

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE  
TRANSLOCACIÓN Y PERMEABILIZACIÓN  
DE LA TOXINA ADENILATO CICLASA DE  
*Bordetella pertussis***

Memoria presentada por  
David González Bullón  
para optar al grado de Doctor en Ciencias

Trabajo dirigido por:  
Dra. Helena Ostolaza Etxabe y Dr. César Martín Plágaro



# Índice

<b>Capítulo 1: Introducción</b>	<b>16</b>
<b>1.1. <i>Bordetella pertussis</i>, tos ferina y factores de virulencia</b>	<b>17</b>
1.1.1. Tos ferina	17
1.1.2. Factores de virulencia	19
1.1.2.1. Toxinas	19
1.1.2.2. Proteínas de superficie	20
1.1.2.3. Proteínas metabólicas	21
<b>1.2. Proteínas de la familia RTX</b>	<b>21</b>
<b>1.3. La toxina adenilato ciclasa de <i>Bordetella pertussis</i></b>	<b>27</b>
1.3.1. Operón <i>cya</i> y regulación génica	28
1.3.2. Características estructurales	29
1.3.2.1. Dominio AC	29
1.3.2.2. Dominio RTX	30
1.3.3. Activación de la ACT mediante palmitilación de los residuos K860 y K983	31
1.3.4. Secreción de la ACT mediante el sistema de secreción T1SS	32
1.3.5. Unión a células	35
1.3.6. Translocación del dominio catalítico y actividad adenilato ciclasa	37
1.3.7. Actividad hemolítica	41
1.3.8. Efectos producidos por la ACT	44
<b>1.4. Estructura, ensamblaje y permeabilización de la membrana de las proteínas formadoras de poros</b>	<b>46</b>
1.4.1. Clasificación de las proteínas formadoras de poros	46
1.4.1.1. Proteínas formadoras de poro de tipo $\alpha$	46
1.4.1.2. Proteínas formadoras de poro de tipo $\beta$	47
1.4.2. Interacción de las proteínas formadoras de poros con membranas	47
1.4.3. Mecanismos de inserción de las proteínas formadoras de poros	48

1.4.4. Procesos de oligomerización de las proteínas formadoras de poros	51
1.4.4.1. Poros proteicos	52
1.4.4.2. Poros toroidales	54
1.4.5. Permeabilización de membranas	56
1.4.4.1. Mecanismo de permeabilización <i>all-or-none</i>	57
1.4.4.2. Mecanismo de permeabilización gradual	58
<b>Objetivos</b>	<b>60</b>
<b>Capítulo 2: Materiales y métodos</b>	<b>61</b>
<b>2.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b>	<b>62</b>
2.1.1. Mutagénesis de sitio dirigido por PCR	62
2.1.2. Cultivo de bacterias	62
2.1.3. Transformación de bacterias	63
<b>2.2. PURIFICACIÓN, ANÁLISIS Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE PROTEÍNAS</b>	<b>65</b>
2.2.1. Expresión y purificación de proteínas	65
2.2.1.1. Expresión y purificación de ACT recombinante ( <i>r-Ec-ACT</i> ) y los mutantes PF, S606A y D1079A	65
2.2.1.2. Expresión y purificación de calmodulina recombinante ( <i>rCaM</i> )	67
2.2.2. Electroforesis de proteínas	69
2.2.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS	69
2.2.2.2. Electroforesis en geles nativos	70
2.2.2.2.1. Preparación de muestras	71
<u>2.2.2.2.1.1. Muestras de proteínas en solución</u>	71
<u>2.2.2.2.1.2. Membranas de macrófagos J774A.1</u>	71
<u>2.2.2.2.1.3. Membranas de liposomas</u>	72

2.2.2.2.2. <i>Preparación de geles nativos en gradiente de poliacrilamida</i>	72
2.2.2.2.3. <i>Electroforesis nativa</i>	73
<b>2.2.2.3. Electroforesis 2D</b>	<b>73</b>
<b>2.2.2.4. Tinción de geles y de membranas de nitrocelulosa</b>	<b>74</b>
2.2.2.4.1. <i>Tinción con azul Coomassie</i>	74
2.2.2.4.2. <i>Tinción de plata</i>	74
2.2.2.4.3. <i>Tinción rojo Ponceau</i>	75
2.2.2.4.4. <i>Tinción negativa zinc-imidazol</i>	75
<b>2.2.3. Cromatografía de tamizado molecular</b>	<b>75</b>
<b>2.2.4. Cuantificación de concentración de proteína</b>	<b>76</b>
<b>2.2.5. Ensayos de actividad hemolítica</b>	<b>77</b>
<b>2.2.6. Ensayos de determinación de actividad fosfolipasa A</b>	<b>78</b>
2.2.6.1. <b>Inhibición química con el inhibidor MAFP</b>	<b>78</b>
2.2.6.2. <b>Ensayos <i>in vitro</i></b>	<b>79</b>
2.2.6.2.1. <i>Espectrometría de masas (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC)</i>	79
2.2.6.2.2. <i>Determinación de actividades fosfolipasa A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> mediante substratos lipídicos fluorogénicos PED-A1 y PED6</i>	81
2.2.6.2.3. <i>Determinación de actividad fosfolipasa A mediante ensayo acoplado con la enzima lipoxigenasa</i>	83
2.2.6.2.4. <i>Análisis de actividad fosfolipasa A mediante cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC)</i>	83
2.2.6.3. <b>Ensayos <i>in vivo</i></b>	<b>84</b>
<b>2.2.7. Proteólisis controlada</b>	<b>85</b>
<b>2.3. MEMBRANAS MODELO</b>	<b>86</b>
<b>2.3.1. Liposomas</b>	<b>86</b>
2.3.1.1. <b>LUV</b>	<b>88</b>
2.3.1.2. <b>GUV</b>	<b>90</b>
<b>2.3.2. Monocapas</b>	<b>91</b>

2.3.3. Cuantificación de la concentración de lípido	93
<b>2.4. TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS</b>	<b>94</b>
2.4.1. Liberación de contenidos acuosos de liposomas mediante fluorescencia	94
2.4.2. Movimiento transmembrana de fosfolípidos ( <i>Flip-flop</i> )	95
2.4.3. Unión de toxina a LUVs determinada mediante FRET	97
2.4.4. Permeabilización de GUVs determinada mediante microscopía confocal	98
<b>2.5. DICROISMO CIRCULAR</b>	<b>99</b>
2.5.1. Preparación de muestras	100
2.5.2. Medición de muestras	100
<b>2.6. CITOMETRÍA DE FLUJO</b>	<b>100</b>
2.6.1. Determinación de la permeabilización de la membrana de macrófagos mediante yoduro de propidio	102
<b>2.7. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS</b>	<b>103</b>
2.7.1. Transferencia de proteínas e inmunodetección	103
2.7.1.1. Transferencia semiseca	103
2.7.1.2. Transferencia húmeda	104
2.7.1.3. Inmunodetección mediante anticuerpos	104
2.7.2. Cuantificación de cAMP por ELISA	105
<b>2.8. CULTIVOS CELULARES</b>	<b>106</b>
2.8.1. Cultivos de células eucariotas	106
2.8.1.1. Células J774A.1 (ATCC® TIB-67™)	106
2.8.2. Ensayo de viabilidad celular o citotoxicidad	107
<b>Capítulo 3: Estudio sobre el mecanismo de translocación del dominio catalítico</b>	<b>109</b>
<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>110</b>
<b>3.2. RESULTADOS</b>	<b>111</b>

3.2.1. Determinación de las actividades fosfolipasa A <sub>1</sub> y A <sub>2</sub> <i>in vitro</i>	111
3.2.2. La actividad fosfolipasa de la ACT es similar a las fosfolipasas tipo patatín	117
3.2.3. Caracterización de la actividad fosfolipasa de la ACT <i>in vivo</i>	124
3.2.4. Estudio de las implicaciones de la actividad fosfolipasa en la capacidad citotóxica de la toxina adenilato ciclasa	126
<b>3.3. DISCUSIÓN</b>	<b>134</b>
<b>Capítulo 4: Caracterización de la permeabilización de la membrana inducida por la toxina adenilato ciclasa</b>	<b>143</b>
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>144</b>
<b>4.2. RESULTADOS</b>	<b>147</b>
4.2.1. Estudio de la estructura de la toxina salvaje ACT y el mutante PF en solución	147
4.2.2. Análisis de la interacción de la toxina ACT y el mutante PF con membranas	149
4.2.3. Estudio de la oligomerización de la ACT y el mutante PF en membranas modelo	154
4.2.4. Estudio de la oligomerización de la ACT y el mutante PF en macrófagos J774A.1	158
4.2.5. Análisis de la actividad formadora de poros producida por la toxina ACT y el mutante PF	163
4.2.6. Determinación del diámetro de los poros formados por la ACT y el mutante PF en vesículas unilamelares gigantes (GUV) mediante microscopía confocal	168
4.2.7. Análisis de la estabilidad de la ACT y el mutante PF en membranas modelo	179
<b>4.3. DISCUSIÓN</b>	<b>184</b>

<b>Capítulo 5: Conclusiones</b>	<b>198</b>
<b>Capítulo 6: Referencias</b>	<b>200</b>

# Capítulo 1

## Introducción

## 1.1. *Bordetella pertussis*, tos ferina y factores de virulencia

Las infecciones del tracto respiratorio son las causantes de una tercera parte de las muertes a nivel mundial (*The top 10 causes of death, World Health Organization*). Este ecosistema les proporciona a las bacterias un lugar para su residencia, una plataforma para la transmisión hacia otros individuos y, en algunos patógenos oportunistas, es el nicho para una eventual enfermedad invasiva.

*Bordetella pertussis* es la bacteria causante de la tos ferina. Es una bacteria *Gram* negativa que fue descrita por primera vez por Bordet y Gengou en 1906, a pesar de que había sido vista por primera vez en el año 1900. Se trata de un cocobacilo pequeño (entre 0,2 y 0,7  $\mu\text{m}$ ), inmóvil, estrictamente aeróbico, posee cápsula, presenta filamentos similares a pilis y su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 35°C y 37°C. El aislamiento de la bacteria por primera vez se realizó gracias al desarrollo de un medio de cultivo sólido rico en extracto de patata mezclado con sangre de oveja, en el cual tras 3-4 días de incubación se observaron colonias de *Bordetella pertussis* parecidas a perlas de mercurio. A pesar de que la bacteria no necesita un medio de cultivo complicado para su crecimiento éste es difícil de conseguir, al igual que la metodología para su aislamiento, el cual es complejo (Bouchez *et al*, 2015).

### 1.1.1. Tos ferina

La **tos ferina**, también denominada *pertussis*, es una enfermedad altamente contagiosa causada por la infección aguda de las vías respiratorias por parte de bacteria patógena *Bordetella pertussis*. Existen diversos factores que pueden afectar a las manifestaciones clínicas producidas por la bacteria tales como la edad del paciente, inmunización o infección previa, adquisición pasiva del anticuerpo, factores genéticos o tratamiento antibiótico. El periodo de incubación habitual es de entre 7 y 10 días. Típicamente, la enfermedad clásica se manifiesta en niños recién nacidos sin inmunizar, dura entre 6 y 12 semanas y tiene tres fases: la fase catarral, la fase paroxística y la fase de convalecencia (Mattoo *et al*, 2005).

- Durante la fase catarral los pacientes sufren de rinitis, lacrimación y una tos leve, síntomas similares a los presentes en pacientes infectados por rinovirus. Es

una fase que dura entre 7 y 14 días, durante la cual la tos empeora tanto en frecuencia como en gravedad. La temperatura corporal de los enfermos es normal u, ocasionalmente, algo elevada.

- La fase paroxística, que se inicia durante la segunda semana de la enfermedad, se caracteriza por unos ataques de tos que comprimen episodios de entre 5 y 10 (a veces incluso más) convulsiones durante una única expiración o paroxismo. Al final de la expiración se da un esfuerzo inspiratorio masivo por parte del paciente, durante el cual ocurre el clásico alarido característico de la enfermedad. Esta fase dura entre 2 y 8 semanas.
- Por último se produce la transición hacia la fase de convalecencia, la cual es gradual y está asociada a una disminución de la frecuencia de los paroxismos y una posterior reducción en la severidad de esos eventos. Esta última etapa dura entre una y dos semanas.

En los pacientes con tos ferina pueden aparecer diferentes complicaciones (ruptura de alveolos, hematoma epidural y subdural, ruptura del diafragma, apnea...), de entre las cuales las más comunes son la neumonía, otitis media, convulsiones y encefalopatía. Mientras que la neumonía puede ocurrir como un evento principal en respuesta a la infección por la bacteria o por una infección secundaria provocada por otros patógenos, las convulsiones y la encefalopatía pueden deberse a la hipoxia cerebral causada por los posibles paroxismos severos que pueden padecer los pacientes.

En años recientes se ha detectado un incremento significativo en el número de casos de esta patogénesis en diferentes países, no solo en países en vías de desarrollo, sino también en países desarrollados como Estados Unidos, de tal modo que la OMS la ha declarado enfermedad reemergente (Hegerle *et al*, 2013; Sheridan *et al*, 2014). El resurgimiento de la tos ferina está ocurriendo a pesar de una vacunación muy elevada (95%), posiblemente debido a la combinación entre la suspensión del uso de las vacunas originales que consistían en formulaciones con bacterias atenuadas, y la poca eficacia de las preparaciones acelulares utilizadas en los actuales programas de vacunación, las cuales aportan al individuo vacunado una inmunidad inefectiva y efímera. Ante esta situación se ha suscitado nuevamente un gran interés por el desarrollo de nuevas

vacunas, así como por la aplicación de nuevas estrategias de inmunización (Carbonetti, 2016).

### **1.1.2. Factores de virulencia**

Durante los procesos de invasión de *Bordetella pertussis*, ésta secreta una serie de factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis general causada por la bacteria. Estos factores de virulencia se pueden clasificar en tres tipos: toxinas, proteínas de superficie y proteínas metabólicas (Melvin *et al*, 2014).

#### **1.1.2.1. Toxinas**

De todos los factores de virulencia secretados por la bacteria *Bordetella pertussis* las dos con mayor importancia, e indispensables para la colonización del tracto respiratorio son la toxina adenilato ciclasa (ACT) y la toxina pertúsica (PT). Mientras la primera de ellas se describirá con mayor detalle más adelante, la toxina pertúsica es una proteína con múltiples subunidades (AB<sub>5</sub>) que consiste en una subunidad A enzimáticamente activa (S1) asociada de forma no covalente con un pentámero de subunidades de unión (S2, S3, dos copias de S4 y S5). Esta toxina es secretada mediante el sistema de secreción tipo IV y se une a moléculas glicoconjugadas en las superficies celulares. Sin embargo, no se han identificado receptores específicos de la toxina pertúsica, la cual parece unirse a las células de una manera no-saturable e inespecífica. Tras su internalización mediante endocitosis, la toxina es transportada mediante una vía retrógrada al retículo endoplasmático, donde la subunidad S1 se transloca a través de la membrana para acceder al citosol. Esta subunidad forma parte de la familia de las toxinas ribosiladoras de ADP, la cual modifica una cisteína cerca de la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas, inhibiendo la activación de éstas (Carbonetti, 2015).

De entre todos los factores de virulencia sintetizados por las bacterias del género *Bordetella*, la citotoxina traqueal es la que produce la citopatología epitelial específica y característica de la tos ferina. Su estructura corresponde al monómero disacárido-tretrapéptido de un peptidoglicano, siendo ésta exactamente la de *N-acetylglucosaminyl-1,6-anhydro-N-acetylmuramyl-(L)-alanyl-g-(D)-glutamyl-mesodiaminopimelyl-(D)-alanine*. Esta citotoxina es la causante de la inflamación de las mitocondrias, la extrusión de las células ciliadas y la inhibición de la síntesis de DNA, la

cual es altamente dependiente de la dosis de citotoxina. Este último efecto se ha descrito únicamente en células traqueales de hámsteres (Mattoo *et al*, 2001).

Por último está la toxina dermonecrótica, la cual es responsable de la formación de lesiones necróticas subcutáneas. Posee actividad transglutaminasa, puede activar las Rho GTPasas e inhibir la diferenciación celular osteogénica *in vitro*, indicando que la toxina actúa directamente en las células huésped. Dado que carece de una secuencia de señalización para su exportación y no es secretada por las bacterias crecidas en cultivos se especula con que esta proteína funciona dentro del citoplasma de la bacteria durante la infección, posiblemente facilitando la supervivencia de la bacteria dentro de las células (Fukui *et al*, 2004).

### **1.1.2.2. Proteínas de superficie**

Las proteínas de superficie juegan un papel esencial en la adherencia de la bacteria *Bordetella pertussis* al epitelio respiratorio, contribuyendo así mismo a la subsistencia de ésta en el tracto respiratorio inferior modulando la respuesta inmune del huésped. Entre estas proteínas se encuentra la hemaglutinina filamentosa (FHA), que gracias a una región denominada dominio de unión a heparina (*heparin-binding domain*, HBD) media la interacción de la bacteria con las células huésped, uniéndose a carbohidratos sulfatados como la heparina o al heparán sulfato. Se cree que la interacción con las células diana ocurre mediante el anclaje de la región N-terminal mientras que la zona C-terminal se localiza distalmente, situándola en una posición óptima para interactuar con las células. La hematoglutinina, considerada la adhesina de mayor importancia en el género *Bordetella*, es una proteína de 220 kDa que posee actividades inmunomoduladoras, actuando en macrófagos, células dendríticas y en los procesos de inflamación mediante la inducción de IL-6 e IL-10 y suprimiendo la generación de IL-12, generando células T<sub>reg</sub> productoras de IL-10, lo cual evita la aparición de IFN- $\gamma$  necesaria para la generación de una respuesta inmune mediada por las células T<sub>H</sub>1 (apartado 1.1.5) (Scheller *et al*, 2015).

Por otra parte está la pertactina, una adhesina de autotransporte de tipo I de 60 kDa que se cree que interactúa con otros factores de virulencia como la toxina ACT. Esta proteína, que contiene un motivo RGD (formado por la tríada Arg-Gly-Asp) y dos motivos

de repeticiones de regiones inmunodominantes ricas en prolina, está involucrada, al igual que la hemaglutinina, en la adhesión de la bacteria y su producción es requerida para evadir la eliminación mediada por neutrófilos (Hegerle *et al*, 2014).

Por último la bacteria es capaz de producir lipopolisacáridos, los cuales constan de un lípido A pentaacilado unido a un trisacárido. Esta molécula carece del antígeno-O, por lo que comúnmente se le denomina lipooligosacárido. En ratones, las células TLR4 reconocen estos lipooligosacáridos, activando la respuesta temprana TNF- $\alpha$ , reclutando neutrófilos en los pulmones. En humanos, en cambio, la habilidad de la molécula para estimular las células TLR4 es bastante inferior, por lo que la inflamación causada por la bacteria se reduce, facilitando de este modo la permanencia del patógeno durante la infección (Brummelman *et al*, 2015).

### **1.1.2.3. Proteínas metabólicas**

Muchos de los genes regulados por el sistema *BvgAS* codifican proteínas que están probablemente involucradas en el metabolismo, la respiración y otros procesos fisiológicos, reflejando de este modo la diversidad de condiciones ambientales con los que se encuentran las diferentes especies de *Bordetella*, dado que viajan entre y fuera del tracto respiratorio de los mamíferos. Así mismo existen evidencias de la producción de biofilms por parte de las bacterias de este género tanto *in vitro* como durante la infección, lo que probablemente puede contribuir a la colonización del tracto respiratorio (Melvin *et al*, 2014).

## **1.2. Proteínas de la familia RTX**

El concepto de la familia de proteínas RTX (*Repeats-in-ToXin*) fue introducido por primera vez por Roland Welch en el año 1991. Dentro de este grupo se clasificó inicialmente a una familia de citotoxinas formadoras de poros y dependientes de calcio ampliamente diseminadas y producidas por patógenos bacterianos *Gram* negativos de los órdenes *Enterobacteriaceae* y *Pasteurellaceae* (**Tabla 1.1**). A pesar de que cada una de estas toxinas presenta una especificidad hacia las células huésped muy diferenciada,

todas tienen en común la presencia de una serie de repeticiones de nonapéptidos ricos en glicina y ácido aspártico en su secuencia de aminoácidos.

**Tabla 1.1: Clasificación y características de diferentes toxinas de la familia RTX.** Tabla adaptada de Linhartová y cols. (2010).

Toxina RTX	Bacteria	Tamaño molecular	Especificidad celular
HlyA	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica	110 kDa	Amplia
EhxA	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	107 kDa	Eritrocitos y leucocitos humanos y bovinos
CyaA	<i>Bordetella pertussis</i>	177 kDa	Amplia, principalmente fagocitos mieloides
LktA	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	114 kDa	Leucocitos
ApxIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	110 kDa	Eritrocitos
VcRtxA	<i>Vibrio cholerae</i>	484 kDa	Células epiteliales laríngeas humanas
VvRtxA	<i>Vibrio vulnificus</i>	550 kDa	Células epiteliales intestinales
Citotoxina RTX	<i>Kingella kingae</i>	?	Células epiteliales y sinoviales, células de tipo macrófago

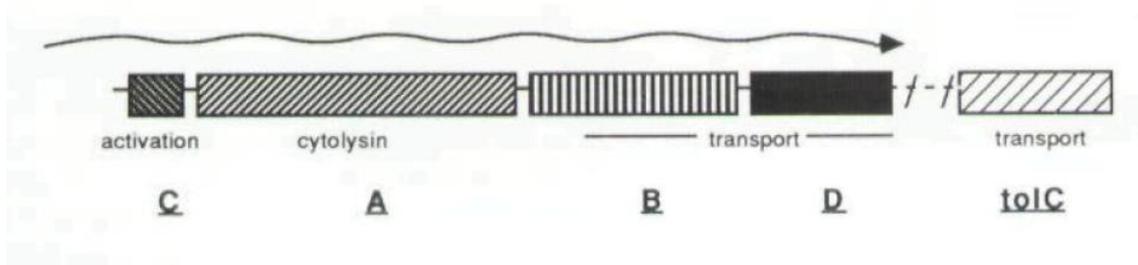
A pesar de que, debido a razones históricas, la palabra toxina está incluida en el nombre de la familia, las proteínas incluidas en este grupo poseen una gran variedad de actividades así como de masas moleculares (desde 40 kDa a más de 600 kDa). Hoy en día, aparte de las ya mencionadas citotoxinas, se incluyen dentro de esta familia diferentes clases de proteínas, tales como leucotoxinas o hemolisinas, proteasas, lipasas bacterianas, bacteriocinas así como proteínas involucradas en la movilidad de las cianobacterias e incluso proteínas sin función actualmente conocida. A pesar de que en algunos casos no sean toxinas, éstas pueden actuar de forma sinérgica como factores de virulencia causando daños en los tejidos y/o provocando la producción de mediadores inflamatorios (Linhartová *et al*, 2010).

Históricamente las proteínas RTX se dividen en dos grandes grupos: las toxinas formadoras de poro y las proteínas MARTX (Multifunctional-Autoprocessing Repeats-in-Toxin). Las proteínas englobadas en el primer grupo se dividen a su vez en dos grupos, las hemolisinas (toxinas formadoras de poros con baja especificidad celular) y las

leucotoxinas (toxinas formadoras de poros específicas de ciertas clases y topologías celulares), clasificación secundaria hoy en día obsoleta.

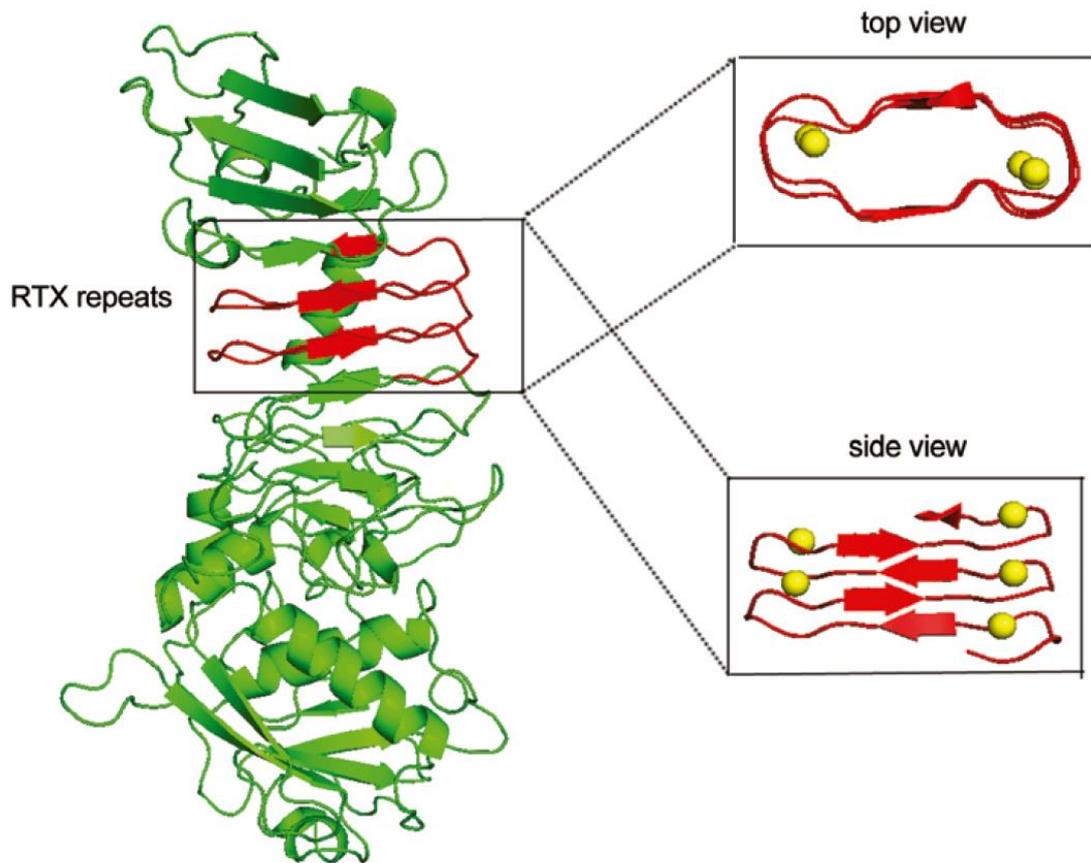
A pesar de esta diferenciación, las toxinas formadoras de poros poseen una serie de características comunes entre ellas:

1. *Sistema de secreción tipo 1 (TISS)*. Las proteínas RTX son liberadas por la bacteria al medio extracelular por este sistema de secreción. A pesar de ser relativamente simple, éste sistema de secreción es capaz de transportar polipéptidos mayores de 800 kDa a través de la membrana bacteriana en cuestión de segundos. El translocador, presente en la membrana interior, está compuesto por un transportador ABC, que provee energía al sistema a través de la hidrólisis de ATP, unido a una proteína de fusión de membrana multimérica. Junto a una proteína trimérica presente en la membrana exterior, el translocador forma un canal continuo y estrecho, a través del cual pasan únicamente las proteínas en cuya secuencia contiene una señal de secreción poco conservada de aproximadamente 50 residuos (Holland *et al*, 2005).
2. *Operón rtx*. Este operón posee tanto los genes responsables de la producción de las propias proteínas RTX como los genes auxiliares que codifican las proteínas que forman parte del sistema de secreción tipo 1. Normalmente está constituido por cuatro genes presentes en un único operón junto con un quinto gen fuera del operón (**Figura 1.1**). El operón constaría del gen *rtxC*, responsable de la activación mediante una modificación postraduccional de la proteína RTX, la cual está codificada por el gen *rtxA*; y los genes *rtxB* y *rtxD*, los cuales codifican las proteínas necesarias para el sistema de transporte, produciendo el primero de ellos el transportador ABC y el segundo la proteína accesoria que une el transportador con la proteína trimérica presente en la membrana externa. Por último se encuentra el gen *tolC*, presente en otra región del cromosoma bacteriano, el cual codifica el componente de la membrana externa del sistema de secreción (Welch, 1991). En el caso del operón *rtx* de la toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* el gen *rtxE* sustituye a *tolC*, con la diferencia de que éste se encuentra dentro del operón (Glaser *et al*, 1988a).



**Figura 1.1: Organización genética del operón *rtx*.** Imagen tomada de Welch (1991).

3. *Modificación postraduccional.* Dado que las proteínas RTX se producen como proteínas inactivas, éstas necesitan de un mecanismo de activación para poder ejercer sus actividades. En este caso esa activación consiste en la unión covalente de uno o varios ácidos grasos a grupos amino laterales de lisinas presentes en la secuencia aminoacídica, residuos que se encuentran altamente conservados entre las distintas proteínas de la familia. Esta reacción está catalizada por la aciltransferasa codificada por el gen *rtxC* del operón (Trent *et al*, 1999).
4. *Dominio de repeticiones.* Estas proteínas poseen el dominio de repeticiones que da nombre a la familia (RTX, del inglés *Repeats-in-Toxin*), el cual está formado por motivos de nonapéptidos consecutivos con la secuencia consenso X-(L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D, donde X representa cualquier residuo. En cada repetición los primeros seis residuos forman un giro con la capacidad de unir calcio, mientras que los tres aminoácidos restantes forman una pequeña lámina  $\beta$ . La consecución de láminas y giros forman una hélice dextrógira de hojas  $\beta$  paralelas, donde un giro de cada hélice corresponde a dos aminoácidos (Luo *et al*, 2015). La descripción de esta estructura fue descrita por primera vez gracias a la cristalización de la proteasa alcalina de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 1.2) por Baumann y cols. (1993).



**Figura 1.2: Estructura tridimensional de la proteasa alcalina de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID: 1KAP).** La proteasa alcalina, las repeticiones RTX y los iones de calcio están coloreados de verde, rojo y amarillo respectivamente. Las proyecciones superiores y laterales de las repeticiones indican la formación de la estructura de hojas  $\beta$  paralelas formada por hélices dextrógiras de láminas  $\beta$ . Imagen tomada de Luo y cols. (2015).

5. *Dominio hidrofóbico.* Se trata de una región rica en aminoácidos hidrofóbicos que formaría una serie de hélices  $\alpha$  transmembrana, las cuales estarían involucradas en la formación de poros que serían responsables de la citotoxicidad producida por las proteínas (Felmlee *et al*, 1985) o produciendo una actividad semejante a la provocada por un poro mediante la desestabilización de la membrana originada por el desplazamiento de los fosfolípidos debido a la inserción de las hélices en la membrana, pero sin la capacidad de atravesarla (Soloaga *et al*, 1999).
6. *Unión a calcio.* En ausencia de calcio el dominio de repeticiones presenta una estructura desordenada, poco estable y altamente hidratada. La unión a calcio induce la compactación y deshidratación del dominio, formando estructuras

secundarias y terciarias estables. Por tanto, este cambio conformacional producida por el calcio es un mecanismo clave para la activación de las funciones de las proteínas RTX (Sotomayor-Pérez *et al*, 2013).

7. *Punto isoeléctrico ácido*. Los puntos isoeléctricos predichos para las toxinas RTX tienden a ser generalmente ácidos, con algunas excepciones como es el caso de la toxina LtxA de *Actinobacillus actinomycescomitans*. En general, las secuencias aminoacídicas son ricas en residuos cargados positivamente en la parte amino terminal. Por lo tanto, para lograr un pI ácido, hay una preponderancia de aminoácidos cargados negativamente en la parte distal de las proteínas (Welch, 2001).

Por otra parte, las proteínas MARTX (Multifunctional-Autoprocessing Repeats-in-ToXin) son una familia de moléculas caracterizadas por su estructura molecular y la organización de los genes que codifican las proteínas. Estos genes producen proteínas con secuencias aminoacídicas entre 3212 y 5206 residuos, cuyo dominio de exhibe una secuencia consenso de 18 residuos X-(V/I)-X-X-G-X-X-N-X-(V/I)-X-X-G-D-G-X-D-X, el cual difiere del nonapéptido habitual. Adicionalmente poseen en el N-terminal otro dominio de repeticiones, con dos clases diferenciadas: por una parte una secuencia consenso de 20 aminoácidos G-X-X-G-(N/D)-(L/I)-(T/S)-F-X-G-A-G-(A/G)-X-N-X-(L/I)-X-(RH) y por otra una secuencia de 19 residuos T-(K/H)-V-G-D-G-X-(S/T)-V-A-V-M-X-G-X-A-N-(I/V)-X. En conjunto todas estas repeticiones ricas en glicina representan habitualmente alrededor del 25% de la secuencia total de aminoácidos de este tipo de proteínas (Lin *et al*, 1999).

Las proteínas de esta categoría han sido identificadas principalmente en diferentes especies del género *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. splendidus*, *V. anguillarum* y *V. vulnificus*), así como en bacterias como *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis* o *Photobacterium luminescens*. Las regiones centrales de estas proteínas están compuestas por diferentes dominios que, una vez en el interior de las células eucariotas, provocan diferentes actividades citotóxicas. Aun así, salvo la actividad biológica de los dominios de MARTX<sub>Vc</sub> de *Vibrio cholerae*, el cual mediante alteraciones en la permeabilización en las uniones celulares contribuye a las respuestas inflamatorias agudas características de la cólera (Cordero *et al*, 2006), y MARTX<sub>Vv</sub> de *Vibrio vulnificus*,

proteína de 5206 aminoácidos de 556 kDa con segmentos homólogos a los presentes en las toxinas formadoras de poros RTX capaces de perturbar las membranas plasmáticas (Lee *et al*, 2007), los efectos producidos por esos dominios centrales son desconocidos, así como las alteraciones provocadas en la proteína tras sus respectivas modificaciones postraduccionales (Satchell, 2007).

### **1.3. La toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis***

La toxina adenilato ciclasa, ACT o CyaA, es una de las proteínas más importantes secretadas por la bacteria *Bordetella pertussis*. Esta toxina, identificada hace más de 40 años, exhibe tres características principales: (1) es secretada por bacterias virulentas, (2) es activada por calmodulina de células eucariotas y (3) puede invadir células catalizando en el citosol de la célula diana la síntesis no-regulada de adenosín monofosfato-3',5' cíclico (AMP cíclico o cAMP) a partir del adenosín trifosfato (ATP) intracelular (Ladant *et al*, 1999).

Fue caracterizada por primera vez por Hewlett y cols. (1976) al analizar el sobrenadante de cultivos de *Bordetella pertussis*, purificándola mediante técnicas de cromatografía y caracterizándola como una proteína termolábil, cuyas condiciones óptimas para su máxima actividad eran una temperatura de 30°C, un pH entre 7 y 8 y un requerimiento de magnesio. Posteriormente se determinó que la toxina era activada por calmodulina (Wolff *et al*, 1980) y que tras su activación era capaz de invadir las células eucariotas produciendo un incremento de los niveles de cAMP (Confer *et al*, 1982).

Se trata de una proteína bifuncional de 1706 aminoácidos y un tamaño molecular aparente de aproximadamente 200 kDa, con dos dominios claramente diferenciables: los primeros 400 aminoácidos del extremo aminoterminal componen el dominio adenilato ciclasa (dominio AC) y los 1300 aminoácidos restantes constituyen el dominio hemolítico o formador de poros (dominio RTX) (Gross *et al*, 1992), siendo estas dos actividades, la catalítica y la formadora de poros, independientes una de la otra (Ehrmann *et al*, 1992).

Utilizando ratones como modelos respiratorios se ha observado que la ACT es un factor de virulencia indispensable durante las primeras fases de la colonización del tracto respiratorio por parte de la bacteria. La eliminación genética de los genes que codifican esta toxina reducen considerablemente los efectos patológicos producidos por ésta, reduciendo el número de colonias bacterianas recogidas de los pulmones y suprimiendo casi al completo las lesiones y las respuestas inflamatorias producidas por el patógeno (Weiss *et al*, 1989).

### 1.3.1. Operón *cya* y regulación génica

El análisis genético del *locus* que codifica la toxina adenilato ciclasa como sus proteínas accesorias tanto para su activación como su secreción a través de la membrana bacteriana hacia el medio extracelular muestra una alta homología a la presentada por la  $\alpha$ -hemolisina de *Escherichia coli* (Glaser *et al*, 1988b).

El operón *cya* está compuesto por dos segmentos claramente diferenciados (**Figura 1.3**) (Masure, 1992): tomando como referencia el promotor  $P_{cyaA}$ , secuencia abajo se encuentra la región multigénica *cyaABDE*, mientras que secuencia arriba, a 260 pares de bases, se encuentra el ORF (marco abierto de lectura, del inglés *Open Reading Frame*) que codifica la proteína aciltransferasa accesorio *cyaC* tras su promotor específico  $P_{cyaC}$  (Glaser *et al*, 1988c). Además, existe un segundo promotor tras el gen *cyaA*,  $P_{cyaBDE}$ , que codifica únicamente para los ORF *cyaB*, *cyaD* y *cyaE* (Laoide *et al*, 1990).

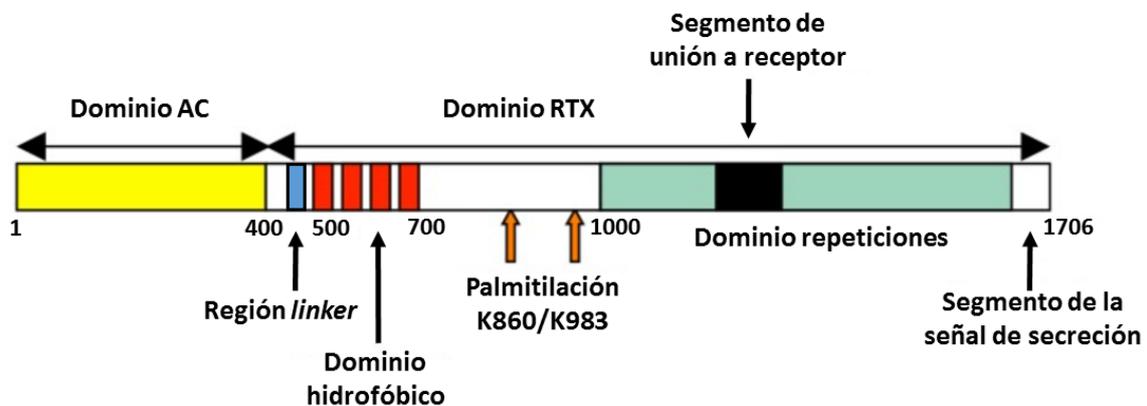
Dentro del grupo génico *cyaABDE*, tras el promotor, se encuentra el ORF *cyaA*, el cual codifica la protoxina adenilato ciclasa (proACT), siendo ésta la forma inactiva de la ACT. La proteína accesorio que desempeña la maduración de la proACT es la CyaC, cuyo ORF se encuentra secuencia arriba respecto al promotor  $P_{cyaC}$ . Tras el gen *cyaA* se encuentra el promotor  $P_{cyaBDE}$ , seguido de los ORF *cyaB* y *cyaD*, los cuales son homólogos a los genes *hlyB* y *hlyD*, responsables del transporte de la toxina a través de la membrana de la bacteria. Por último, contiguo al ORF *cyaD*, se encuentra el gen *cyaE*, indispensable para el transporte de la toxina (Barry *et al*, 1991).



**Figura 1.3: Representación esquemática de la organización transcripcional del operón *cya*.** Las flechas indican la dirección de la transcripción, mientras que el grosor de éstas indica la abundancia relativa de los transcritos. Imagen modificada de Goyard y cols. (1992) y Masure (1992).

### 1.3.2. Características estructurales

En la estructura de la toxina adenilato ciclasa se pueden diferenciar dos dominios: el dominio catalítico adenilato ciclasa (o dominio AC, residuos  $\approx$ 1-400) y el dominio RTX formador de poros (aminoácidos  $\approx$ 400-1706) (Ladant *et al*, 1999) (Figura 1.4).



**Figura 1.4: Representación esquemática de la secuencia de aminoácidos de la toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*.** Imagen modificada de Masin y cols. (2015).

#### 1.3.2.1. Dominio AC

Dentro del dominio catalítico de la toxina se pueden distinguir a su vez dos subdominios diferentes, el dominio T25 y el dominio T18, los cuales se pueden obtener *in vitro* gracias a procesos de proteólisis parcial (Ladant *et al*, 1989):

- *Dominio T25*. Comprende los aminoácidos 1-224. Contiene la secuencia consenso G-X-X-X-G(A)-K-S, la cual está presente en la mayoría de las proteínas que unen ATP. Mutaciones en los aminoácidos K58 y K65 reducen drásticamente la conversión de ATP en cAMP, por lo que el dominio se ha propuesto como parte del centro catalítico. Además se ha descrito que existen en este dominio otros residuos involucrados en la actividad catalítica de la toxina (Munier *et al*, 1992).
- *Dominio T18*. Consiste en el resto de residuos del dominio catalítico, es decir, los residuos que quedan entre las posiciones 225 y 399. Se trata de una región con una estructura de hélices  $\alpha$  anfipáticas. Se trata del dominio de unión a calmodulina, cuya zona de unión se encuentra alrededor del aminoácido W242, dado que su sustitución reduce considerablemente la afinidad de la toxina hacia la calmodulina (Glaser *et al*, 1989).

### 1.3.2.2. Dominio RTX

El dominio formador de poros consta a su vez de los siguientes segmentos:

- *Dominio hidrofóbico*. Consta de los aminoácidos entre las posiciones 500 y 700, y está constituido por una serie de hélices  $\alpha$  transmembrana esenciales tanto para la translocación del dominio catalítico como para la formación de poros por parte de la toxina (Basler *et al*, 2007). Mediante técnicas bioinformáticas se han predicho cinco hélices transmembrana potenciales (502-522, 529-549, 571-591, 607-627 y 678-698) (Osicková *et al*, 1999).
- *Residuos de palmitilación*. Se trata de dos lisinas en las posiciones 860 (Hackett *et al*, 1995) y 983 (Hackett *et al*, 1994), las cuales son reconocidas por la aciltransferasa *CyaC* la cual transfiere ácidos grasos (habitualmente ácidos palmíticos) con la ayuda de la ACP (*Acyl Carrier Protein* o proteína transportadora de acilos) produciendo la activación de la toxina (Westrop *et al*, 1996).
- *Dominio de repeticiones*. Consta de los aminoácidos comprendidos entre la posición 1014 y 1612 y se caracteriza por la presencia de repeticiones del nonapéptido G-G-X-G-X-D-X-U-X (donde X representa cualquier aminoácido y U cualquier residuo alifático o aromático tales como Leu, Ile, Val, Phe y Tyr) característico de la familia de proteínas RTX (Sotomayor-Pérez *et al*, 2010). Este

dominio de entre 40 y 45 repeticiones está dividido en 5 secciones o bloques: bloque I (aminoácidos entre las posiciones 1014 y 1087), bloque II (residuos 1138-1210), bloque III (residuos 1247-1352), bloque IV (residuos 1377-1489) y bloque V (residuos 1529-1612) (Bauche *et al*, 2006).

- *Dominio de unión al receptor.* Dentro del dominio de repeticiones se encuentra un segmento comprendido entre los aminoácidos 1166 y 1286 responsable de la unión de la toxina a su receptor celular, la integrina CD11b/CD18 (también denominada integrina  $\beta_2$ , CR3 o *complement receptor 3*, Mac-1 o  $\alpha_M\beta_2$ ) (El-Azami-El-Idrissi *et al*, 2003).
- *Segmento de la señal de secreción.* Se trata de un segmento de 74 aminoácidos presentes en el extremo carboxilo de la toxina que es necesario para el transporte de la proteína a través del sistema de secreción de la bacteria. Esta señal lleva a cabo la inserción de la toxina desplegada a través del conducto *CyaBDE*, permitiendo su secreción directa desde el citosol bacteriano al medio externo (Sebo *et al*, 1993).

Recientemente se ha descrito que la región comprendida entre el aminoácido 400 y el 500 podría ser una especie de *linker* o conector entre los dominios AC y el RTX, y que podría estar implicado en la translocación del dominio catalítico mediante la formación de una hélice  $\alpha$  con capacidad de unirse a membranas con lípidos aniónicos, desestabilizándola y favoreciendo la translocación del dominio AC a través de la membrana plasmática (Subrini *et al*, 2013).

### **1.3.3. Activación de la ACT mediante palmitilación de los residuos K860 y K983**

Al igual que las demás toxinas RTX, la ACT es inicialmente sintetizada en forma de protoxina inactiva, denominada ProACT (Sebo *et al*, 1991). Para que la protoxina adquiera plena funcionalidad se requiere de una modificación postransduccional en forma de palmitilación de dos residuos conservados en la familia, que están presentes en el dominio RTX de la toxina: la lisina de la posición 983 (Hackett *et al*, 1994) y la lisina de la posición 860 (Hackett *et al*, 1995). Ambas modificaciones son necesarias no solo para la citotoxicidad producida por la toxina, sino también para la unión de ésta a

membranas celulares, aunque la importancia de la palmitilación del residuo K860 sea menor que la del residuo K983 (Masin *et al*, 2005).

