* 40 (2): 111-124
- Anderluh, G., A. Barlic, I. Krizaj, G. Menestrina, *et al.* (1998) Avidin-FITC topological studies with three cysteine mutants of equinatoxin II, a sea anemone pore-forming protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242(1): 187-190
- Anderluh, G., A. Barlic, Z. Podlessek, P. Macek, *et al.* (1999) Cysteine-scanning mutagenesis of a eukaryotic pore-forming toxin from sea anemone: topology in lipid membranes. *Eur. J. Biochem.* 263(1): 128-136
- Anderluh, G., M. Dalla Serra, G. Viero, G. Guella, *et al.* (2003) Pore formation by equinatoxin II, a eukaryotic protein toxin, occurs by induction of non-lamellar lipid structures. *J. Biol. Chem.* 278(46): 45216-45223
- Bakrac, B., I. Gutierrez-Aguirre, Z. Podlessek, A. F. Sonnen, *et al.* (2008) Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin. *J. Biol. Chem.* 283(27): 18665-18677
- Bleicken, S., M. Classen, P. V. Padmavathi, T. Ishikawa, *et al.* (2010) Molecular details of Bax activation, oligomerization, and membrane insertion. *J. Biol. Chem.* 285(9): 6636-6647
- Castrillo, I., J. Alegre-Cebollada, A. M. del Pozo, J. G. Gavilanes, *et al.* (2009) ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR assignments of the actinoporin Sticholysin I. *Biomol. NMR Assign.* 3(1): 5-7
- García-Linares, S., I. Castrillo, M. Bruix, M. Menendez, *et al.* (2013) Three-dimensional structure of the actinoporin sticholysin I. Influence of long-distance effects on protein function. *Arch. Biochem. Biophys.* 532(1): 39-45
- Gromiha, M., M. J. An, H. Kono, M. Oobatake, *et al.* (1999) ProTherm: Thermodynamic Database for Proteins and Mutants. *Nucleic Acids Res* 27(1): 286-288
- Gutiérrez-Aguirre, I., A. Barlic, Z. Podlessek, P. Macek, *et al.* (2004) Membrane insertion of the N-terminal alpha-helix of equinatoxin II, a sea anemone cytolytic toxin. *Biochem. J.* 384 (Pt 2): 421-428
- Harshman, S. y N. Sugg (1985) Effect of calcium ions on staphylococcal alpha-toxin-induced hemolysis of rabbit erythrocytes. *Infect. Immun.* 47(1): 37-40
- Hervis-Valdés, Y. P. (2013) Obtención y marcaje con sonda paramagnética electrónica del mutante StIP80C de Sticholisina I, actinoporina de *Stichodactyla helianthus*. Tesis de Maestría., Universidad de La Habana, Cuba.
- Hervis-Valdés, Y. P., A. Valle Garay, L. Canet Santos, C. M. Álvarez Valcárcel, *et al.* (2014) Importancia funcional de la Pro80 para la interacción con membranas y la formación de poros por la sticholisina I, actinoporina de *Stichodactyla helianthus* (Anthozoa: Stichodactylidae). *Rev. Cub. Cien. Biol.* 3(2): 27-40

- Hinds, M., G. W. Zhang, G. Anderluh, P. E. Hansen, *et al.* (2002) Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytolytic toxin equinatoxin II: implications for pore formation. *J. Mol. Biol.* 315 (5): 1219-1229
- Humphrey, W., A. Dalke y K. Schulten. (1996) VMD-Visual Molecular. *J. Mol. Graphics.* 14(1):33-38
- Kristan, K., Z. Podlesek, V. Hojnik, I. Gutierrez-Aguirre, *et al.* (2004) Pore formation by equinatoxin, a eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable beta-sandwich. *J. Biol. Chem.* 279(45): 46509-46517
- Kristan, K., C. G. Viero, M. Dalla Serra, P. Macek, *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(5259): 680-685
- Lanio, M. E., V. Morera, C. Alvarez, M. Tejuca, *et al.* (2001) Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 39(2-3): 187-194
- Malovrh, P., G. Viero, M. D. 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(25): 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 insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure* 11(11): 1319-1328
- Mechaly, A., E. A. Bellomio, D. Gil-Carton, K. Morante, *et al.* (2011) Structural insights into the oligomerization and architecture of eukaryotic membrane pore-forming toxins. *Structure* 19(2): 181-191
- 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(8): 1083-1094.
- Penton, D., V. Perez-Barzaga, I. Diaz, M. L. Reytor, J. Campos, *et al.* (2011) Validation of a mutant of the pore-forming toxin sticholysin-I for the construction of proteinase-activated immunotoxins. *Protein. Eng. Des. Sel.* 24(6): 485-493
- 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(10): 1782-1794
- Rojko, N., B. Cronin, J. S. Danial, M. A. Baker, *et al.* (2014) Imaging the lipid-phase-dependent pore formation of equinatoxin II in droplet interface bilayers. *Biophys. J.* 106(8): 1630-1637
- Rojko, N., M. Dalla Serra, P. Macek y G. Anderluh (2015) Pore formation by actinoporins, cytolytic toxins from sea anemones. *Biochem. Biophys. Acta.* 1858(3):446-456
- Subburaj, Y., U. Ros, E. Hermann, R. Tong, *et al.* (2015). Toxicity of an alpha-pore-forming toxin depends on the assembly mechanism on the target membrane as revealed by single molecule imaging. *J. Biol. Chem.* 290(8): 4856-4865
- Tanaka, K., J. M. Caaveiro, K. Morante, J. M. Gonzalez-Manas, *et al.* (2015) Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid. *Nat. Commun.* 6:6337
- Tejuca, M., G. Anderluh y M. D. Serra (2009) Sea anemone cytolytic toxins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon* 54:1206-1214
- Valle, A., A. Lopez-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 (1): 8-17
- Vriend, G. (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 8(1): 52-56, 29



Editor para correspondencia: Dra. Maday Alonso