La activación de la proACT se produce tras la palmitilación del grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina de la posición 983. Para ello se utiliza como donadora de ácidos grasos a una proteína transportadora de acilo (*acil-ACP*) (Hackett *et al*, 1994). Esta reacción es catalizada por la proteína *CyaC*, una aciltransferasa que se coexpresa junto con la toxina (Barry *et al*, 1991).

Por analogía con el proceso de acilación de la  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* (Worsham *et al*, 2005) la reacción se produciría tras la formación de un complejo de alta afinidad entre la *acil-ACP* y la *CyaC*, tras lo cual la primera transferiría el grupo acilo a la segunda, produciendo en el proceso el intermediario denominado *acil-CyaC*. Este intermediario transferiría posteriormente este grupo acilo a la proACT, uniéndolo covalentemente a la amina- $\epsilon$  lateral de las lisinas 860 y 983.

#### **1.3.4. Secreción de la ACT mediante el sistema de secreción T1SS**

Tal y como se ha mencionado las proteínas RTX son secretadas por el sistema de secreción de tipo 1 (T1SS) formado en el caso de la toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* por las proteínas *CyaBDE*, usando un mecanismo similar al de la  $\alpha$ -hemolisina de *Escherichia coli*, la cual utiliza un aparato *HlyBD/TolC* (Gentshev *et al*, 2002). Por analogía, la proteína *CyaB* funcionaría como el transportador ABC, el cual reconocería la señal de secreción de 74 residuos de la toxina dirigiendo el polipéptido de la toxina a través del conducto trimérico *CyaBDE* (Lecher *et al*, 2012) permitiendo la secreción directa de la proteína desde el citoplasma bacteriano al medio extracelular (Masin *et al*, 2015).

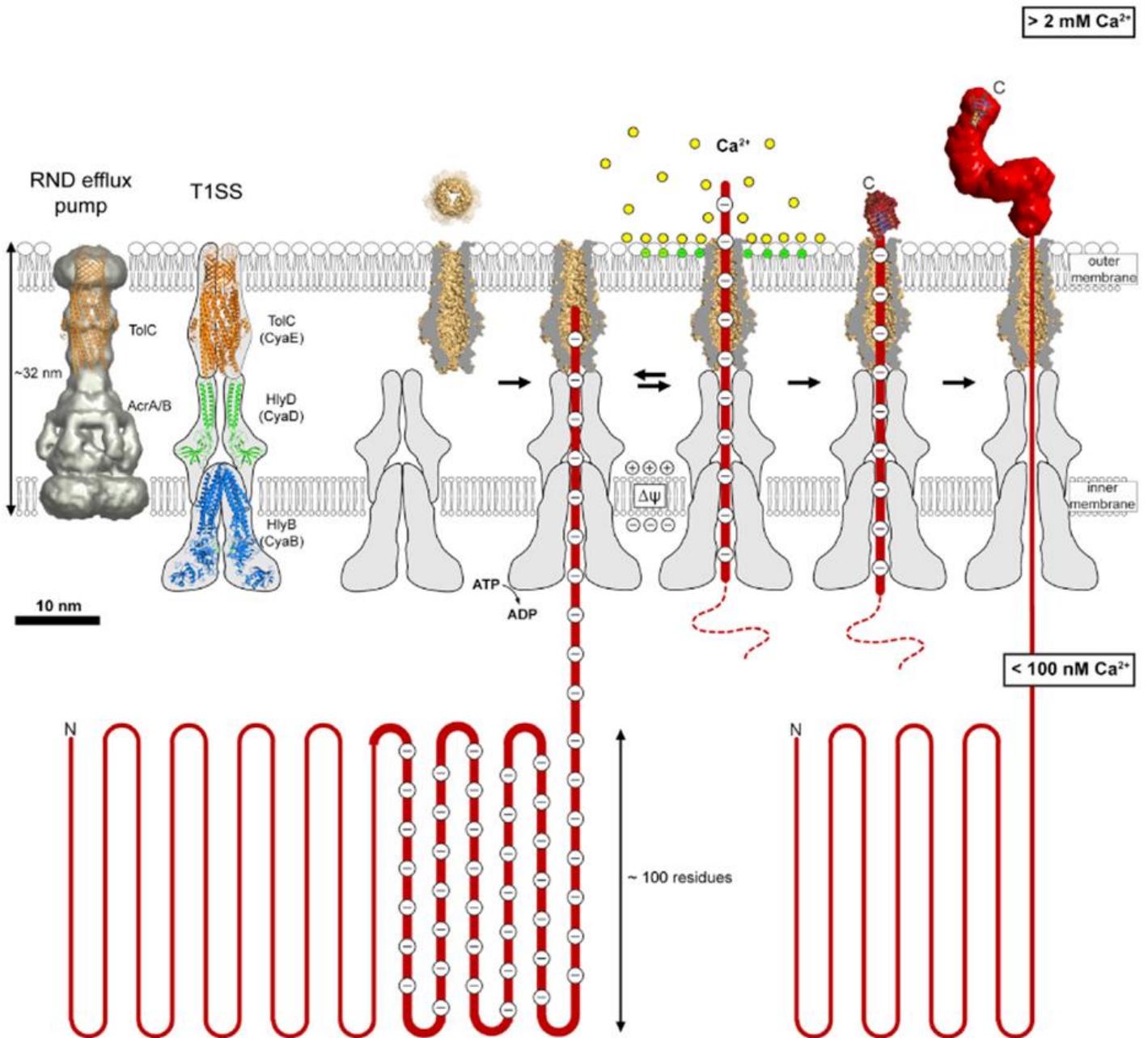
Se ha postulado que durante el proceso de secreción la toxina permanecería en una conformación desplegada, dado que con esa conformación se facilitaría su absorción y secreción a través de la maquinaria del sistema de secreción (Sotomayor-Pérez *et al*, 2014). Esta hipótesis se sustenta en que el dominio RTX se encuentra nativamente desordenado, inestable e hidratado a bajas concentraciones de calcio. La unión de calcio induce la compactación y la deshidratación del dominio de repeticiones, formando en el proceso unas estructuras secundarias y terciarias estables. Por tanto, las bajas

concentraciones de calcio presentes en el citosol bacteriano (0,1-1  $\mu\text{M}$ ) prevendrían el plegamiento del dominio RTX (Chenal *et al*, 2009). La conformación desplegada se debe en parte a los residuos cargados negativamente presentes en el dominio RTX, los cuales producirían repulsiones electrostáticas internas entre ellos, dotando a los motivos RTX de una gran flexibilidad estructural (Sotomayor-Pérez *et al*, 2011). La combinación de ambos factores favorecería el estado desplegado de la toxina, facilitando de este modo el reconocimiento de la señal de secreción por parte del sistema T1SS y su secreción a través del angosto canal de secreción.

En consecuencia, el plegamiento de la toxina ocurriría tras su secreción, proceso que puede ser regulado con precisión por el gradiente de calcio presente en la membrana bacteriana. Asumiendo una secreción direccional del polipéptido desde su C-terminal hacia el N-terminal, debido a que la señal de secreción reside en el extremo carboxilo, el bloque V del dominio de repeticiones sería el primero en salir por el canal de secreción al medio extracelular rico en calcio. La unión del calcio a las diferentes repeticiones desencadenaría su plegamiento formando una estructura compacta y estable (Sotomayor-Pérez *et al*, 2010).

Se ha determinado que cada bloque de repeticiones posee una estructura tipo capuchón en su extremo carboxilo que a medida que emerge por el conducto formado por el sistema de secreción tipo 1, la unión con el calcio extracelular desencadena su plegamiento (Bumba *et al*, 2016). La hidrólisis de ATP provee al sistema de energía mecánica para realizar los cambios conformacionales, generando golpes energéticos que facilitan la progresiva inserción de las repeticiones en el conducto del sistema de secreción. Además, el movimiento electroforético de las cargas negativas del dominio RTX a través del gradiente de potencial de membrana negativo de la membrana interna de la pared bacteriana podría también facilitar la extrusión de la toxina hacia el medio extracelular (Blenner *et al*, 2010). Una vez secretada al medio extracelular, la estabilización del capuchón radicado en el terminal carboxilo del bloque V, cuya secuencia no es homóloga a las del resto de bloques, es obligatoria para la estabilización de toda la estructura en hojas  $\beta$ , las cuales actúan como *brownian ratchets* que aceleran la translocación vectorial de los largos polipéptidos RTX a través de los conductos de la maquinaria T1SS. La mutagénesis de ciertos aminoácidos de esta estructura produce

toxinas desplegadas e inactivas. Una vez el bloque V es secretado y estabilizado por el calcio, éste sirve como punto de nucleación para el resto de la región RTX (Figura 1.5).



**Figura 1.5: Representación esquemática de la secreción de la toxina adenilato ciclasa a través del sistema de secreción tipo 1.** Imagen tomada de Bumba y cols. (2016).

En el año 2005 Lee y cols. describieron que, una vez secretada, la ACT es capaz de formar estructuras oligoméricas en solución, siendo estos oligómeros dímeros o incluso asociaciones de mayor masa molecular. Esta autoasociación de las diferentes unidades

de la toxina en forma oligomérica en solución es dependiente de la acilación de la proteína, pero no de la presencia de calcio. El no requerir calcio para la autoasociación de la ACT indicaría que el dominio de repeticiones característico de las toxinas RTX no está involucrado en este proceso, pero sí que se requiere para conferir a la proteína una conformación adecuada para su unión a las membranas plasmáticas (Rose *et al*, 1995). Por otro lado, dado que la acilación es necesaria para el correcto funcionamiento de la actividad hemolítica de la ACT pero no para la translocación del dominio catalítico (Hackett *et al*, 1995; Osicková *et al*, 1999), se ha determinado que la acilación de la proteína contribuye a la interacción proteína-proteína o confiere a la molécula una conformación necesaria para los procesos de oligomerización, proceso que sería la base de la hemólisis producida por la toxina (Lee *et al*, 2005).

Recientemente se ha propuesto que la forma fisiológicamente activa de la toxina podría ser el monómero, poseyendo esta forma tanto la actividad hemolítica como la citotóxica (translocación del dominio catalítico). Históricamente las purificaciones de la ACT se mantienen en urea, que al dializarla, diluirla o con cambios de tampón, forma multímeros. Aun así, jugando con las concentraciones de calcio, la acilación de las lisinas y el confinamiento molecular se pueden obtener ratios mayores de la forma monomérica de la toxina frente a las formas oligoméricas (Karst *et al*, 2014). Esta forma monomérica es capaz de mantener su estabilidad estructural durante largos periodos de tiempo a temperatura ambiente, siendo resistente a la desnaturalización térmica. Una vez plegada este monómero mantiene la capacidad hemolítica de la toxina, mientras que para translocar el dominio catalítico y convertir el ATP de las células diana en cAMP necesita de concentraciones submilimolares de calcio (Cannella *et al*, 2017).

### **1.3.5. Unión a células**

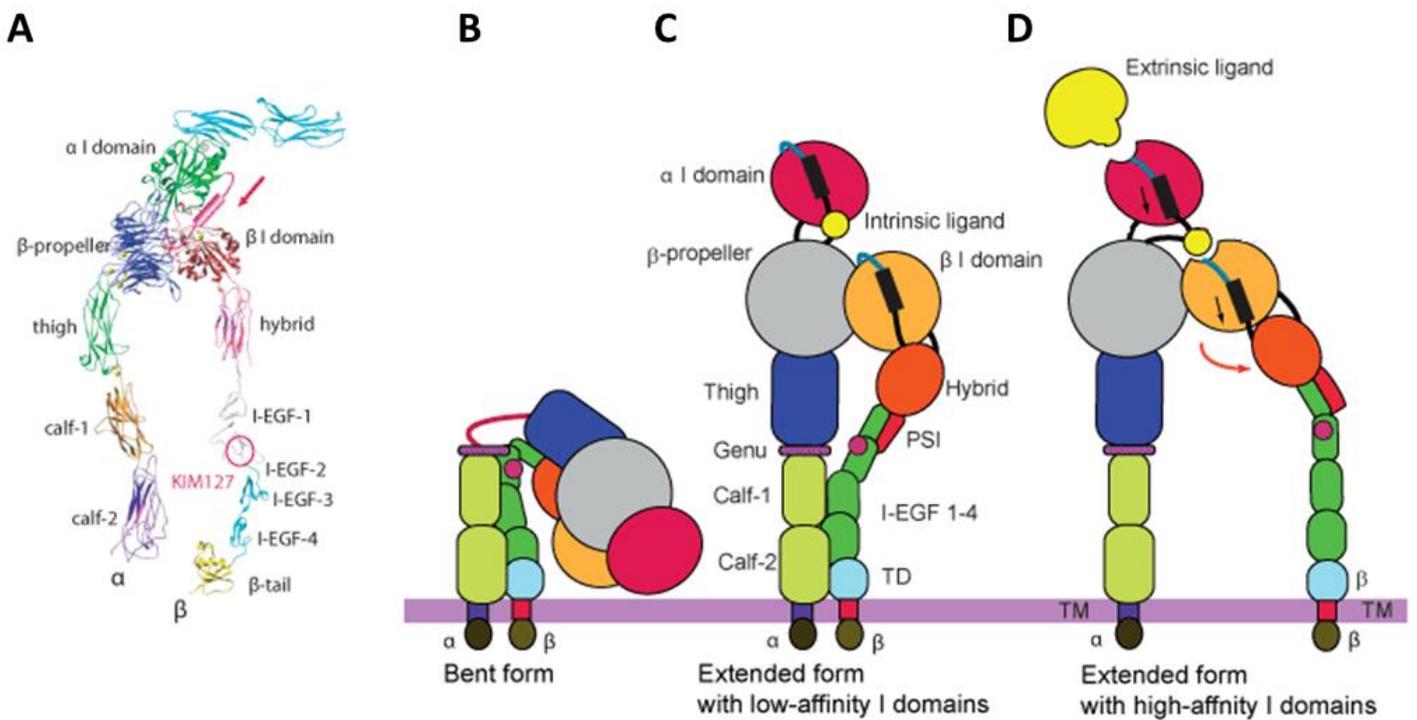
La ACT es capaz de unirse e invadir una gran variedad de tipos celulares, desde eritrocitos hasta células epiteliales o diversos tipos de células del sistema inmune, produciendo en ellas efectos tanto citotóxicos y como líticos (Hansky *et al*, 1985; Rogel *et al*, 1992, Eby *et al*, 2010). Así mismo es capaz de interactuar con membranas modelo permeabilizándolas (Martín *et al*, 2004). Esta unión es dependiente de la concentración de toxina, de la modificación postransduccional y de la presencia de calcio

en el medio extracelular, pero independiente de la temperatura ya que es capaz de unirse a las células entre 0°C y 37°C, aunque a bajas temperaturas la unión se ve reducida (Gray *et al*, 1999).

Sin embargo, se ha determinado que, además de esta unión inespecífica, la ACT reconoce de manera específica la integrina CD11b/CD18 (CR3, Mac-1 o  $\alpha_M\beta_2$ ) presente en células inmunes de la línea mieloide, tales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Así, mediante experimentos realizados con líneas de células mieloides se ha determinado que la unión y las propiedades tóxicas de la ACT se ven favorecidas gracias a su interacción con la integrina  $\alpha_M\beta_2$ , existiendo una correlación positiva entre la unión eficiente y saturable de la toxina con la expresión de CD11b en las células, así como una inhibición de la toxina al bloquear el receptor con anticuerpos monoclonales anti-CD11b. La expresión de esta integrina  $\beta_2$  en líneas celulares sin este receptor aumenta exponencialmente la unión de la ACT y su citotoxicidad, por lo que dicha integrina es considerada receptor específico de la ACT en células fagocíticas. Por último, tal y como se estableció previamente, la presencia de calcio es indispensable para la unión de la ACT a la integrina CD11b/CD18 (Guermontprez *et al*, 2001). La unión específica de la ACT con la integrina parece ser a través de los residuos de ácido siálico presentes en la integrina CD11b/CD18, siendo ésta dependiente de las interacciones electrostáticas producidas por estos residuos cargados negativamente (Morova *et al*, 2008).

Es conocido que la unión de ligandos a las integrinas  $\beta_2$  se hace a través de su dominio I, lo cual produce en el receptor un cambio conformacional pasando de estar en una forma inactiva (conformación cerrada y curvada de baja afinidad) a otra activa (conformación abierta y extendida de alta afinidad) (**Figura 1.6**). Este cambio produce la activación de las tirosina quinasas de la familia Src, lo que lleva a una cascada de señalización activando los mecanismos de respuesta inmune (Tan, 2012). Aun así, se ha descubierto que la unión de la ACT a la integrina no activa estos mecanismos, debido a que se une a un segmento que se encuentra fuera del dominio I del receptor (entre los residuos 614 y 682), lo que junto con la producción de cAMP intracelular por parte del dominio catalítico de la toxina bloquea las subsiguientes cascadas de señalización que activan la respuesta inmune de las células (Osicka *et al*, 2015).

Por otra parte se ha descrito también que la toxina adenilato ciclasa es capaz de unirse a las células T a través del receptor CD11a/CD18 o LFA-1 (Paccani et al, 2011). Esta interacción entre la toxina y este receptor ocurre cuando esta última se encuentra en conformación abierta, la cual representa una fracción muy baja de toda la integrina presente en la membrana celular. Debido a esa baja proporción de la conformación activa de esta integrina se registra una baja actividad citotóxica por parte de la toxina en esta línea celular.



**Figura 1.6: Estructura, dominios y conformaciones de las integrinas de la familia  $\beta_2$ .** En la imagen se representa la estructura terciaria de los componentes  $\alpha$  y  $\beta$  de las integrinas de la familia  $\beta_2$  indicando los diferentes dominios (A) así como los cambios conformacionales entre la conformación inactiva o cerrada (B) y las conformaciones intermedias (C) y activa o extendida (D) tras la unión del ligando. Figura adaptada de Maruyama y cols. (2012).

### 1.3.6. Translocación del dominio catalítico y actividad adenilato ciclasa

La característica más singular de la ACT es su capacidad para transportar el dominio catalítico del extremo amino directamente a través de la membrana de las células eucariotas, proceso que ocurre independientemente del receptor CD11b/CD18 (Ladant *et al*, 1999; Carbonetti, 2010, Linhartová *et al*, 2013). Se ha propuesto que tras la unión del dominio rico en repeticiones del dominio RTX a la integrina de los fagocitos diana

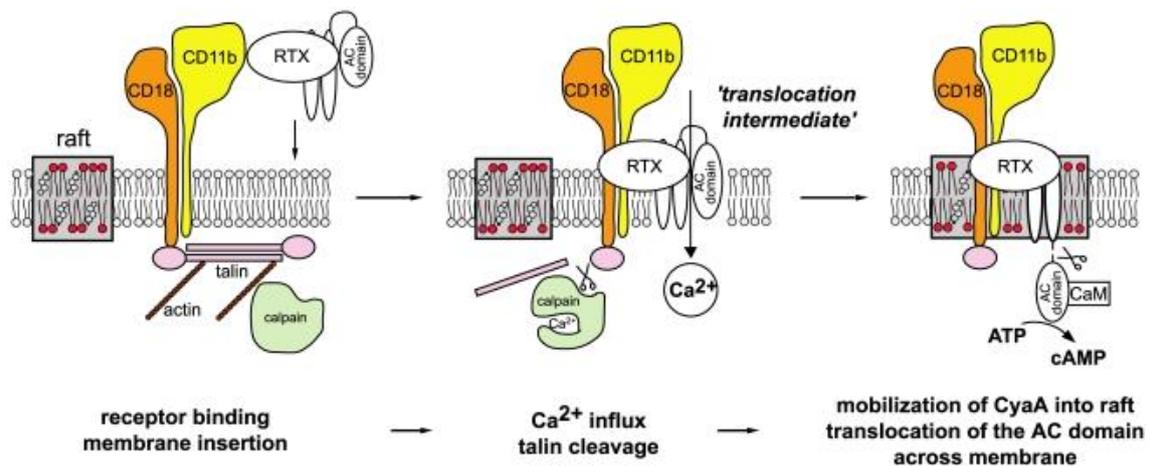
(Guermonprez *et al*, 2001; El-Azami-El-Idrissi *et al*, 2003), la región hidrofóbica de la toxina se inserta en la membrana plasmática de las células diana y transloca el dominio catalítico a través de ésta hacia el citosol celular (Rogel *et al*, 1992).

Estudios iniciales usando inhibidores de vías endocíticas sugirieron que la translocación del dominio catalítico no estaba precedida por la endocitosis de la toxina (Gordon *et al*, 1988). Tiempo después, en el año 1992, Rogel y Hanski establecieron que el extremo carboxilo de la toxina crea un canal en la membrana a través del cual se transloca el fragmento del extremo amino. Sin embargo, esta hipótesis fue descartada tras considerar que el poro formado por la porción hemolítica de la ACT parece ser aparentemente demasiado estrecho (con un diámetro entre 0,6 y 0,8 nm) como para permitir el paso de un polipéptido de aproximadamente 40 kDa, tal y como se ha propuesto tras realizar medidas de conductancia en bicapas planas (Benz *et al*, 1994) y ensayos hemolíticos con protectores osmóticos (Ehrmann *et al*, 1991).

Hoy en día el mecanismo por el cual se produce la translocación del dominio catalítico hacia el citosol de la célula diana es desconocido, aunque se ha descrito extensivamente como un proceso que se da directamente a través de la membrana (Schlecht *et al*, 2004). Aun así, la translocación del dominio catalítico a través de la membrana parece estar dirigido por un potencial de membrana negativo tanto en células (Otero *et al*, 1995) como en membranas modelo (Veneziano *et al*, 2013), ocurre solamente a temperaturas superiores a 15°C (Rogel *et al*, 1992) y requiere de concentraciones de calcio milimolares (Otero *et al*, 1995), dando lugar a un proceso con una vida media de unas pocas segundos (Rogel *et al*, 1992).

A pesar de que la translocación no depende de la permeabilización de la membrana por parte de los poros producidos por la ACT, hay diversos elementos estructurales que pueden ser compartidos por ambos procesos (Osickova *et al*, 2010). Esta observación se debe a que varios residuos de las hélices  $\alpha$  anfipáticas que forman parte del dominio hidrofóbico formador de poros, los glutamatos 509 y 516 de la primera hélice y los glutamatos 570 y 581 de la tercera hélice, son importantes tanto para los procesos de translocación como para la formación y la selectividad hacia los cationes de los canales formados por la toxina (Osicková *et al*, 1999; Basler *et al*, 2007).

En el año 2010 Bumba y cols. propusieron un modelo de translocación basado en la intoxicación producida por la ACT en macrófagos, sugiriendo que tras la unión de la toxina al receptor CD11b/CD18 y la posterior inserción de los segmentos hidrofóbicos, aparte de anclar la toxina a la célula, formaría un intermediario de translocación donde el propio dominio catalítico participaría en la formación de un canal abierto transitorio que permitiría el flujo de iones de calcio hacia el citosol celular (Fiser *et al*, 2007). Este flujo de calcio activaría el corte mediado por la calpaína de la talina que une la integrina al citoesqueleto, liberándose el complejo toxina-receptor, el cual se recolocaría en los microdominios ricos en colesterol. En este ambiente rico en esteroides se realizaría el último paso de la translocación del dominio a través de la membrana plasmática (**Figura 1.7**).



**Figura 1.7:** Modelo de translocación del dominio catalítico de la ACT propuesto por Bumba y cols. (2010).

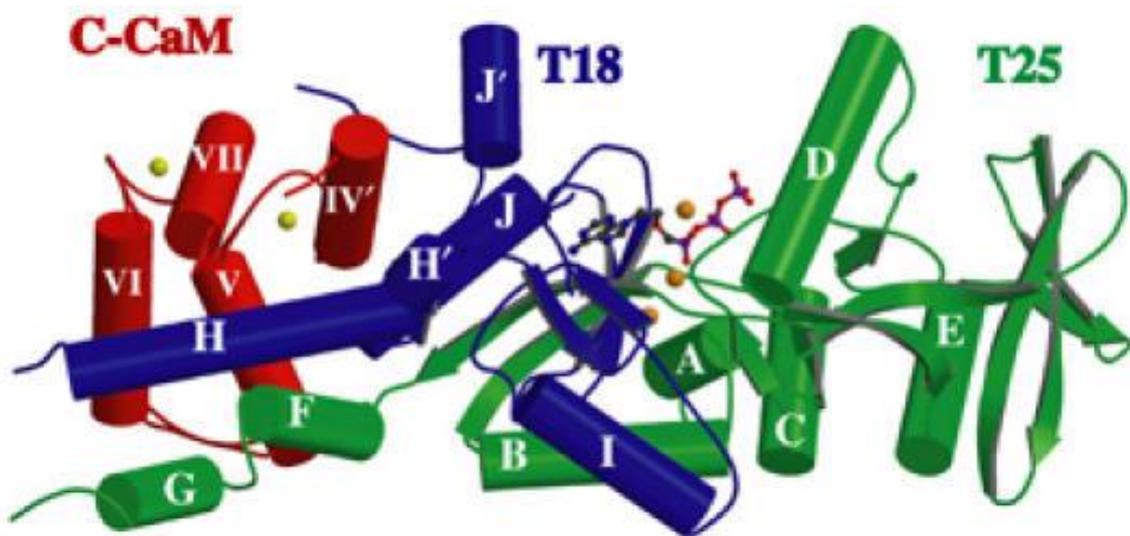
Recientemente, el segmento que une los dominios enzimático y formador de poros de la ACT ha atraído la atención de varios investigadores. Se ha propuesto la presencia de una hélice  $\alpha$  entre los residuos 454 y 485 que estaría involucrada en la translocación del dominio catalítico a través de la membrana (Karst *et al*, 2012; Subrini *et al*, 2013). De hecho la eliminación de los residuos entre las posiciones 375 y 485 (Gray *et al*, 2001) o la unión del anticuerpo monoclonal a un epítipo situado entre los aminoácidos 373 y 399 inhibe la translocación del dominio AC (Lee *et al*, 1999). Adicionalmente la presencia de residuos cargados positivamente dentro de esta región *linker* parecen estar involucrados en la desestabilización de la membrana y el transporte del dominio

catalítico, mientras que las cargas netas negativas entre los residuos 419 y 448 controlan el tamaño y la frecuencia de la formación de poros por parte de la ACT (Masin *et al*, 2016).

Una vez translocado el dominio catalítico nuestro laboratorio demostró recientemente que se produciría una activación de calpaínas celulares, cisteín proteasas calcio-dependientes, que corta la cadena polipeptídica de la ACT en algún punto dentro de la región que conecta el dominio catalítico y el dominio hemolisina (aproximadamente hacia el residuo 480 de la secuencia de la toxina), liberándose el dominio catalítico entero, en forma soluble, en el citosol celular, mientras que el dominio hemolisina permanecería insertado en la membrana celular. Se ha observado así mismo que el dominio catalítico puede colocalizar con la mitocondria y el núcleo de la célula diana, lo que sugiere que podría actuar de forma similar a ciertas adenilato ciclasas solubles que poseen *targets* intracelulares (Uribe *et al*, 2013). La activación de calpaínas celulares podría estar mediada por la entrada de calcio inducida por la propia toxina en las células diana (Fiser *et al*, 2007; Martín *et al*, 2010).

Tras la translocación, la unión a calmodulina al dominio adenilato ciclasa, que ocurre con una afinidad subnanomolar, estimula enormemente, más de tres órdenes de magnitud, la actividad catalítica de dicho dominio, que presenta una constante catalítica,  $k_{cat} > 2000 \text{ s}^{-1}$  (Wolf *et al*, 1980), produciendo niveles suprafisiológicos de cAMP en el citosol de las células diana (Rogel *et al*, 1989; Ladant *et al*, 1999). La cristalización del dominio catalítico unido a la calmodulina (**Figura 1.8**) permitió determinar las características de unión entre ambas moléculas, en la que toman parte tres iones de magnesio, y se produce a través de las superficies positivamente cargadas del dominio catalítico de la ACT, gracias a las cuales producen la unión a la calmodulina, la cual es una proteína ácida con un punto isoeléctrico de 4,1 con cuatro sitios de unión a metales cuya asociación a calcio incrementa 400 veces su afinidad para unirse al dominio catalítico (Shen *et al*, 2002). Por parte del dominio catalítico son cuatro regiones discretas y 49 residuos los que están involucrados en la unión, formando una red de puentes salinos, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas que abrazan a la calmodulina; mientras que por parte de la calmodulina son los residuos de las posiciones 41 y 70 los que provocan un contacto estrecho con el dominio AC. Esta unión estabiliza

el *loop* donde se encuentra el centro activo en contacto con el ATP, produciendo la conversión del ATP en cAMP (Guo *et al*, 2005). Así mismo, la unión del dominio catalítico a la calmodulina induce en éste cambios conformacionales mínimos tanto en su estructura secundaria como terciaria, pero que tienen un gran efecto en las propiedades hidrodinámicas del dominio: mientras que el dominio aislado es esférico e hidratado, la interacción con la calmodulina provoca una elongación, compactación y deshidratación del dominio catalítico (Karst *et al*, 2010).



**Figura 1.8: Estructura secundaria del complejo formado por el dominio catalítico de la toxina junto a la calmodulina.** Los dominios T25 y T18 del dominio catalítico se representan en verde y azul respectivamente, mientras la calmodulina está coloreada de rojo, los iones de calcio de amarillo y los iones de magnesio en naranja. Imagen tomada de Guo y cols. (2005).

### 1.3.7. Actividad hemolítica

Inicialmente, por homología de secuencias con otras toxinas de la familia RTX como la  $\alpha$  hemolisina de *Escherichia coli*, se propuso que la región encargada de la inserción y la actividad formadora de poros de la ACT correspondería a la región entre los aminoácidos de las posiciones 500 y 700, dentro de la cual se encontrarían cuatro segmentos hidrofóbicos y con estructuras  $\alpha$  helicoidales potenciales (Ludwig *et al*, 1987). Así mismo, deleciones internas dentro de esta región confirmaron la implicación de este segmento en la hemólisis, dada la reducción observada en esta actividad (Bellalou *et al*, 1990). Posteriormente, gracias a técnicas de predicción bioinformáticas, se estableció la

presencia de cinco hélices  $\alpha$  transmembrana potenciales dentro de esta región (Osicková *et al*, 1999) (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2: Características de las hélice  $\alpha$  transmembrana potenciales de la región hidrofóbica de la toxina adenilato ciclasa.** Tabla adaptada de Osicková y cols. (1999).

Residuos	Hidrofobicidad media	Secuencia
502–522	0,49	AAVFLGEASSAVAETVSGFF
529–549	0,69	AGGFGVAGGAMALGGGIAAAV
571–591	0,53	IALQLTGGTVELASSIALALA
607–627	0,57	AGAAAGALAAALSPMEIYGLV
678–698	0,69	VGAAVSIAAAASVVGAPVAVV

Se ha estimado un diámetro de poro formado por la toxina adenilato ciclasa de entre 0,6 y 0,8 nm, estimaciones obtenidas tras la realización de experimentos de hemólisis en presencia de protectores osmóticos (Ehrmann *et al*, 1991), así como mediante mediciones de conductancia de poro único en membranas modelo (Benz *et al*, 1994). Estos valores de conductancia obtenidos con la ACT son bastante menores que los observados en otras toxinas RTX como la  $\alpha$  hemolisina de *Escherichia coli*, lo cual se traduciría en un menor flujo de iones y otras moléculas hidrofílicas y, consecuentemente, en una menor capacidad lítica en comparación.

Existe una serie de factores que afectan a la capacidad hemolítica de la toxina:

- *El calcio.* Aumentando de 0,7 mM a 0,8 mM la concentración de calcio se observó un incremento extremo en los valores de conductancia a través de los poros formados por la toxina. Se ha especulado con que en el rango de 0,6 a 0,8 mM de calcio la toxina experimenta un cambio conformacional pasando de un estado *off* a un estado *on*, debido a que a partir de ese rango la unión de calcio al dominio de repeticiones se comporta de manera cooperativa, causando un cambio conformacional importante o un replegamiento parcial de la proteína. En cambio, no se observaron cambios en la conductancia de canal único por parte de la ACT en presencia o ausencia de calmodulina, lo cual reforzaría la hipótesis de que las actividades citotóxica y hemolítica de la toxina son procesos independientes uno del otro (Knapp *et al*, 2003).

- *La carga neta del dominio hidrofóbico.* La integridad y la carga neta del dominio que comprende las hélices  $\alpha$  transmembrana son indispensables para la selectividad de los canales y la tendencia a formar poros por parte de la ACT. El cambio de carga negativa a positiva de los ácidos glutámicos de las posiciones 509 y 516 de la primera hélice por lisina, localizados dentro de la primera hélice  $\alpha$ , reduce sustancialmente la selectividad hacia los cationes pero aumenta la capacidad hemolítica de la toxina, debido a un incremento en la frecuencia de formación de poros pero sin alterar la conductancia de poro único (Osicková *et al*, 1999). Así mismo, la sustitución del ácido glutámico de la posición 570, dentro de la segunda hélice transmembrana, por aminoácidos neutros o positivos reduce la selectividad hacia los cationes (Basler *et al*, 2007).
- *El potencial eléctrico.* La orientación del potencial eléctrico altera la formación de poros por parte de la toxina. Utilizando técnicas de *patch clamp* se ha observado que al aplicar un voltaje positivo en el lado *cis* la ACT es capaz de formar poros con una conductancia de poro único de 45 pS y una vida media de 2 s. En cambio, aplicar en ese mismo lado un voltaje negativo se observaron fluctuaciones irregulares atribuidas a procesos parecidos a una explosión, obteniendo valores de vida media alrededor de 10 ms. Estas diferencias parecen estar relacionadas con las propiedades intrínsecas del dominio transmembrana hidrofóbico, donde la aplicación de una distribución de cargas asimétrica se traduciría en un cambio en la orientación de la toxina en la membrana hacia una posición asimétrica (Knapp *et al*, 2008).
- *El pH.* La conductancia del poro formado por la ACT es dependiente del pH, posiblemente debido a la reacción protonación-deprotonación de uno o varios aminoácidos cargados afincados en posiciones estratégicas dentro del poro (Knapp *et al*, 2008).
- *La composición lipídica.* Este factor puede favorecer o inhibir la permeabilización producida por la toxina. El efecto lítico producido por la ACT se ve favorecido en presencia de lípidos que inducen curvatura negativa (como la fosfatidiletanolamina, o PE, o el colesterol), mientras que lípidos con curvatura positiva (lisofosfatidilcolina entre otros) contrarresta el efecto de la PE reduciendo la capacidad permeabilizadora de la toxina. Este efecto

intensificador de la lisis puede deberse a la formación de estructuras lipídicas no lamelares transitorias por parte de los lípidos con curvatura negativa, formando geometrías parecidas a fases cúbicas o hexagonales invertidas. Así mismo, se ha observado que la toxina adenilato ciclasa produce un movimiento transmembrana de lípidos en las membranas o *flip-flop*. Este efecto se achacó a que la inserción de un número mayor de ACT en la membrana con el tiempo provocaría el incremento de la presión lateral de la membrana exterior, colapsando la arquitectura de la membrana y permitiendo el trasvase de lípidos de una membrana a otra de la bicapa (Martín *et al*, 2004).

### **1.3.8. Efectos producidos por la ACT**

Inicialmente se había observado que la bacteria *Bordetella pertussis* era capaz de producir apoptosis en macrófagos (Khelef *et al*, 1993). Dado la cantidad de factores de virulencia que es capaz de secretar la bacteria no estaba claro cuál de los factores era el responsable o si era necesaria una combinación entre ellos para activar la apoptosis. No fue hasta más adelante cuando se describió que el único factor que era capaz de producir este proceso era la toxina adenilato ciclasa, dado que el resto de factores de virulencia secretados por la bacteria por si solos no eran capaces de activar este mecanismo celular (Khelef *et al*, 1995). La señal para la inducción de la apoptosis parece provenir de modificaciones en la membrana de las mitocondrias producidas por la actividad citotóxica de la ACT, dado que la disrupción de éstas mediante la reducción en el potencial transmembrana de la membrana interna activa la apoptosis. Tanto esta alteración fisiológica como la disminución de los niveles de ATP forman parte de los mecanismos de apoptosis, aunque siempre se necesitan unos niveles mínimos de ATP para su activación, por lo que la ausencia completa de esta molécula inhibe la activación de apoptosis (Bachelet *et al*, 2002).

Se ha establecido que la ACT es capaz de alterar la respuesta inmune, neutralizando temporalmente de las defensas del organismos huésped durante las fases iniciales de la colonización de la bacteria *Bordetella pertussis*. Por una parte es capaz de suprimir la activación y quimiotaxis de los linfocitos T. La producción de cAMP por parte de la ACT en estas células inhibe tanto los receptores de antígenos como los de quimioquinas

mediante una vía en la que la proteína quinasa A está involucrada. Esta inactivación se produce también en otras líneas celulares que expresan las MAP quinasas, diana común de las actividades inmunosupresoras mediadas por la proteína quinasa A (Paccani *et al*, 2008).

Así mismo se ha descrito que la ACT es capaz de inhibir la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (Eby *et al*, 2014), las cuales se ocupan de la inmovilización de una amplia variedad de microorganismos para su posterior eliminación. Esta observación sería la consecuencia de la inhibición del estallido respiratorio mediante la activación de la proteína de intercambio Epac por parte de la producción de cAMP, la cual provoca la inhibición de las fosfolipasas C, cuyo producto, el diacilglicerol, es el activador del estallido respiratorio (Cerny *et al*, 2017).

Adicionalmente se ha descrito que la toxina adenilato ciclasa es capaz de suprimir las funciones bactericidas de los fagocitos. Se ha mencionado previamente que la proteína quinasa A es activada por el aumento de cAMP en las células diana. Esta activación es capaz de estimular la tirosina fosfatasa SHP-1, llevando a la desfosforilación de la subunidad P-c-Fos del factor de transcripción AP-1, lo cual se traduce en una pérdida de la expresión de la enzima iNOS inducida por los receptores de tipo *Toll* (*Toll Like Receptors*, TLR). Esto provoca la inhibición de la producción de niveles bactericidas de óxido nítrico en los macrófagos, permitiendo la supervivencia de la bacteria en el interior celular (Cerny *et al*, 2015). También se ha observado que la ACT, en cooperación con la hemaglutinina filamentosa, es capaz de inhibir la fagocitosis de la bacteria por parte de los neutrófilos (Mobberley-Schuman *et al*, 2005).

A pesar de los efectos nocivos producidos por la invasión de la bacteria *Bordetella pertussis*, parece que el organismo huésped de la bacteria es capaz de utilizar a su favor los efectos citotóxicos de la ACT para activar las respuestas inflamatorias innatas y adaptativas. La actividad formadora de poros de la ACT es capaz de activar la caspasa-1 y el inflasoma NALP3, lo cual activa la producción de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) por parte de las células dendríticas. Esta activación polariza a las células T hacia la producción de células T<sub>H</sub>17, células clave en las respuestas inmunes adaptativas (Dunne *et al*, 2010).

## **1.4. Estructura, ensamblaje y permeabilización de la membrana de las proteínas formadoras de poros**

El correcto y eficiente ensamblaje de los complejos macromoleculares es esencial para su funcionamiento. Los mecanismos exactos por el que estos complejos multiméricos son formados son generalmente difíciles de entender debido a la dificultad de estudiar estos procesos *in vitro* (Iocavache *et al*, 2010). Es el caso del estudio de las proteínas formadoras de poros, con la ventaja de que generalmente pueden ser producidas recombinantemente en forma monomérica soluble, induciendo posteriormente *in vitro* su oligomerización en membranas celulares o artificiales, observando una alta diversidad estructural así como diferentes mecanismos de ensamblaje tras su interacción con las bicapas lipídicas (Gonzalez *et al*, 2008; Iocavache *et al*, 2008).

### **1.4.1. Clasificación de las proteínas formadoras de poros**

Las proteínas formadoras de poros se pueden dividir en dos clases estructurales grandes en base a su estructura secundaria adoptada en la membrana: las proteínas formadoras de poros  $\alpha$  helicoidales (o tipo  $\alpha$ ) y las proteínas formadoras de poro de barril  $\beta$  (o tipo  $\beta$ ) (Gouaux, 1997).

#### **1.4.1.1. Proteínas formadoras de poro de tipo $\alpha$**

Esta clase comprende proteínas como la colicina, el dominio de translocación de la toxina diftérica y la toxina ClyA de *Escherichia coli*. A pesar de que la estructura en solución ha sido descrita para muchas de las proteínas de esta clase la única de la que se tiene su estructura en forma de poro es el de la ClyA (Mueller *et al*, 2009). Aun así, la ClyA no es representativa de las proteínas de este grupo dado que la mayor parte de ellas no forman complejos oligoméricos estables bien definidos (Anderluh *et al*, 2008). La falta de estructuras estables junto con la habilidad de ciertas proteínas  $\alpha$  para provocar reorganizaciones lipídicas ha llevado a proponer la formación de poros toroidales (ver **apartado 1.4.4.2**) por parte de los integrantes de esta familia.

Se han propuesto dos tipos de plegamientos para las proteínas de tipo  $\alpha$  (Iocavache *et al*, 2010). El primero de ellos constaría de una estructura compuesta por 10 hélices anfipática donde 8 de ellas formarían una horquilla helicoidal hidrofóbica central

involucrada en la formación del poro. El segundo de los tipos estaría compuesto por una arquitectura central de hojas  $\beta$  rodeada de hélices, la cual formaría un poro tras la inserción de una hélice anfipática del extremo amino.

#### **1.4.1.2. Proteínas formadoras de poro de tipo $\beta$**

Las proteínas de este grupo son las que más se ha estudiado así como el más amplio, dentro del cual se encuentran las citolisinas dependientes de colesterol (CDC o del inglés *Cholesterol Dependent Cytolysins*), la perforina así como la hemolisina  $\alpha$  de *Staphylococcus aureus*.

Se ha propuesto una secuencia de eventos que llevarían a la formación de poros en la que la estructura soluble, rica en hojas  $\beta$ , está dividida en un sándwich  $\beta$  superior y un dominio en forma de aro inferior (Olson *et al*, 1999). Tras la inserción la región central, caracterizada por un patrón de residuos polares y no polares alternados y plegado contra el dominio de sándwich  $\beta$  de la forma soluble, ésta se abre formando una horquilla  $\beta$  anfipática. La unión de las horquillas de diferentes protómeros genera un barril  $\beta$  anfipático transmembrana que lleva a la formación del poro (Iocavache *et al*, 2008; Anderluh *et al*, 2008).

#### **1.4.2. Interacción de las proteínas formadoras de poros con membranas**

Las proteínas formadoras de poros son producidas habitualmente como moléculas solubles, las cuales se asocian posteriormente con la membrana diana, generalmente a través de receptores específicos (Anderluh *et al*, 2008). Independientemente de su naturaleza bioquímica, la unión a receptores aporta a las proteínas formadoras de poros ventajas que garantizan su especificidad. En el caso de las proteínas de esta familia esos receptores son a veces lípidos, mezclas lipídicas específicas o proteínas presentes en la membrana. Aun así, existen proteínas formadoras de poros que tienen más de una diana en la membrana celular, en la que la unión se produce a receptores proteícos específicos pero en los que la presencia de ciertos lípidos acelera este proceso debido a su carga neta o a la curvatura que confieren a la membrana (Cascales *et al*, 2007). La ventaja más importante de la interacción con ciertos lípidos es que le permite a la proteína dirigirse a un rango amplio de células con composiciones lipídicas parecidas, mientras que la

unión a un receptor proteico las restringe a ciertos tipos celulares (Valeva *et al*, 1997; Álvarez *et al*, 2009).

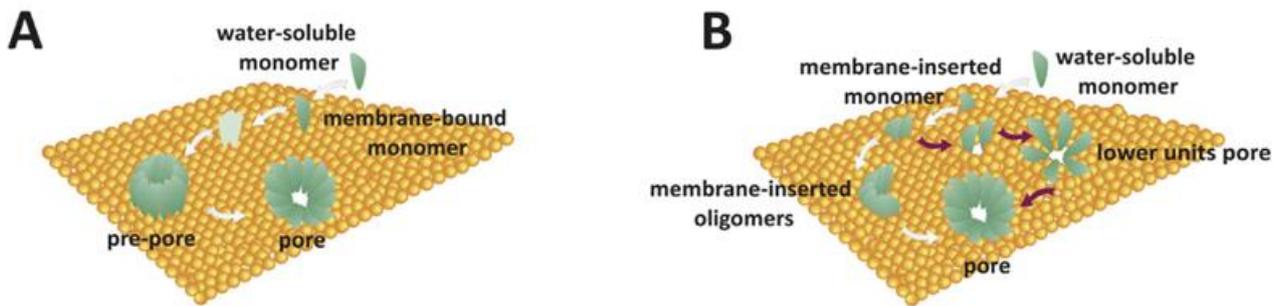
El mecanismo más simple por el cual las proteínas formadoras de poros interactúan con la membrana de la célula diana es mediante las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Mientras que la primera de ellas asegura su atracción a lípidos cargados, la segunda es importante no solo para el reconocimiento de la membrana, sino también para su inserción en la membrana (Ros *et al*, 2015). La diversidad de lípidos preferenciales para las proteínas formadoras de poros es muy amplia: existen proteínas de esta familia que interactúan con la esfingomielina, como la esticolisina II de la anémona marina *Stichodactyla helianthus* (García *et al*, 2012); en otros casos se unen al colesterol, en el caso de la proteína NetB de *Clostridium perfringens* (Savva *et al*, 2013); mientras que otras tienen preferencia por la cardiolipina, como es el caso de la proteína Bax (Cosentino *et al*, 2014). Esta especificidad es de gran importancia tanto para las capacidades citotóxicas de estas proteínas (Harris *et al*, 2010) como para promover diferentes procesos de oligomerización en las membranas (Ishitsuka *et al*, 2007).

### **1.4.3. Mecanismos de inserción de las proteínas formadoras de poros**

Tras la unión a la membrana diana las proteínas formadoras de poros siguen una serie de pasos que llevan a la formación del poro. El primero de ellos ocurre una vez alcanzada la membrana, tras lo cual las proteínas formadoras de poros se insertan en la matriz lipídica. Este proceso puede ocurrir a través de dos vías diferentes:

- *Inserción concertada*. Las unidades oligomerizan en la interfase de la membrana insertándose posteriormente en la matriz lipídica. Inicialmente las unidades proteicas se asocian entre ellas formando un anillo en la superficie de la membrana, formando una estructura denominada pre-poro. En el proceso de la inserción en la membrana cada dominio de interacción con la membrana de cada unidad sufre un cambio conformacional mediante el cual penetra la bicapa lipídica (Gilbert *et al*, 2014). Este es el caso de las proteínas formadoras de poros  $\beta$  así como de algunas proteínas  $\alpha$  como ClyA producidas por ciertas cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella entérica* (Mueller *et al*, 2009) y se aplica habitualmente a los poros proteicos puros.

- *Inserción no concertada*. En este caso, tras un cambio conformacional profundo, las unidades se insertan en la membrana, produciéndose posteriormente los procesos de oligomerización y formación de poro. Este modelo está asociado con la formación de poros proteolipídicos y es característico de arquitecturas heterogéneas y flexibles (Cosentino *et al*, 2016).



**Figura 1.9: Mecanismos de inserción de las proteínas formadoras de poros.** En la imagen se representan los dos tipos de inserción de las proteínas en la membrana: inserción concertada (A) e inserción no concertada (B). Imagen tomada de Cosentino y cols. (2016).

En ambos casos, los procesos de formación de poros en la membrana implica la remodelación de la bicapa lipídica, perturbando la matriz lipídica preexistente con el objetivo de abrir un canal lleno de agua que la atraviese de lado a lado. Hoy en día está generalmente aceptado que en este mecanismo los lípidos son un componente fundamental y que la membrana no se reestructura de forma pasiva (Gilbert, 2016). Esta interacción de las proteínas formadoras de poros con la membrana tiene una serie de efectos en la bicapa lipídica:

- *Remodelación de los dominios lipídicos*. La inserción de proteínas formadoras de poros en la membrana afecta normalmente en cierto grado a la organización de los lípidos. Estas proteínas son capaces de promover la formación de dominios interactuando preferencialmente con los componentes lipídicos, siendo secuestrados en estas regiones o siendo excluidos de estos (Ros *et al*, 2015).
- *Reducción de la tensión de línea en los límites de las fases lipídicas*. Los dominios lipídicos ordenados normalmente presentan una morfología circular que indicaría la existencia de una tensión entre las diferentes fases debido a la

existencia de diferentes grosores entre ellas, llevando a una inclinación lipídica y un estrés de curvatura en estos límites. Al añadir ciertas proteínas formadoras de poros se observa un cambio morfológico en los dominios lipídicos líquido ordenados aumentando éstos de tamaño, volviéndose más irregulares y reduciendo la diferencia de grosor entre las dos fases, en línea con una reducción en la tensión en el límite de fases (García-Sáez *et al*, 2011). Así mismo los lípidos en estas interfases parecer estar intrínsecamente desordenados, lo cual ofrece una menor resistencia hacia la unión y la formación de poros (Barlic *et al*, 2004).

- *Inducción de curvatura de membrana.* La formación de poros también pueden ser adicionalmente modulados por la curvatura. Mediante experimentos de resonancia magnética nuclear (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) se ha determinado que habitualmente la mayor parte de los lípidos que forman las membranas biológicas (como la fosfatidilcolina o la esfingomiélin) tienden a formar dos monocapas enfrentadas una a la otra. Aun así, existen lípidos (como la fosfatidiletanolamina) que producen fases no-lamelares o hexagonales invertidas. Esta tendencia depende de la curvatura intrínseca de la monocapa, la cual está determinada por el ratio de tamaño entre la cabeza polar y las regiones de los grupos acilos (Epanand *et al*, 2015). La presencia de lípidos con curvatura negativa tiene una mayor influencia en poros muy pequeños, mientras que las curvaturas positivas incrementan el radio del poro y tienen un mayor efecto en poros grandes, estabilizando en ambos casos la estructura de los poros (Haney *et al*, 2010).

Aun así, no solo la bicapa lipídica sufre un reordenamiento, sino que las proteínas formadoras de poros también pasan por una reorganización dramática para conseguir la formación de la estructura final, entre los cuales se pueden destacar los siguientes procesos:

- *Cambios conformacionales en la estructura de la proteína.* La unión a membranas ocasionalmente lleva a cambios conformacionales significantes, los cuales provocan desapariciones completas o pérdidas parciales de la estructura terciaria de las proteínas formadoras de poros. Estos cambios tienen un alto

coste energético, ya que suponen primero un proceso de deshidratación de la proteína seguido de la transferencia a un entorno no polar como es la bicapa lipídica, proceso que conlleva cambios conformacionales importantes en la estructura proteica (Fradin *et al*, 2009).

- *Promoción de los procesos de oligomerización.* La unión a regiones específicas de la membrana puede tener beneficios adicionales para la proteína, como es el caso de un incremento en la concentración de proteína en zonas concretas de la membrana, haciendo a la proteína competente para la oligomerización (Lafont *et al*, 2004). A pesar de que las diferentes proteínas formadoras de poros poseen estructuras diversas en solución, en forma de poro dentro de la membrana poseen una organización altamente conservada y común, normalmente en forma de giros  $\alpha$  o  $\beta$ .

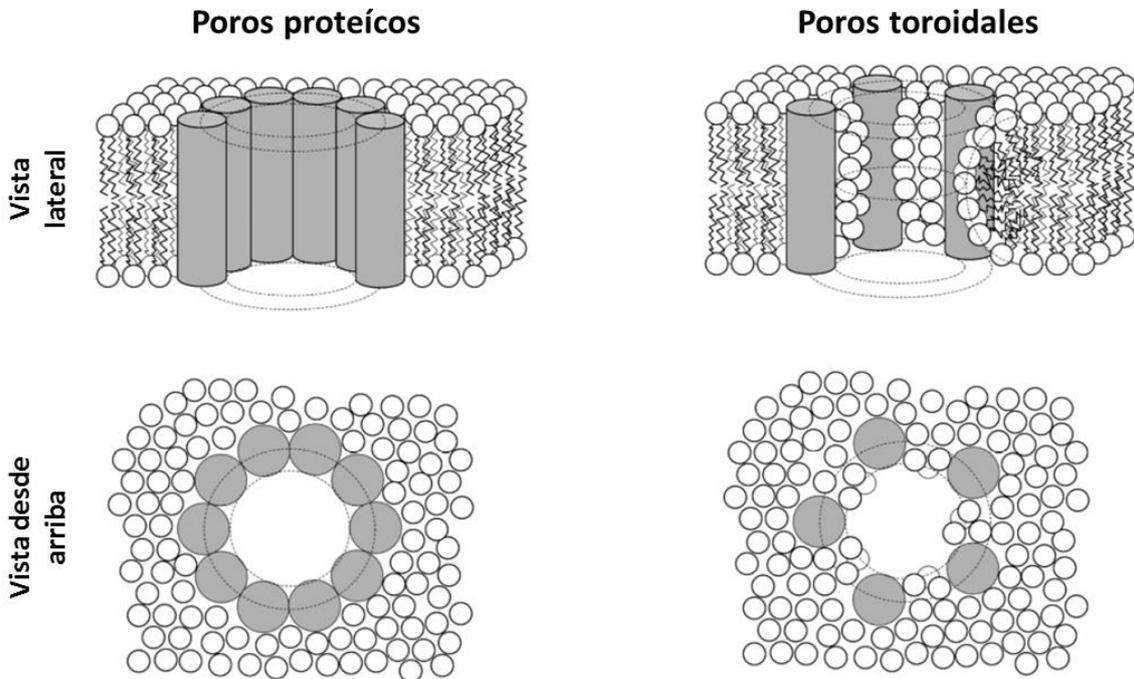
#### **1.4.4. Procesos de oligomerización de las proteínas formadoras de poros**

A pesar de los diferentes tipos de inserción en la membrana de las diferentes proteínas formadoras de poros, las proteínas de esta familia pueden seguir dos vías alternativas para su ensamblaje (Cosentino *et al*, 2016) (**Figura 1.10**):

- *Modelo secuencial.* Es el mecanismo propuesto para la mayor parte de las proteínas de tipo  $\alpha$ , a pesar de que este modelo no ha sido esclarecido aun para la mayoría de ellas. En este caso los bloques de construcción de la estructura final tienen una estequiometría fija y definida, pudiendo ser estos monómeros, dímeros o protómeros de mayor orden.
- *Modelo no secuencial.* A diferencia del modelo secuencial en este caso la adición de unidades para la formación del oligómero posee una estequiometría aleatoria. En este caso el ensamblaje sigue un mecanismo cinético iniciado con la formación de oligómeros de un tamaño determinado al que se le asocia otros aleatoriamente. Este modelo ha sido propuesto recientemente como mecanismo de ensamblaje para la ClyA (Benke *et al*, 2015).

Las proteínas formadoras de poros se caracterizan principalmente por la creación de canales llenos de agua en las membranas con las que interaccionan. Diversos estudios estructurales indican que estos canales pueden formarse de dos modos diferentes

dependiendo de la interacción creada entre la proteína y la matriz lipídica: por una parte se puede crear una interfase proteica continua entre el núcleo de la bicapa y el canal (poros proteicos) o por otra parte las proteínas son capaces de curvar la membrana dirigiéndola hacia una forma toroidal (poros toroidales) (Figura 1.11) (Fradin *et al*, 2009).

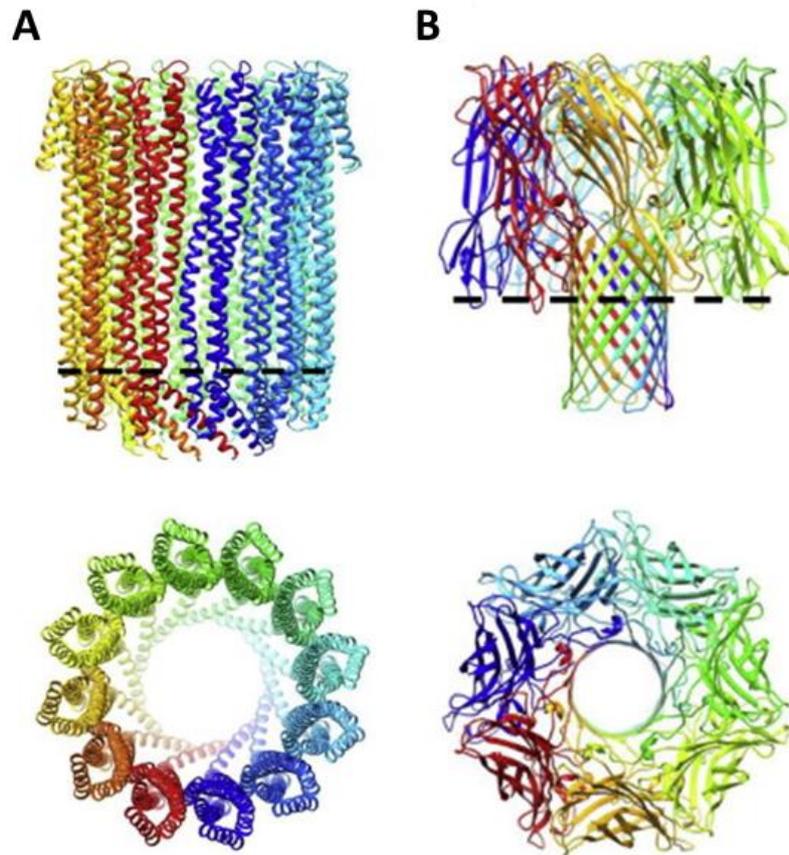


**Figura 1.11: Esquema de la estructura de los diferentes tipos de poros de membrana.** Cada cilindro representa un dominio formador de poros de una proteína individual. Imagen adaptada de Fradin y cols. (2009).

#### 1.4.4.1. Poros proteicos

Los poros clasificados en esta categoría están formados por un anillo de dominios formadores de poros, los cuales no tienen por qué ser necesariamente hélices  $\alpha$ , que forman un canal en la membrana. Esta configuración proteica se encuentra perpendicular respecto al plano de la bicapa lipídica. Estos poros se caracterizan por una estructura proteica bien definida en la que los lípidos se encuentran excluidos. Debido a que los dominios formadores de poros están en contacto directo entre ellos, estas estructuras son estables, con una vida media larga, estequiometrias y diámetros bien definidos y con una alta cooperatividad (Fradin *et al*, 2009).

Históricamente los poros de este tipo se han clasificado en dos grupos: el grupo  $\alpha$  y el grupo  $\beta$  (locavache et al, 2010). Mientras que los poros del primer tipo están definidos por barriles de hélices  $\alpha$  formadas a partir de subunidades oligomerizadoras, en el caso de los poros del segundo tipo cada subunidad provee una o dos laminas  $\beta$  de su estructura para generar un barril  $\beta$  colectivo (**Figura 1.12**).



**Figura 1.12. Clasificación de poros proteicos.** En la imagen superior se representan los poros proteicos de tipo  $\alpha$  (A) y los poros proteicos de tipo  $\beta$  (B), tanto su vista lateral (arriba) como desde arriba (abajo). Imagen modificada de Gilbert y cols. (2014).

Los dominios transmembrana de las proteínas que forman los poros suelen tener una superficie grande hidrofílica que contiene principalmente residuos polares, segmento que se encuentra encarado hacia el interior del canal. Por otra parte, habrá una superficie pequeña hidrofóbica con aminoácidos neutrales con cadenas alifáticas estará enfrentada a la bicapa lipídica. Por último en las dos extremidades del dominio formador de poros se establecerán una serie de residuos polares debido a su afinidad a los grupos

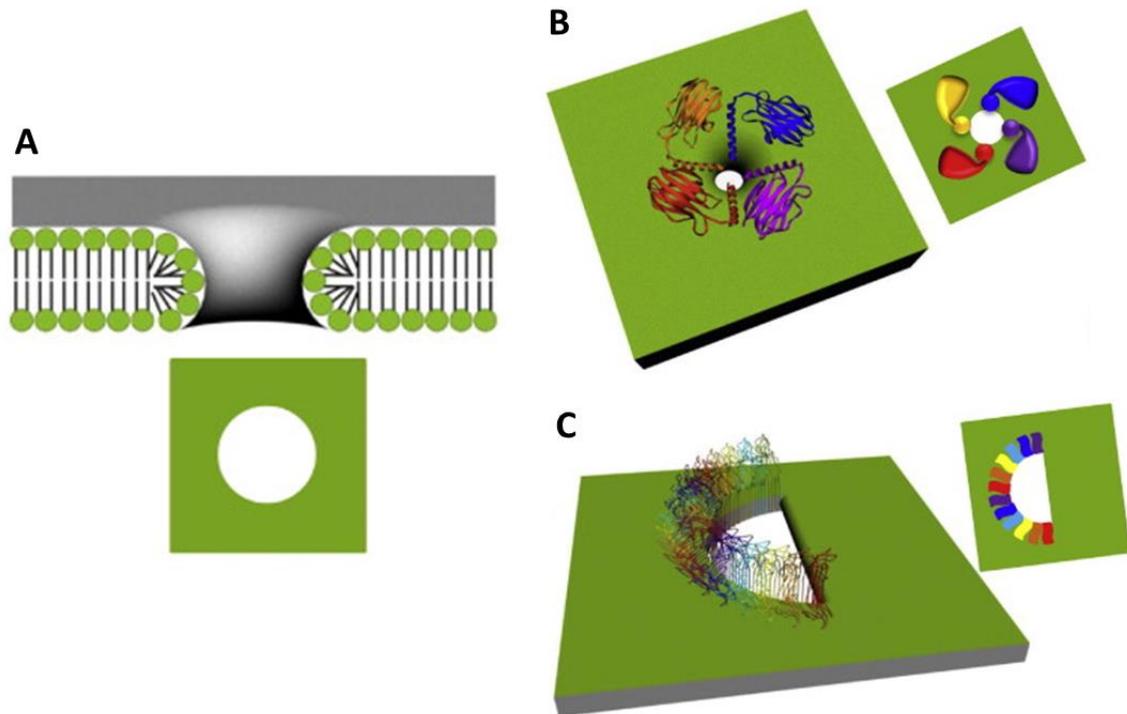
fosfato de los fosfolípidos, así como residuos polares y aromáticos con preferencia a las interfases entre el medio polar y apolar (Killian *et al*, 2000).

#### 1.4.4.2. Poros toroidales

A veces la formación de estructuras no-lamelares en la membrana involucran la formación de poros, denominados poros lipídicos toroidales. Este modelo implica la curvatura positiva de una monocapa lipídica plana formando una estructura denominada medio *torus*. En esta configuración, la membrana adopta tanto una curvatura positiva en paralelo al eje del poro y una curvatura negativa perpendicular a ese mismo eje (Lins *et al*, 2008).

Los poros toroidales se pueden clasificar en tres tipos diferentes (Gilbert *et al*, 2014) (**Figura 1.13**):

- *Poros toroidales lipídicos*. En este tipo de poros únicamente parte los lípidos de la bicapa lipídica, cuyas cabezas polares se posicionarían de tal forma que curvan la membrana positivamente. Debido a que las cabezas polares están expuestas al lumen del poro éstas contribuyen a las propiedades del poro, como por ejemplo la selectividad (Anderluh *et al*, 2003) o el movimiento transmembrana de los lípidos entre las monocapas (Valcarcel *et al*, 2001). Dentro de este grupo estarían los poros formados durante la electroporación o durante la deformación de la membrana (Teissie *et al*, 2005).
- *Poro toroidal proteolipídico de tipo matriz*. Este tipo de poros están formados por una estructura de cadenas polipeptídicas y lípidos intercalados entre ellos (Mancheño *et al*, 2003). Las actinoporinas de las anémonas presentan este tipo de estructura toroidal (Rojko *et al*, 2016).
- *Poro toroidal proteolipídico de tipo arco*. El poro está formado por una estructura proteica complementado por una disposición toroidal de los lípidos a uno de sus lados (Metkar *et al*, 2015). Las proteínas de la familia MACPF/CDC (Sonnen *et al*, 2014) y aparentemente Bax (Xu *et al*, 2013) y péptidos como la protegrina-1 (Prieto *et al*, 2014) y A $\beta$ 1-41, el cual está involucrado en la enfermedad del Alzheimer (Jang *et al*, 2013) presentan estructuras de este tipo.



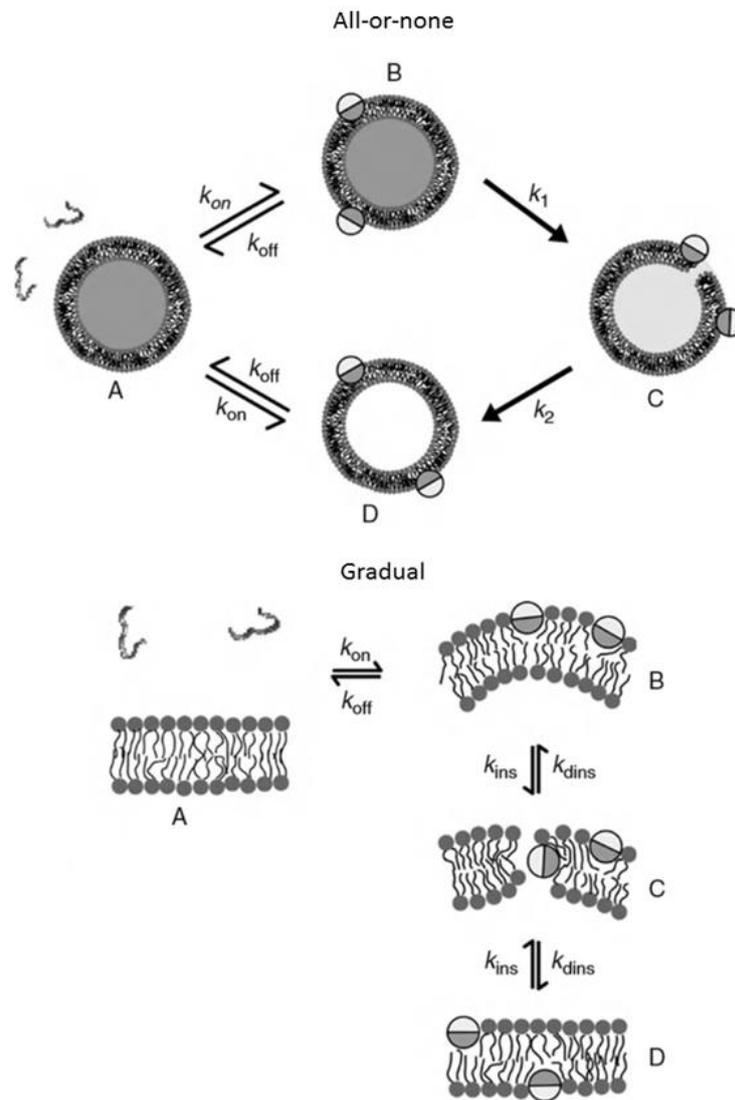
**Figura 1.13: Clasificación de poros toroidales.** En la imagen se representan los poros toroidales lipídicos (A), poros toroidales proteolipídicos de tipo matriz (B) y poros toroidales proteolipídicos de tipo arco (C). Imagen modificada de Gilbert y cols. (2014).

En el caso de ambos tipos de poros toroidales proteolipídicos los dominios formadores de poros no están necesariamente en contacto entre ellos, sino más bien separados por lípidos. Debido a que la proteína está en contacto con las cabezas polares de los fosfolípidos en toda su longitud la proteína suele tener una carga, en la que la mayor parte de los residuos son interfaciales. La estequiometría de estos poros suele ser menos estable y su aparición suele ser facilitada por la presencia de lípidos que promueven la curvatura de la membrana así como la transferencia de lípidos de una monocapa a otra (proceso denominado como *flip-flop*), por lo que ambas características son evidencias indirectas de la formación de este tipo de poros (Matsuzaki *et al*, 1996). Así mismo, la participación de los lípidos como elemento estructural del poro se traduce en una distribución amplia de la conductancia de canal único (Antonini *et al*, 2014).

#### 1.4.5. Permeabilización de membranas

La permeabilización incontrolada de la membrana por las proteínas formadoras de poros puede tener consecuencias dramáticas en las células diana debido a que puede provocar la alteración de la homeostasis iónica que puede llevar a la perturbación de los gradientes electroquímicos y la consecuente muerte celular. Por esta razón es importante la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en estos procesos (Apellániz *et al*, 2010).

Mediante observaciones estructurales y cinéticas en vesículas con contenidos encapsulados se han propuesto dos modelos en los que esta permeabilización puede ocurrir (**Figura 1.13**): una primera situación en la que la liberación de contenidos ocurre de un modo gradual (mecanismo gradual) y un segundo escenario de dos poblaciones de vesículas en los que una fracción de vesículas pierde todo su contenido y otra que no pierde nada (mecanismo *all-or-none*) (Wimley *et al*, 1994).



**Figura 1.13: Modelos de los mecanismos de liberación *all-or-none* y gradual.** Ambos modelos presentan cuatro estados diferentes: la proteína en solución (A), la proteína unida a la membrana de la vesícula con contenidos fluorescentes encapsulados (B), la proteína en estado poro (C) y la proteína unida a las vesículas vacías (en el mecanismo *all-or-none*) o inactivas (en el mecanismo gradual) (D). Imagen tomada de Almeida y cols. (2012).

#### 1.4.4.1. Mecanismo de permeabilización *all-or-none*

Este mecanismo se caracteriza por una fuerte cooperación para la permeabilización de la membrana, así como un tiempo de vida o tamaño de poro lo suficientemente grande para asegurar el equilibrio de los contenidos de la vesícula con el medio externo (Apellániz *et al*, 2010).

El modelo más simple de este mecanismo de permeabilización se ha observado en péptidos cuya unión a las membranas es irreversible, necesitando número pequeño de unidades por vesícula para la formación de un poro estable en el tiempo, los cuales son capaces de liberar todos los contenidos en un determinado lapso de tiempo (Almeida *et al*, 2012). Aun así, a pesar de que la liberación de contenidos fluorescentes puede ocurrir en cuestión de segundos, no es necesario que este proceso sea tan rápido. En algunos casos el estado poroso de la vesícula puede ser transitorio, pero con un tiempo de vida lo suficientemente largo como para liberar todos los contenidos de la vesícula, creando una población de vesículas vacías que se incrementa en el tiempo. En cualquier caso, este mecanismo es consecuencia de la entrada de toda la vesícula en un estado poroso, el cual suele estar combinado con un flujo rápido de contenidos a través del poro (Gregory *et al*, 2008).

#### **1.4.4.2. Mecanismo de permeabilización gradual**

El mecanismo de permeabilización gradual se basa en la liberación parcial de contenidos de una vesícula, en los que la permeabilización completa no es sencilla de conseguir a pesar de que se añadan grandes cantidades de péptido a las vesículas. Aun así, existen casos de comportamientos de este tipo que llevan a la permeabilización completa de la vesícula (Pokorny *et al*, 2004).

Hoy en día no se conoce el mecanismo molecular exacto por el que ocurre este proceso, aunque se han propuesto varias hipótesis. Una de ellas propone la presencia de alteraciones transitorias de la permeabilización de la membrana asociada al reordenamiento de los lípidos y polipéptidos ocurridos durante la inserción de las proteínas formadoras de poros en la membrana (Almeida *et al*, 2009). Otra de las hipótesis sugiere la formación de poros temporal debido al incremento en la tensión de la membrana tras la unión asimétrica de los péptidos a la bicapa lipídica (Gregory *et al*, 2009).

En todo caso la perturbación de la membrana, la cual actúa como catalizador del flujo de contenidos, se produce tras la inserción y translocación transitoria de los péptidos en la membrana, donde la permeabilización depende del grado de perturbación de la membrana y de la distribución del péptido a lo largo de la membrana (Yandek *et al*,

2009). La translocación del péptido y el flujo ocurren simultáneamente hasta que la población de péptido se equilibra en toda la membrana. Cuando se llega al equilibrio la membrana se restaura y el flujo se ralentiza o se para completamente, impidiendo la permeabilización completa de la vesícula (Matsuzaki *et al*, 1995).

# Objetivos

La citotoxicidad causada por la toxina adenilato ciclasa es consecuencia de la combinación entre la translocación del dominio catalítico, proceso que lleva a la conversión del ATP intracelular en cAMP a niveles suprafisiológicos, y la formación de poros permeables por parte de su dominio RTX. En esta tesis doctoral se han analizado aspectos hoy en día desconocidos de ambos procesos, planteando concretamente los siguientes objetivos:

- Esclarecer el proceso a través del cual el dominio catalítico se transloca a través de la membrana plasmática de las células diana.
- Estudiar los procesos de inserción, oligomerización, estructura y mecanismos de permeabilización tanto en membranas modelo, analizando posibles cambios dependiendo de la composición lipídica y la concentración de toxina, así como en células eucariotas.

# Capítulo 2

## Materiales y métodos

## 2.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 2.1.1. Mutagénesis de sitio dirigido por PCR

Los mutantes puntuales ACT-S606A y ACT-D1079A fueron generados por la empresa *Innoprot* (Parque Tecnológico de Zamudio, España). Para obtener ambos mutantes se utilizó el kit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, CA, EEUU), utilizando para ello los *primers* descritos en la **tabla 2.1** y siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

**Tabla 2.1:** Oligonucleótidos utilizados para la generación de los mutantes S606A y D1079A de la toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*.

Mutante	Sentido	Oligonucleótido
S606A	Forward	5' GTGGCCGGGGCGGCGCCGGGGCGG 3'
	Reverse	5' CCGCCCCGGCCCGCCCGCCCGGCCAC 3'
D1079A	Forward	5' GCAACCAGCTCGCTGGCGGCGCGGG 3'
	Reverse	5' CCCGCGCCCGCCAGCGAGCTGGTTGC 3'

### 2.1.2. Cultivo de bacterias

El cultivo de bacterias se efectuó en medio LB (Luria-Bertani) (Scharlab, España), tanto para cultivos líquidos como sólidos. Este medio está compuesto por 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl por litro a un pH 7, añadiendo agar (VWR, España) al 1,5% (p/v) para el cultivo en medio sólido.

En esta tesis se utilizaron distintas cepas de la bacteria *Escherichia coli*, cuyas características se resumen en la **tabla 2.2**.

Tabla 2.2: Características de las cepas bacterianas utilizadas en esta tesis.

Cepa bacteriana	Plásmido	Medio de cultivo selectivo	Observaciones
<i>E. coli</i> XL1-Blue	-	Medio LB + tetraciclina (10 µg/ml)	
	pT7CACT1	Medio LB + tetraciclina (10 µg/ml) + ampicilina (100 µg/ml)	Plásmido cedido amablemente por el Dr. Peter Sebo (Instituto de Microbiología, Academia de la Ciencia de la República Checa)
	pCyaAC-PF		Plásmido cedido amablemente por la Dr. Powthongchin (Instituto de Biología Molecular y Genética, Universidad de Mahidol, Tailandia)
	pT7CACT1-T1816G		Plásmido construido por la empresa Innoprot (España)
	pT7CACT1-A3236C		Plásmido construido por la empresa Innoprot (España)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	-	Medio LB	
	pET-rCaM	Medio LB + ampicilina (100 µg/ml)	Plásmido cedido amablemente por el Dr. Alvaro Villarroel (Instituto de Biofísica, Centro Mixto CSIC-UPV/EHU, España)

### 2.1.3. Transformación de bacterias

La transformación bacteriana consiste en la adquisición de DNA exógeno por parte de las células. El DNA puede ser tanto un plásmido que contiene una secuencia de replicación autónoma para su propagación, como una porción de DNA lineal para ser integrado en el genoma. El DNA exógeno habitualmente suele contener un marcador que permite la selección de células transformadas satisfactoriamente mediante su crecimiento en medio selectivo (Bergkessel *et al*, 2013).

Entre los diferentes métodos de transformación bacteriana se encuentran los dos métodos artificiales más utilizados, la quimiotransformación y la electroporación, así como otras técnicas menos extendidas como la transformación por protoplastos y esferoplastos, la técnica de congelación y descongelación, sonicación celular, transferencia de DNA mediada por liposomas, transformación mediada por quitosano, transformación biobalística y transformación tribos. Todas estas metodologías constan de tres fases comunes: (1) la fase de preparación, en la cual la bacteria se hace receptiva hacia el DNA exógeno (es decir, hacerla competente), normalmente mediante la

modificación de la membrana celular y la debilitación de la pared celular para hacerlas más permeables hacia las macromoléculas; (2) la fase de choque, en la que la célula, en presencia de DNA, es sometida a un choque no letal (normalmente mediante un choque térmico, aplicando un alto voltaje o mediante choque sónico) que transitoriamente abre la membrana o pared celular y permite la permeabilización del DNA hacia el interior; y (3) la fase de recuperación, en la que la bacteria es incubada en un medio rico en nutrientes para que ésta restaure su membrana o pared celular (Aune *et al*, 2010).

En esta tesis se ha utilizado la transformación química como método para la adquisición de DNA por parte de las bacterias. Este método utiliza la presencia de cationes divalentes durante el protocolo, debido a que la carga positiva de los cationes ayuda a condensar el DNA desnudo protegiendo la carga negativa de los grupos fosfatos, consiguiendo en el proceso paquetes de DNA más pequeños para su absorción celular. Así mismo los cationes también pueden anular las fuerzas electrostáticas repulsivas presentes entre el DNA y la membrana externa, facilitando de ese modo el contacto entre el DNA y la membrana (Weston *et al*, 1981).

Aunque la adsorción completa del DNA a la superficie celular ocurre a 0°C, la transferencia eficiente de éste a través de la membrana solo tiene lugar durante el choque térmico, momento en el cual la viabilidad celular desciende drásticamente debido al daño extenso provocado en la membrana. La relación entre el daño producido en las bacterias y la capacidad de incorporar el DNA exógeno revela una dependencia de las células hacia la concentración de cationes divalentes presentes en el proceso, la duración del choque térmico, el tiempo de incubación con los cationes a 0°C y la fase de crecimiento de las células, siendo las bacterias que se encuentran creciendo exponencialmente las más vulnerables hacia el daño y la transferencia de material genético (Sabelnikov, 1994).

El protocolo de transformación química utilizado en esta tesis comienza con el crecimiento de bacterias *E. coli* en el correspondiente medio selectivo o/n a 37°C con una agitación de 200 rpm en un incubador *Certomat BS-1* (Sartorius Stedim Biotech, Irlanda) para que las bacterias se saturen. Al día siguiente los medios saturados se diluyeron 30 veces en medio selectivo hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 a 600 nm, momento en el que se recogieron alícuotas de 2 ml de bacterias, las cuales se

centrifugaron durante 10 minutos a 4500  $xg$  a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante resuspendiendo posteriormente el pellet en 1 ml de 100 mM  $CaCl_2$  frío, manteniendo la suspensión durante 30 minutos en hielo. Terminada la incubación se centrifugaron de nuevo las bacterias a 4500  $xg$  durante 10 minutos a 4°C. Tras la centrifugación se retiraron 950  $\mu l$  de sobrenadante, resuspendiendo en el volumen restante las bacterias, obteniendo finalmente bacterias quimiocompetentes, terminando de este modo la fase de preparación.

Para la fase de choque se añadieron a las células competentes 2  $\mu g$  del plásmido correspondiente, mezclando la suspensión de bacterias e incubando la mezcla durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se sometió la mezcla a un choque térmico incubando las bacterias durante un minuto y medio a 42°C. Para proseguir hacia la fase de recuperación se añadieron 500  $\mu l$  de medio LB, incubando las bacterias durante 45 minutos a 37°C a 500 rpm en un *Thermomixer comfort* (Eppendorf, Alemania). Tras la incubación se centrifugaron las bacterias a 4500  $xg$  durante 10 minutos a temperatura ambiente, eliminando a continuación 400  $\mu l$  del sobrenadante, resuspendiendo las bacterias en los 100  $\mu l$  restante y sembrándolas en placas Petri con medio de cultivo selectivo sólido, incubándolas ON a 37°C. Para finalizar se picó una de las colonias bacterianas, incubándola en medio LB con medio de cultivo selectivo líquido ON a 37°C a 200 rpm en un incubador *Certomat BS-1* (Sartorius Stedim Biotech, Irlanda) hasta su saturación, bacterias que se crecieron para su utilización inmediata o para su almacenaje a -80°C añadiendo glicerol hasta una concentración final del 40% (v/v).

## **2.2. PURIFICACIÓN, ANÁLISIS Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE PROTEÍNAS**

### **2.2.1. Expresión y purificación de proteínas**

#### **2.2.1.1. Expresión y purificación de ACT recombinante (*r-Ec-ACT*) y los mutantes PF, S606A y D1079A**

Para la purificación de las diferentes toxinas se siguió el protocolo descrito por Karst y cols. (2014).

Se crecieron las bacterias transformadas en medio LB con ampicilina y tetraciclina a una concentración final de 100 µg/ml ON a 37°C con una agitación de 200 rpm en un incubador *Certomat BS-1* (Sartorius Stedim Biotech, Irlanda) hasta su saturación. Una vez saturados los medios se diluyeron 30 veces en medio LB con la misma concentración de ampicilina hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,6 y 0,8 a 600 nm, momento en que se indujo la expresión de la toxina añadiendo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (*IPTG*, Apollo Scientific, Reino Unido) a una concentración final de 1 mM, manteniendo posteriormente los cultivos a 37°C a 175 rpm en el mismo incubador durante 4 horas.

Tras la inducción se centrifugaron los cultivos bacterianos a 8000 xg durante 15 minutos a 4°C en el rotor *JLA 9.1000* (Beckman Coulter, CA, EEUU), resuspendiendo el pellet en tampón TN (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8). A continuación se añadió PMSF a una concentración final de 1 mM y un coctel de inhibidores de proteasas (*cOplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche, Suiza), tras lo cual se procedió a la sonicación de las bacterias en un sonicador *Soniprep 150* (Q Instrument Services Ltd, Irlanda) sometiendo las bacterias por duplicado a 10 ciclos de 30 segundos “ON” y 20 segundos “OFF” a 12 micras de amplitud.

A continuación se sometió el sonicado a dos centrifugaciones consecutivas utilizando el rotor *JA-20* (Beckman Coulter, CA, EEUU):

- Primero se realizó un centrifugación a 26000 xg durante 15 minutos a 4°C, tras lo cual se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet nuevamente en tampón TN.
- Una centrifugación a 18000 xg durante 18 minutos a 4°C con el objetivo de eliminar las proteínas solubles.

Tras las centrifugaciones se desechó nuevamente el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en tampón TNU (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH 8) para disolver los cuerpos de inclusión, dejando posteriormente el solubilizado a 4°C en agitación o/n. Al día siguiente se centrifugó a 23000 xg en el mismo rotor durante 30 minutos a 4°C, eliminando el pellet y recogiendo el sobrenadante, el cual se llevó a una concentración final de 150 mM NaCl añadiendo volumen de una disolución de 2 M NaCl.

La muestra se cargó a continuación en una columna de intercambio iónico, mezclando el sobrenadante con la resina *Q Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare, IL, EEUU) la cual había sido previamente equilibrada primero con una solución de 1 M Tris-HCl pH 8, posteriormente con 50 mM Tris a pH 8 y por último con buffer de equilibrado A (150 mM NaCl, 50 mM, 8 M Urea, pH 8), dejando la mezcla en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación la resina se empaquetó con la proteína y se lavó con buffer de equilibrado A, tras lo cual la proteína se eluyó con tampón de elución B (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH 8), recogiendo fracciones de 2 ml de proteína. Estas fracciones se cargaron en un gel desnaturizante SDS-PAGE (**apartado 2.2.2.1**), determinando en cuales se encuentra la toxina por medio de una tinción de *Coomassie* (**apartado 2.2.2.4.1**), juntando las fracciones con proteína y diluyéndolas con un buffer con 50 mM Tris-HCl y 8 M urea hasta obtener una concentración final de 150 mM NaCl. La proteína se cargó a continuación en una columna con resina *Q Sepharose Fast Flow* la cual había sido previamente equilibrada primero con 1 M Tris-HCl pH 8, seguido por 50 mM Tris-HCl pH 8 y por último con buffer de equilibrado A. Una vez cargada la proteína se lavó nuevamente con buffer de equilibrado A, eluyendo posteriormente con tampón de elución B, recogiendo fracciones de 2 ml que se analizaron mediante SDS-PAGE (**apartado 2.2.2.1**) y una tinción de *Coomassie* del gel (**apartado 2.2.2.4.1**) para determinar en cuales se encuentra la proteína de interés.

Las fracciones con mayor cantidad de toxina se agruparon, se diluyeron 5 veces en buffer A (1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8) y se cargaron en una columna hidrofóbica preempaquetada *HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose High Performance* (GE Healthcare, IL, EEUU), cuya resina había sido previamente equilibrada con el mismo buffer. Una vez cargada la toxina, se lavó con buffer A, seguido con 50 mM Tris-HCl a pH 8 en agua MQ, posteriormente con una mezcla de 50% (v/v) de isopropanol en agua MQ y por último con 50 mM Tris-HCl a pH 8. Para terminar se eluyó la proteína con buffer B (50 mM Tris-HCl, 8 M urea, 2 mM EDTA, pH 8 en agua MQ) recogiendo fracciones de 1,5 ml y analizándolas nuevamente por SDS-PAGE (**apartado 2.2.2.1**) y tinción de *Coomassie* (**apartado 2.2.2.4.1**), alicuotando las más concentradas y calculando la concentración de proteína purificada por el método de Bradford (**apartado 2.2.4**).

### 2.2.1.2. Expresión y purificación de calmodulina recombinante (*rCaM*)

Para la expresión y purificación de calmodulina se siguió el protocolo descrito por Hayashi y cols. (1998).

La transformación de bacterias *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) con el plásmido *pET-rCaM* se realizó mediante el método de transformación bacteriana por  $\text{CaCl}_2$ , las cuales se crecieron en medio LB con ampicilina a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  o/n a 37°C a 200 rpm en un incubador *Certomat BS-1* (Sartorius Stedim Biotech, Irlanda) hasta alcanzar la saturación. Posteriormente los cultivos se diluyeron 50 veces en medio fresco con ampicilina y se crecieron en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica entre 1 y 1,2 a 595 nm, momento en el que se indujo la expresión de calmodulina añadiendo IPTG a una concentración final de 0,4 mM, manteniendo a continuación los cultivos con una agitación constante de 175 rpm en el mismo incubador a 37°C durante 6 horas. Tras la incubación, las bacterias se centrifugaron a 8000  $\times g$  durante 15 minutos a 4°C, desechando el sobrenadante y resuspendiendo las bacterias en tampón LysB (50 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7,5) suplementado con 0,2 mM de PMSF. A continuación las bacterias se lisaron mediante sonicación en un sonicador *Soniprep 150* (3 ciclos de intervalos 20 segundos “ON” y 10 segundos “OFF” a 10 micras de amplitud) seguido de 3 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido.

El lisado se centrifugó a 11500  $\times g$  durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante, el cual se calentó durante 5 minutos a 95°C con el objetivo de agregar, desnaturalizar y precipitar gran parte de las proteínas excepto la calmodulina, dado que ésta es resistente a la desnaturalización térmica. Se centrifugó nuevamente el preparado en las mismas condiciones, el sobrenadante se recogió y se suplemento con  $\text{CaCl}_2$  hasta una concentración final de 5 mM con el objetivo de plegar de nuevo la calmodulina.

Este sobrenadante se inyectó en una columna con la resina *Phenyl Spharose High Performance* (GE Healthcare, IL, EEUU) equilibrada con 10 volúmenes de resina de tampón CQB (50 mM Tris, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 M NaCl, pH 7,5). Tras la inyección del sobrenadante se realizaron una serie de lavados consistentes en 10 volúmenes de tampón CWB (50 mM Tris, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 M NaCl, pH 7,5) seguido de otros 10 volúmenes de buffer CHSWS (50 mM Tris, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 M NaCl, pH 7,5). Para

terminar se recogieron fracciones de 1,5 ml eluyendo la calmodulina con tampón CEB (50 mM Tris, 1 mM EGTA, pH 7,5), las cuales se analizaron por SDS-PAGE (**apartado 2.2.2.1**) y tinción de *Coomassie* (**apartado 2.2.2.4.1**), alicuotando las más concentradas tras haber determinado su concentración por el método de Bradford (**apartado 2.2.4**).

## **2.2.2. Electroforesis de proteínas**

### **2.2.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS**

La electroforesis en gel de poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, PAGE) es la técnica más extendida para la separación y caracterización de proteínas desde la década de 1970. La matriz de poliacrilamida se forma mediante la copolimerización de acrilamida y un agente entrecruzador bifuncional o *crosslinker*, siendo entre todos los posibles la bisacrilamida (*N,N'*-metilenbisacrilamida) el más utilizado. Esta reacción es catalizada en presencia de tetrametiletilendiamina (*N,N,N',N'*-tetrametiletano-1,2-diamina, TEMED) y persulfato de amonio (PSA). Una de las mayores ventajas de este proceso de polimerización es que el tamaño del poro puede variar alterando los ratios entre la acrilamida y el *crosslinker*, permitiendo de este modo la separación de un amplio rango de masas moleculares. Generalmente el tamaño del poro es uno de los factores junto con el campo eléctrico, el tamaño, la forma y la carga superficial de las proteínas que determinan la distancia a la que la proteína migra a través de la matriz porosa. Adicionalmente, el uso del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) incrementa la resolución de la separación de las proteínas minimizando los efectos de las diferencias de carga eléctrica y garantizando que todas las proteínas de una muestra migren como aniones. Además, el SDS ayuda en la desnaturalización y el despliegue de las proteínas eliminando las diferencias en sus estructuras secundaria y terciaria (Srinivas, 2012).

En esta tesis se ha utilizado el protocolo descrito por Laemmli (1970) para la separación de proteínas. Los geles están compuestos por dos zonas: una región concentradora o *stacking* y una región separadora o *resolving*. La mezcla para el *stacking* consiste del porcentaje de acrilamida determinado de una mezcla acrilamida/bisacrilamida (en proporción 30:0,8) junto con 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% SDS (p/v), 0,1% PSA (v/v) y 0,15% TEMED (v/v). En el caso del *resolving* se preparó una mezcla con el porcentaje de

acrilamida deseado con 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS (p/v), 0,04% PSA (p/v) y 0,15% TEMED (v/v). Las muestras se desnaturalizaron añadiendo tampón de carga (50 mM Tris-HCl, 5% v/v glicerol, 4% p/v SDS, 0,02% p/v azul de bromofenol, 10 mM DTT, pH 6,8) y para la estimación del tamaño molecular se utilizó una mezcla de marcadores de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*, Bio-Rad, CA, EEUU).

Una vez terminada la electroforesis los geles se someten a una transferencia semiseca a membrana de nitrocelulosa (**apartado 2.9.1.1**), una tinción de *Coomassie* (**apartado 2.2.2.4.1**) o una tinción de plata (**apartado 2.2.2.4.2**), dependiendo del experimento a realizar.

### **2.2.2.2. Electroforesis en geles nativos**

La electroforesis *Blue-Native* (*Blue-native electrophoresis*, BN-PAGE), la electroforesis nativa simple (*Clear-native electrophoresis*, CN-PAGE) y la electroforesis nativa simple de alta resolución (*high resolution CN-PAGE*, hrCN-PAGE) son técnicas electroforéticas a microescala que se utilizan para la separación de proteínas nativas y complejos proteicos. Aunque históricamente se ha utilizado ampliamente la técnica de BN-PAGE para muchas investigaciones biológicas, bioquímicas y clínicas, desde un punto de vista práctico las tres técnicas difieren esencialmente en los tampones cátodos utilizados durante el proceso, dado que los tres sistemas de electroforesis utilizan habitualmente geles en gradiente de acrilamida para la separación de proteínas. En cambio, la migración electroforética de las proteínas y los principios de separación difieren bastante entre los tres sistemas, los cuales se correlacionan con la carga intrínseca o impuesta de las proteínas (Wittig et al, 2008).

La técnica de BN-PAGE fue inicialmente desarrollada para aislar complejos proteicos de membrana de mitocondrias purificadas. En el proceso se identificaron cuatro sustancias químicas importantes para su correcto funcionamiento: (1) detergentes neutros suaves para la solubilización de membranas, (2) el colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* para imponer una carga negativa a la superficie de las proteínas, (3) *2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-hydroxymethyl)-1,3-propanediol* (Bis-Tris) o tampones con imidazol para estabilizar el gel nativo en un pH 7.0-7.5, y (4) el ácido 6-aminohexanoico, un

componente zwitteriónico para mejorar la solubilización de la membrana por parte de los detergentes neutros (Schägger *et al*, 1991).

En el caso de CN-PAGE, se utilizan los mismos tampones que en BN-PAGE pero a las muestras no se les añade ningún colorante, por tanto es una técnica sin cambio de carga y la separación o migración dependerá de la carga intrínseca de la proteína, admitiendo las ventajas y limitaciones que ello conlleva. Debido a ello el CN-PAGE está limitado a proteínas ácidas, las cuales migrarán al ánodo, mientras que las proteínas con un  $pI > 7$  migran hacia el cátodo y se pierden. Por otro lado se trata de la técnica más suave para separar estructuras proteicas supramoleculares (Wittig *et al*, 2005).

Por último, la tercera de las técnicas, hrCN-PAGE, desde un punto de vista funcional se encuentra más cerca del BN-PAGE ya que provoca un cambio de carga a la muestra. La diferencia entre ambas radica en que este cambio se produce mediante micelas de detergentes aniónicos o neutros. Desafortunadamente se trata de la técnica menos suave de las tres dado que favorece la disociación de las subunidades de los complejos (Wittig *et al*, 2007).

En esta tesis, se ha utilizado el protocolo para BN-PAGE adaptado en el laboratorio que ha sido adaptado en el laboratorio (Wittig *et al*, 2006).

#### *2.2.2.2.1. Preparación de muestras*

##### 2.2.2.2.1.1. Muestras de proteínas en solución

Se siguió el protocolo descrito en el **apartado 2.2.3**.

##### 2.2.2.2.1.2. Membranas de macrófagos J774A.1

Se incubaron macrófagos J774A.1 confluentes con medio DMEM sin suero durante 1 hora a 37°C, tras lo cual se realizó una incubación con la toxina en las condiciones establecidas para cada experimento (concentración de toxina, tiempo de incubación, temperatura...). Terminada la incubación se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con PBS frío suplementado con 5 mM EDTA para eliminar la toxina no unida y parar los posible procesos de reparación de la membrana activados por las células.

A continuación se rascaron las células y se centrifugaron a 14000 *g* durante 10 minutos a 4°C, los macrófagos se resuspendieron en tampón de solubilización A (50 mM NaCl, 50 mM imidazole, 2 mM ácido 6-aminohexanoico, 1 mM EDTA, pH 7), añadiendo posteriormente *IGEPAL*® CA-630 (Sigma Aldrich, MO, EEUU) de un stock al 20% en agua destilada hasta conseguir una concentración final en la mezcla del 5% (p/v). Se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente para romper las células y se centrifugó la suspensión a 100000 *xg* durante 15 minutos a 4°C utilizando el rotor *TLA-100* (Beckman Coulter, CA, EEUU). De esta manera se precipitaron los restos celulares quedando en el sobrenadante micelas de membrana celular, las cuales se recogieron para su análisis electroforético.

#### 2.2.2.2.1.3. Membranas de liposomas

Se incubaron liposomas (**apartado 2.3.1.1**) con toxina durante 30 minutos a 37°C en agitación continua, centrifugando posteriormente la mezcla a 14000 *xg* durante 15 minutos a temperatura ambiente para sedimentar los agregados formados por la proteína no unida. A continuación se recogió el sobrenadante con los proteoliposomas y se centrifugó a 100000 *xg* durante 1 hora a 4°C en el rotor *TLA-55* (Beckman Coulter, CA, EEUU). Tras la centrifugación se desechó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en tampón de solubilización A y se añadió *IGEPAL*® CA-630 (Sigma Aldrich, MO, EEUU) de un stock al 20% en agua destilada hasta un concentración final del 5% (p/v). Se dejó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente para romper los liposomas y centrifugó la mezcla a 100000 *xg* durante 15 minutos a 4°C utilizando el rotor *TLA-100* (Beckman Coulter, CA, EEUU), recuperando el sobrenadante para su posterior análisis mediante electroforesis.

#### 2.2.2.2.2. Preparación de geles nativos en gradiente de poliacrilamida

La preparación de los geles nativos en gradiente se realizó en un *Mini-PROTEAN 3 Multi-Casting Chamber* acoplado a un *Model 485 Gradient Former*, ambos facilitados por Bio-Rad (CA, EEUU). Los geles se prepararon con un gradiente de acrilamida desde el 2 al 12%, utilizando dos mezclas que contienen *Gel buffer 3X* (75 mM imidazol, 1,5 M ácido 6-aminohexanoico, pH 7), *AB3-mix* (48 g acrilamida y 1,5 g bisacrilamida en 100 ml de agua) y glicerol a una concentración final del 20% (v/v) únicamente en el caso de la

mezcla con mayor porcentaje de acrilamida. Se añadió a ambas mezclas persulfato de amonio (PSA) al 10% (p/v) y TEMED, procediendo tras su adición a la producción del gradiente y a posterior polimerización.

#### 2.2.2.2.3. *Electroforesis nativa*

A las muestras se les añadió *NativePAGE™ Sample Buffer* (Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) y se cargaron en los geles en gradiente, utilizando como tampón de cátodo una mezcla de 50 mM tricina y 7,5 mM imidazol a pH 7 y como tampón de ánodo uno con 25 mM imidazole a pH 7. Para la estimación del tamaño molecular se utilizaron marcadores de peso molecular (*NativeMark™ Unstained Protein Standard*, Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU). Los geles se corrieron a 4°C a 150 V durante 1 hora seguido de 250 V durante otra hora adicional a 4°C. Terminada la electroforesis los geles se sometieron a:

- Una tinción zinc-imidazol (**apartado 2.2.2.4.4**) para realizar posteriormente una electroforesis de segunda dimensión (**apartado 2.2.2.3**).
- Una tinción de plata (**apartado 2.2.2.4.2**).
- Una transferencia húmeda (**apartado 2.7.1.2**) a una membrana de nitrocelulosa para la posterior detección de la proteína de interés mediante inmunodetección (**apartado 2.7.1.3**), tras comprobar la correcta transferencia de las proteínas mediante una tinción de la membrana con rojo *Ponceau* (**apartado 2.2.2.4.3**).

#### 2.2.2.3. **Electroforesis 2D**

Uno de los métodos más utilizados para la identificación y caracterización de la composición monomérica de complejos de proteínas de membranas se basa en una combinación que consta de una primera dimensión nativa realizada mediante BN-PAGE seguida de una segunda dimensión desnaturizante por SDS-PAGE. Durante la primera dimensión nativa los complejos proteicos se separan según su masa molecular, cuyas diferentes bandas se incuban con SDS bajo condiciones reductoras, resultando en la desnaturalización de los complejos de proteína de membrana. Todas las proteínas liberadas del complejo son separadas posteriormente a lo largo de un campo eléctrico

en un gel SDS-PAGE, separando las subunidades del complejo por su masa molecular (Braun *et al*, 2007).

En este trabajo se ha utilizado esta técnica para analizar la composición de los oligómeros de toxina en membranas celulares. Los geles realizados en condiciones nativas (**apartado 2.2.2.2**) se tiñeron con una tinción negativa zinc-imidazol (**apartado 2.2.2.4.4**), cortando posteriormente las bandas de interés e incubándolas con *2D Sample Buffer* (300 mM Tris, 600  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanol, 24% v/v glicerol, 24% v/v SDS, 0,12% p/v azul de bromofenol) durante 1 hora a temperatura ambiente. Estos trozos de gel se cargaron a continuación en un gel SDS-PAGE (**apartado 2.2.2.1**) del 8,5% de acrilamida con un *stacking* al 3% de acrilamida, cuya electroforesis se realizó a temperatura ambiente a un voltaje constante de 150 V. El análisis de las proteínas se continuó transfiriendo las muestras a una membrana de nitrocelulosa por transferencia semiseca (**apartado 2.9.1.1**), sometiendo por último la membrana a una inmunodetección mediante anticuerpos específicos contra la toxina (**apartado 2.9.1.3**).

#### **2.2.2.4. Tinción de geles y de membranas de nitrocelulosa**

##### *2.2.2.4.1. Tinción con azul Coomassie*

La tinción azul de *Coomassie* se realizó incubando el gel con una mezcla de 35% metanol (v/v), 10% ácido acético (v/v), 0,1% *Coomassie Brilliant Blue R-250* (p/v) (Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) en agua destilada hasta la tinción completa del gel. Para desteñir el gel se lavó con una mezcla que contenía 10% ácido acético (v/v) y 40% metanol (v/v) en agua destilada hasta la visualización de las bandas de proteína.

##### *2.2.2.4.2. Tinción de plata*

Antes de proceder con la tinción de plata se fijó el gel agitándolo durante 1 hora a temperatura ambiente en una mezcla de 50% metanol (v/v), 12% ácido acético glacial (v/v) y 500  $\mu$ l de formaldehído al 40% (v/v) en agua MQ. Tras la fijación del gel se realizaron 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con la Solución I (50% v/v de etanol en agua MQ) seguido de 3 lavados con agua MQ de 20 segundos. Posteriormente se incubó el gel durante 1 minuto a temperatura ambiente con una mezcla al 0,15% (v/v) de Solución A (8,6% (p/v) de tiosulfato de sodio pentahidratado en agua MQ) en agua MQ, seguido de otros 3 lavados de 20 segundos con agua MQ. Tras los lavados se añadió

durante 20 minutos a temperatura ambiente la Solución II (0,2% (p/v) nitrato de plata y 75  $\mu$ l de formaldehído al 40% (v/v) en agua MQ) y se realizaron otros 3 lavados de 20 segundos con agua MQ. Para terminar se tiñeron las bandas de proteína incubando el gel durante 5-10 minutos a temperatura ambiente con la Solución III (6% carbonato de sodio, 5  $\mu$ l de Solución A y 50  $\mu$ l de formaldehído al 40% (v/v) en agua MQ), terminando con unos 3 últimos lavados de 20 segundos con agua MQ (Simpson, 2007).

#### 2.2.2.4.3. *Tinción rojo Ponceau*

La tinción rojo *Ponceau* se realizó incubando la membrana de nitrocelulosa con una mezcla de 0,1% *Ponceau S* (p/v) (Sigma Aldrich, MO, EEUU) y 1% ácido acético glacial (v/v) hasta su tinción completa. Para la visualización de las bandas se destiñó la membrana utilizando una mezcla con 1% de ácido acético glacial (v/v) en agua destilada.

#### 2.2.2.4.4. *Tinción negativa zinc-imidazol*

Se incubó el gel durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación con un tampón de 0,2 M imidazol y 0,1% (p/v) SDS en agua destilada. Tras la incubación se procedió a una incubación de aproximadamente 1 minuto con 0,2 M ZnSO<sub>4</sub>, hasta la visualización de las bandas de proteína, momento en el que se sumergió el gel en agua destilada.

### 2.2.3. **Cromatografía de tamizado molecular**

La cromatografía de exclusión molecular (*size-exclusion chromatography*, SEC) es un tipo de cromatografía líquida usada comúnmente para el análisis de polímeros. La separación mediante esta técnica se basa en la exclusión parcial de las moléculas de polímeros de los poros de la fase estacionaria. Mientras que las moléculas de menor tamaño son capaces de entrar en la mayoría de los poros y se eluyen al final del cromatograma, las moléculas grandes no pueden entrar en algunos de los poros y pasan por la columna más rápido. Si las macromoléculas son demasiado grandes para entrar por cualquiera de los poros se eluyen en el límite de exclusión de la columna. Para asegurar la suficiente resolución el análisis de las muestras mediante la cromatografía de exclusión molecular se realiza utilizando columnas largas e incluso utilizando diferentes columnas en serie a flujos relativamente bajos (Uliyanchenko, 2014).

En esta tesis se ha estudiado la oligomerización de las toxinas ACT y PF en solución mediante cromatografía de exclusión molecular. El protocolo de diálisis de la toxina purificada en urea consiste de 3 pasos:

- Una diálisis de 1 hora a 4°C frente a tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8).
- Un cambio de tampón seguido de una diálisis o/n a 4°C.
- Un segundo cambio de tampón seguido por una diálisis de 1 hora a 4°C.

Mediante este protocolo de diálisis la proteína recupera su conformación nativa. Para eliminar posibles agregados se centrifugó el dializado a 14000 xg durante 15 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante y determinando la concentración proteica mediante el método de Bradford (**apartado 2.2.4**).

La toxina dializada se pasó posteriormente por una columna *Superdex 200 10/300 GL* (GE Healthcare, IL, EEUU) equilibrada en tampón de hemólisis conectada a un cromatógrafo *ÅKTA Purifier P-900* (GE Healthcare, IL, EEUU) a un flujo constante de 0,2 ml/min.

#### **2.2.4. Cuantificación de concentración de proteína**

En este trabajo se utilizaron el método de Bradford o el método del ácido bicinconínico (o BCA) para la cuantificación de proteína en las muestras. El primero de los métodos se basa en la unión de la molécula *Coomasie Brilliant Blue G-250* a las proteínas, interacción que provoca que el máximo de absorbancia de la molécula libre se desplace de 465 nm a 595 nm, produciendo un cambio de color de la solución de rojo-marrón a azul y permitiendo su monitorización a 595 nm (Bradford, 1976). El método de BCA, en cambio, se basa en la reacción de Biuret, en la que se genera Cu<sup>1+</sup> durante el proceso de reducción de Cu<sup>2+</sup> tras su interacción con las proteínas en medio alcalino. La interacción de Cu<sup>1+</sup> con ácido bicinconínico produce un complejo estable, soluble en agua y púrpura, el cual es intensamente absorbido a 562 nm (Smith *et al*, 1985).

Ambos métodos presentan una relación lineal entre la cantidad de proteína y la absorbancia registrada a su correspondiente longitud de onda, por lo que la selección

de uno u otro método dependerá de que las muestras posean o no compuestos que puedan afectar a la correspondiente reacción.

El sistema de medición es el mismo en ambos casos: por una parte se preparó una recta patrón entre 0 y 16  $\mu\text{g}$  de BSA (Sigma Aldrich, MO, EEUU) y por otra un volumen determinado de la muestra cuya concentración se quería calcular. Dado que se utilizaron kits comerciales tanto para el caso del método de Bradford (Bio-Rad, CA, EEUU) como para el de BCA (Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) se siguieron los protocolos provistos por cada uno de los fabricantes.

### **2.2.5. Ensayos de actividad hemolítica**

Para determinar la actividad formadora de poros de la toxina se realizaron ensayos de actividad hemolítica utilizando para ello el protocolo descrito por Bellalou y cols. (1990) adaptado en nuestro laboratorio. La técnica consiste en la incubación de eritrocitos de carnero con la toxina, diferenciando dos tipos de experimento:

- Incubación con diluciones seriadas de toxina: la lisis de los eritrocitos se determina espectrofotométricamente cuantificando la hemoglobina liberada al medio tras un tiempo de incubación.
- Cinéticas de hemólisis: se determina espectrofotométricamente monitorizando la pérdida de turbidez de la muestra debido a la lisis celular durante un lapso de tiempo continuo.

En ambos casos la sangre sigue un proceso de lavado y estandarización, para lo cual se lavó sangre de carnero (Pronadisa, España) dos veces con NaCl 0,9% seguido de otros dos lavados con tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8) mediante centrifugaciones de 10 minutos a 2100  $xg$  a 4°C hasta que el sobrenadante quede transparente. Terminados los lavados se estandariza la sangre para obtener una concentración de  $10^9$  células/ml resuspendiendo los eritrocitos en tampón de hemólisis hasta obtener una absorbancia de 0,6 a 412 nm al mezclar 37,5  $\mu\text{l}$  de la suspensión de eritrocitos con 3 ml de agua destilada.

Para los ensayos con diluciones seriadas se prepararon 12 diluciones seriadas de la toxina a 1:2 en tampón de hemólisis en una placa cónica de 96 pocillos en un volumen

final de 100 µl, añadiendo posteriormente 100 µl adicionales de la sangre previamente estandarizada. Adicionalmente se prepararon pocillos para determinar el 0% de hemólisis (100 µl de tampón de hemólisis con 100 µl de sangre estandarizada) y el 100% de hemólisis (incubación de 100 µl de sangre estandarizada con 100 µl de tampón de hemólisis con 0,1% de Tritón X-100 p/v para obtener la lisis completa de los eritrocitos). La placa se incubó posteriormente en un Thermomixer a 37°C durante el tiempo establecido, tras lo cual se centrifugó la placa a 950 xg durante 5 minutos a 4°C para precipitar los eritrocitos no lisados, midiendo la absorbancia a 412 nm de los sobrenadantes. Para calcular el porcentaje de hemólisis de las muestras se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hemólisis} = [(Abs_{412} \text{ muestra} - Abs_{412} \text{ 0\%}) / Abs_{412} \text{ 100\%}] \times 100$$

Para las cinéticas de hemólisis se utilizó un espectrofotómetro *CARY 300 Bio UV-Visible Spectrophotometer* (Agilent Technologies, CA, EEUU) midiendo valores de absorbancia a 700 nm cada 5 segundos durante 2 horas de una mezcla de sangre estandarizada con una concentración fija de toxina en agitación continua a 37°C.

## **2.2.6. Ensayos de determinación de actividad fosfolipasa A**

### **2.2.6.1. Inhibición química con el inhibidor MAFP**

Para inhibir químicamente la actividad fosfolipasa de la ACT se siguió el protocolo establecido por Phillips y cols. (2003), modificado en el laboratorio. Dado que tras la purificación de la ACT la toxina se encuentra desnaturalizada en buffer con urea la toxina debe recuperar su estructura para poder ser reconocida por el inhibidor. Para ello se dializó la ACT purificada frente a tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8) ON a 4°C utilizando una membrana de diálisis de celulosa con un tamaño de poro de 14 kDa (Sigma Aldrich, MO, EEUU). Tras la diálisis se recuperó el volumen y se centrifugó a 14000g durante 10 minutos a 4°C para sedimentar la proteína agregada, recogiendo el sobrenadante y calculando su concentración mediante el método de Bradford (**apartado 2.2.4**). A continuación se procedió a la inhibición de la actividad fosfolipasa con el inhibidor de fosfolipasas MAFP (*Methyl arachidonyl fluorophosphate*, Sigma Aldrich, MO, EEUU). Para ello se incubó la toxina con una relación proteína:inhibidor saturante de 1:100 ON en constante agitación a 4°C.

Terminada la incubación se realizó una diálisis extensiva adicional frente a tampón de hemólisis durante 48 horas para eliminar el inhibidor no unido a la toxina siguiendo el protocolo utilizado previamente. Una vez terminado el proceso de diálisis, se recuperó el volumen de la toxina inhibida químicamente, centrifugándolo para eliminar los posibles agregados y calculando nuevamente la concentración de proteína por el método de Bradford (**apartado 2.2.4**). Como control para determinar la posible degradación que pueda sufrir la toxina durante los procesos de inhibición y diálisis, paralelamente se realiza el mismo procedimiento con una muestra de ACT a la que no se le adiciona inhibidor.

### **2.2.6.2. Ensayos *in vitro***

#### *2.2.6.2.1. Espectrometría de masas (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC)*

La técnica de espectrometría de masas MALDI se basa en la utilización de una “matriz” que absorbe la energía de un láser produciendo una generación de iones. La idoneidad de la matriz (la cual está normalmente formada por componentes orgánicos aunque se puedan utilizar componentes inorgánicos como el grafito) está determinada por el tipo de láser y la longitud de onda de emisión. Cuando el haz de luz choca contra la muestra (normalmente un co-cristal formado entre la matriz y la muestra en el que la primera de ellas está en exceso respecto a la segunda) ésta es absorbida por la matriz, vaporizándola y llevando la muestra a la fase de vapor. Durante el proceso de expansión de la muestra por la nube de gas los iones presentes en ella (normalmente  $H^+$  y  $Na^+$ ) son intercambiados entre la matriz y la muestra, originando moléculas de la muestra cargadas, también llamados iones cuasimoleculares. Una vez formados, estos iones se aceleran en un campo eléctrico. Tras pasar por una rejilla cargada estos iones se mantienen a la deriva en un espacio libre de campo, momento en el que se produce la separación de masas: los iones de baja masa molecular llegan antes al detector que los de alta masa, obteniendo en el proceso un espectro de masas, que se compara posteriormente con el obtenido en una muestra patrón (Fuchs *et al*, 2010).

En esta tesis se utilizó la espectrometría de masas para determinar los productos de la reacción obtenidos tras la incubación de vesículas unilamelares de fosfolípidos puros

con la toxina ACT. Para este experimento se incubaron 100  $\mu\text{M}$  de LUVs (**apartado 2.3.1.1**) de POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, Avanti Polar Lipids, AL, EEUU) con 100 nM de ACT (relación lípido:proteína 1000:1) durante 30 minutos a 37°C en constante agitación en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8). Terminada la incubación se procedió a la extracción de los lípidos añadiendo una mezcla de cloroformo:metanol 3:1 (v/v), preparación que se llevó para su análisis mediante cromatografía líquida de ultra alta eficacia (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC).

La UHPLC fue llevada a cabo mediante un sistema *ACQUITY UPLC* (Waters, MA, EEUU) equipado con una bomba binaria de liberación de disolventes, inyector automático de muestras y un horno para columnas. Las muestras fueron inyectadas en una columna *Acquity UPLC HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$ , 100x2,1 mm* (Waters, MA, EEUU), la cual fue precalentada a 65°C. Las fases móviles consistieron en una fase A compuesta por acetonitrilo:acetato de amonio a 10 mM en agua a una proporción 40:60 (v/v); y una fase B consistente en acetonitrilo:isopropanol con 10 mM acetato de amonio en una proporción 10:90 (v/v). La separación se realizó durante 13 minutos en las siguientes condiciones: entre el minuto 0 y el minuto 10 se realizó un gradiente lineal de 40% al 100% de fase B, entre el minuto 10 y 11 se mantuvo un 100% de fase B para finalmente realizar una reequilibración del sistema con un 40% de fase B (v/v) durante 2 minutos antes de pasar a la inyección de la siguiente muestra. El flujo se mantuvo a 0,5 ml/min y el volumen de inyección fue de 1  $\mu\text{l}$ . Todas las muestras se mantuvieron a 4°C durante el análisis.

Los datos de UHPLC-MSE fueron adquiridos en un *SYNAPT G2 HDMS* (Waters, MA, EEUU) con una configuración híbrida cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-ToF) equipado con una fuente de ionización en electrospray (*Electrospray Ionization*, ESI) (Waters, MA, EEUU), el cual puede ser operado tanto en modo positivo (ESI+) como en negativo (ESI-). El voltaje de capilaridad se fijó en 0,7 kV para ESI+ o 0,5 kV para ESI-. Adicionalmente se utilizó nitrógeno como gas desolvatante y cónico, a un flujo de 900 l/h para el modo positivo y 30 l/h para el modo negativo. La temperatura de la fuente se fijó en 120°C mientras que la temperatura para la desolvatación se estableció en 400°C.

Para la calibración de masas se utilizó una disolución de leucina-encefalina (2 ng/ $\mu\text{l}$ ) en acetonitrilo:ácido fórmico al 0,1% en agua (1:1, v/v), cuyos ratio masa/carga (m/z) se

monitorizaron en 556,2771 y 278,1141 en ESI+, o 554,2615 y 236,1035 en ESI- utilizando un tiempo de escaneado de 0,3 s, con intervalos de 10 s, realizando una media de 3 escaneados con una ventana de masa de  $\pm 0,5$  Da. Por último se utilizó un voltaje de capilaridad de 2 kV y una energía de colisión de 21 eV en ESI+, mientras que para el modo ESI- los valores fueron de 2,5 kV y 30 eV respectivamente. El calibrado interno se introdujo en el atomizador a un flujo constante de 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  utilizando una bomba externa.

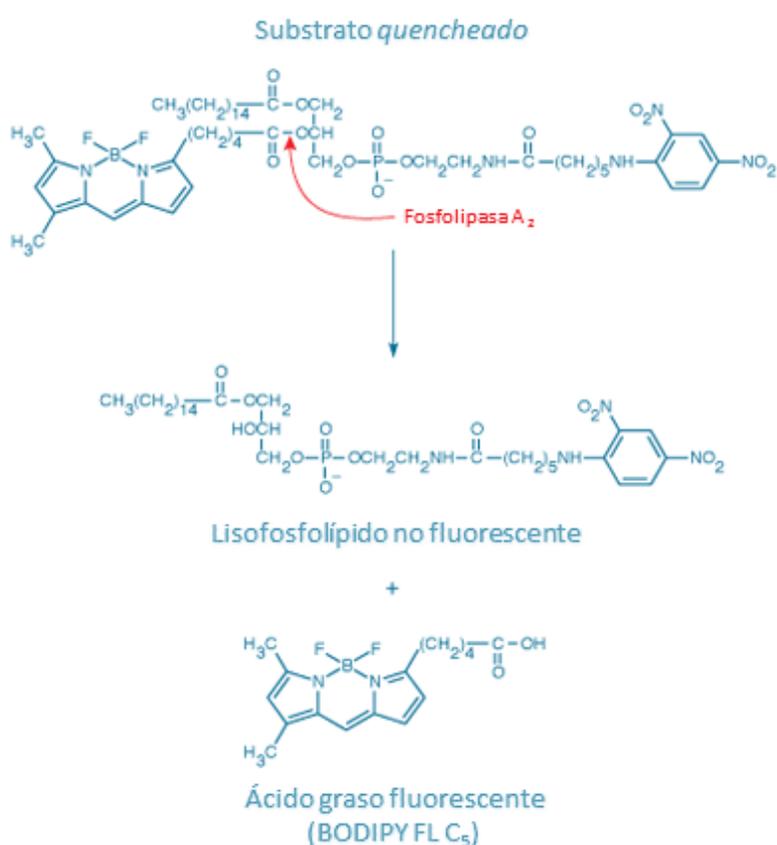
Previamente al análisis, el espectrómetro de masas fue calibrado con una solución de 0,5 mM de formiato de sodio. Todos los espectros obtenidos fueron automáticamente corregidos usando la calibración de masas realizada previamente.

La adquisición de los datos tuvo lugar en un rango de masas entre 50 y 1200 u con un modo de resolución  $\text{FWHM} \approx 20000$ , un tiempo de escaneado de 0,5 s y un tiempo de demora entre escaneados de 0,024 s. El espectrómetro de masas fue operado en el modo de adquisición de MSE continuo para ambas polaridades. Durante este método de adquisición el primer cuadrupolo Q1 fue operado únicamente en el modo de banda ancha rf, permitiendo a todos los iones entrar en la celda de colisión *T-wave*. Se crearon dos funciones de adquisición discretas e independientes: la primera función, fijada en 6 eV, recoge los datos de baja energía o no fragmentados, mientras que la segunda función recoge los datos de alta energía o fragmentados utilizando para ello una rampa de energía de colisión entre 15 y 40 eV. En ambos casos se utilizó argón para realizar la colisión inducida por disociación (*Collision Induced Dissociation, CID*).

#### 2.2.6.2.2. Determinación de actividades fosfolipasa $A_1$ y $A_2$ mediante substratos lipídicos fluorogénicos PED-A1 y PED6

Para determinar una posible actividad fosfolipasa de la toxina se utilizaron los substratos fluorogénicos PED-A1 (*N-((6-(2,4-DNP)amino)hexanoyl)-1-(BODIPY® FL C5)-2-hexyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*, Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) para determinar la actividad fosfolipasa  $A_1$  o PED6 (*N-((6-(2,4-dinitrophenyl)amino)hexanoyl)-2-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*, Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) para la determinación de la actividad fosfolipasa  $A_2$ . Tanto los substratos PED-A1 como PED6

son glicerofosfoetanolaminas modificadas en las que el ácido graso de la posición *sn-1* o *sn-2* está marcado con la sonda fluorescente BODIPY® FL y con un grupo dinitrofenol conjugado a la cabeza polar para proveer al lípido de *quenching* intramolecular. Por tanto, la liberación del ácido graso de la primera posición en el caso del substrato PED-A1 o del ácido graso de la segunda posición en el caso del substrato PED6 eliminaría ese *quenching*, incrementando la fluorescencia del fluoróforo, aumento que se puede medir a 515 nm (**Figura 2.1**).



**Figura 2.1: Mecanismo de aumento de fluorescencia provocado por la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> sobre el substrato fluorescente PED6.** Imagen modificada proporcionada por *Thermo Fisher Scientific*.

Para este trabajo se prepararon LUVs (**apartado 2.3.1.1**) de DOPC (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, Avanti Polar Lipids, AL, EEUU) con un 20% de concentración molar de PED-A1 o PED6. Se realizaron espectros de emisión de fluorescencia en una mezcla de 10  $\mu$ M de LUVs cada minuto durante un total de 30 minutos. Los LUV se incubaron en constante agitación con un rango de concentraciones de toxina (0,5-40

nM) a 37°C en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8) en un espectrofluorímetro *FluoroLog-3* (HORIBA, Japón) con la excitación fijada en a 480 nm y registrando la emisión entre 490 y 650 nm, con la apertura de ambos monocromadores fijada en 5 nm.

#### 2.2.6.2.3. *Determinación de actividad fosfolipasa A mediante ensayo acoplado con la enzima lipoxigenasa*

Para la determinación *in vitro* de la actividad fosfolipasa A mediante el uso de la enzima lipoxigenasa se siguió el protocolo descrito por Jiménez-Atiénzar y cols. (2003). Este ensayo se basa en la adición de una molécula de oxígeno a un ácido graso con una estructura (Z,Z)-pentadieno mediado por la lipoxigenasa una vez liberado un ácido graso de un fosfolípido debido a una actividad fosfolipasa. Tras la oxidación del ácido graso se genera el correspondiente hidroperóxido, cuya aparición se puede determinar espectrofotométricamente a 234 nm.

Para este trabajo se han preparado LUVs (**apartado 2.3.1.1**) con DLPC (*1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, Avanti Polar Lipids, AL, EEUU), PLPC (*1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, AL, Avanti Polar Lipids, EEUU) y PAPC (*1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, Avanti Polar Lipids, AL, EEUU) dado que tanto el ácido linoleico como el ácido araquidónico tienen la estructura necesaria para que la lipoxigenasa catalice satisfactoriamente la reacción. En los ensayos, se incubaron 65 µM. de LUVs con toxina y 0,25 µg de lipoxigenasa a 37°C en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8) y se realizaron cinéticas de 2 horas en agitación constante. La reacción se determinó en un espectrofotómetro *Varian CARY 300 Bio UV/Visible Spectrophotometer* (Agilent Technologies, CA, EEUU).

#### 2.2.6.2.4. *Análisis de actividad fosfolipasa A mediante cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC)*

La catálisis producida por una actividad fosfolipasa A genera una mezcla compleja del substrato hidrolizado y de los productos generados, es decir, lisofosfolípidos y ácidos grasos. Dicha actividad puede ser determinada mediante el análisis de los ácidos grasos libres presentes en esa mezcla, por lo que es necesario realizar una separación de los

diferentes grupos lipídicos. Para la separación de las diferentes especies lipídicas se utilizó TLC, la cual se basa en la separación de analitos en una fase estacionaria por las diferencias de polaridad de las diferentes moléculas. La fase estacionaria más habitual utilizada para efectuar la separación de lípidos son la sílica y la alúmina, siendo la más común la sílica, la cual puede ser modificada mediante diferentes impregnaciones con otras sustancias para optimizar la separación de ciertas clases de lípidos. Esta fase estacionaria es polar, mientras que la fase móvil es de carácter apolar. Esta segunda fase consiste en un sistema de solventes (con predominancia de disolventes orgánicos como el cloroformo y el hexano) que separan los lípidos de acuerdo a la polaridad de las cabezas de los fosfolípidos presentes en la muestra (Fuchs *et al*, 2011).

Para la determinación de ácidos grasos mediante esta técnica se prepararon LUVs (**apartado 2.3.1.1**), los cuales se incubaron con toxina en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8) a 37°C en agitación constante. Transcurrida la incubación se procedió a la extracción de la fase orgánica o clorofórmica mediante la adición de 1 ml de metanol, 1 ml de cloroformo y 0,9 ml de 0,2 M HCl y 2 M KCl, mezcla que se sometió a una centrifugación a 950 *xg* durante 5 minutos, recuperando posteriormente la fase orgánica y evaporándola para concentrar la muestra lipídica.

La separación de los lípidos extraídos se efectuó en placas de *Silica Gel 60* (Merck Millipore, Alemania) exponiéndola a una única fase móvil compuesta por *n*-heptano:éter diisopropílico:ácido acético glacial en una proporción 70:30:2 (v/v/v). Una vez realizada la separación se reveló la placa sumergiéndola durante 5 minutos en una solución compuesta por un 10% (p/v) de sulfato de cobre pentahidratado y un 8% (v/v) de ácido fosfórico, tras lo cual se secó la placa utilizando un secador. Para revelar las manchas de lípidos, la placa se calentó a 200°C entre 3 y 5 minutos (Touchstone, 1982). El análisis se realizó comparando la intensidad de las manchas respecto a las obtenidas en el control sin toxina, intensidades determinadas mediante un densitómetro *GS-800 Calibrated Densitometer* (Bio-Rad, CA, EEUU).

### **2.2.6.3. Ensayos *in vivo***

Se crecieron células J774A.1 en medio de cultivo completo en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80%, momento en el cual se añadió a cada

pocillo 1,5  $\mu\text{Ci/ml}$  de ácido araquidónico tritiado (*Arachidonic Acid [5,6,8,9,11,12,14,15-<sup>3</sup>H(N)]*), Perkin Elmer, MA, EEUU). A continuación se mantuvieron las células a 37°C o/n para permitir la captación e incorporación del ácido graso marcado radioactivamente. Una hora antes de realizar la incubación con toxina se retiró el medio de cultivo y se sustituyó con medio de cultivo fresco sin suero. Las células marcadas radioactivamente se incubaron con toxina 20 nM durante 10 minutos a 37°C. Terminado el tiempo de incubación se retiró el medio de incubación, se añadió 1 ml de metanol y se rascaron las células. La separación de fases se realizó mediante la adición de 1 ml de cloroformo y 0,9 ml de 0,2 M HCl y 2 M KCl, seguido de una centrifugación de la mezcla a 950 g durante 5 minutos, recuperando posteriormente la fase orgánica o clorofórmica, la cual se evaporó con el objetivo de concentrar la muestra.

La separación de los lípidos extraídos se efectuó mediante TLC (**apartado 2.2.6.1.4**) cargando las muestras evaporadas en placas de *Silica gel 60* (Merck Millipore, Alemania) y utilizando única fase móvil compuesta por n-heptano:éter diisopropílico:ácido acético glacial a una proporción 70:30:2 (v/v/v). Los ácidos grasos libres se visualizaron tiñendo las placas con vapor de yodo y comparando las manchas de cada muestra con la del patrón de ácidos grasos. A continuación, se rascaron las manchas de interés, se extrajeron los lípidos de la sílica añadiendo 200  $\mu\text{l}$  de una mezcla metanol:agua 1:1 (v/v), y se cuantificó la radioactividad añadiendo 2 ml de líquido de centelleo PCS (Amersham Biosciences, Reino Unido) en un contador de centelleo *Tri-Carb 2900TR Low Activity Liquid Scintillation Analyzer* (Perkin Elmer, MA, EEUU).

### **2.2.7. Proteólisis controlada**

Los experimentos de proteólisis parcial se pueden utilizar para investigar características conformacionales de proteínas o topología de proteínas insertadas en membranas. Se ha demostrado que las zonas donde se puede dar el proceso proteolítico a lo largo de la cadena polipeptídica de una proteína se caracterizan por la flexibilidad del esqueleto de la proteína, implicando que las proteasas pueden localizar las zonas de despliegue de una cadena proteica de forma diferente dependiendo de la conformación adoptada (Fontana *et al*, 2004). Este tipo de experimento se ha utilizado en esta tesis para determinar las posibles conformaciones adoptadas tanto por la ACT como su mutante

PF así como el grado de protección que conceden las diferentes composiciones lipídicas a ambas proteínas.

En esta tesis se ha seguido el protocolo propuesto por Bakás y cols. (1998) adaptado en el laboratorio. Se incubaron liposomas (**apartado 2.3.1.1**) con toxina durante 30 minutos a 37°C en constante agitación en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8). Tras la incubación se centrifugó la mezcla a 14000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar la toxina no unida y agregada, recuperando el sobrenadante, el cual se incubó durante 10 minutos a 10°C con tripsina (*TCPK-treated trypsin*, Sigma Aldrich, MO, EEUU) a una concentración final de 16,8 µM. Tras la incubación se añadió buffer de carga a las muestras, las cuales se hirvieron a 100°C durante 5 minutos y se cargaron en un gel desnaturizante SDS-PAGE a un 8,5% de acrilamida y con un *stacking* de 4,7% de acrilamida.

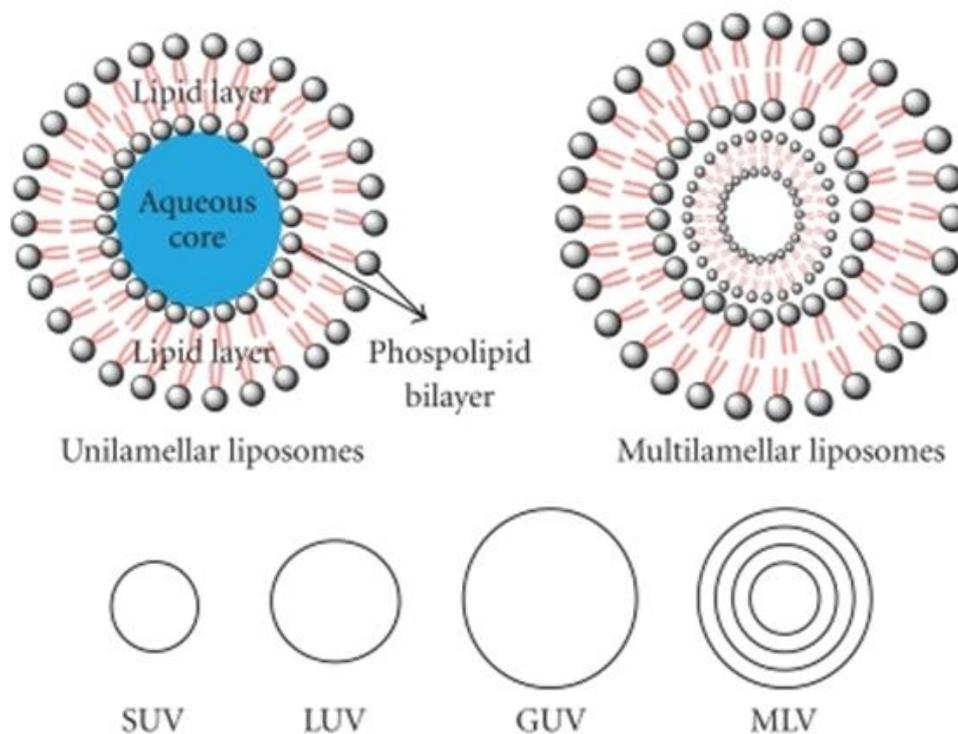
## **2.3. MEMBRANAS MODELO**

### **2.3.1. Liposomas**

Los liposomas son vesículas esféricas que consisten en un espacio o volumen acuoso rodeado por una o más bicapas de fosfolípidos. La generación de todos los tipos de vesículas lipídicas se basa en el autoensamblaje de los fosfolípidos. Los fosfolípidos son moléculas con una cabeza polar y dos colas hidrofóbicas largas, las cuales provocan que sean pobremente solubles en agua. Esta baja solubilidad se debe a que al formarse una bicapa de fosfolípidos existe un área finita con una energía asociada a su borde donde las colas hidrofóbicas están expuestas al agua. Esta energía puede ser minimizada si la bicapa forma una esfera, dado que de este modo se elimina el borde, aunque existe a su vez una penalización energética debido a la fuerza necesaria para originar la curvatura de los fosfolípidos. Por tanto, el liposoma con el menor diámetro posible se formará cuando la energía del borde exceda la energía de curvatura. Dado que los fosfolípidos suelen conservarse en solventes orgánicos, al eliminar ese solvente mediante evaporación los fosfolípidos se ensamblan en una pila de bicapas, las cuales se separan aplicando fuerzas de hidratación acompañadas o en ausencia de campos eléctricos. Así

mismo, mientras la bicapa lipídica se reorganiza desde un disco plano a una esfera el área de la vesícula puede aumentar en tamaño debido a la adición de moléculas de fosfolípido y otros fragmentos de bicapa. Las cinéticas relativas del ensamblaje de la bicapa debido a las fuerzas hidrodinámicas y a la separación provocada por las fuerzas de hidratación dictan el tamaño y la lamelaridad de las vesículas formadas, dando lugar a los diferentes tipos de vesículas (Lasic, 1995).

Las vesículas formadas son frecuentemente clasificadas dependiendo de su tamaño (pequeñas, grandes o gigantes), número de bicapas (unilamelares, oligolamelares o multilamelares) o la carga de los fosfolípidos (neutro, aniónico o catiónico). Recientemente los liposomas también se han clasificado respecto a su función (convencional, furtivo, enfocado a ligando, liberación a largo plazo o liberación por desencadenante). La clasificación más utilizada es la que cataloga los liposomas por su tamaño y lamelaridad, diferenciándose dentro de esta catalogación las vesículas unilamelares pequeñas (*Small Unilamellar Vesicles*, SUV), vesículas unilamelares grandes (*Large Unilamellar Vesicles*, LUV), vesículas unilamelares gigantes (*Giant Unilamellar Vesicles*, GUV) y vesículas multilamelares (*Multilamellar Vesicles*, MLV) (Patil y cols., 2014) (**Figura 2.2**).



**Figura 2.2: Representación esquemática de las estructuras básicas y los diferentes tipos de liposomas.** En la figura se representan los tipos de vesículas lipídicas según su lamelaridad (unilamelares y multilamelares) así como la clasificación por tamaños, diferenciándose de este modo los SUV ( $\varnothing$  0,02  $\mu\text{m}$ -0,2  $\mu\text{m}$ ), LUV ( $\varnothing$  0,2  $\mu\text{m}$ -1  $\mu\text{m}$ ), MLV ( $\varnothing$  >0,1  $\mu\text{m}$ ) y GUV ( $\varnothing$  >1  $\mu\text{m}$ ). Imagen tomada de Mishra y cols. (2011).

En esta tesis se han utilizado vesículas unilamelares grandes (*Large Unilamellar Vesicles*, LUV) y vesículas unilamelares gigantes (*Giant Unilamellar Vesicles*, GUV).

### 2.3.1.1. LUV

Es posible obtener vesículas unilamelares con un amplio rango de diámetros, desde 50 nm hasta 1  $\mu\text{m}$ . Estas vesículas poseen un tamaño uniforme, ser aplicables a la mayor parte de mezclas lipídicas posibles y tienen que ser capaces de encapsular eficientemente iones, metabolitos y moléculas de alta masa molecular (Deamer y Bangham, 1976).

En este trabajo se han utilizado LUVs con sondas fluorescentes encapsuladas y vesículas libres de ellas, habiendo ligeras diferencias en los protocolos de preparación de cada uno de los tipos. En ambos casos la preparación de LUVs comenzó con la evaporación de la fase orgánica (una mezcla cloroformo:metanol 2:1) en la que se encuentran

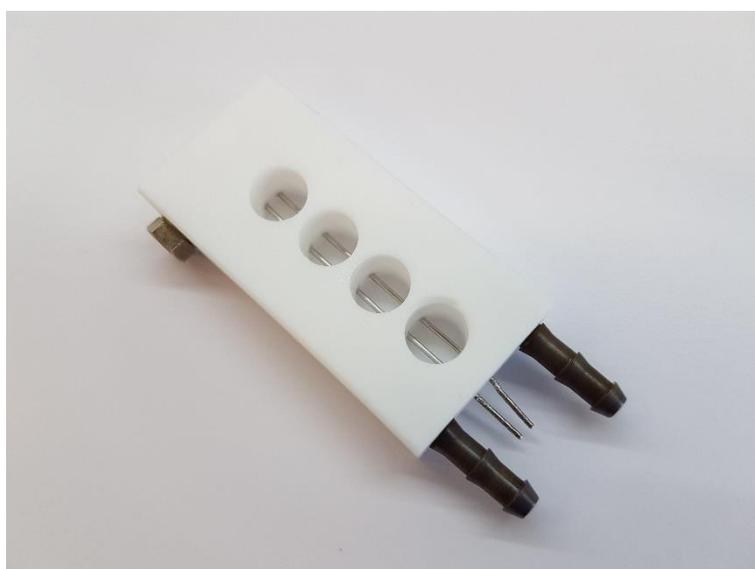
disueltos los lípidos, debido a que los disolventes orgánicos pueden dificultar el ensamblaje posterior en vesículas esféricas. Para ello se mezclaron los lípidos deseados a la concentración y relación molar deseada y se secaron primero con nitrógeno hasta evaporar completamente el volumen y posteriormente manteniendo la película de lípido seco obtenida durante 2 horas en una bomba de vacío para asegurar la completa eliminación de trazas de disolvente orgánico.

Tras la evaporación se procedió a la hidratación de la película lipídica en tampón, siendo éste isosmótico respecto al buffer en el que se realizaron posteriormente los experimentos. Para hacer vesículas libres de sondas fluorescentes encapsuladas se utilizó tampón de liposomas (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8), mientras que para encapsular la sonda fluorescente ANTS (*8-Aminonaphthalene-1,3,6-Trisulfonic Acid Disodium Salt*, Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) y su *quencheador* DPX (*p-Xylene-Bis-Pyridinium Bromide*, Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) se utilizó un tampón con 70 mM NaCl, 20 mM Tris, 12,5 mM ANTS, 45 mM DPX a pH 8. En ambos casos los lípidos se resuspendieron con un vórtex mientras se mantuvo la suspensión por encima de su temperatura de transición ( $T_m$ ), obteniendo en el proceso MLVs. Para eliminar las sucesivas capas se sometieron los MLVs a 10 ciclos de congelación/descongelación, pasando la mezcla de nitrógeno líquido a un baño termostático. Al finalizar el proceso se obtuvieron lo denominado FTMLV (*Freeze and Thaw Multilamellar Vesicles*), por lo que se utilizó la técnica de extrusión para obtener una población homogénea de LUVs (Hope *et al*, 1995). Para ello la mezcla de FTMLV se pasó 10 veces a través de dos filtros de policarbonato con un diámetro de poro de 0,1  $\mu\text{m}$  (*Whatman Polycarbonate Membrane Filters 0,1  $\mu\text{m}$* , GE Healthcare, IL, EEUU) mediante un extruder (Northern Lipids, Canadá).

En el caso de las vesículas con contenidos fluorescentes, la suspensión de LUVs se pasó por una columna PD-10 (GE Healthcare, IL, EEUU) equilibrada previamente con tampón de liposomas para eliminar las sondas no encapsuladas. En ambos casos tras finalizar la preparación de las vesículas se procedió a la cuantificación de concentración de lípido mediante el método de FISKE (**apartado 2.3.3**).

### 2.3.1.2. GUV

Dentro de la categoría de tamaño de GUVs entran las vesículas unilamelares con un diámetro entre 1 y 100  $\mu\text{m}$ , siendo éste el rango habitual en el que se engloban la mayoría de células biológicas. Un GUV, por tanto, se asemeja a la estructura básica compartimental de las células biológicas en el sentido de que la membrana de la vesícula imitaría la matriz lipídica cerrada de la membrana plasmática. Debido a su mayor diámetro en comparación con los LUVs su investigación se suele realizar mediante microscopía óptica (Walde *et al*, 2010). Existen diferentes métodos para preparar GUVs, entre ellos el método de hidratación en presencia de un campo eléctrico utilizado en esta tesis.



**Figura 2.3: Compartimento para la preparación de vesículas unilamelares gigantes (GUV).**

Para preparar GUVs se ha seguido el protocolo descrito por Landeta y cols. (2015), adaptado en el laboratorio. Para ello se han utilizado compartimentos con cuatro espacios circulares atravesados por dos alambres de platino (**Figura 2.3**). En cada uno de los cuatro espacios se depositaron entre los dos alambres un total de 6  $\mu\text{l}$  de una mezcla lipídica deseada a una concentración de 1 mM en 3 tandas de 2  $\mu\text{l}$ . Dado que en esta tesis se han analizado los GUVs por microscopía confocal, para la posterior visualización de las vesículas la mezcla de lípidos utilizada contenía un 0,5% de concentración molar de fosfatidiletanolamina conjugada con la sonda fluorescente

rodamina (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)*), Avanti Polar Lipids, AL, EEUU). Tras la aplicación de los lípidos se mantuvo el compartimento durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la evaporación del cloroformo y la precipitación de los lípidos en los alambres. Posteriormente se añadieron a cada espacio 400  $\mu$ l de sacarosa disuelta en agua destilada, cuya concentración era isosmótica respecto al tampón en el cual se realizó el experimento.

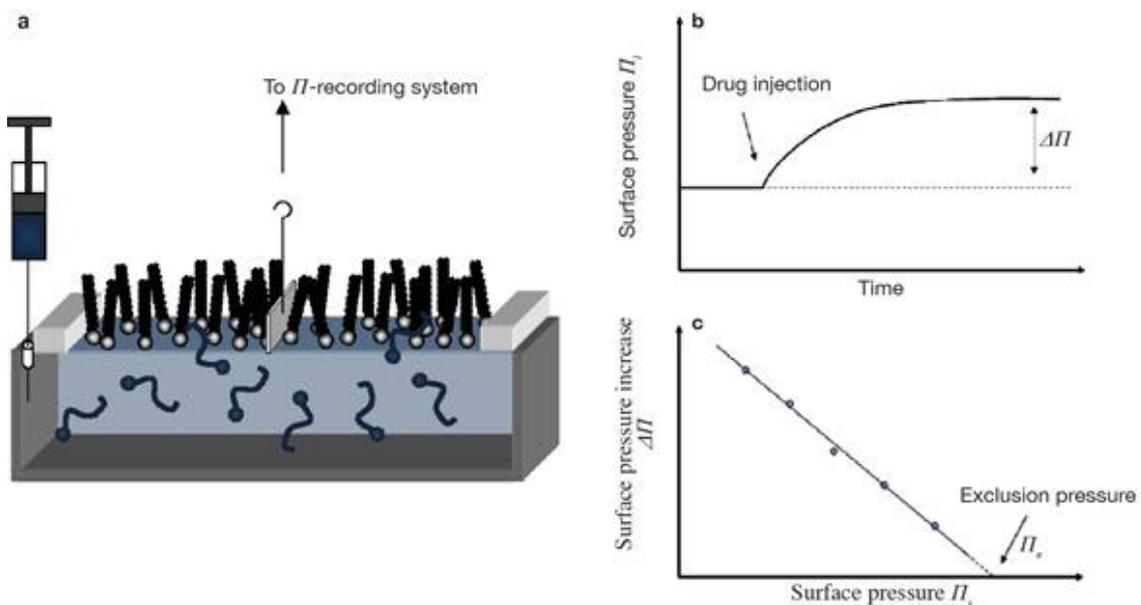
Para la formación de los GUVs se aplicó un campo de corriente alterna utilizando un generador *TTi TG315 Function Generator* (AIM-TTI: Aim & Thurlby Thandar Instruments, Reino Unido). La generación de las vesículas se realizó en dos pasos: primero se aplicó una frecuencia de 10 Hz, un voltaje pico a pico (*peak-to-peak voltage*, PK-PK) de 2,5 V<sub>p-p</sub> y un valor eficaz o valor cuadrático medio (*Root Mean Square*, RMS) de 0,9 V<sub>rms</sub> durante 2 horas, seguido por otros 40 minutos en los que frecuencia se bajó a 2 Hz, sin alterar los valores del resto de parámetros. Los compartimentos se mantuvieron siempre por encima de la temperatura de transición de los lípidos que se utilizaron.

### **2.3.2. Monocapas**

Las membranas biológicas históricamente se han descrito como bicapas lipídicas cuya única función se limita a la compartimentalización celular, pero hoy en día se sabe que muchas proteínas interactúan con ella. Esa interacción lleva a variaciones locales de la presión lateral de las membranas. Para el estudio de esa interacción proteína-lípido se han usado diferentes sistemas modelo cuyo objetivo es imitar la interfase presente entre la bicapa lipídica, entre los cuales se encuentra las monocapas de Langmuir en interfase aire/agua. Las monocapas de Langmuir se producen y caracterizan en un aparato que consiste en una depresión (habitualmente compuesto de materiales hidrofóbicos como el teflón), que contiene una subfase de agua y unas barreras móviles que se mueven sobre la superficie de agua. Sobre esa superficie acuosa se coloca una cantidad determinada de material anfifílico (normalmente lípido) disuelto en un disolvente orgánico volátil como el cloroformo (Dynarowicz-Lątka *et al*, 2001).

Habitualmente la forma de caracterizar una monocapa es mediante las isothermas de presión superficial ( $\pi$ )/área (A), es decir, un gráfico que representa el cambio en la

presión superficial en función del área disponible para cada una de las moléculas presentes en la superficie de la subfase acuosa. Los lípidos se extienden sobre la interfase aire/agua hasta conseguir una presión superficial inicial ( $\pi_i$ ), momento en el que se inyecta en la subfase una cantidad deseada de proteína. Dependiendo de la actividad superficial y de su afinidad por el lípido, la presión superficial incrementará hasta un estado estable, el cual se denomina presión de adsorción en equilibrio ( $\pi_e$ ), pudiendo calcular el incremento de la presión superficial ( $\Delta\pi = \pi_e - \pi_i$ ). La dimensión de este cambio dependerá de la presión superficial inicial, por lo que se realizan una serie de medidas a  $\pi_i$  distintas. Se pueden determinar diferentes parámetros representando en un gráfico los diferentes valores de  $\Delta\pi$  en función de su  $\pi_i$ : extrapolando la regresión hacia el eje de abscisas se puede obtener la presión lateral crítica, mientras que extrapolando hacia el eje de ordenadas se poder determinar el  $\Delta\pi$  máxima (Calvez *et al*, 2009) (Figura 2.4).



**Figura 2.4:** Representación esquemática de la utilización de la técnica de Langmuir para evaluar el poder de penetración de un componente bioactivo en una monocapa lipídica. En la figura se representa la inyección del componente en la monocapa (A), la cinética de penetración del componente en la monocapa tras la inyección de la muestra en la subfase mediante la medición de la presión superficial (B) y representación gráfica del incremento de la presión superficial frente a la presión inicial para la determinación de la presión de exclusión (C). Imagen tomada de Eeman y cols. (2010).

Para este trabajo se ha utilizado un tensiómetro superficial *μTroughS* de Kibron Inc (Finlandia) para determinar las posibles diferencias en la interacción de la toxina salvaje ACT y el mutante PF en monocapas de distintas composiciones lipídicas. Las monocapas se produjeron encima de tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8) a una temperatura constante de 37°C. Una vez estabilizada la presión superficial se añadieron 250 nM de toxina en agitación y se esperó hasta la estabilización de la presión superficial de la monocapa para poder determinar la presión final ( $\pi_e$ ).

### **2.3.3. Cuantificación de la concentración de lípido**

Para la determinación de la concentración de fosfolípidos se siguió el método establecido por Fiske y SubbaRow en 1925 y mejorado por Böttcher y cols. en 1961. Este método se basa en la digestión con ácido perclórico a 200°C para producir la liberación del fosfato inorgánico, procediendo posteriormente a la incubación con molibdato. La reacción producida entre el grupo fosfato de los fosfolípidos y el molibdato al calentar la mezcla a 100°C, genera en el proceso ácido fosfomolibdico, el cual se reduce produciendo un compuesto coloreado cuya absorbancia se determina a 812 nm.

Al igual que en los métodos de determinación de concentración de proteína, se preparó una recta patrón entre 0 y 150 nmol de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, así como un volumen determinado de la muestra a analizar. A todas ellas se añadieron 500  $\mu$ l de ácido perclórico al 70% y se hidrolizaron durante 45 minutos a 200°C. A continuación se añadieron 4 ml de una solución de heptamolibdato amónico (2,2 g de heptamolibdato amónico y 14,3 ml de ácido sulfúrico al 95-98% en un litro de agua) y, en agitación, 500  $\mu$ l de una disolución de ácido ascórbico al 10% (p/v). La mezcla se mantuvo a 100°C durante 15 minutos, tras lo cual se procedió a la medición de la absorbancia a 812 nm.

## 2.4. TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS

### 2.4.1. Liberación de contenidos acuosos de liposomas mediante fluorescencia

Este ensayo está basado en el encapsulamiento de la molécula fluorescente *1-aminonaphthalene-3,6,8-trisulfonic acid* (ANTS) y su *quencheador*  *$\alpha,\alpha'$ -bispyridinium dibromide* (DPX) dentro de los liposomas, lo cual se traduce en una ausencia de la señal fluorescente. En caso de haber una perturbación en la membrana debido a la acción de la toxina, ambas moléculas se liberan al medio, diluyéndose y provocando una reducción notable del *quenching* del ANTS por parte del DPX, aumentando la señal de fluorescencia (Smolarsky *et al*, 1977). En esta tesis por tanto se ha determinado la capacidad de liberación de ambas moléculas debido tanto a la acción de la toxina salvaje ACT como del mutante PF en liposomas de diferentes composiciones lipídicas.

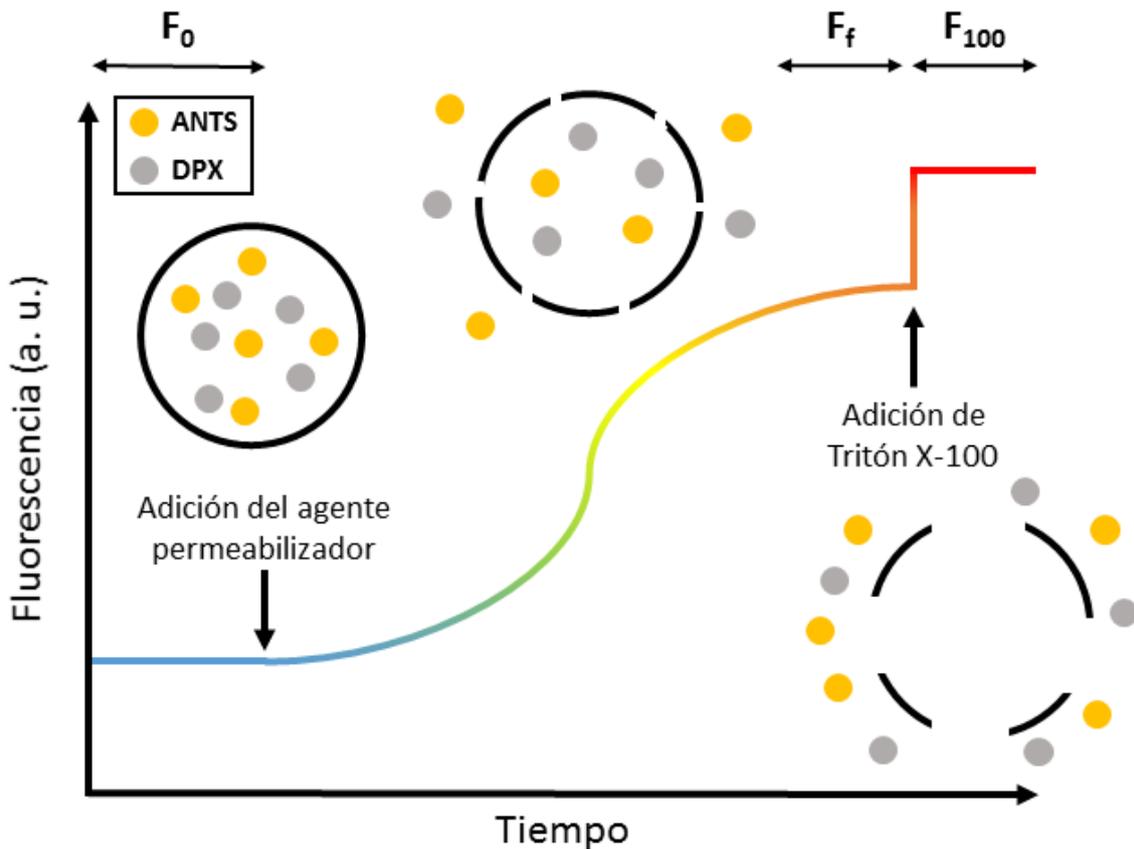
Las cinéticas de liberación se realizaron en un espectrofluorímetro *FluoroLog-3* (HORIBA, Japón), incubando diferentes concentraciones de toxina con una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  de liposomas con ambas moléculas encapsuladas (**apartado 2.3.1.1**) en constante agitación a 37°C en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8). El registro de fluorescencia se realizó excitando la mezcla a 355 nm y recogiendo la emisión de fluorescencia a 520 nm, con las aperturas de ambos monocromadores fijados en 5 nm. Las cinéticas se realizaron durante 30 minutos y constaron de 3 partes (**Figura 2.5**):

- El registro de la fluorescencia basal ( $F_0$ ) de la muestra antes de la adición de la toxina durante el primer minuto.
- El registro de la fluorescencia una vez añadido el agente permeabilizador durante los siguientes 28 minutos.
- La fluorescencia emitida tras la adición del detergente Tritón X-100 durante el último minuto, a una concentración en la que las vesículas se solubilizan al completo ( $F_{100}$ ).

Para determinar el porcentaje de liberación final se utiliza la siguiente ecuación

$$\% \text{ Liberación} = (F_f - F_0) / (F_{100} - F_0) \times 100$$

donde  $F_f$  representa la fluorescencia registrada en el minuto anterior a la adición del detergente.



**Figura 2.5. Representación esquemática del ensayo de liberación de contenidos fluorescentes.** Inicialmente los liposomas contienen las moléculas ANTS y DPX encapsulados, provocando la atenuación del ANTS por parte del DPX. La adición del agente lítico permeabilizaría la membrana de la vesícula liberando ambas moléculas, cuya dilución en el medio exterior produciría un incremento en la emisión de fluorescencia del ANTS.

#### 2.4.2. Movimiento transmembrana de fosfolípidos (*Flip-flop*)

El ensayo para determinar el movimiento transmembrana de lípidos está basado en el fenómeno de la transferencia de energía de resonancia de Förster o FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*). Este fenómeno se basa en el solapamiento del espectro de emisión de un fluoróforo con el espectro de excitación de otro cuando están muy

próximos entre sí. De esta manera es posible excitar la fluorescencia del primero (donador) y registrar la fluorescencia emitida por el segundo (receptor) (Förster, 2012).

En este caso el donador es la molécula *7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl* (NBD) unida a un fosfolípido inicialmente localizado en la monocapa interna de la membrana mientras que el receptor es la rodamina, la cual está unida a un anticuerpo presente fuera de la vesícula. Cuando ocurre un movimiento transmembrana algunos de los lípidos con NBD unido se transferirán a la monocapa externa, pudiendo interactuar con la rodamina unida al anticuerpo (Contreras *et al*, 2003).

Para preparar LUVs marcados con NBD-PE en su membrana interna se preparó una mezcla de DOPC (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, Avanti Polar Lipids, AL, EEUU) con un 0,6% de concentración molar de NBD-PE (*N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*, Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) siguiendo el protocolo descrito en el **apartado 2.3.1.1**. Estos liposomas fueron tratados con ditionito de sodio (Sigma Aldrich, MO, EEUU) para eliminar por oxidación la fluorescencia del NBD de la membrana externa, eliminando posteriormente el exceso de ditionito pasando la preparación de LUVs por una columna PD10 con resina *Sephadex G-25* (GE Healthcare, Reino Unido) equilibrada con tampón de liposomas (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8).

Para la determinación del posible movimiento de los lípidos de una capa a otra se incubaron 100  $\mu$ M de LUVs con 100 nM de toxina (relación lípido:proteína:lípido 1000:1) en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8) en constante agitación a 37°C. Cada cinco minutos durante media hora se recogieron alícuotas de 50  $\mu$ l de la suspensión, incubándolas con 1  $\mu$ l de rodamina conjugada a un anticuerpo (*Tetramethylrhodamine Goat Anti-Mouse IgG (H / L)*, Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) en agitación, la cual es impermeable a la membrana, en tampón de hemólisis y se realizaron espectros en un espectrofluorímetro *FluoroLog-3* (HORIBA, Japón) con la excitación fijada en 460 nm y recogiendo la emisión entre 510 y 640 nm, con las aperturas de los monocromadores tanto de excitación como de emisión fijadas en 5 nm. Adicionalmente se utilizó un filtro de 515 nm en el monocromador de emisión para evitar la contribución de la luz dispersada.

### 2.4.3. Unión de toxina a LUVs determinada mediante FRET

En esta tesis se ha estudiado la transferencia de energía (explicada previamente en el **apartado 2.4.2**) entre la fluorescencia intrínseca de la toxina y una sonda fluorescente unida a fosfolípidos presentes en la bicapa de membranas modelo para analizar la unión de la proteína hacia una membrana. Por tanto, como donador se ha utilizado la propia fluorescencia intrínseca de la toxina debido a los triptófanos y tirosinas presentes en su secuencia aminoacídica, mientras que el receptor será el pireno, el cual estará presente en las membranas de vesículas unido a una fosfatidiletanolamina. Dado que el FRET se basa en las interacciones de corto alcance (20-30 Å) entre el donador y aceptor la disminución de la señal de la fluorescencia intrínseca indicará la unión de la proteína a las membranas de las vesículas (Qin *et al*, 2004).

Para esta tesis se ha utilizado el protocolo descrito por Ray y cols. (2012), adaptado en nuestro laboratorio, para estudiar las características de unión de la toxina a vesículas de diferentes composiciones lipídicas. Para ello se incubaron diferentes concentraciones de liposomas (**apartado 2.3.1.1**) con un 1% de concentración molar de una fosfatidiletanolamina marcada con pireno (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(1-pyrenesulfonyl)*, Avanti Polar Lipids, AL, EEUU) con una concentración estática de toxina durante 5 minutos a 37°C con una agitación constante. Tras la incubación se realizaron espectros de cada muestra en un espectrofluorímetro *FluoroLog-3* (HORIBA, Japón), excitando la muestra a 290 nm y recogiendo la señal de emisión entre 300 y 500 nm, fijando la apertura de ambos monocromadores en 3 nm.

El análisis de los datos se realizó tal y como se ha descrito previamente, utilizando para el cálculo de las constantes de disociación ( $K_D$ ) de cada curva la siguiente ecuación (Qin *et al*, 2004):

$$K_D = \frac{\delta}{N} [L]_{1/2} - \frac{[P]}{2}$$

donde  $\delta$  representa la fracción de lípido presente en la membrana externa de una vesícula de 100 nm de diámetro,  $N$  el número de moléculas que toman parte en la unión,  $[L]_{1/2}$  la saturación media de la proteína en su unión a la membrana y  $[P]$  la concentración de proteína.

#### **2.4.4. Permeabilización de GUVs determinada mediante microscopía confocal**

Una de las aplicaciones más obvias de los GUVs es su uso como sistema modelo para el estudio de ciertas propiedades fisicoquímicas de las membranas biológicas, ya sea estudiando las propiedades mecánicas de la membrana, la formación de dominios lipídicos, la dinámica de los lípidos, el aumento del grosor de la membrana, así como procesos de fisión y fusión. Sin embargo, la aplicación más utilizada de este tipo de vesículas se encuentra en el campo de las proteínas de membrana, siendo como requisito indispensable que la proteína de interés se pueda reconstituir en el GUV. La ventaja de los GUVs frente a los LUVs radica en la posibilidad de poder visualizar directamente esos procesos así como la realización de análisis cuantitativos gracias a su mayor tamaño (Walde *et al*, 2010).

En esta tesis se han utilizado los GUVs para visualizar y cuantificar la permeabilización de vesículas de diferentes composiciones lipídicas incubadas con toxina frente a dextranos de diferentes tamaños hidrodinámicos mediante microscopía confocal. La visualización se realizó en cámaras previamente bloqueadas durante 20 minutos a temperatura ambiente con BSA libre de ácidos grasos a una concentración de 10 mg/ml y posteriormente lavadas con tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8). En cada una de ellas, en un volumen final de 400 µl, se mezclaron 4 µl de dextranos unidos a FITC de un stock a 10 mg/ml, toxina a la concentración deseada y 80 µl de GUVs marcados con rodamina (**apartado 2.3.1.2**) en tampón de hemólisis. Los experimentos se realizaron en un microscopio confocal *Nikon Eclipse TE-2000* (Nikon, Japón) activando dos canales: un primer canal excitando a 488 nm y recogiendo la señal con el detector de 515/30 nm para visualizar los dextranos y un segundo canal excitando a 561 nm y recogiendo la fluorescencia emitida con el detector a 593/40 nm para la visualización de la rodamina presente en la membrana de las vesículas. Para determinar el porcentaje de permeabilización se comparó la señal emitida por los dextranos del interior de las vesículas con la fluorescencia presente fuera de ellas, utilizando para la cuantificación el software *Fiji* (GNU General Public License).

## 2.5. DICROISMO CIRCULAR

La luz polarizada plana está integrada por dos componentes polarizados circulares de igual magnitud, uno rotando en sentido de las agujas del reloj (hacia la derecha o R) y otro al contrario (hacia la izquierda o L). El dicroísmo circular (*circular dichroism* o CD) se refiere a la absorción diferencial entre los dos componentes. Si al atravesar una muestra los componentes L y R no son absorbidos o lo son al mismo nivel, la combinación de ambos componentes generará una radiación polarizada en el plano original. En cambio, si L y R son absorbidas a distintos niveles, la radiación resultante poseerá una polarización elíptica. Por tanto, una señal de CD será observada cuando un cromóforo sea quiral u ópticamente activo cuando se de alguna de las siguientes condiciones: (a) sea intrínsecamente quiral debido a su estructura, (b) esté covalentemente unida al centro quiral de la molécula, o (c) esté colocada en un plano asimétrico respecto a la estructura tridimensional adoptada por la molécula. Para la medición de dicroísmo circular se utilizan espectropolarímetros, instrumentos capaces de medir la diferencia en absorbancia entre los componentes polarizados circulares L y R ( $\Delta A = A_L - A_R$ ), generando datos en forma de elipticidad ( $\theta$ ) en grados (Kelly *et al*, 2005).

El dicroísmo circular es un método excelente para la determinación de la estructura secundaria de las proteínas, así como su pérdida debido a procesos de desnaturalización. Cuando los cromóforos de las amidas del polipéptido de las proteínas están alineados en una matriz, su transición óptica se desplaza o se divide en múltiples transiciones debido a esas interacciones. El resultado se traduce en espectros de CD, los cuales son característicos para cada uno de los diferentes elementos estructurales: mientras que las proteínas  $\alpha$ -hélice se observan bandas negativas a 222 nm y 208 nm así como una banda positiva a 193 nm, en el caso de las proteínas con hojas- $\beta$  antiparalelas expresan bandas negativas a 218 nm y positivas a 195 nm, mientras que las proteínas desordenadas presentan una baja elipticidad por encima de 210 nm y bandas negativas cerca de 195 nm (Greenfield, 2006).

En esta tesis se ha utilizado el análisis mediante dicroísmo circular para analizar la estabilidad estructural frente al incremento de la temperatura de las toxinas incubadas con liposomas de diferentes composiciones lipídicas.

### 2.5.1. Preparación de muestras

Se midieron dos tipos de muestra: proteína en solución y proteína unida a membranas de liposomas. En el caso de la proteína en solución se mantuvo la toxina en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8) durante 10 minutos a 4°C para que ésta recuperara su conformación nativa, tras lo cual se centrifugó la mezcla a 14000 *xg* durante 10 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante para su posterior análisis. Para la proteína unida a membranas se incubaron los liposomas (**apartado 2.3.1.1**) con toxina durante 30 minutos a 37°C. En ambos casos, terminada la incubación se centrifugó la muestra a 14000 *xg* durante 10 minutos a temperatura ambiente, reteniendo el sobrenadante para su análisis por dicroísmo circular.

### 2.5.2. Medición de muestras

Para la medición se utilizó un espectropolarímetro *JASCO J-810 Spectropolarimeter* (JASCO, MD, EEUU). Se realizaron dos tipos de experimento: espectros y rampas de temperatura. En el caso de los espectros se incubaron las muestras de 20°C a 90°C realizando espectros cada 2,5°C en el rango de 200 nm a 400 nm, recogiendo para cada espectro datos cada 0,2 nm a una velocidad de 100 nm/min. Para las rampas de temperatura se calentaron las muestras de 20°C a 90°C a una velocidad de 1°C/min, recogiendo datos cada 0,2°C a una longitud de onda fija establecida en 222 nm.

## 2.6. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica analítica y preparativa basada en el uso de sondas fluorescentes que tienen una especificidad estructural y/o funcional. Esta tecnología presenta ventajas importantes respecto a otras técnicas fluorométricas, entre ellas la posibilidad de hacer medidas rápidas de partículas o células. Las medidas se hacen individualmente en células intactas de poblaciones homogéneas o heterogéneas de células vivas o fijadas (Maftah *et al*, 1993).

La adquisición de datos se hace a través de unas lentes colocadas alrededor del punto de análisis que recogen la luz que proviene de las células como resultado de su

iluminación por los láseres. Normalmente hay dos lentes, las cuales recogen la luz que emite cada célula a medida que pasa por el punto de análisis dando cada una de ellas una señal distinta (Givan, 2011):

- La primera de las lentes se encuentra en sentido directo respecto a la trayectoria del haz del láser. Esta lente enfoca la luz a un fotodiodo que tiene enfrente una reja bloqueadora en una posición en la que es capaz de bloquear el láser. Únicamente la luz que ha sido refractada cuando pasa a través de una partícula va a ser desviada lo suficiente de su dirección original para evitar la reja, pudiendo llegar a la lente y ser registrada. Una célula con una gran área refractará una mayor cantidad de luz hacia el fotodetector, por lo que este valor proporciona información sobre el tamaño de la partícula. Esta luz que se recoge se denomina *forward scatter light* (FSC).
- La segunda de las lentes se encuentra en un ángulo recto respecto a la trayectoria del haz del láser (ortogonal). Esta lente recoge la luz que ha sido difractada hacia ángulos anchos. Cuantas más irregularidades tenga la superficie de la célula mayor cantidad de luz será difractada hacia esos ángulos. La información recogida por esta lente se denomina *side scatter light* (SSC).

Tanto el FSC como el SSC se recogen en tubos fotomultiplicadores (PMT, *Photomultiplier Tube*), pero para registrar la luz fluorescente (FL, *fluorescence light*) emitida por las células analizadas se necesitan detectores y PMT adicionales. La detección de la luz fluorescente es similar a la detección del SSC pero con la adición de una serie de filtros y espejos diseñados para que éstos transmitan y reflejen luz de longitudes de onda específica. La luz multicolor de una muestra se emite lateralmente hacia una serie de PMT, cuyo número varía dependiendo del citómetro de flujo. Cada PMT mediante una serie de filtros y espejos recoge una longitud de onda de emisión específica. Como se necesitan múltiples láseres de excitación para excitar un alto rango de fluorocromos (cada uno con su propia longitud de onda de excitación y emisión) los citómetros suelen tener diferentes láseres. Las células, por tanto, pasan por cada uno de los láseres y los fotodetectores se colocan espacialmente para que cada detector (PMT) recoja la luz excitada con los diferentes láseres (Wagonner, 2001).

El citómetro de flujo utilizado en esta tesis (*BD FACS Calibur*, BD Biosciences, NJ, EEUU) tiene dos láseres (uno que excita a 488 nm y otro a 633 nm) y, aparte de los detectores de FSC y SSC, cuatro detectores:

- FL1: recoge a 530 nm la fluorescencia excitada a 488 nm.
- FL2: recoge a 585 nm la fluorescencia excitada a 488 nm.
- FL3: recoge a 670 nm la fluorescencia excitada a 633 nm.
- FL4: recoge a 661 nm la fluorescencia excitada a 633 nm.

En esta tesis se ha utilizado la técnica de citometría de flujo por una parte para determinar la permeabilización de los macrófagos J774A.1 hacia el ioduro de propidio y por otra parte para determinar la externalización de fosfatidilserina en macrófagos de la misma línea celular.

### **2.6.1. Determinación de la permeabilización de la membrana de macrófagos mediante ioduro de propidio**

El ioduro de propidio (*Propidium Iodide*, PI) es una molécula fluorescente pequeña que se une al DNA pero que carece de la capacidad de transportarse pasivamente hacia el interior de células con sus membranas plasmáticas intactas. Por tanto, el análisis de la absorción de PI por parte de las células se puede utilizar para cuantificar la permeabilización de las células debido a lesiones presentes en sus membranas celulares (Crowley *et al*, 2016).

En esta tesis se ha utilizado el análisis de absorción de PI para determinar la permeabilización causada por la ACT en células. Para ello se utilizaron macrófagos J774A.1 confluentes preincubados durante 1 hora con medio DMEM sin suero a 37°C, los cuales se trataron con 20 nM de ACT a la misma temperatura durante los tiempos establecidos. Terminada la incubación se realizaron 3 lavados con PBS frío con 5 mM de EDTA, seguido de una incubación con DMEM sin suero suplementado con PI (Sigma Aldrich, MO, EEUU) a una concentración de 1 mg/ml durante 5 minutos a 37°C, tras lo cual se retiró el medio y se realizaron otros 3 lavados adicionales con PBS frío con 5 mM de EDTA para eliminar el PI no absorbido. Por último, se levantaron las células y se analizó la fluorescencia emitida por el ioduro de propidio de cada muestra en el

citómetro. Para calcular el porcentaje de permeabilización de las células se relativizaron los datos de media geométrica ( $G_m$ ) de la fluorescencia de las muestras con toxina con la obtenida en las células control sin ella.

## **2.7. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS**

### **2.7.1. Transferencia de proteínas e inmunodetección**

La transferencia de macromoléculas (proteínas o ácidos nucleicos) a membranas microporosas es un proceso denominado *blotting*, término que abarca tanto el *spotting* (deposición manual de una muestra) como la transferencia desde geles de acrilamida. Las proteínas que se resuelven mediante electroforesis son habitualmente transferidas a soportes de membranas adsorbentes bajo la influencia de una corriente eléctrica, proceso conocido como *Western Blot* (WB). La utilización posterior de anticuerpos específicos para reconocer las proteínas (sobre todo las poco abundantes) que se han transferido a la membrana se conoce como *immunoblotting*, técnica que tiene una amplia aplicación en el campo de la bioquímica y la biología molecular. La eficiencia de la transferencia de las proteínas a una membrana depende sobre todo de la naturaleza del gel, la masa molecular de las proteínas que se quieran transferir y el tipo de membrana microporosa (Kurien *et al*, 2009).

En esta tesis se han utilizado dos tipos de transferencias a membranas de nitrocelulosa: la transferencia semiseca y la transferencia húmeda.

#### **2.7.1.1. Transferencia semiseca**

En una transferencia semiseca el sándwich de gel y membrana se coloca entre dos placas de acero inoxidable o grafito con electrodos de carbón, formando un campo eléctrico uniforme en toda la superficie. Las ventajas de este tipo de transferencia radican en que se pueden transferir varios geles a la vez y que se necesita un menor voltaje para la transferencia de las proteínas a la membrana (Kurien *et al*, 2006).

En esta tesis se ha utilizado esta técnica para la transferencia de proteínas que previamente se han sometido a un proceso de electroforesis desnaturizante SDS-

PAGE. Se colocó el gel sobre una membrana de nitrocelulosa (*Protran BA83 Nitrocellulose Blotting Membrane, 0.2 μm, 82 mm*, GE Healthcare, IL, EEUU) y, recubriendo a ambos lados, 4 papeles de filtro (*Grade 3MM Chr Blotting Paper*, GE Healthcare, IL, EEUU) por cada lado. Todos los componentes fueron previamente empapados en tampón de transferencia semiseca (30 mM glicina, 50 mM Tris, 0,0375% p/v SDS, 20% v/v metanol, pH 9,2). Este sándwich se colocó posteriormente en un equipo de transferencia semiseca (*Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell*, Bio-Rad, CA, EEUU) y se aplicó una voltaje constante de 15 V durante 40 minutos a temperatura ambiente. Terminada la transferencia se procedió a la inmunodetección de las proteínas de interés (**apartado 2.7.1.3**).

#### **2.7.1.2. Transferencia húmeda**

En este trabajo se ha utilizado el protocolo descrito inicialmente por Towbin y cols. (1979) adaptado en nuestro laboratorio. Este tipo de transferencia se ha utilizado para la transferencia de proteínas separadas mediante electroforesis nativa a membranas de nitrocelulosa.

Se colocó el gel encima de una membrana de nitrocelulosa (*Protran BA83 Nitrocellulose Blotting Membrane, 0.2 μm, 82 mm*, GE Healthcare, IL, EEUU) y se colocaron 3 papeles de filtro (*Grade 3MM Chr Blotting Paper*, GE Healthcare, IL, EEUU) y una esponja a cada lado, todos empapados en tampón de transferencia húmeda (386,4 mM glicina, 47,9 mM Tris, 0,1% p/v SDS 20% v/v metanol). Este sándwich se colocó posteriormente en un *Mini Trans-Blot® Cell* (Bio-Rad, CA, EEUU), se colocó en una cubeta con buffer de transferencia húmeda junto con un bloque de hielo y se le aplicó un amperaje constante de 190 mA por cada gel durante 3 horas a 4°C. Para determinar la correcta transferencia de las proteínas se tiñó la membrana con rojo *Ponceau* (**apartado 2.2.2.4.3**), marcando las bandas del marcador molecular, y se procedió a la inmunodetección de las proteínas de interés (**apartado 2.7.1.3**).

#### **2.7.1.3. Inmunodetección mediante anticuerpos**

Las técnicas de inmunodetección (*immunoblotting*) se basan en el uso de anticuerpos específicos para identificar proteínas diana entre una mezcla de proteínas. Las proteínas son separadas mediante una electroforesis y transferidas a una membrana,

normalmente de nitrocelulosa, la cual sufre tres procesos diferentes. En el primero de ellos se bloquea la membrana para evitar interacciones inespecíficas de los anticuerpos que se utilizarán posteriormente. En el segundo la membrana se cubre con un anticuerpo primario para el reconocimiento de la proteína de interés, mientras que en el tercer y último paso se utiliza un anticuerpo secundario marcado con una enzima o radioisótopo que reconoce el anticuerpo primario (Magi *et al*, 2005).

En esta tesis, antes de empezar con el bloqueo se realizaron tres lavados de las membranas con TBST (0,1% Tween-20 (p/v), 150 mM, 10 mM Tris, pH 7,5). Para el bloqueo se incubaron en agitación las membranas con una solución de leche en polvo al 5% en TBST (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se añadió el anticuerpo específico de la proteína de interés a la solución mencionada previamente, incubando las membranas o/n en agitación a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con TBST para eliminar el exceso de anticuerpo, procediendo a continuación a la incubación de las membranas con el anticuerpo secundario en una mezcla de leche en polvo al 5% en TBST (p/v) en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la incubación se realizaron otros 3 lavados con TBST para eliminar el anticuerpo no unido y se incubaron las membranas con una solución de luminol (*SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate*, Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU). Esta solución será oxidada por la peroxidasa presente en el anticuerpo secundario, emitiendo luz en el proceso. La detección de la señal se realizó en un instrumento *myECL™ Imager* (Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU).

### **2.7.2. Cuantificación de cAMP por ELISA**

Para determinar la cantidad de cAMP intracelular generado en células por la toxina se sembraron células J774A.1 en placas de 96 pocillos. Una vez confluentes, se reemplazó el medio de cultivo por *Opti-MEM* (Invitrogen, MA, EEUU) suplementado con 2 mM CaCl<sub>2</sub> y tras una hora de incubación a 37°C se incubaron las células con toxina 5 nM durante 30 minutos a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó la placa a 600 xg durante 10 minutos a 4°C para sedimentar las células, se eliminó el sobrenadante y se añadió 0,1 M HCl con 0,3% Tritón X-100 (p/v) durante 10 minutos a RT para lisar las células. Una vez lisadas las células se centrifugó de nuevo la placa a 600 xg durante 10

minutos a 4°C para sedimentar los restos celulares y se recogió el sobrenadante, en el cual se calculó la concentración de cAMP siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial (*cAMP ELISA kit*, Enzo Lifesciences, NY, EEUU). Adicionalmente, la concentración de proteína de cada muestra se determinó mediante BCA (**apartado 2.2.4**).

En el caso de la concentración de cAMP generado por la toxina en solución se incubó 1 nM de toxina en presencia de 2 nM de calmodulina y 5 mM de ATP en un tampón consistente en 30 mM Tris, 20 mM MgCl<sub>2</sub> y 100 μM CaCl<sub>2</sub> a pH 8 durante 10 minutos a 37°C en agitación constante. Para la cuantificación de cAMP generado por la reacción se utilizó el kit comercial mencionado anteriormente.

## 2.8. CULTIVOS CELULARES

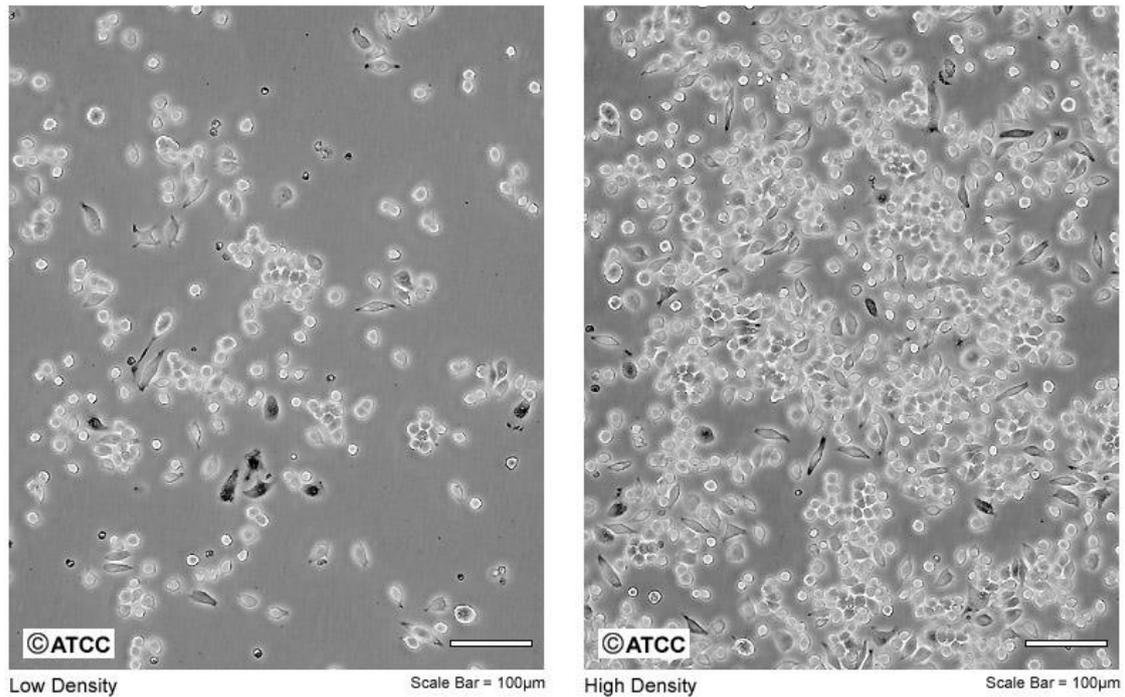
### 2.8.1. Cultivos de células eucariotas

#### 2.8.1.1. Células J774A.1 (ATCC® TIB-67™)

Línea celular establecida en 1976 por Ralph y cols. que consiste en monocitos-macrófagos obtenidos a partir de linfomas histiocíticos de ratón (*Mus musculus*). Esta línea celular se caracteriza por la expresión del receptor del complemento 3 (CR3) y del receptor Fc de alta afinidad para IgG1 (FcγR1). Así mismo, las células J774A.1 son activas en la fagocitosis dependiente de anticuerpo, exhiben una baja citólisis y sintetizan grandes cantidades de lisozima así como de interleucina 1 beta (IL1β). Por último, el tiempo de duplicación de la población es de aproximadamente 17 horas (**Figura 2.6**).

El cultivo de esta línea celular se hizo en medio DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium, Low Glucose 1000 mg/l*, Sigma Aldrich, MO, EEUU) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS, Lonza, Bélgica) inactivado térmicamente durante 50 minutos, con penicilina y estreptomina a una concentración de 100 U/ml y 100 μg/ml respectivamente y 4 mM de L-glutamina (*Pen Strep Glutamine*, Invitrogen, MA, EEUU). Para facilitar su crecimiento las células de esta línea se mantuvieron a 37°C, con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 90% de humedad.

ATCC Number: **TIB-67**  
Designation: **J774A.1**



**Figura 2.6: Cultivo de macrófagos J774A.1.** En la figura se representan imágenes obtenidas mediante microscopía óptica tanto de cultivos de baja densidad celular (panel de la izquierda) como de cultivos de alta densidad celular o confluentes (panel de la derecha). Las imágenes han sido proporcionadas por ATCC.

### 2.8.2. Ensayo de viabilidad celular o citotoxicidad

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH, *lactate dehydrogenase*) es una proteína citosólica que cataliza la conversión de piruvato a lactato en presencia de NADH. Las células que tienen su membrana dañada liberan la enzima LDH al medio extracelular, la cual puede detectarse mediante diferentes kits comerciales (Specian *et al*, 2016). Dado que la LDH cataliza la reducción de  $\text{NAD}^+$  a NADH en presencia de lactato, este kit mide la formación de NADH mediante una reacción acoplada en la que la sal de tetrazolium INT se reduce hasta formar formazán rojo, el cual se puede medir espectrofotométricamente a 490 nm.

En esta tesis se ha utilizado la actividad LDH para examinar la capacidad citotóxica de la toxina ACT y de los mutantes PF, S606A y D1079A. Para determinar la cantidad de LDH

liberada al medio extracelular se sembraron macrófagos J774A.1 en placas de 96 pocillos. Una vez confluentes y una hora antes de realizar el ensayo, se reemplazó el medio de cultivo por Opti-MEM suplementado con CaCl<sub>2</sub> a una concentración final de 2 mM. La adición de diluciones seriadas 1:2 de toxina se realizó sobre las propias células, incubándolas durante 2 horas a 37°C. Las muestras control de liberación completa de LDH se prepararon rompiendo las células mecánicamente. Terminada la incubación se centrifugó la placa a 400 xg durante 5 minutos a 4°C para sedimentar las células y se recogió el sobrenadante para calcular la actividad LDH siguiendo los indicadores del kit comercial (*CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay*, Promega, WI, EEUU). Los resultados se expresaron mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = (\text{Abs}_{490} \text{ muestra} - \text{Abs}_{490} \text{ blanco}) / (\text{Abs}_{490} \text{ control } 100\% - \text{Abs}_{490} \text{ blanco}) \times 100$$

# **Capítulo 3**

## **Estudio sobre el mecanismo de translocación del dominio catalítico**

### 3.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha determinado que multitud de toxinas bacterianas poseen diversas actividades lipasas intrínsecas que ayudan en los procesos citotóxicos producidos por estas proteínas. Estas actividades enzimáticas pueden ser diversas, describiéndose desde actividades fosfolipasa A hasta actividades fosfolipasa C pasando por actividades esfingomielinasas.

Dentro de este grupo de las toxinas con actividades fosfolipasa A existen diferentes ejemplos. La toxina ExoU de *Pseudomonas aeruginosa* por ejemplo tiene una actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> que contribuye a la muerte necrótica, permeabilización celular y la rápida propagación de la bacteria (Sato *et al*, 2004), mientras que la actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> de la toxina VipD de *Legionella pneumophila* altera la composición de los endosomas catalizando la disminución de PI(3)P de una forma dependiente de Rab5, bloqueando de este modo la fusión de los endosomas con las vacuolas que contienen la bacteria (Gaspar *et al*, 2014).

Anteriormente, nuestro laboratorio describió que la interacción de la toxina ACT con membranas modelo produce estructuras lipídicas temporales no-lamelares de geometrías que se asemejan a fases invertidas cúbicas, provocando en el proceso un movimiento transmembrana (*flip flop*) de los lípidos entre la bicapa lipídica de las membranas (Martín *et al*, 2004). Este movimiento transmembrana puede ocurrir por diversos motivos, desde el movimiento espontáneo de los lípidos entre las dos bicapas que conforman las membranas hasta la inserción de moléculas ajenas a la membrana (lípidos, proteínas, detergentes...), incluyendo la generación enzimática de lípidos en una de las bicapas de la membrana (Contreras *et al*, 2010).

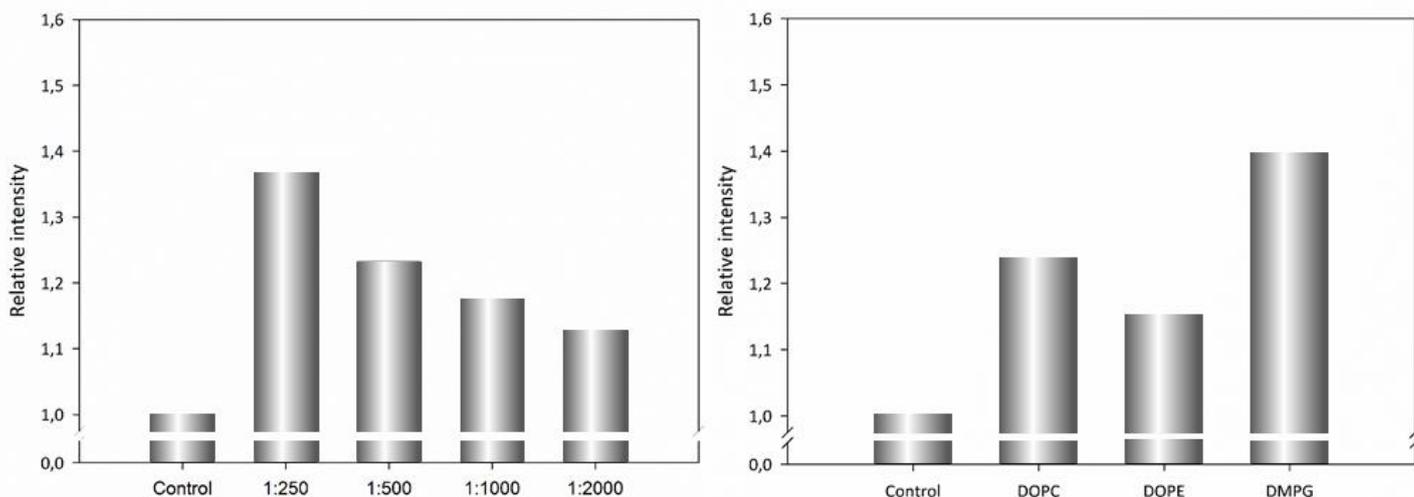
El objetivo de este capítulo por tanto es determinar la existencia de una posible actividad lipasa de la toxina adenilato ciclasa (ACT) de la bacteria *Bordetella pertussis*, así como su posible involucración en el movimiento transmembrana descrito por nuestro grupo anteriormente y su contribución a los efectos citotóxicos producidos por la toxina.

## 3.2. RESULTADOS

### 3.2.1. Determinación de las actividades fosfolipasa A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> *in vitro*

Tras una incubación de la ACT con liposomas con las composiciones lipídicas adecuadas *in vitro* y realizando posteriormente una separación de lípidos mediante cromatografía de capa fina (TLC) con la mezcla de disolventes correspondiente no se observaron bandas correspondientes a ceramida ni diacilglicerol, por lo que en principio se descartaron las actividades esfingomielinasa y fosfolipasa C respectivamente.

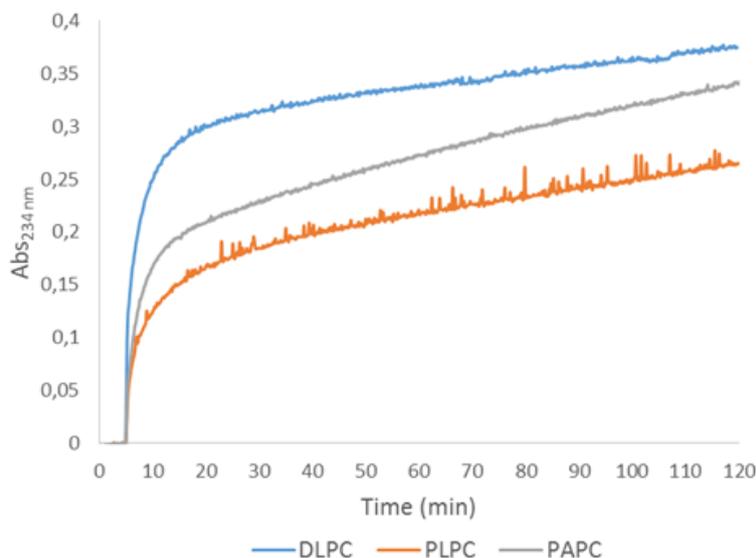
En cambio, al realizar una separación de los lípidos en una placa de TLC tras incubar liposomas de POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) con diferentes concentraciones de toxina durante 30 minutos a 37°C se visualizaron bandas con un R<sub>F</sub> (*Ratio of Front*) parecido al observado en el patrón de los ácidos grasos libres, cuya intensidad aumentaba cuanto más toxina se añadiera a los liposomas de POPC (**Figura 3.1A**). Estos datos indicaron que la toxina podría interactuar con los lípidos de una bicapa lipídica de una forma en la que la ACT hidroliza el enlace éster de los ácidos grasos de la primera, segunda o ambas posiciones de los fosfolípidos, liberando ácidos grasos libres en el proceso. Adicionalmente, al incubar liposomas con otros posibles substratos hidrolizables por una actividad fosfolipasa A como DOPC (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), DOPE (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*) y DMPG (*1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)*) se observaron bandas con diferentes intensidades que correspondían a los ácidos grasos libres (**Figura 3.1B**). Todos estos datos parecen indicar que la toxina adenilato ciclasa posee una actividad fosfolipasa A intrínseca, dado que en las mezclas únicamente se añadió toxina a las vesículas, sin presencia de proteínas ni enzimas adicionales.



**Figura 3.1: Análisis de la generación de ácidos grasos libres mediante cromatografía de capa fina.** En los gráficos se muestra la intensidad relativa de las bandas correspondientes a los ácidos grasos libres respecto al control (liposomas sin toxina) producidos tras la acción de actividad fosfolipasa A de la ACT sobre liposomas. La separación de los lípidos se realizó tras la incubación durante 30 minutos a 37°C en agitación de 250  $\mu$ M de liposomas de POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) con diferentes relaciones proteína:lípido (A) o con 250  $\mu$ M de liposomas de DOPC (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), DOPE (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*) o DMPG (*1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)*) con 250 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:1000) (B).

Esta posible actividad fosfolipasa A de la toxina adenilato ciclasa se confirmó mediante experimentos de ensayo acoplado con la enzima lipoxigenasa. Esta enzima reacciona con los ácidos grasos que poseen una estructura específica generando hidroperóxido en el proceso, cuya aparición se puede registrar a 234 nm. En la **figura 3.2** se observa que tras la adición de la toxina a liposomas de DLPC (*1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), PLPC (*1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) y PAPC (*1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) se registró una rápida aparición de hidroperóxido en la mezcla durante los primeros minutos, manteniéndose los valores de absorbancia estables durante el resto de la cinética de 2 horas. Estos datos indicarían que la generación de ácidos grasos libres producidos por la ACT es rápida, produciéndose esa actividad fosfolipasa A durante los primeros instantes tras la interacción de la toxina con las membranas lipídicas. Adicionalmente, dado que en el caso de los liposomas de PLPC y PAPC los lípidos que los componen el ácido graso que reconoce la lipoxigenasa (ácido linoleico y ácido araquidónico) se encuentra en la segunda posición se puede deducir que la ACT posee por lo menos actividad fosfolipasa

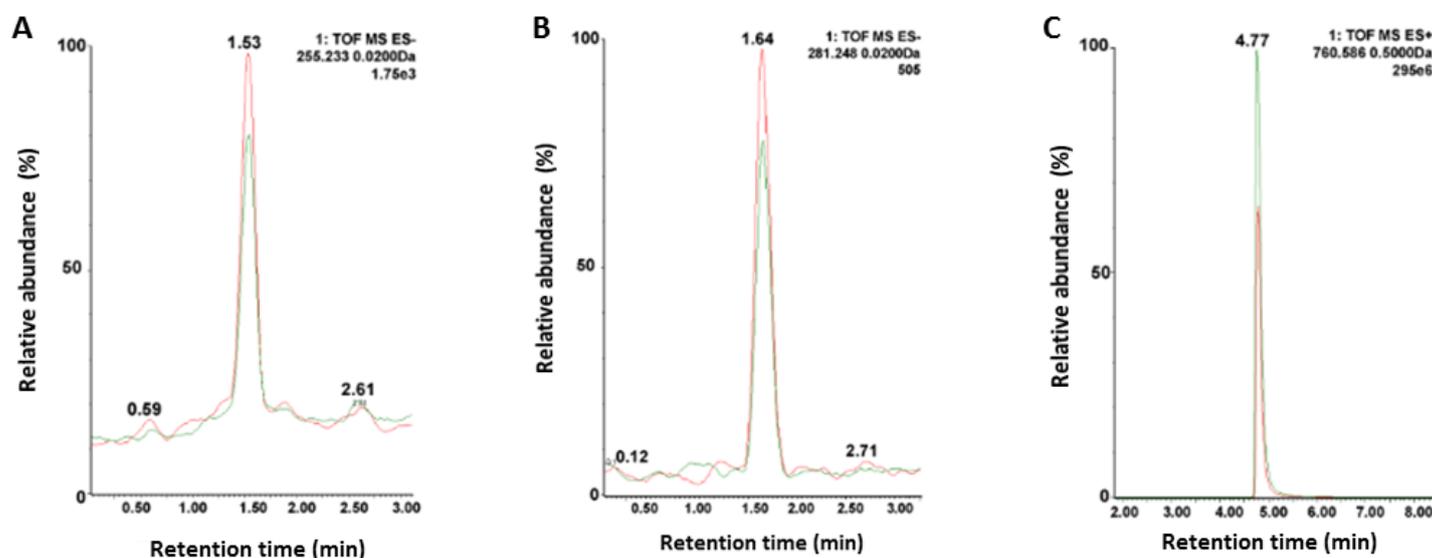
A<sub>2</sub>; aunque el hecho de que en liposomas de DLPC, con ambos ácidos grasos siendo reconocibles por la enzima, se obtengan valores de absorbancia mayores no se puede descartar que la toxina posea igualmente actividad fosfolipasa A<sub>1</sub>.



**Figura 3.2: Cinéticas de ensayo acoplado con lipoxigenasa para la determinación de presencia de ácidos grasos libres.** En esta gráfica se representan cinéticas de 2 horas a 37°C registrando la aparición de hidroperóxido mediante absorbancia a una longitud de onda de 234 nm. La adición de 65 nM de ACT a 65 µM de liposomas (relación proteína:lípido 1:1000) se realizó a los 5 minutos de comenzar la medición.

Para determinar si esa actividad fosfolipasa de la toxina es A<sub>1</sub> o A<sub>2</sub> se incubaron liposomas de POPC con toxina durante 30 minutos a 37°C y tras la extracción de los lípidos se realizó un análisis mediante espectrometría de masas de la fase orgánica. La elección de POPC como sustrato se realizó para poder diferenciar entre las actividades fosfolipasa A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, dado que en caso de poseer la primera de ellas se liberaría ácido palmítico mientras que en el caso de la segunda aparecería un pico en el espectro de masas correspondiente al ácido oleico. Al analizar los cromatogramas de las muestras incubadas con toxina se observaron picos de mayor intensidad en los iones del ácido palmítico (**Figura 3.3A**) y ácido oleico (**Figura 3.3B**) respecto a la muestra control (sin toxina). Este aumento de ambos ácidos grasos estuvo acompañado con la disminución del ion correspondiente al fosfolípido completo (**Figura 3.3C**), dado que a medida que se da la hidrólisis del POPC daría como producto lisofosfolípidos por una parte y los ácidos grasos por otra, desapareciendo el sustrato original. Estos datos de

espectrometría de masas junto con las placas de TLC y el ensayo acoplado indicarían que la ACT posee las actividades fosfolipasa A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>.

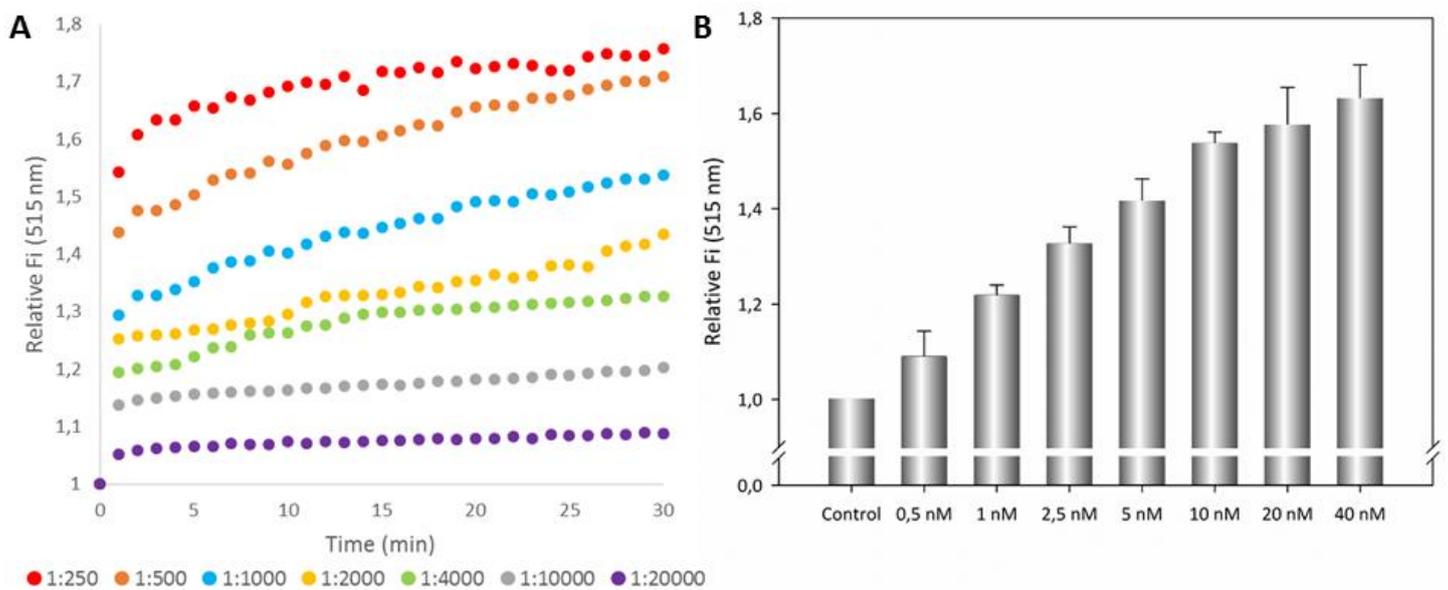


**Figura 3.3: Identificación de los componentes producidos por la actividad fosfolipasa A de la ACT por UHPLC/MSE.** Se identificaron los productos de la reacción *in vitro* mediada por la actividad fosfolipasa A de la toxina incubando liposomas de POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) con la toxina ACT mediante la cromatografía líquida de alta eficacia y la adquisición simultánea de la masa exacta de los lípidos a energías de colisión alta y baja (UHPLC/MSE). En esta figura se representan los espectros de masa UHPLC-ESI-MSE de los iones (A) m/z 255,2330 [*Palmitic acid-H*]<sup>-</sup>, (B) m/z 255,2330 [*Oleic acid-H*]<sup>-</sup> y (C) m/z 760.5851 [*PC(16:0/18:1)+H*]<sup>+</sup> en presencia (línea roja) o ausencia (línea verde) de la toxina.

Para analizar adicionalmente ambas actividades se recurrió a los sustratos fluorogénicos PED-A1 y PED6. Ambos sustratos son fosfatidiletanolaminas modificadas con la sonda BODIPY FL<sup>®</sup> anclada en el primer (PED-A1) o en el segundo (PED6) ácido graso y un grupo dinitrofenilo en la cabeza polar que provee el *quenching* intramolecular. En caso de producirse la hidrólisis del ácido graso marcado debido a una actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> o A<sub>2</sub> se eliminaría esa atenuación y se incrementaría la emisión de fluorescencia del fluoróforo a 515 nm.

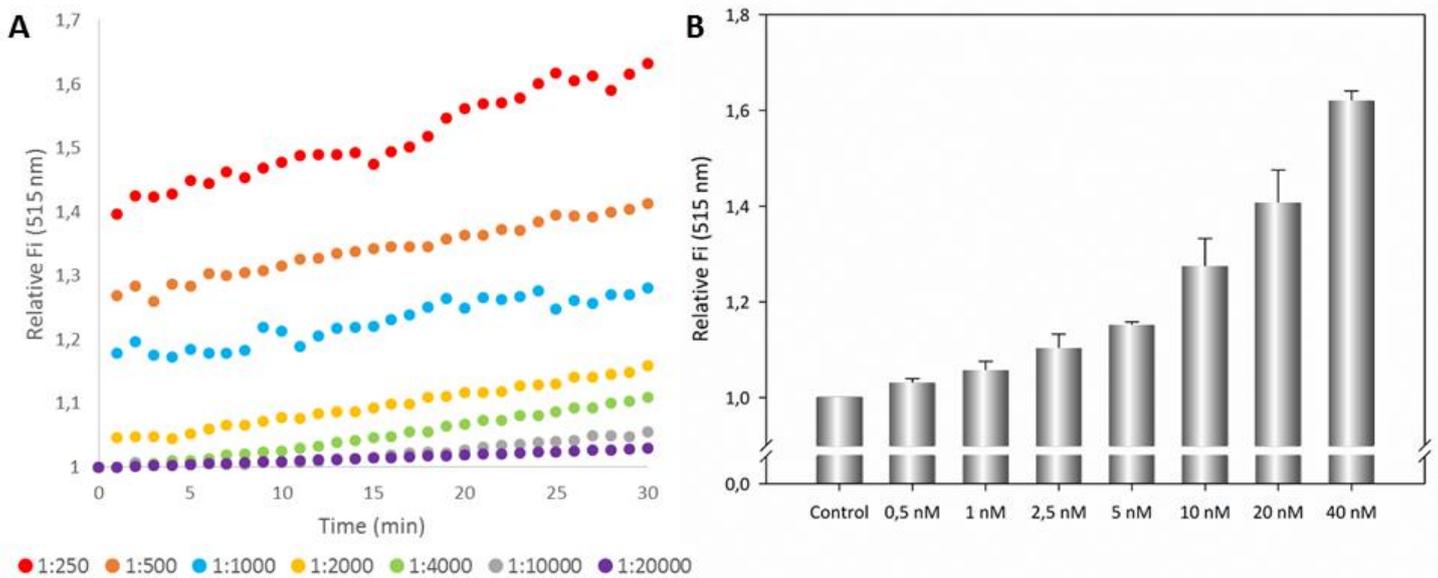
En el caso de la actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> se prepararon liposomas con una composición lipídica de DOPC:PED-A1 a una relación molar de 8:2 y se registró la fluorescencia emitida a 515 nm tras la adición de la toxina a diferentes concentraciones. Se observó

un aumento de fluorescencia con el tiempo a 515 nm con el tiempo respecto a la obtenida en los liposomas sin tratar tras la adición de la proteína a diferentes relaciones molares proteína:lípido (**Figura 3.4A**), así como una correlación positiva entre la fluorescencia registrada tras 30 minutos de incubación y la concentración de toxina añadida (**Figura 3.4B**). Estos datos indicarían que la ACT posee actividad fosfolipasa A<sub>1</sub>, donde el corte del ácido graso de la primera posición se produce muy rápido en el tiempo, y que ésta es dependiente de la concentración. Como control positivo se añadió una fosfolipasa A<sub>1</sub> de *Thermomyces lanuginosus* (Sigma Aldrich, MO, EEUU) a una concentración final de 0,25 µg/ml, obteniendo valores relativos de fluorescencia a 515 nm de 3,066±0,046 (DE) respecto al control.



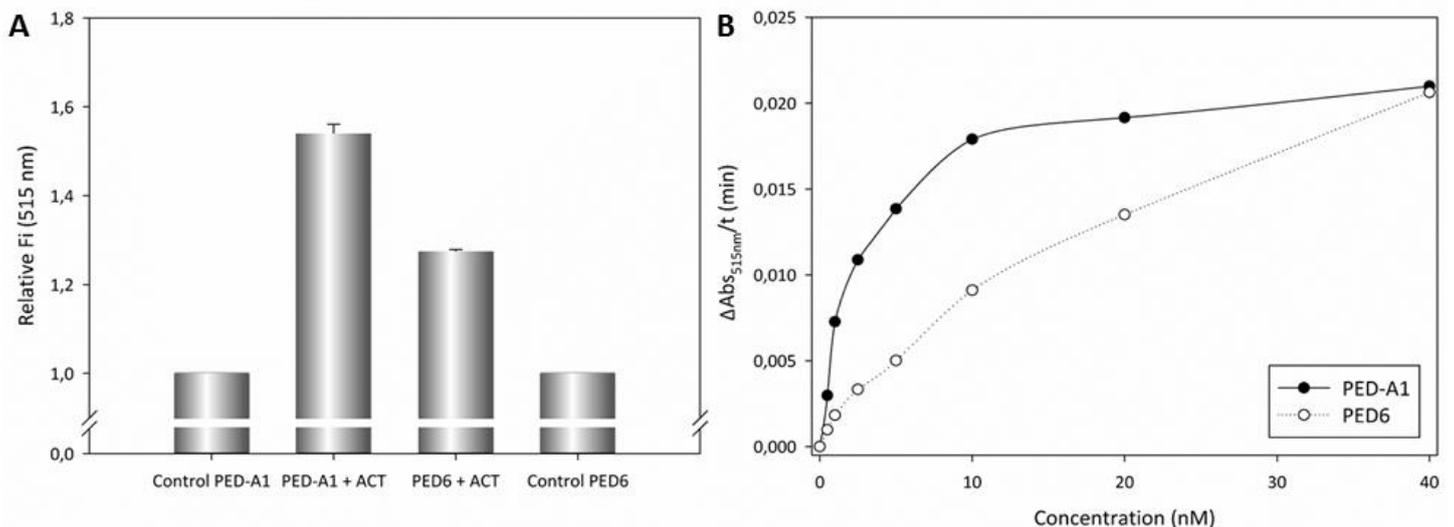
**Figura 3.4: Determinación de la actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> de la toxina adenilato ciclasa mediante el substrato fluorogénico PED-A1.** Se incubaron 10 µM de liposomas de DOPC:PED-A1 a una relación molar 8:2 con diferentes concentraciones de ACT a 37°C en constante agitación, excitando la muestra a 480 nm, recogiendo espectros de fluorescencia entre 490 y 650 nm cada minuto durante 30 minutos y relativizando los valores obtenidos a 515 nm (fluorescencia de emisión máxima) respecto al tiempo 0 (vesículas sin toxina). En esta gráfica se representa por una parte las cinéticas de fluorescencia relativa (A) de liposomas incubados con 40 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:250), 20 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:500), 10 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:1000), 5 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:2000), 2,5 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:4000), 1 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:10000) y 0,5 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:20000); y por otro los valores finales de fluorescencia relativa respecto al control tras 30 minutos de incubación (B).

En cuanto a una posible actividad fosfolipasa  $A_2$ , se prepararon liposomas de DOPC:PED6 a la misma concentración molar que en el caso del sustrato PED-A1 y se incubaron con el mismo rango de concentraciones de toxina a 37°C en agitación. Al igual que con la fosfolipasa  $A_1$  la hidrólisis del ácido graso de la segunda posición aumenta con el tiempo, aunque la mayor parte de la liberación se da en los primeros momentos tras la adición de la toxina (**Figura 3.5A**). Adicionalmente, el procesamiento del ácido graso es igualmente dependiente de la concentración de toxina añadida a las vesículas (**Figura 3.5B**). En el caso de la hidrólisis del sustrato PED6, como control positivo se añadió 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fosfolipasa  $A_2$  (*phospholipase A<sub>2</sub> from honey bee venom*, Sigma Aldrich, MO, EEUU), obteniendo valores relativos de fluorescencia a 515 nm respecto al control sin toxina de  $2,896 \pm 0,078$  (DE).



**Figura 3.5: Determinación de la actividad fosfolipasa  $A_2$  de la toxina adenilato ciclasa mediante el sustrato fluorogénico PED6.** Se incubaron 10  $\mu\text{M}$  de liposomas de DOPC:PED6 a una relación molar 8:2 con diferentes concentraciones de ACT a 37°C en constante agitación, excitando la muestra a 480 nm, recogiendo espectros de fluorescencia entre 490 y 650 nm cada minuto durante 30 minutos y relativizando los valores obtenidos a 515 nm (fluorescencia de emisión máxima) respecto al tiempo 0 (vesículas sin toxina). En esta gráfica se representa por una parte las cinéticas de fluorescencia relativa (A) de liposomas incubados con 40 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:250), 20 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:500), 10 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:1000), 5 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:2000), 2,5 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:4000), 1 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:10000) y 0,5 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:20000); y por otro los valores finales de fluorescencia relativa respecto al control tras 30 minutos de incubación (B).

Observando conjuntamente los datos de fluorescencia relativos tras 30 minutos de incubación se puede determinar que la toxina adenilato ciclasa posee actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, con mayor preferencia hacia la hidrólisis del ácido graso de la primera posición en comparación con el de la segunda posición (**Figura 3.6A**). Así mismo, al analizar los cambios de fluorescencia a 515 nm con el tiempo tras la adición de diferentes concentraciones de toxina, se pudo determinar que la hidrólisis del sustrato fluorogénico PED-A1 se satura a concentraciones menores de toxina en comparación con la del sustrato PED6, tal y como se observa en la **figura 3.6B**, obteniendo unos valores de EC<sub>50</sub> de 2,42 nM y 12,85 nM para las actividades fosfolipasa A<sub>1</sub> y fosfolipasa A<sub>2</sub> respectivamente, confirmando esa mayor preferencia por el ácido graso de la primera posición.

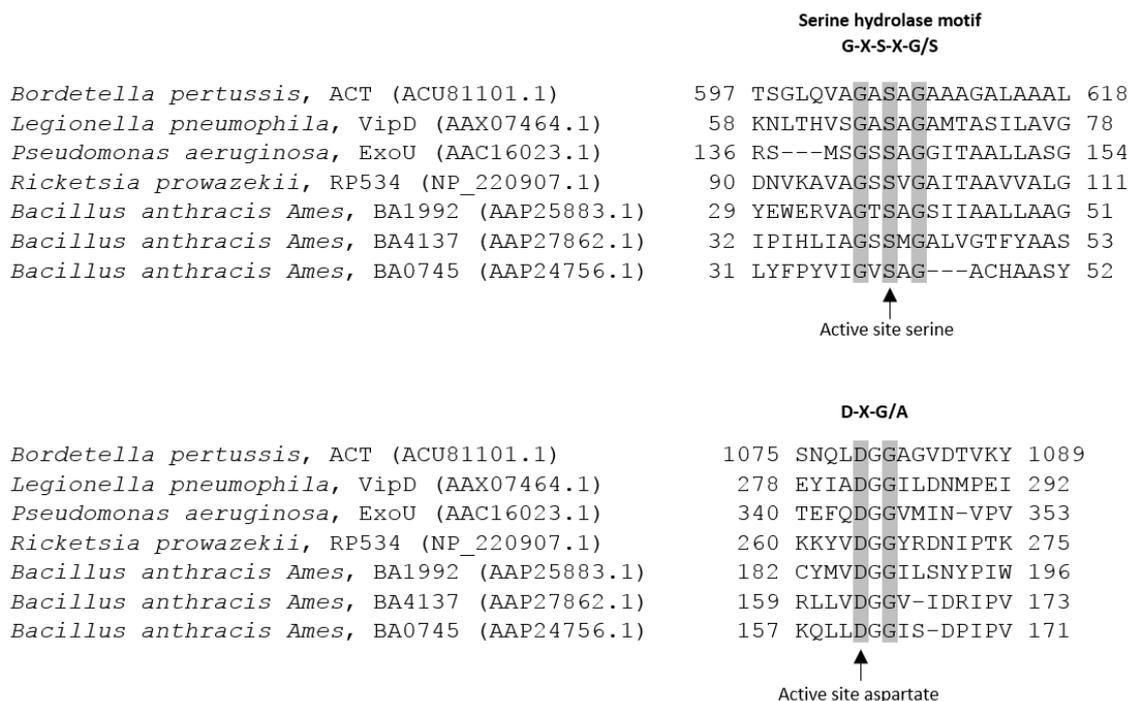


**Figura 3.6: Comparación de las actividades fosfolipasa A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> de la ACT.** En la imagen se pueden observar los valores de fluorescencia relativa tras 30 minutos de incubación de 10 nM de ACT con 10 μM de liposomas de DOPC con un 20% de concentración molar de sustrato fluorogénico (PED-A1 o PED6) A 37°C (A), así como el aumento de la fluorescencia con el tiempo, ΔAbs<sub>515nm</sub>/t (min) respecto a la concentración de toxina añadida (B).

### 3.2.2. La actividad fosfolipasa de la ACT es similar a las fosfolipasas tipo patatín

Para determinar de entre todos los tipos de fosfolipasas A con cual tiene mayor homología la actividad de la ACT se realizó una alineación de secuencia aminoacídica mediante el programa *Clustal Omega* con secuencias conocidas de diferentes

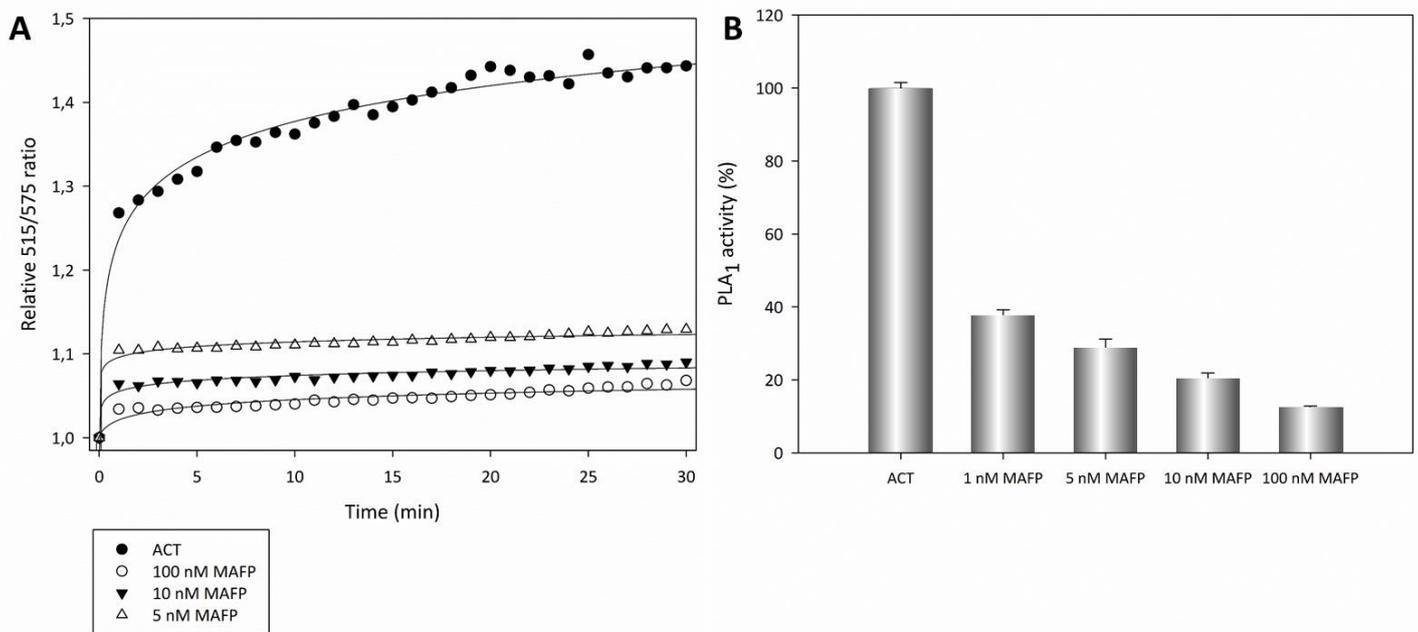
fosfolipasas A. Esta alineación dio como resultado una alineación altamente conservada con la diada catalítica serina/ácido aspártico de las fosfolipasas tipo patatín, consistente en un motivo hidrolasa G-X-S-X-G/S característico de las esterasas y un segundo motivo D-X-G/A (Rydel *et al*, 2003). La alineación de las secuencias indicaron que la serina 606 y el ácido aspártico de la posición 1079 de la toxina ACT están altamente conservados respecto a la diada catalítica presente en las fosfolipasas de este tipo (**Figura 3.7**).



**Figura 3.7: Alineación de la secuencia de aminoácidos de la toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* con otras secuencias de proteínas con actividad fosfolipasa de tipo patatín conocida.** Entre paréntesis se indica el número de acceso en la base de datos de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, MD, EEUU).

Para confirmar esta homología se utilizó la molécula MAFP, un inhibidor selectivo, irreversible y dirigido hacia el centro catalítico. Este inhibidor actúa sobre las fosfolipasas A<sub>2</sub> citosólicas (cPLA<sub>2</sub>) del grupo IV, así como de fosfolipasas A<sub>2</sub> independientes de calcio (iPLA<sub>2</sub>) y fosfolipasas A<sub>1</sub>, en forma de enzima acil intermediaria análoga al ácido araquidónico, uniéndose irreversiblemente a la serina catalítica (Lio *et al*, 1996). Así mismo este inhibidor ha sido utilizado en otras toxinas bacterianas para suprimir su actividad fosfolipasa A, como es el caso de la toxina ExoU de *Pseudomonas aeruginosa* (Benson *et al*, 2010).

Para determinar esa posible inhibición que se da en el resto de toxinas se incubaron 10  $\mu\text{M}$  de liposomas de DOPC con un 20% de concentración molar del substrato fluorogénico PED-A1 con 10 nM de ACT (relación proteína:lípido 1:1000) en presencia de distintas concentraciones del inhibidor MAFP. Al observar las cinéticas de fluorescencia relativa se observó una disminución de fluorescencia proporcional a la concentración de inhibidor presente en la mezcla (**Figura 8A**). Así mismo, tras 30 minutos de incubación se observaron inhibiciones del 60% de la actividad en relaciones toxina:inhibidor de 10:1, llegando a inhibiciones casi completas en condiciones saturantes del inhibidor respecto a la proteína (**Figura 3.8B**). Estos datos confirmarían que la responsable de la actividad fosfolipasa de la toxina adenilato ciclasa es una serina catalítica presente en la secuencia aminoacídica de la ACT.

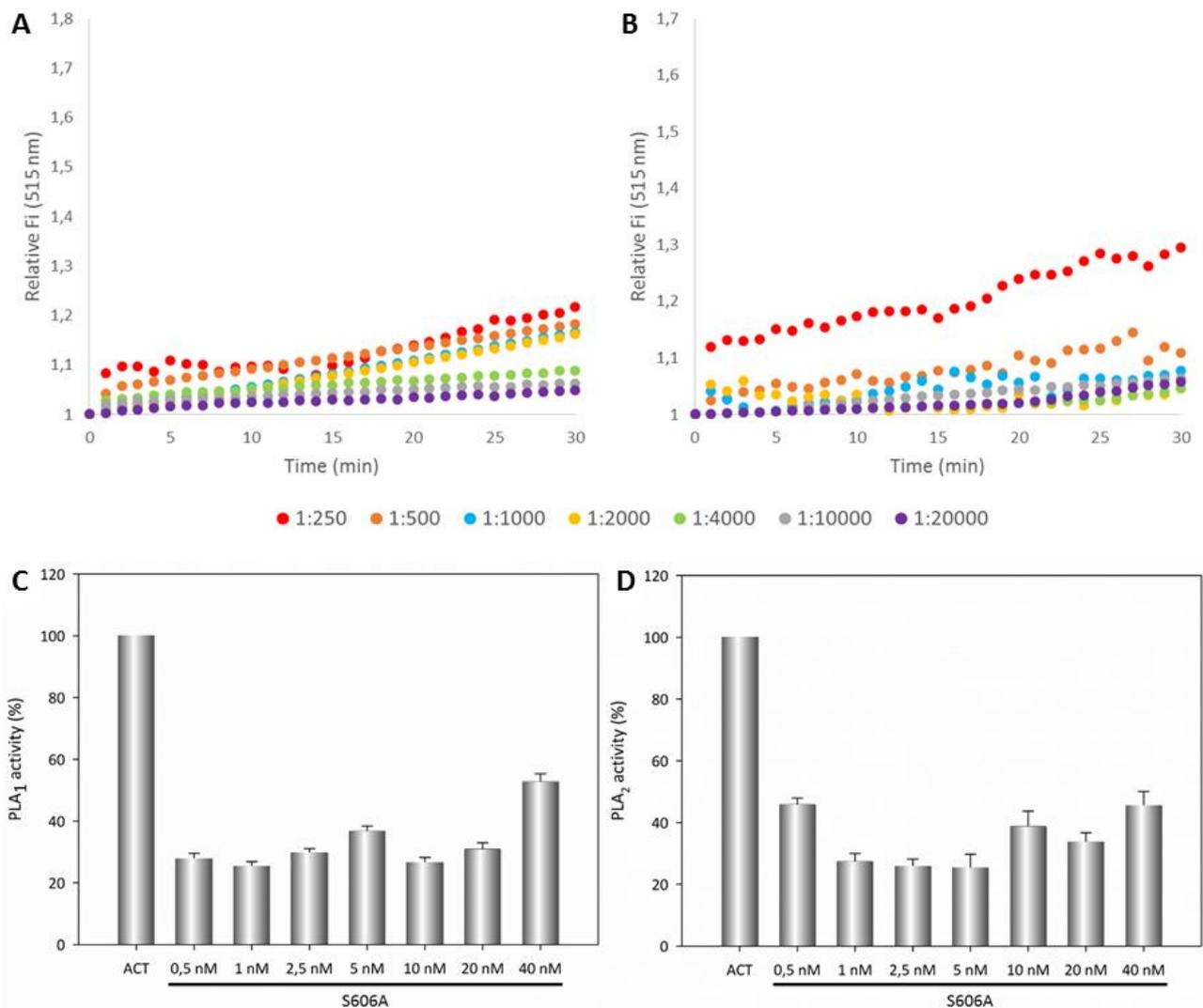


**Figura 3.8: Inhibición de la actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> de la ACT en presencia del inhibidor MAFP.** Se ha determinado el efecto de diferentes concentraciones del inhibidor sobre la actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> de 10 nM de ACT al incubarlos con 10  $\mu\text{M}$  de liposomas de DOPC:PED-A1 a una relación molar 8:2. Los datos se representaron en fluorescencia relativa registrada a 515 nm respecto al control en función del tiempo (A) o porcentaje de actividad a los 30 minutos de incubación respecto a la actividad registrada por la ACT sin inhibidor (B).

Una vez realizada la alineación de secuencias y tras la identificación mediante la inhibición química por MAFP de una serina como responsable de la actividad fosfolipasa A de la ACT se procedió a la mutagenesis de los aminoácidos indentificados como

responsables de la actividad fosfolipasa para determinar si en realidad son los que catalizan la hidrólisis de los ácidos grasos. Para ello se sustituyeron tanto la serina de la posición 606 como el ácido aspártico de la posición 1079 por una alanina, dando como resultado el mutante S606A y el mutante D1079A.

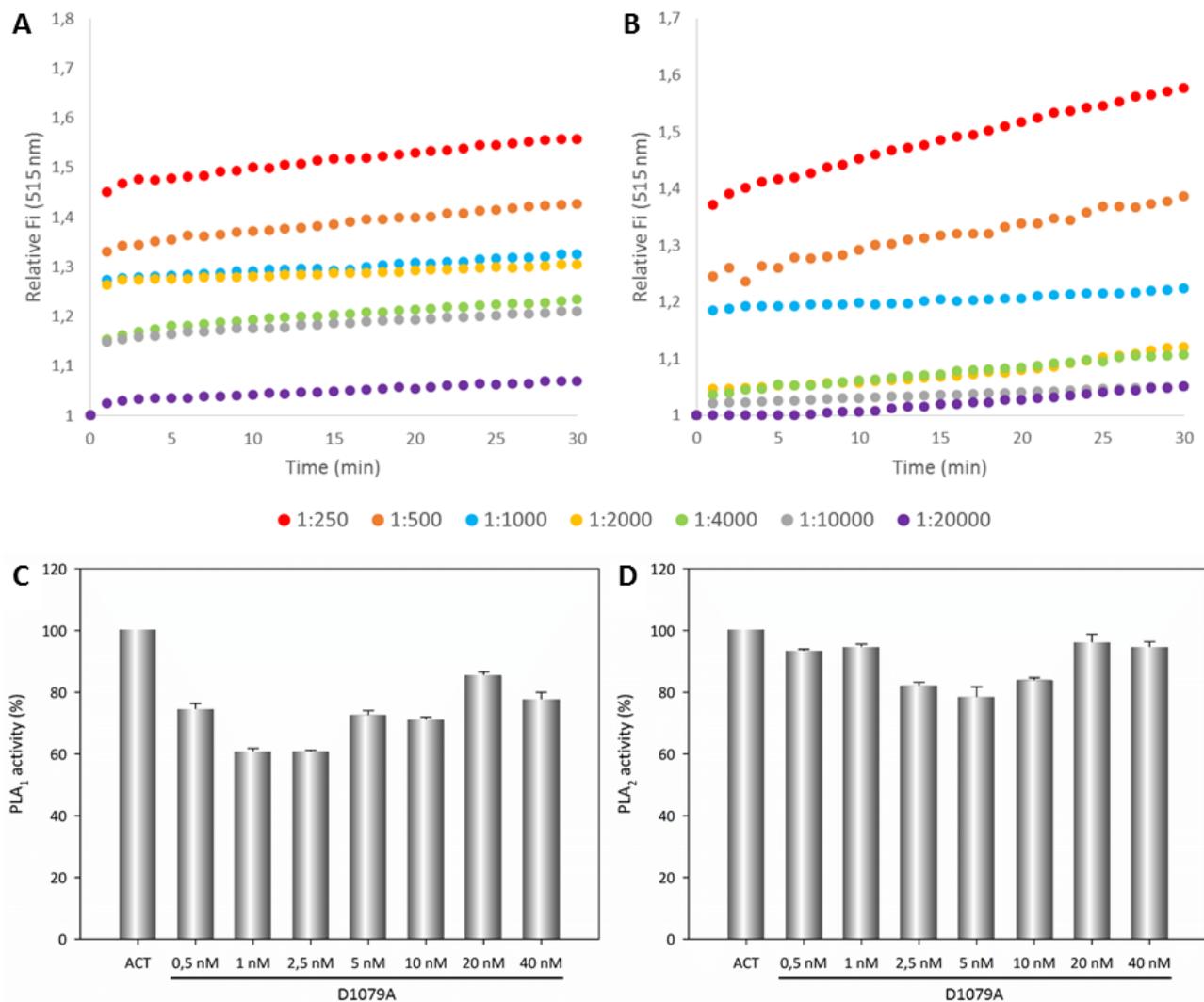
Primero se caracterizó la actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> del mutante S606A *in vitro* utilizando para ello los liposomas de DOPC con un 20% de substrato fluorogénico PED-A1 o PED6, incubando estas vesículas con diferentes concentraciones del mutante S606A a 37°C y registrando el aumento de fluorescencia a 515 nm. El aumento de la señal registrada a 515 nm se ve inhibido casi completamente en el caso del mutante S606A, tanto para la actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> (**Figura 3.9A**) como para la A<sub>2</sub> (**Figura 3.9B**). Comparando estos datos con los valores obtenidos para la toxina salvaje se puede concluir que la mutación de la serina de la posición 606 de la toxina adenilato ciclasa produce un mutante que no es capaz de hidrolizar los ácidos grasos ni de la primera ni de la segunda posición de una forma eficiente, obteniendo inhibiciones entre un 60 y un 80% tanto para la actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> (**Figura 3.9C**) como A<sub>2</sub> (**Figura 3.9D**).



**Figura 3.9: Determinación de la actividad fosfolipasa A del mutante S606A.** Se incubaron 10  $\mu$ M de liposomas de DOPC a una concentración molar de PED-A1 o PED6 a una relación molar 8:2 con diferentes concentraciones de S606A a 37°C en constante agitación, excitando la muestra a 480 nm, recogiendo espectros de fluorescencia entre 490 y 650 nm cada minuto durante 30 minutos y relativizando los valores obtenidos a 515 nm (fluorescencia de emisión máxima) respecto al tiempo 0 (vesículas sin toxina). En esta gráfica se representan las cinéticas de fluorescencia relativa de liposomas incubados con 40 nM de S606A (relación proteína:lipido 1:250), 20 nM de S606A (relación proteína:lipido 1:500), 10 nM de S606A (relación proteína:lipido 1:1000), 5 nM de S606A (relación proteína:lipido 1:2000), 2,5 nM de S606A (relación proteína:lipido 1:4000), 1 nM de S606A (relación proteína:lipido 1:10000) y 0,5 nM de S606A (relación proteína:lipido 1:20000) para el substrato PED-A1 (A) y PED6 (B), así como los porcentajes de actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> (C) y A<sub>2</sub> (D) respecto a los obtenidos por la toxina salvaje.

En cuanto a la actividad fosfolipasa mostrada por el mutante D1079A, en cambio, no se observaron reducciones en la hidrólisis de los substratos fluorogénicos PED-A1 (**Figura 3.10A**) ni PED6 (**Figura 3.10B**), manteniendo casi intacta la capacidad de hidrólisis de

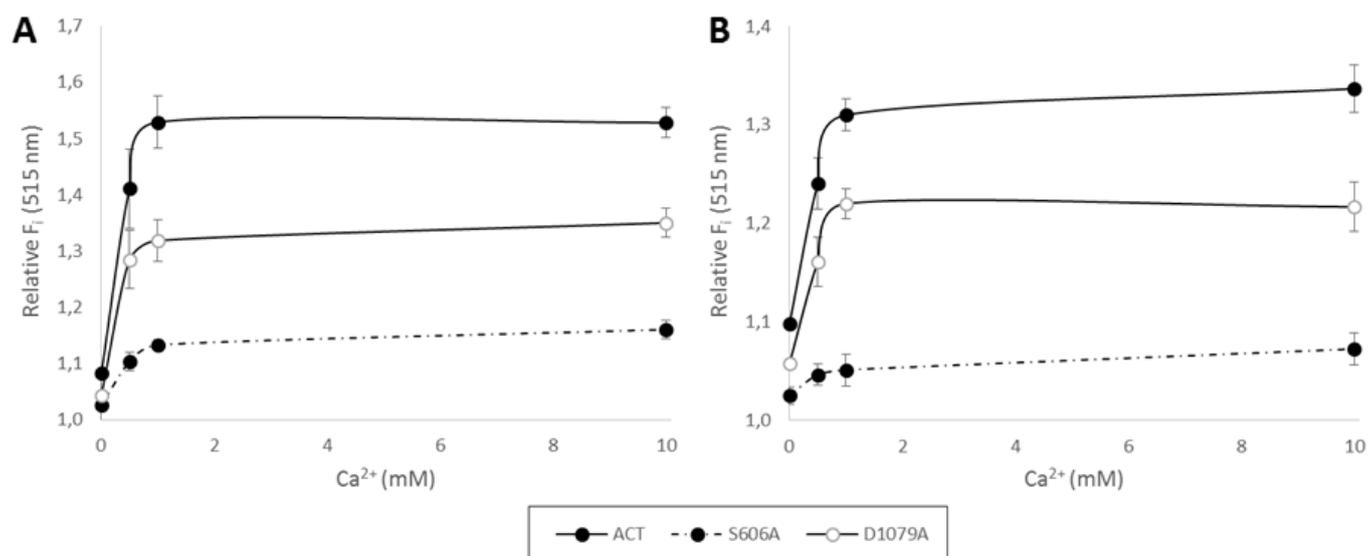
ambos ácidos grasos. Así mismo, la mayor parte del aumento en la señal de fluorescencia se da en el primer minuto tras la adición de la proteína, por lo que tampoco se observaron cambios drásticos en las cinéticas de corte respecto a las de la toxina salvaje. En consecuencia, la mutagénesis del ácido aspártico de la posición 1079 provoca inhibiciones de alrededor del 30%, siendo la máxima inhibición en torno al 40%, en el caso de la hidrólisis del primer ácido graso en todo el rango de concentraciones estudiado (**Figura 3.10C**); mientras que en el caso de la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> ésta se mantiene casi intacta en torno al 80-90% de actividad en comparación con la ACT (**Figura 3.10D**).



**Figura 3.10: Determinación de la actividad fosfolipasa A del mutante D1079A.** Se incubaron 10  $\mu$ M de liposomas de DOPC una concentración molar de PED-A1 o PED6 a una relación molar 8:2 con diferentes concentraciones de D1079A a 37°C en constante agitación, excitando la muestra a 480 nm, recogiendo espectros de fluorescencia entre 490 y 650 nm cada minuto durante 30 minutos y relativizando los valores obtenidos a 515 nm (fluorescencia de emisión máxima) respecto al tiempo 0 (vesículas sin toxina). En esta gráfica se representan las cinéticas de fluorescencia relativa de liposomas incubados con 40 nM de D1079A (relación proteína:lípido 1:250), 20 nM de D1079A (relación proteína:lípido 1:500), 10 nM de D1079A (relación proteína:lípido 1:1000), 5 nM de D1079A (relación proteína:lípido 1:2000), 2,5 nM de D1079A (relación proteína:lípido 1:4000), 1 nM de D1079A (relación proteína:lípido 1:10000) y 0,5 nM de D1079A (relación proteína:lípido 1:20000) para el sustrato PED-A1 (A) y PED6 (B), así como los porcentajes de actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> (C) y A<sub>2</sub> (D) respecto a los obtenidos por la toxina salvaje.

Por último se analizó el efecto del calcio en la actividad fosfolipasa de la toxina. En la **figura 3.11** se puede observar que, observando los valores de fluorescencia relativa tras

30 minutos de incubación, a concentraciones de calcio mayores a 1 mM la actividad ocurre al máximo tanto para la toxina salvaje como para el mutante D1079A, actividad que se encuentra ligeramente reducida para ambas proteínas a 0,5 mM de CaCl<sub>2</sub>. Por otra parte, la falta de calcio anula completamente la capacidad hidrolítica de ambos ácidos grasos. En el caso del mutante de la serina de la posición 606 en todo el rango de concentraciones de calcio las actividades fosfolipasa A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> se encuentran inhibidas.

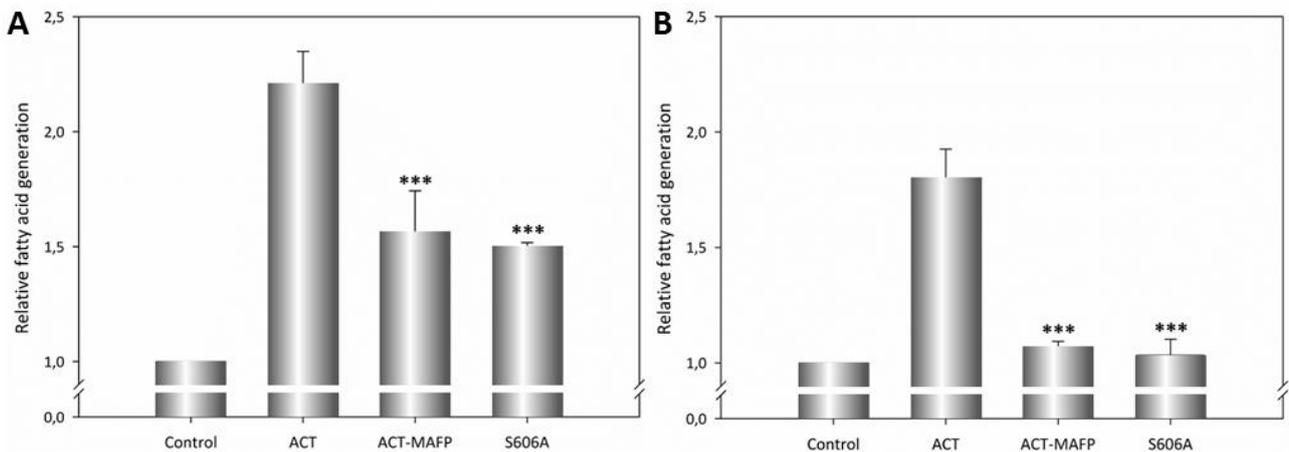


**Figura 3.11: Efecto del calcio en la actividad fosfolipasa A de la ACT.** Se incubaron 10  $\mu$ M de liposomas de DOPC con un 20% de concentración molar de los lípidos fluorogénicos PED-A1 (A) o PED6 (B) en tampón con diferentes concentraciones de calcio (0 mM, 0,5 mM, 1 mM y 10 mM CaCl<sub>2</sub>) y 10 nM de ACT o los mutantes S606A y D1079A (relación proteína:lípido 1:1000). En la gráfica se representan los valores de fluorescencia relativa a 515 nm respecto al control (vesículas sin toxina) tras 30 minutos de incubación en constante agitación a 37°C.

### 3.2.3. Caracterización de la actividad fosfolipasa de la ACT *in vivo*

A continuación se verificó si la actividad fosfolipasa de la ACT descrita *in vitro* se observa también *in vivo* mediante la cuantificación de la generación de ácidos grasos libres en macrófagos J774A.1 marcados con ácido araquidónico tritiado tras una incubación de 10 minutos a 37°C con la toxina. Se observó que las células tratadas con la toxina presentaban entre 2 y 2,5 veces más cantidad de ácidos grasos que las células control que no habían sido tratadas con la toxina. Por otra parte, tanto la toxina preincubada con el inhibidor MAFP como el mutante inactivo S606A presentaron una reducción importante en la generación de ácidos grasos, con valores relativos alrededor de 1,5

(Figura 3.12A). Dado que este aumento de la generación del lípido puede deberse a la activación de fosfolipasas A intracelulares por parte de la entrada de calcio producida por la ACT (Fiser *et al*, 2007; Martín *et al*, 2010) se analizó la posible generación de ácidos grasos en células preincubadas con una mezcla del inhibidor irreversible de fosfolipasas A<sub>2</sub> citosólicas, fosfolipasas A<sub>2</sub> independientes de calcio y fosfolipasas A<sub>1</sub> MAFP y del inhibidor de fosfolipasas A<sub>2</sub> secretoras LY311727. En estas condiciones que observó un aumento sobre 1,7 veces de la presencia de ácidos grasos libres respecto a las células sin toxina, aumento que dada la inhibición de las fosfolipasas intracelulares solo puede atribuirse a una generación por parte de la ACT, mientras que en las células incubadas con la toxina tratada con MAFP o el mutante no se observó ninguna generación de ácidos grasos, obteniendo valores similares a los de las células sin tratar (Figura 3.12B).



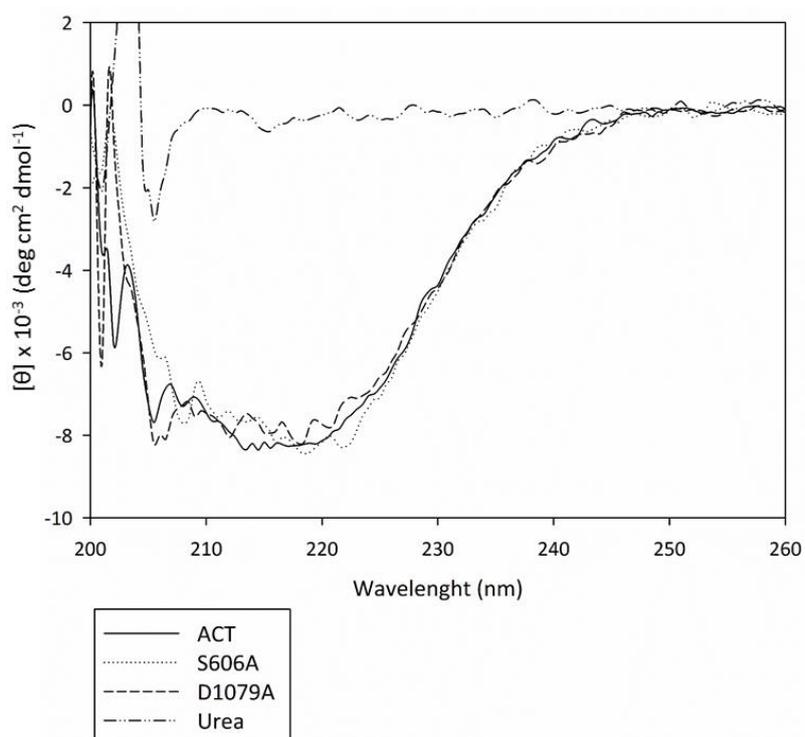
**Figura 3.12: Generación de ácidos grasos *in vivo* en macrófagos J774A.1.** Se incubaron macrófagos marcados radioactivamente con ácido araquidónico tritiado con 20 nM de ACT, ACT preincubada con el inhibidor MAFP (ACT-MAFP) o el mutante S606A durante 10 minutos a 37°C, tras lo cual se extrajeron los lípidos, se separaron los lípidos por TLC, se rascó la banda correspondiente a los ácidos grasos y se llevó la muestra al contador de centelleo. En la gráfica se presentan la cantidad de ácidos grasos presentes en cada muestra relativizados respecto al control (células sin toxina) en células sin tratar (A) o tratadas previamente (B) durante 30 minutos con 25 µM de MAFP y 25 µM de LY311727 a 37°C.

Con estos datos junto con los obtenidos en membranas modelo se puede establecer que la toxina adenilato ciclasa posee una actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> tanto *in vitro* como *in vivo*, donde el residuo responsable de esta actividad es la serina de la posición 606, la cual se puede inhibir tanto químicamente como por mutaciones puntuales.

### 3.2.4. Estudio de las implicaciones de la actividad fosfolipasa en la capacidad citotóxica de la toxina adenilato ciclasa

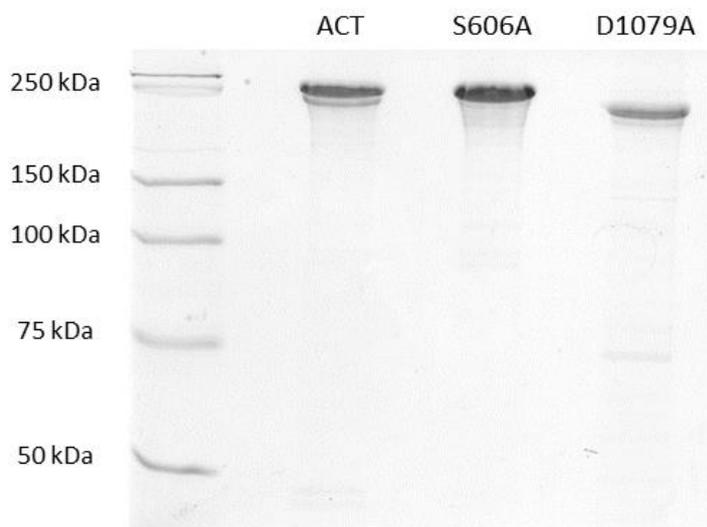
Antes de comenzar con los estudios se realizaron dos comprobaciones previas: la primera de ellas sería analizar los posibles cambios en la estructura secundaria de la proteína, mientras que la segunda consistiría en comprobar si tras la purificación de las toxinas existen contaminantes que puedan ser las causantes de la actividad fosfolipasa (como por ejemplo las fosfolipasas intracelulares presentes en las bacterias *E. coli* desde las que se purifica tanto la toxina como ambos mutantes).

Para comprobar si las sustituciones de la serina de la posición 606 y el ácido aspártico de la posición 1079 por alanina altera la estructura secundaria de la toxina se comparó el espectro de dicroísmo circular de la ACT con los obtenidos de los mutantes S606A y D1079A en solución. En la **figura 3.13** se puede observar que la mutagénesis de esos aminoácidos no altera la estructura de la toxina. Así mismo, la urea en que se encuentra la toxina purificada no contribuye a la absorbancia registrada.



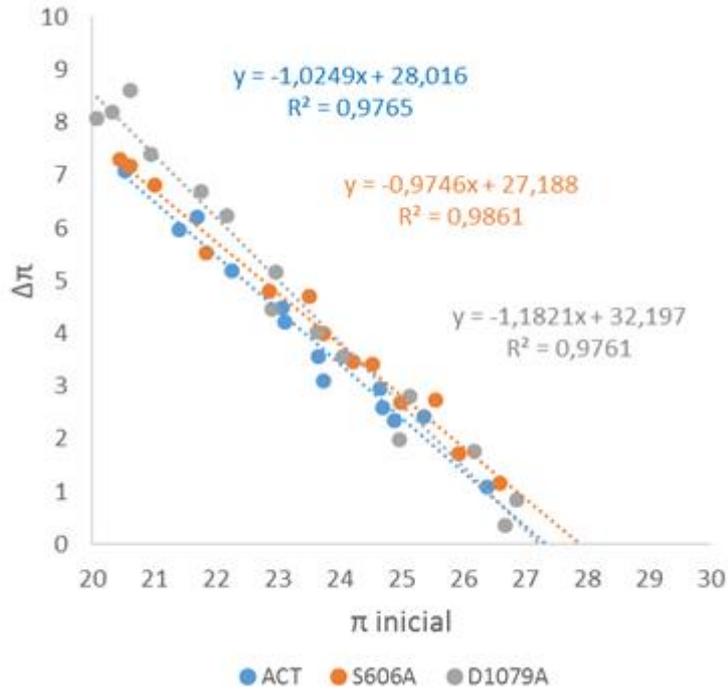
**Figura 3.13: Análisis de la estructura secundaria de la ACT, los mutantes S606A y D1079A y la urea mediante dicroísmo circular.** En la figura se representan los espectros de las tres toxinas y la urea en tampón de hemólisis tras una incubación de 1  $\mu\text{M}$  de cada proteína durante 10 minutos a 4°C.

En cuanto al análisis de los posibles contaminantes que se hayan podido mantener a lo largo de la purificación, se realizó un gel SDS-PAGE cargando la proteína purificada para determinar su pureza. Tras la tinción de *Coomassie* se pudo observar que tanto la ACT como los mutantes S606A y D1079A tienen una alta pureza, sin apenas contaminantes. Por otra parte, el mutante de la serina parece presentar un tamaño aparente muy parecido al de la toxina salvaje ACT, mientras que en el mutante del ácido aspártico se observó una pequeña reducción de su masa molecular respecto a la de las otras dos proteínas (**Figura 3.14**).



**Figura 3.14:** Gel SDS-PAGE al 8,5% de acrilamida de la ACT y los mutantes S606A y D1079A.

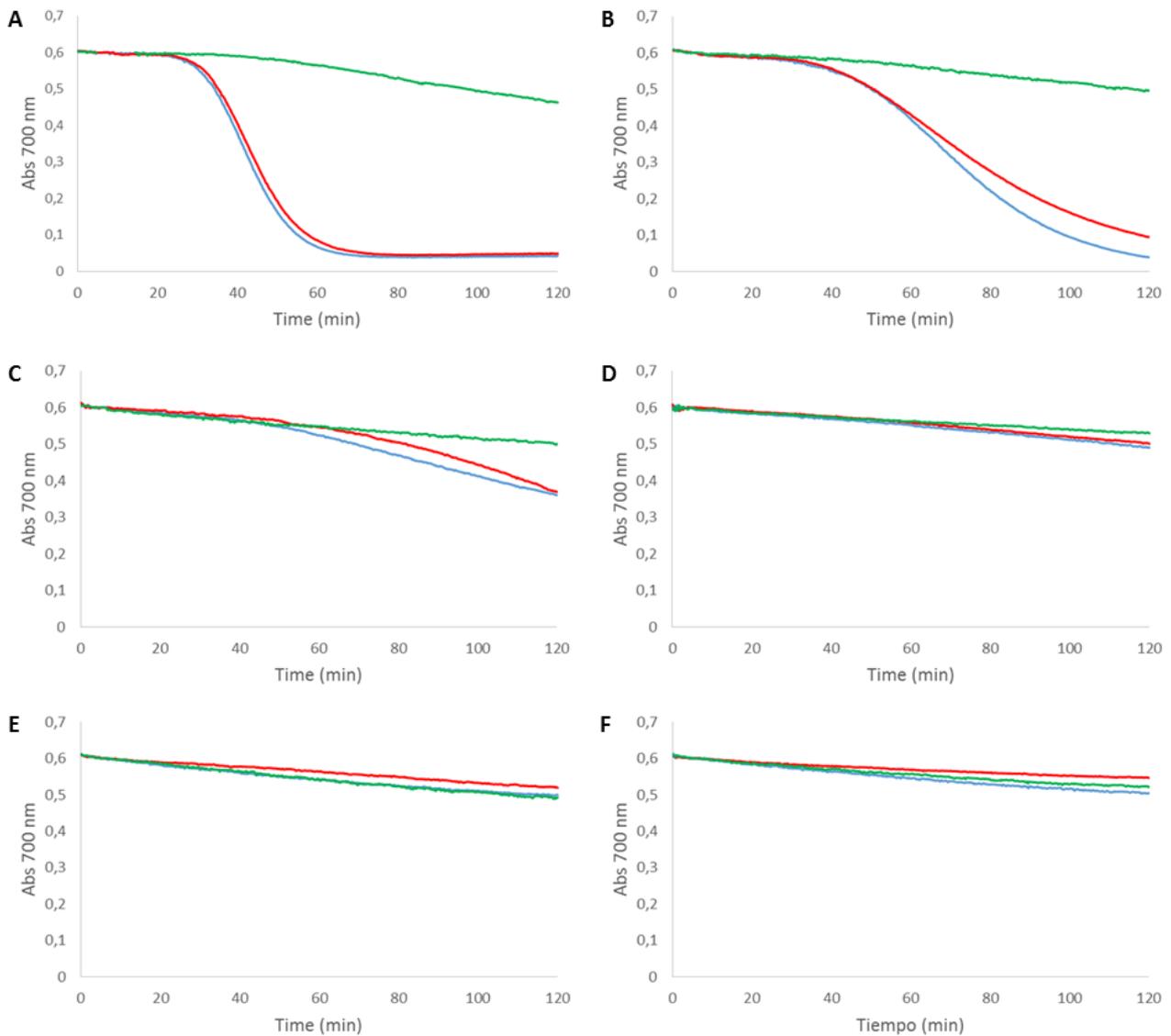
Terminadas las comprobaciones se procedió al análisis de los posibles cambios en la actividad de la toxina debido a las mutaciones de la serina de la posición 606 y el ácido aspártico de la posición 1079. Primero se analizó si existen diferencias en la inserción de los mutantes S606A y D1079A en monocapas de DOPC en comparación con la toxina salvaje. Se observó que la presión lateral crítica del mutante de la serina ( $\pi$  lateral crítica=27,897) y el ácido aspártico ( $\pi$  lateral crítica=27,237) no mostraban diferencias significativas respecto a la registrada por la ACT ( $\pi$  lateral crítica=27,335), indicando una interacción con membranas lipídicas muy parecidas (**Figura 3.15**).



**Figura 3.15: Isothermas  $\Delta\pi$ - $\pi_{\text{inicial}}$  de la ACT y los mutantes S606A y D1079A para monocapas de DOPC.** En la figura se representa los cambios en la presión lateral ( $\Delta\pi$ ) respecto a diferentes presiones iniciales ( $\pi_{\text{inicial}}$ ) tras la adición de 250 nM de ACT o los mutantes S606A y D1079A a monocapas de DOPC preparadas en tampón de hemólisis a 37°C.

Una vez hechas esas dos comprobaciones se procedió al estudio de los posibles efectos causados por la sustitución de la serina y el ácido aspártico en la actividad de la toxina. Primero se procedió al análisis de la actividad hemolítica de los mutantes S606A y D1079A para comprobar si existen cambios respecto a la observada en la toxina salvaje. Para ello se analizó la turbidez de una suspensión de eritrocitos mediante el registro de la absorbancia a 700 nm: en caso de existir actividad hemolítica por parte de la toxina o sus mutantes los eritrocitos se romperían disminuyendo la turbidez de la mezcla. En la **figura 3.16** se puede observar que el mutante D1079A presenta una actividad hemolítica casi completamente inhibida respecto a la toxina salvaje en todo el rango de concentraciones estudiado. En el caso del mutante de la serina 606 se pudo determinar que a altas concentraciones presenta cinéticas de hemólisis comparables a las de la ACT, mientras que en el otro extremo presenta cierta inhibición de la hemólisis a bajas concentraciones. En el rango intermedio, en cambio, tras dos horas de cinética la absorbancia registrada en la suspensión con el mutante S606A es parecida a la

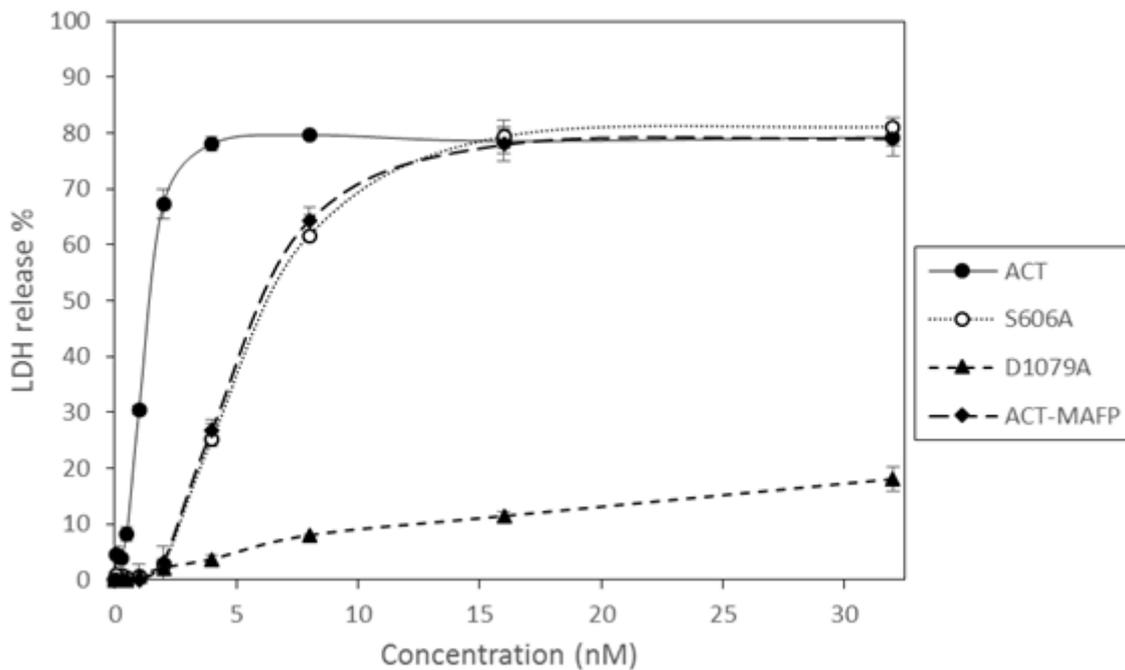
registrada por la ACT, pero el perfil de la cinética se ve alterado, siendo ésta algo más lenta en comparación con registrada por la toxina salvaje.



**Figura 3.16: Cinéticas de hemólisis en eritrocitos de carnero.** Se añadieron eritrocitos de carnero hasta obtener una absorbancia de 0,6 a 700 nm en tampón de hemólisis. La toxina se añadió a los 5 minutos de comenzar la medida, manteniendo la mezcla en agitación a una temperatura de 37°C constantes. En la figura se representan las siguientes condiciones: (A) 250 nM de toxina, (B) 100 nM de toxina, (C) 50 nM de toxina, (D) 25 nM de toxina, (E) 10 nM de toxina y (F) 5 nM de toxina. En azul se representa la ACT, en rojo el mutante S606A y en verde el mutante D1079A.

Posteriormente se estudió si las sustituciones por alanina de ambos aminoácidos responsables de la actividad fosfolipasa alteran la capacidad citotóxica de la toxina. Para ello se incubaron macrófagos J774A.1 con diluciones seriadas de la ACT y cada uno de

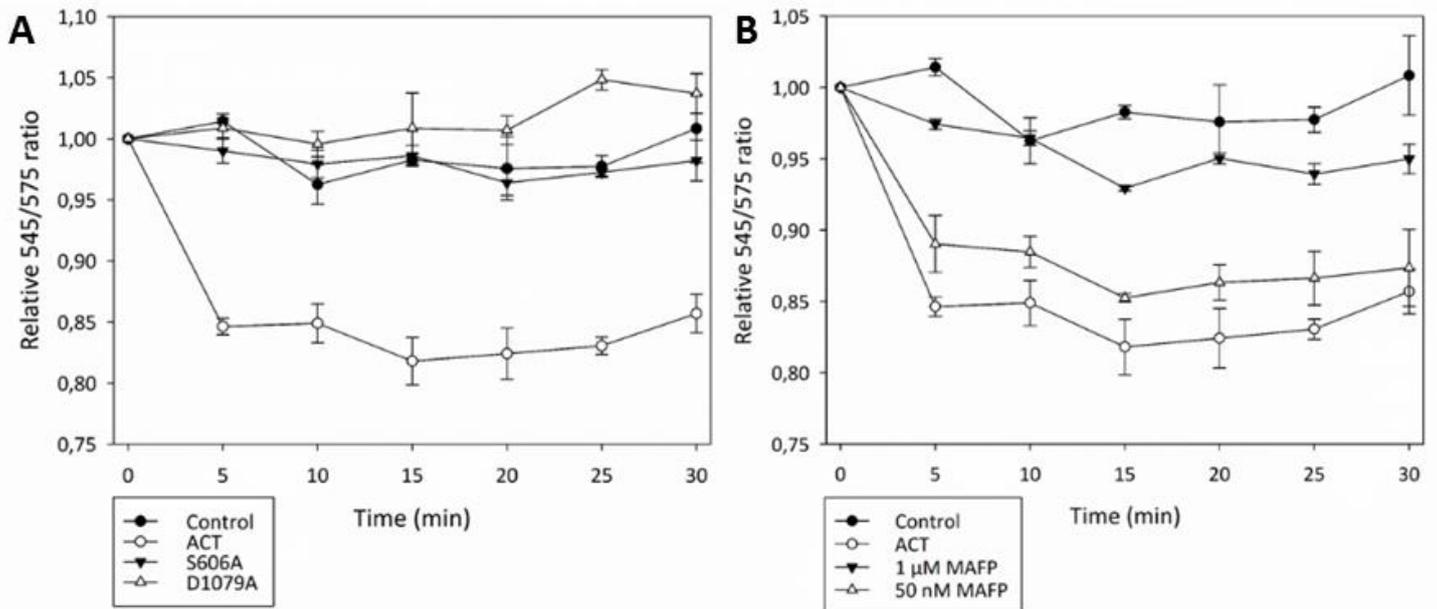
los mutantes y se midió la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). Tras dos horas de incubación se pudo observar que al igual que con la actividad hemolítica en eritrocitos, la capacidad citotóxica del mutante D1079A se encontraba completamente inhibida en todo el rango de concentraciones. En el caso del mutante S606A, por otra parte, a altas concentraciones de toxina (por encima de aproximadamente 15 nM) los valores de liberación de LDH son iguales a los producidos por la toxina sin mutar. En cambio, a medida que baja la concentración de toxina la mutagénesis de la serina de la posición 606 produce cada vez una mayor inhibición de la citotoxicidad producida por la toxina. Por último, se observó que la toxina inhibida químicamente con el inhibidor de fosfolipasas MAFP presenta un perfil citotóxico parecido al registrado por el mutante S606A (Figura 3.17). Por tanto, estos datos de citotoxicidad junto con los de la actividad hemolítica indican que a bajas concentraciones la toxina necesita de la actividad fosfolipasa para producir sus efectos citotóxicos.



**Figura 3.17:** Ensayo de citotoxicidad de la ACT, la toxina salvaje preincubada con el inhibidor MAFP y los mutantes S606A y D1079A en macrófagos J774A.1. Se incubaron las células J774A.1 con diluciones seriadas 1:2 de toxina durante 2 horas a 37°C. Los valores de citotoxicidad se expresaron como porcentaje de LDH liberado al medio extracelular.

Como se ha mencionado anteriormente nuestro laboratorio ha descrito previamente que la ACT produce el movimiento transmembrana de los lípidos (o *flip flop*) entre las

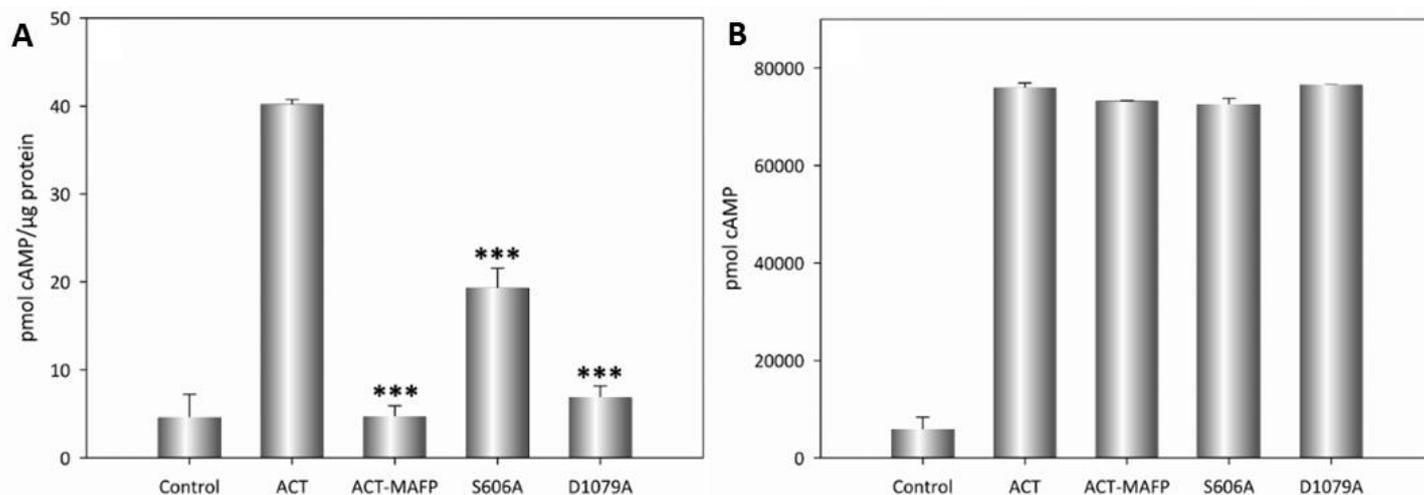
dos membranas de la bicapa lipídica. Así mismo, se ha descrito en la literatura que las actividades enzimáticas pueden producir este movimiento. Por tanto, dado que se obtuvo un mutante de la toxina adenilato ciclasa carente de actividad fosfolipasa se estudió su efecto en el *flip flop* para averiguar si ésta es la causante. Para ello se prepararon liposomas de DOPC marcados con la sonda fluorescente NBD unida a una fosfatidiletanolamina en la capa interna, los cuales se incubaron con la toxina. En caso de ocurrir un movimiento transmembrana parte de ese lípido marcado pasaría a la capa externa que, al reaccionar con la rodamina que se encuentra conjugada a un anticuerpo que se añade a la mezcla, daría lugar a un proceso de FRET disminuyendo la emisión de fluorescencia del NBD a 545 nm y aumentando la de la rodamina a 575 nm. En la **figura 3.18A** se puede observar como en presencia de ACT el ratio 545/575 disminuye con el tiempo respecto al control, indicando que la ACT está produciendo un movimiento transmembrana de los lípidos. En cambio, al incubarse con los mutantes S606A y D1079A se puede observar como no existe ese proceso de *flip flop*, obteniendo ratios parecidos a los del control sin toxina en todo el rango temporal analizado. Por tanto, se puede concluir que el movimiento transmembrana de la toxina está producida por su actividad fosfolipasa. Para confirmar esta inhibición se incubaron los liposomas marcados con NBD con ACT en presencia del inhibidor MAFP. En la **figura 3.18B** se aprecia que el *flip flop* producido por la toxina salvaje sufre una mayor inhibición cuanto mayor concentración del inhibidor se añade a la mezcla.



**Figura 3.18: Movimiento transmembrana (*flip flop*) de lípidos por parte de la toxina.** En la figura se representa los cambios de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo NBD como ratio de las de las intensidades a 545/575 nm. Se incubaron 100  $\mu$ M de liposomas de DOPC con un 0,6% de concentración molar de NBD-PE con 100 nM (relación proteína:lípido 1:1000) de ACT o de los mutantes S606A y D1079A en tampón de hemólisis durante 30 minutos a 37°C (A) o con 100 nM de ACT en presencia del inhibidor MAFP a diferentes concentraciones (B).

Por último, se cuantificó la generación de AMP cíclico (cAMP) producido por la toxina salvaje, la toxina preincubada con el inhibidor MAFP y los mutantes de la serina 606 y el ácido aspártico 1079 en macrófagos J774A.1 para comprobar si la actividad fosfolipasa de la toxina está involucrada en la translocación del dominio catalítico. En la **figura 3.19A** se puede observar que la incubación de las células con la toxina inhibida químicamente y ambos mutantes presentan una significativa reducción del cAMP producido por el dominio catalítico respecto a la ACT, indicando una probable implicación de la actividad fosfolipasa en la translocación del dominio AC. Para excluir que la incubación con el inhibidor o que las mutaciones de la serina o del ácido aspártico afectan al dominio catalítico de la toxina y eso se traduzca en la ausencia de producción de cAMP intracelular se realizó un ensayo de generación de las toxinas en solución en presencia de 5 mM de ATP. Tras una incubación de 10 minutos se observó que los valores de cAMP presentados tanto por la toxina preincubada como por los mutantes S606A y D1079A son similares a los obtenidos por la toxina salvaje (**Figura 3.19B**), por lo que se puede

deducir que ninguna de las alteraciones químicas o mutagénicas afectan al dominio AC de la toxina.



**Figura 3.19: Generación de cAMP en macrófagos J774A.1 y en solución.** Representación de los valores de cAMP obtenidos tras la incubación de células J774A.1 con 20 nM de ACT, ACT preincubada con MAFP o los mutantes S606A y D1079A durante 30 minutos a 37°C (A) o en solución tras 10 minutos de incubación de 1 nM con 5 mM ATP a 37°C en constante agitación (B).

Resumiendo los datos obtenidos por los mutantes S606A y D1079A se puede determinar que el mutante de la serina 606 de la secuencia aminoacídica de la toxina carece tanto de la actividad fosfolipasa A<sub>1</sub> como de la A<sub>2</sub>, lo cual afecta tanto a su capacidad de mover lípidos entre las dos bicapas lipídicas que conforman las membranas (*flip flop*) así como a su capacidad citotóxica a concentraciones menores de 2 nM, seguramente debido a su menor capacidad de generar cAMP en macrófagos J774A.1. El resto de parámetros (inserción en membranas, capacidad hemolítica, generación de cAMP en solución y citotoxicidad a concentraciones mayores a 2 nM) se mantienen intactas o casi inalteradas. Por otra parte, la mutación del ácido aspártico de la posición 1079 por alanina abroga la hemólisis, la citotoxicidad, el movimiento transmembrana de lípidos y la generación de cAMP en células, manteniendo casi intactas ambas actividades fosfolipasa así como su inserción en membranas y la generación de cAMP en solución (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1: Comparación de la citotoxicidad de la ACT y los mutantes S606A y D1079A.** En la tabla se resumen las diferentes actividades citotóxicas de las tres toxinas. Los símbolos +, ++, +++ y ++++ corresponden los valores 0-25%, 25-50%, 50-75% y 75-100% respectivamente relativos al efecto observado en la toxina salvaje, siendo ésta en todos los parámetros el 100%.

	PLA <sub>1</sub> activity	PLA <sub>2</sub> activity	Membrane insertion	Flip flop	Hemolysis	Cytotoxicity	cAMP in solution	cAMP in cells
ACT	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
S606A	+	+	++++	+	++++	0-2 nM + ≥2 nM ++/++++	++++	++
D1079A	+++	++++	++++	+	+	+	++++	+

### 3.3. DISCUSIÓN

En esta tesis se ha descrito por primera vez que la toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* posee una actividad lipasa intrínseca, siendo ésta una actividad fosfolipasa A, la cual es capaz de hidrolizar tanto el ácido graso de la primera posición como el de la segunda. Esta actividad se ha caracterizado tanto en procesos *in vitro*, mediante el análisis en membranas modelo (cromatografía en capa fina, ensayo acoplado con la enzima lipoxigenasa, espectrometría de masas y sustratos fluorogénicos), como *in vivo* en macrófagos J774A1 (ensayo de radioactividad). En este trabajo se ha determinado que esta actividad novel está directamente relacionada con el mecanismo de translocación del dominio catalítico, proceso de gran importancia en los efectos citotóxicos producidos por la toxina.

Aun así no es la primera vez que se descubre que una toxina bacteriana posee esta actividad enzimática capaz de hidrolizar los ácidos grasos de los fosfolípidos, dado que son procesos que se han estudiado en otras proteínas bacterianas, como son los casos de la toxina ExoU de *Pseudomonas aeruginosa* y la toxina VipD de *Legionella pneumophila*.

En el caso de la toxina ExoU de *Pseudomonas aeruginosa* se trata de una citotoxina de tipo III de aproximadamente 74 kDa con una actividad fosfolipasa A conferida por la diada catalítica S142/D344 cuya actividad permeabiliza las células, provocando su muerte celular mediante un choque séptico (Sato *et al*, 2003). Esta toxina es liberada por la bacteria mediante un sistema de secreción tipo III junto con otras tres toxinas,

cada una con actividades enzimáticas bien definidas: ExoS, ExoT (ambas enzimas bifuncionales con actividades ADP-ribosiltransferasa que codifican proteínas activadoras de GTPasas) y ExoY (una adenilato ciclasa). A pesar de que cada una de ellas presenta una importancia relativa diferente, todas contribuyen en diferente grado en la patogénesis general producida por la bacteria (Shaver *et al*, 2004).

Por otra parte, la toxina VipD de *Legionella pneumophila* se trata de una fosfolipasa A<sub>1</sub> secretada por el sistema de secreción tipo IV que altera la composición lipídica de las membranas de endosomas tempranos, protegiendo gracias a este proceso a la bacteria de la fusión endosomal. Esta activación se produce tras su unión con la proteína Rab5, previniendo que tanto Rab5 como Rab22 se unan a los efectores rabaptin-5, rabenosin-5 y EEA1, bloqueando mediante esta interacción el tráfico endosomal y la subsecuente degradación lisosomal (Ku *et al*, 2012).

A diferencia de estos dos ejemplos de toxinas bacterianas con actividades fosfolipasa A, la toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* posee todos los mecanismos necesarios en su secuencia aminoacídica para unirse y translocar su dominio catalítico a través de la membrana de su célula diana, sin la necesidad de proteínas auxiliares que ayuden a completar la actividad citotóxica del patógeno. Así mismo, no se puede descartar que la ACT posea una actividad lisofosfolipasa adicional a las actividades fosfolipasa A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, dado que se ha observado la presencia de las tres actividades en la proteína RP534 de *Rickettsia prowazekii*, proteína homóloga a la ExoU de *Pseudomonas aeruginosa* (Housley *et al*, 2011).

Así mismo, el descubrimiento de esta actividad enzimática puede explicar la razón por la cual la translocación del dominio catalítico solo se produce a temperaturas superiores a 15°C, dado que tal y como se ha establecido anteriormente entre las condiciones necesarias para una correcta translocación de ese dominio se encuentran la temperatura y la concentración de calcio, mientras que la unión de la toxina a bicapas lipídicas no se ve afectado por la temperatura (Rogel *et al*, 1992; Otero *et al*, 1995). La actividad fosfolipasa es una actividad enzimática al fin y al cabo, y como tal la necesidad de una temperatura mínima que active la catálisis no es un escenario irracional, tal y como se ha visto para otras fosfolipasas A como las neurotoxinas β-bungarotoxina y taipoxina (Fathi *et al*, 2013) o las fosfolipasas A de la soja (Mariani *et al*, 2015), cuyas

hidrólisis de los ácidos grasos se activan por encima de 20°C en todos los casos. Así mismo, se ha visto que la falta de calcio inactiva la actividad fosfolipasa de la toxina, lo cual concuerda con la inhibición de la translocación en ambientes carentes de este ión.

El análisis de comparación de secuencias de aminoácidos indican que esta actividad fosfolipasa A de la toxina es homóloga a las fosfolipasas de tipo patatin o fosfolipasas A<sub>2</sub> del grupo IV, más concretamente a las fosfolipasas de tipo patatin (Ghosh *et al*, 2006). Estas fosfolipasas contienen los denominados dominios patatin, los cuales son prevalentes entre las procariotas y las eucariotas. Estos dominios albergan unos pliegues hidrolasa  $\alpha/\beta$  así como una diada catalítica serina/ácido aspártico. El primero de los aminoácidos se encuentra dentro de la secuencia hidrolasa consenso G-X-S-X-G, mientras que el ácido aspártico se encuentra en el motivo D-X-G/A (Rydel *et al*, 2003). La diferencia de las fosfolipasas de este tipo con las fosfolipasas citosólicas radica en que mientras que las segundas tienen una alta especificidad hacia los lípidos que contienen ácido araquidónico, las primeras son más promiscuas respecto al sustrato y no requieren de una activación interfacial (Anderson *et al*, 2015).

Basándose en cristales y en otros experimentos bioquímicos se ha determinado que el mecanismo de ataque consistiría en el posicionamiento de la serina catalítica cerca de los enlaces éster. Tras la formación del complejo enzima-sustrato el ácido aspártico activa a la serina absorbiendo un protón durante el ataque nucleofílico al enlace éster. Posteriormente se genera un intermediario serina-acilo mediante la transferencia del protón desde el aspártico al lisofosfolípido formado. La hidrólisis del intermediario acilo por parte del agua ocurre a través de un mecanismo análogo (Dessen *et al*, 1999).

Entre las características de esta actividad fosfolipasa A de la toxina adenilato ciclasa se encuentra la baja especificidad de la toxina hacia el sustrato a hidrolizar, lo cual coincide con la baja especificidad manifestada por las fosfolipasas de tipo patatin. Se ha podido observar que la liberación de ácidos grasos por parte de la toxina se produce tanto en fosfolípidos de carga neutra (DOPC, POPE) como en lípidos aniónicos (DMPG), aunque esa generación se encuentra en distintos niveles dependiendo del sustrato. Esta observación se refuerza al analizar los datos obtenidos mediante el ensayo acoplado con lipoxigenasa, donde la hidrólisis del ácido araquidónico (ácido graso preferente para las fosfolipasas citosólicas) en liposomas de PAPC no difiere

significativamente de la observada en fosfolípidos con ácido linoleico (liposomas de PLPC y DLPC) como sustrato a hidrolizar.

Aparte de la poca especificidad de la toxina respecto al sustrato a hidrolizar, el hecho concluyente de que la actividad fosfolipasa A de la toxina se incluya dentro de las fosfolipasas de tipo patatin se debe a que esta actividad se ve completamente suprimida tanto *in vitro* como *in vivo* por el inhibidor de fosfolipasas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> citosólicas (cPLA<sub>2</sub>) y A<sub>2</sub> independientes de calcio (iPLA<sub>2</sub>) MAFP, un análogo fosforado del ácido araquidónico de la familia de los ésteres organofosforados, conocidos por inhibir las serinas catalíticas de las enzimas (Amara *et al*, 2012). Este inhibidor se ha utilizado para inhibir exitosamente, al igual que en el caso de la toxina adenilato ciclasa, la actividad fosfolipasa de otras toxinas como la toxina ExoU de *Pseudomonas aeruginosa* y la proteína homóloga RP534 de *Rickettsia prowazekii* (Housley *et al*, 2011).

La alineación de la secuencia de la toxina adenilato ciclasa con las secuencias aminoacídicas de otras fosfolipasas de tipo patatin determinó que la serina catalítica de éstas coincide con la de la posición 606 de la ACT, comprendida en una serie de residuos que coincide con el motivo hidrolasa y única en la secuencia de la toxina. En el caso del segundo aminoácido, en cambio, a pesar de determinar el mayor porcentaje de homología en el residuo número 1079 y sus aminoácidos adyacentes, en la secuencia de la toxina se pueden encontrar otros 22 puntos donde se observa la secuencia consenso del ácido aspártico. Por tanto, podría resultar que el ácido aspártico 1079 no forme parte de la diada catalítica responsable de la actividad fosfolipasa de la toxina.

La serina catalítica responsable de la actividad fosfolipasa de la toxina adenilato ciclasa se encuentra dentro de una región hidrofóbica con estructuras potencialmente anfifílicas e hidrofóbicas, la cual es parecida a la región formadora de poros de la  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli*. Deleciones en esta región de la ACT indicarían que este fragmento es responsable tanto del transporte del dominio catalítico como de la formación de poros (Benz *et al*, 1994). Así mismo, la serina 606 sería el aminoácido anterior al comienzo de la cuarta hélice  $\alpha$  (aminoácidos 607-627) del dominio transmembrana (Osicková *et al*, 1999). Por otra parte, el segundo aminoácido de la diada catalítica, el ácido aspártico de la posición 1079, se encontraría dentro del bloque I (aminoácidos

1006-1087) de los cinco que componen el tándem de repeticiones ricas en glicina y ácido aspártico de la región de unión a calcio (Bauche *et al*, 2006).

En este trabajo se han descrito las consecuencias biológicas de esta actividad lipasa en la citotoxicidad producida por la ACT. Tanto la inhibición química por MAFP como la mutagénesis de la serina 606 identificada mediante alineación de secuencias apuntan a que esta actividad está relacionada con la translocación del dominio catalítico, dado que ambos procesos inhiben la generación de cAMP en macrófagos J774A.1 mientras que la actividad hemolítica no se ve afectada, lo cual concuerda con que ambas actividades son independientes una de la otra (Sakamoto *et al*, 1992).

Gracias a los experimentos de liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se puede observar que la inhibición tanto química como mediante mutaciones de la actividad fosfolipasa reduce drásticamente la citotoxicidad producida por la toxina a concentraciones bajas, mientras que a altas cantidades de toxina los porcentajes de liberación se igualan. Esto puede deberse a que la actividad formadora de poros tiene una mayor importancia en ese rango de concentraciones, compensando la ausencia de translocación del dominio catalítico, cuya contribución a la citotoxicidad general es superior a bajas concentraciones de toxina (Hewlett *et al*, 2006). Estudios recientes indican que analizando concentraciones de ACT en secreciones nasofaríngeas de babuinos infectados con *Bordetella pertussis* se obtienen valores de entre 1 y 5 ng/ml, por lo que la actividad fosfolipasa de la toxina es de vital importancia en la patogénesis producida por la bacteria (Eby *et al*, 2013).

Existen evidencias de que el dominio catalítico es transportado directamente a través de la membrana plasmática sin necesidad de proteínas que ayuden en el proceso, lo que provoca que la intoxicación producida por la toxina sea rápida y el incremento de los niveles de cAMP en el citosol se detecte en tiempos muy cortos (Ladant *et al*, 1999). Una de las características de la actividad fosfolipasa de la toxina se deduce al observar las cinéticas de hidrólisis de los ácidos grasos, las cuales indican que es un proceso rápido. Dado que el objetivo de la actividad fosfolipasa es translocar el dominio catalítico es comprensible que la actividad lipasa ocurra también a tiempos cortos, tal y como se ha descrito en este trabajo. Por tanto, eliminar mediante la hidrólisis de los fosfolípidos la barrera que separa al dominio catalítico del compartimento intracelular es un proceso

que no necesitaría de proteínas adicionales que ayuden en ese proceso y explicaría a la vez su transporte directo a través de la membrana.

Así mismo, se ha observado que el movimiento transmembrana de lípidos se inhibe al eliminar la actividad fosfolipasa de la toxina tanto por inhibición química como por mutagénesis. Aun así no está claro si el *flip flop* se trata de un mecanismo del que se vale la toxina para transportar el dominio catalítico o de una consecuencia provocada por la translocación. A pesar de ello, la relación entre la translocación del dominio catalítico, la actividad fosfolipasa de la toxina y el *flip flop* se intensifica por una parte al observar la eliminación de los tres procesos mediante mutagénesis o inhibición química y por otra al no existir incongruencias en los tiempos en el que los procesos ocurren, existiendo una correlación temporal entre los tres.

A diferencia de los valores obtenidos con los controles positivos en liposomas de DOPC:PED-A1/PED6, en el caso de la ACT se observa una saturación a concentraciones altas de toxina. Esto puede deberse a una inhibición por sustrato, la cual la toxina utilizaría como posible mecanismo autorregulatorio. Esta inhibición puede deberse a dos razones: (1) dado que el objetivo de la toxina es crear un mecanismo para la translocación de su dominio catalítico y no hidrolizar todo el sustrato disponible, una vez translocado el dominio catalítico la ACT no tendría la necesidad de proseguir con la actividad fosfolipasa; o (2) tras la translocación del dominio catalítico la proteína adopta una diferente conformación en la que la serina catalítica no tiene acceso al sustrato para seguir hidrolizándolo.

A pesar de la implicación de la actividad fosfolipasa de la ACT en la translocación del dominio catalítico éste no parece ser el único requisito para que ese transporte se lleve a cabo, dado que también es indispensable una correcta estabilidad estructural. Este hecho se puede derivar de dos observaciones: por una parte el cambio de la serina catalítica por una alanina reduce considerablemente los niveles de cAMP en células en comparación con los obtenidos por la toxina salvaje, pero no anula completamente la generación intracelular de esta molécula, por lo que la necesidad de condiciones adicionales no se puede descartar. Por otra parte, el mutante D1079A, con una mutación dentro de la región de las repeticiones ricas en glicina y ácido aspártico, presenta unos niveles de cAMP comparables a los obtenidos en células sin toxina, a pesar de seguir

manteniendo casi intacta la actividad fosfolipasa. Este dominio, cuyo análisis por homología sugiere que forma una estructura  $\beta$ -roll antiparalela, parece ser de gran importancia debido a que la unión de calcio a este dominio confiere a la toxina una mayor estabilidad estructural (Pojanapotha *et al*, 2011).

Dado que el análisis mediante dicroísmo circular no revela cambios importantes en la estructura secundaria del mutante, se puede suponer que el cambio de ácido aspártico por alanina altera la estructura terciaria de la toxina, eliminando a su vez la capacidad hemolítica de la proteína que, junto con la incapacidad de translocar el dominio catalítico, anularía todos los efectos citotóxicos producidos por el mutante, tal y como reflejan los datos de liberación de LDH. Para el dominio de repeticiones de la  $\alpha$ -hemolisina de *Escherichia coli*, la unión a calcio a este fragmento induce un cambio conformacional que se transmite al dominio hidrofóbico N-terminal, exponiéndolo a una correcta inserción en la membrana (Sánchez-Magraner *et al*, 2007).

En el caso de la toxina VipD de *Legionella pneumophila* su unión a Rab5 reposiciona el *loop* que obstruye el centro catalítico, exponiendo la cavidad catalítica dentro del dominio N-terminal de la proteína y activando la hidrólisis del ácido graso de la primera posición (Lucas *et al*, 2014). Análogamente, en el caso de la ACT podríamos estar ante un proceso alostérico parecido, en el que el correcto plegamiento de la región de repeticiones provocada por el calcio regule la actividad fosfolipasa y, consecuentemente, la translocación del dominio catalítico y los cambios conformacionales derivados del proceso. Este plegamiento favorecería el correcto posicionamiento del dominio transmembrana, ayudando de este modo en la translocación del dominio catalítico. Este efecto regulatorio producido por el calcio en el dominio hidrofóbico ha sido descrito en estudios anteriores, en los que se ha determinado que la unión a calcio modula la tendencia de la ACT a formar canales en membranas lipídicas (Knapp *et al*, 2003).

El correcto plegamiento del dominio de repeticiones ricas en glicina y ácido aspártico parece necesario para el transporte del dominio catalítico a través de la membrana, pero no para la actividad fosfolipasa dado que el mutante D1079A solo presenta una pequeña reducción en la actividad fosfolipasa respecto a la toxina salvaje. Esto podría indicar que en los primeros instantes del contacto de la toxina con las membranas celulares la

actividad fosfolipasa produce todo su efecto, observación sustentada en la rápida hidrólisis de los ácidos grasos. Tras la formación de lisofosfolípidos la toxina posicionaría correctamente el dominio transmembrana para llevar a cabo la translocación del dominio AC. La pequeña reducción observada en la hidrólisis de los ácidos grasos por parte del mutante del ácido aspártico podría deberse a que el plegamiento del dominio de repeticiones posicionaría la serina 606 para un óptimo acceso al sustrato y/o catalizar eficientemente la hidrólisis del fosfolípido, aunque no parece ser un requisito indispensable.

Así mismo, observando los datos obtenidos en monocapas ni la actividad fosfolipasa ni la estabilidad del segmento transmembrana parecen ser importantes para una correcta interacción membrana-toxina. Por tanto, teniendo en cuenta la rápida generación de ácidos grasos, se puede deducir que la actividad fosfolipasa ocurre tras la interacción entre la toxina y la célula, provocando la translocación del dominio catalítico y la rápida generación de cAMP intracelular tras la correcta inserción del dominio transmembrana de la toxina. Por último, la actividad fosfolipasa no parece ser indispensable para la formación de poros dado que el mutante S606A mantiene casi inalterada la actividad hemolítica. Estos datos concuerdan con la dualidad presente en la ACT mencionada anteriormente, donde las actividades hemolítica y catalítica son independientes una de la otra.

El hecho de que la estabilidad de la región transmembrana sea necesaria para la translocación y que la serina catalítica se encuentre cerca de una posible hélice transmembrana que podría facilitar su correcto posicionamiento para la hidrólisis del sustrato podría indicar la formación de un poro proteolipídico o toroidal, a través del cual se transporte el dominio catalítico hacia el citosol de las células diana.

La nomenclatura de los poros toroidales proviene de la formación de estructuras con forma de donut o anillos (*torus*) con curvatura positiva, los cuales se encuentran en perpendicular respecto al plano de la membrana debido a la organización de las cabezas polares de los lípidos. Estas estructuras permiten la formación de un flujo continuo de la membrana entre una monocapa a la otra a lo largo de la superficie del poro (Gilbert *et al*, 2014). Así mismo, esta reorganización activa el intercambio de lípidos entre ambas membranas (Metkar *et al*, 2011), posee una gran flexibilidad estructural permitiendo la

variación del tamaño del poro (Fuertes *et al*, 2010) y le confiere una baja selectividad (Terrones *et al*, 2004).

La formación de poros toroidales se ha propuesto para diferentes péptidos antimicrobianos, así como para diferentes actinoporinas y esticolisinas. En el caso del péptido colicina E1, por ejemplo, se ha observado que la presencia de lisofosfatidilcolina aumenta la capacidad para formar canales por parte de la proteína gracias a la curvatura positiva conferida por la presencia de este lípido en la membrana (Sobko *et al*, 2004). Así mismo, se ha descubierto que este péptido induce procesos de *flip flop* en las membranas (Sobko *et al*, 2010). En este trabajo se ha descrito la formación de lisofosfolípidos por parte de la ACT a través de su actividad fosfolipasa A, así como la relación entre esta actividad con el movimiento transmembrana de lípidos. Por lo tanto se puede deducir que en el caso de la ACT podría ocurrir un proceso similar, donde la generación de este lípido favorecería la generación de un poro toroidal.

Se pueden diferenciar dos tipos de poros toroidales: (1) una estructura tipo matriz formado por la intercalación de cadenas polipeptídicas y lípidos (como en el caso de las actinoporinas) y (2) estructura de tipo arco en el que por una parte existe una estructura proteica que es complementada por una reorganización toroidal de lípidos adicional (propuesta para la neumolisina, la perforina y la proteína Bax) (Gilbert *et al*, 2014).

Debido a la dualidad presente en los efectos biológico producidos por la toxina adenilato ciclasa, en la que las actividades del dominio formador de poros y del dominio catalítico son independientes una de la otra, podríamos estar hablando de una estructura parecida a la propuesta en el segundo de los casos, en la que el dominio formador de poros crearía una estructura proteica y paralelamente el segmento transmembrana junto con los lípidos presentes en la membrana celular formaría una estructura toroidal proteolipídica a través de la cual se transportaría el dominio catalítico.

# **Capítulo 4**

## **Caracterización de la permeabilización de la membrana inducida por la toxina adenilato ciclasa**

## 4.1. INTRODUCCIÓN

Las toxinas citolíticas son producidas por una gran variedad de organismos, particularmente por las bacterias. Estas toxinas presentan un mecanismo dual a la hora de poner en marcha sus efectos citotóxicos: por una parte, como mecanismos ofensivos, ayudan en la digestión o degeneración del organismo anfitrión, mientras que por otra, como armas defensivas, se protegen anulando los mecanismos de defensa de los huéspedes. Las toxinas se secretan como proteínas solubles, pero una vez alcanzan el objetivo se transforman en proteínas de membrana insertándose o translocándose ellas mismas a través de las membranas celulares. Parece que muchas de estas toxinas forman únicamente poros, perturbando la barrera y permeabilizándola dirigiendo a la célula hacia su muerte, pero existen toxinas que actúan intracelularmente, para lo que necesitan que atraviesen la membrana de la célula huésped. Para que estas toxinas que inicialmente son solubles consigan insertarse en las membranas tienen que someterse a una serie de cambios conformacionales que expongan o generen nuevas superficies hidrofóbicas que le permitan penetrar en la bicapa lipídica (Alouf, 2001).

Existe una serie de pasos básicos involucrados en la generación de poros por parte de estas toxinas. Primero la toxina tiene que ser secretada, paso que puede ser realizado mediante sistemas complejos de secreción o mediante proteínas líticas que permeabilizan el organismo productor de la toxina. Posteriormente las moléculas se dirigen a las células correctas utilizando para ello mecanismos de reconocimiento por receptores, entre los cuales se pueden englobar tanto lípidos como proteínas concretas. Por último, la concentración de toxina en la célula diana provoca los procesos de oligomerización y de inserción en la membrana plasmática, terminado de este modo con el proceso de generación de poros (Parker *et al*, 2005).

Tradicionalmente el estudio de las toxinas formadoras de poros se ha enfocado en la relación entre la estructura y la función. A pesar de ello, las propiedades fisicoquímicas de la membrana pueden influenciar de una manera importante el proceso de formación de los poros producidos por la toxina. Propiedades de la membrana como la separación de lípidos en diferentes dominios, la fluidez y la composición lipídica controlan la unión de la toxina a la bicapa lipídica, la disponibilidad de los receptores, los procesos de

oligomerización y el grado de inserción de la proteína entre otros parámetros, afectando en última instancia a las propiedades de la estructura final (Rojko *et al*, 2015).

Los canales que forman las toxinas formadoras de poro varían en tamaño, produciendo poros con un diámetro desde 1-2 nm (como la  $\alpha$ -hemolisina de *Staphylococcus aureus*) hasta poros de entre 25 y 30 nm descritos en el caso las citolisinas dependientes de colesterol (*Cholesterol Dependent Cytolysins*, CDC). La existencia de este amplio rango de diámetros se debe a la estequiometría de los anillos oligoméricos formados por las toxinas, oscilando desde los heptámeros producidos por la  $\alpha$ -hemolisina hasta poros en los que forman parte entre 30 y 50 unidades monoméricas descritas para las CDC. Aun así, recientemente se ha identificado cierta plasticidad en el grado de oligomerización, observando estructuras con diferentes grados de oligomerización producidos por la misma toxina. A pesar de todo, tanto las dinámicas de ensamblaje para llegar a esas estructuras finales como si esos procesos de oligomerización ocurren mediante la adición secuencial de monómeros o mediante la interacción de intermediarios multiméricos difieren entre las diferentes especies de toxinas formadoras de poros (Locavache *et al*, 2010).

A pesar de ello, en todos los casos en la determinación de la estructura de las proteínas de membrana los detergentes juegan un papel fundamental debido a que éstos son esenciales durante los procesos de solubilización, purificación y cristalización. La estructura y la dinámica de las proteínas de membrana están muy relacionadas con las propiedades de los lípidos que las rodean. Debido a la naturaleza anfipática de los detergentes se pueden extraer las proteínas de membrana perturbando la bicapa lipídica sin alterar en el proceso la estructura de la proteína, imitando gracias a ello a la membrana que rodea la región hidrofóbica de las proteínas de membrana generando en el proceso un complejo proteína-detergente soluble en agua y previniendo la agregación proteica tras la eliminación de su ambiente natural. Tras realizar esta solubilización existe un amplio abanico de técnicas con las que determinar tanto la estructura de la proteína (cristalografía, resonancia magnética nuclear...) como grados de oligomerización en condiciones nativas (electroforesis nativa, FRET...) (Moraes *et al*, 2014).

La integridad de la membrana celular es crítica para la separación de los compartimentos internos y externos de las células eucariotas. Dado que la formación de un poro por parte de una toxina es una fisura en el continuo de la membrana que conlleva un posible desequilibrio homeostático fatal para la célula, la activación de mecanismos de reparación son necesarios para la supervivencia de éstas. En el caso de las lesiones producidas por las toxinas formadoras de poros estas perturbaciones se traducen habitualmente en un flujo de calcio hacia el interior de la célula, el cual activa la maquinaria de reparación y estimula los eventos de señalización intracelulares que activan las vías de reparación específicas para cada célula. Habitualmente el secuestro y la eliminación de las toxinas mediante distintas vías endocíticas es el método que utilizan las células diana para asegurar su supervivencia, las cuales pueden estar acompañadas en ciertos casos por procesos adicionales de exocitosis lisosomal (Babiychuk *et al*, 2015).

En el caso de la toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* se ha establecido que ésta es secretada al medio extracelular a través del sistema de secreción tipo 1 (Coote, 1992) y que ésta formaría en solución dímeros o estructuras de mayor tamaño molecular (Lee *et al*, 2005). Hoy en día no se ha conseguido la estructura cristalina de la toxina completa aunque sí la del complejo formado por el dominio adenilato ciclasa y la calmodulina (Guo *et al*, 2005), pero se ha determinado mediante técnicas de inmunoro que la toxina formaría monómeros, dímeros, grupos de dímeros u oligómeros de mayor tamaño en membranas de eritrocitos (Vojtova-Vodolanova *et al*, 2009). De estos procesos de oligomerización descritos llama la atención la incongruencia entre los datos obtenidos en solución y en las membranas de eritrocitos debido a la formación de monómeros en membranas de eritrocitos a partir de dímeros en solución, así como el haber realizado el estudio en células sin el receptor CD11b/CD18, dado que esta integrina aumenta la sensibilidad de las células hacia la intoxicación por parte de la toxina (Guermonprez *et al*, 2001). Aun así conviene recordar que la toxina adenilato ciclasa es capaz de actuar en células que no expresan este receptor (Eby *et al*, 2012).

Por tanto, en este capítulo se indagará en los procesos de oligomerización o autoensamblaje que sigue la toxina en membranas de macrófagos J774A.1, así como dilucidar la naturaleza del posible intermediario multimérico que se podría formar en

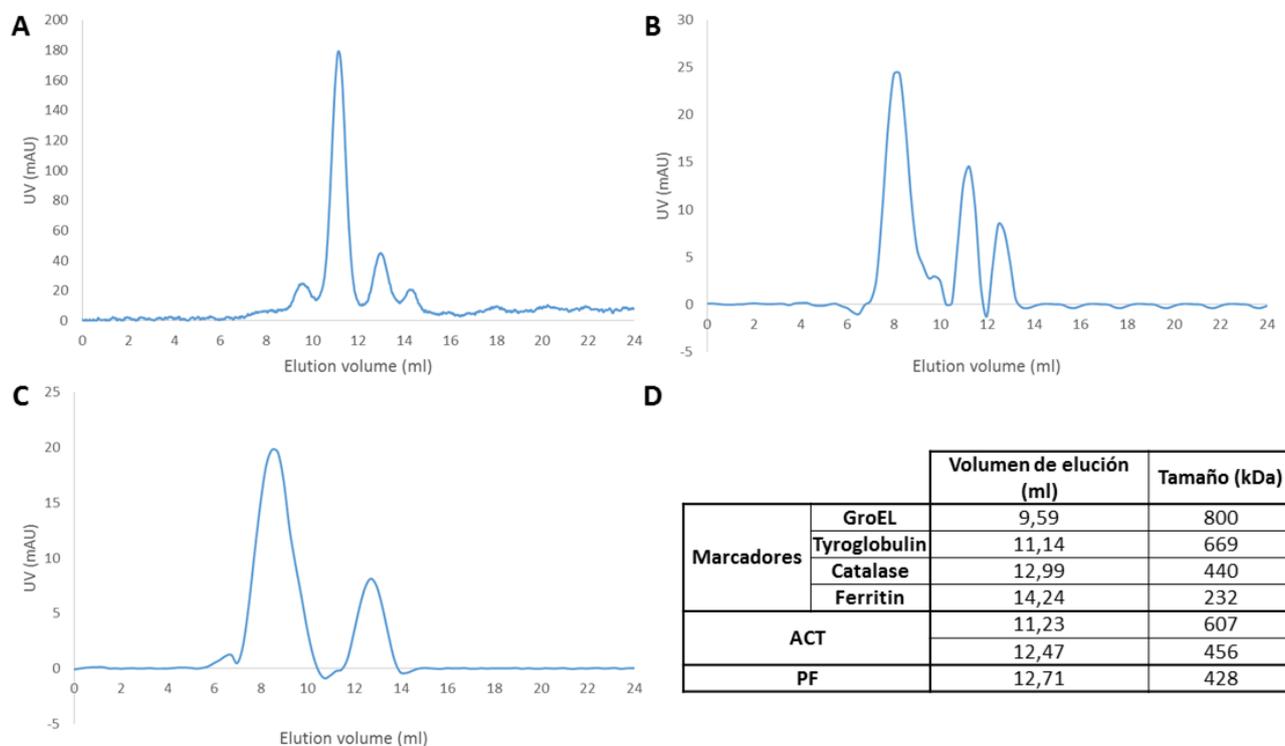
solución. Adicionalmente se analizará si existen preferencias por parte de la toxina de ciertas composiciones lipídicas y si éstas afectan al grado de oligomerización, a la estructura de la proteína o al diámetro del poro formado por la toxina. Por último, se analizarán los procesos de reparación de los poros formados por la toxina, utilizando para ello el mutante  $\Delta N482$  (denominado a partir de ahora PF), el cual teóricamente comprime el dominio formador de poros de la toxina al carecer del dominio catalítico.

## 4.2. RESULTADOS

### 4.2.1. Estudio de la estructura de la toxina salvaje ACT y el mutante PF en solución

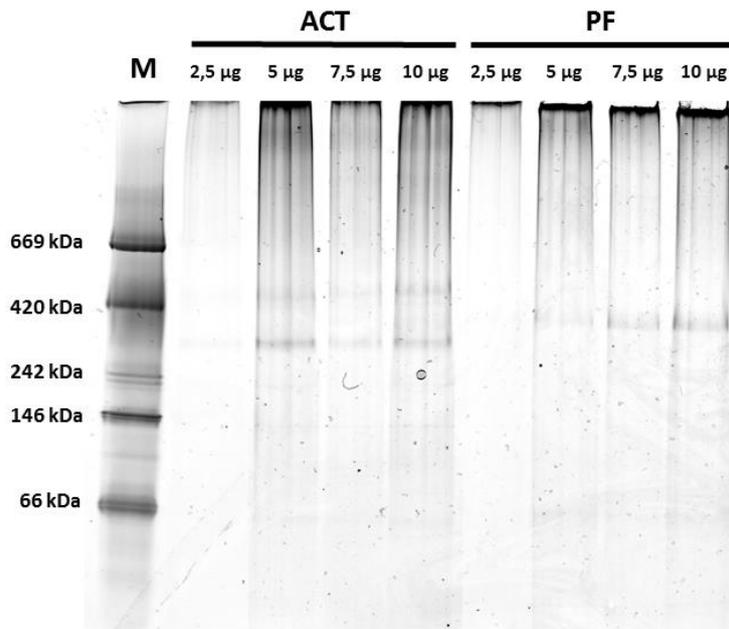
Antes que nada se realizó un estudio de la oligomerización en solución, dado que éste puede diferir entre cuando es secretada y cuando está insertada en una membrana lipídica. Para estudiar la oligomerización en solución se dializaron ambas toxinas purificadas en urea *overnight* a 4°C contra un tampón que contiene calcio para que ambas toxinas recuperaran su conformación nativa. Posteriormente se inyectaron ambas proteínas por separado en una columna de exclusión molecular *Superdex 200 10/300 GL* equilibrada en el mismo tampón que se utilizó en la diálisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH8). Los cromatogramas de la señal ultravioleta obtenidos muestran 3 picos cuando se carga la toxina salvaje (**Figura 4.1B**) y 2 picos en el caso del mutante PF (**Figura 4.1C**). En ambos casos la elución del primero de los picos quedaría dentro del volumen muerto de la columna y podría tratarse de agregados de ambas toxinas, dado que la toxina en ausencia de una membrana lipídica y a concentraciones superiores a 100 µg/ml la toxina tiende a agregarse mostrando una masa molecular aparente superior a 1000 kDa (Lee *et al*, 2005). Por tanto, descartando ese primer pico se obtuvieron dos picos en el caso de la ACT y uno en el caso del mutante PF, cuyos volúmenes de elución se compararon con los obtenidos por el patrón (**Figura 4.1A**). Al realizar la comparación se concluyó que el primer pico de la ACT corresponde a un tamaño de 607 kDa y el segundo de 456 kDa, correspondientes a un trímero y a un dímero respectivamente. En el caso del mutante PF, el pico obtenido correspondería a

un tamaño de 428 kDa, que se correspondería a un trímero aproximadamente (**Figura 4.1D**).



**Figura 4.1: Caracterización de la estructura de la ACT y el mutante PF en solución mediante cromatografía de exclusión molecular.** En la figura se representan los cromatogramas de valores ultravioleta obtenidos tras inyectar en una columna *Superdex 200 10/300 GL* una mezcla de marcadores moleculares (A), la ACT (B) y el mutante PF (C) incubados en tampón de hemólisis a 4°C a un flujo de 0,2 ml/min utilizando un cromatógrafo *ÄKTA Purifier P-900*, así como la estimación del tamaño molecular de los picos de ambas proteínas en función de su volumen de elución (D).

Para confirmar estos datos se cargaron diferentes cantidades de ambas toxinas dializadas en un gel nativo BN-PAGE en gradiente de acrilamida, el cual se sometió posteriormente a una tinción de plata, resultado que se puede observar en la **figura 4.2**. En el gel se puede apreciar que la toxina completa en solución produce dos bandas que correspondería a tamaños de 371 kDa y 543 kDa, mientras que en las calles en las que se ha cargado el mutante PF solo se aprecia una única banda de 422 kDa. Dado que el tamaño molecular de la ACT es 200 kDa y el del mutante PF de 126 kDa aproximadamente se puede concluir que la ACT forma en solución dímeros y trímeros mientras que el dominio formador de poros es capaz únicamente de formar trímeros.



**Figura 4.2: Gel BN-PAGE de los oligómeros formados en solución por la toxina salvaje ACT y el mutante PF.** Las toxinas purificadas se dializaron ON en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH8) a 4°C, se cargaron diferentes cantidades de ACT y PF en un gel BN-PAGE en gradiente de acrilamida del 3 al 15%, corriendo el gel a 4°C a 150 V durante 1 hora y 250 V durante otra hora adicional. Por último se realizó una tinción de plata para visualizar las bandas.

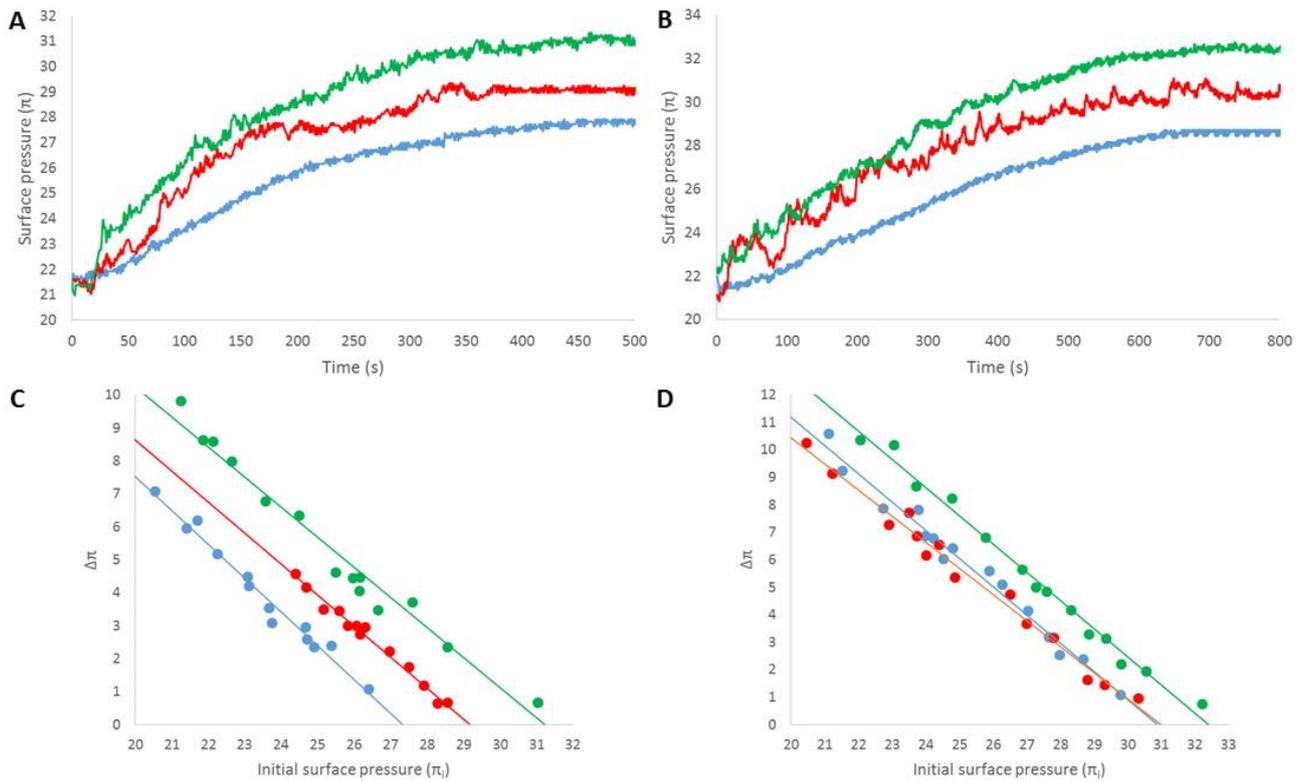
#### **4.2.2. Análisis de la interacción de la toxina ACT y el mutante PF con membranas**

Tras determinar la estructura que forman en solución tanto la ACT como la PF se procedió al estudio de la interacción de esos oligómeros con membranas de diferentes composiciones lipídicas, analizando la tendencia a insertarse de ambas toxinas en membranas de diferentes composiciones lipídicas. Para ello se realizaron estudios de este proceso en monocapas de Langmuir, permitiendo la observación directa de la inserción de las proteínas sin la interferencia de fenómenos como el cambio en la arquitectura de los lípidos, ya que por diseño la monocapa no puede sufrir una reestructuración en tres dimensiones esencial para la alteración de la barrera de permeabilidad (Sánchez-Magraner *et al*, 2006).

Al observar las cinéticas de inserción se concluyó que la mayor presencia de colesterol en la composición lipídica no solo induce un mayor cambio en la presión superficial de

la monocapa, sino que las cinéticas son sustancialmente más rápidas tanto para la toxina salvaje (**Figura 4.3A**) como para el mutante PF (**Figura 4.3B**). A pesar de la composición lipídica todas y cada una de las cinéticas registradas no son mono-exponenciales, lo cual indicaría que en ellas no solo se observa el proceso de inserción sino también la contribución de otros mecanismos en la formación del poro.

Por último, se realizaron isothermas en los que se representaba el incremento en la presión superficial ( $\Delta\pi$ ) frente a diferentes presiones iniciales ( $\pi_i$ ), con el objetivo de calcular las presiones laterales críticas, donde un valor indicaría una densidad de empaquetamiento lipídico e inserción proteica mayor. En el caso de la ACT se observó una correlación positiva entre la presión lateral crítica y la cantidad de colesterol presente en la monocapas (**Figura 4.3C**). En cambio, ese aumento de la presión lateral crítica cuanto mayor concentración molar de colesterol esté presente en la membrana también se observa en los datos obtenidos por el mutante PF, aunque ese aumento es bastante menor (**Figura 4.3D**). Al observar los datos se puede concluir que la ACT, y sobre todo el mutante PF, es perfectamente capaz de permeabilizar la membrana plasmática de las células diana, dado que la presión crítica en ellas es de aproximadamente 30 mN/m, valor excedido en composiciones lipídicas superiores al 33% de colesterol (**Tabla 4.1**), valor dentro del rango presente en células eucariotas (Marsh, 1996; Brockman, 1999).



**Figura 4.3: Estudio mediante monocapas de la inserción de la ACT y el mutante PF en membranas.** Isothermas  $\Delta\pi-\pi_{\text{inicial}}$  para monocapas de diferentes composiciones lipídicas. En la figura se representa por una parte las cinéticas de inserción en monocapas de diferentes composiciones lipídicas (DOPC, azul; DOPC:Chol 2:1, rojo; DOPC:Chol 1:1, azul) de la ACT (A) y el mutante PF (B), así como las isothermas  $\Delta\pi-\pi_{\text{inicial}}$  para los cambios en la presión lateral ( $\Delta\pi$ ) respecto a diferentes presiones iniciales ( $\pi_{\text{inicial}}$ ) tras la adición de 250 nM de ACT (C) o PF (D) a monocapas preparadas en tampón de hemólisis a 37°C.

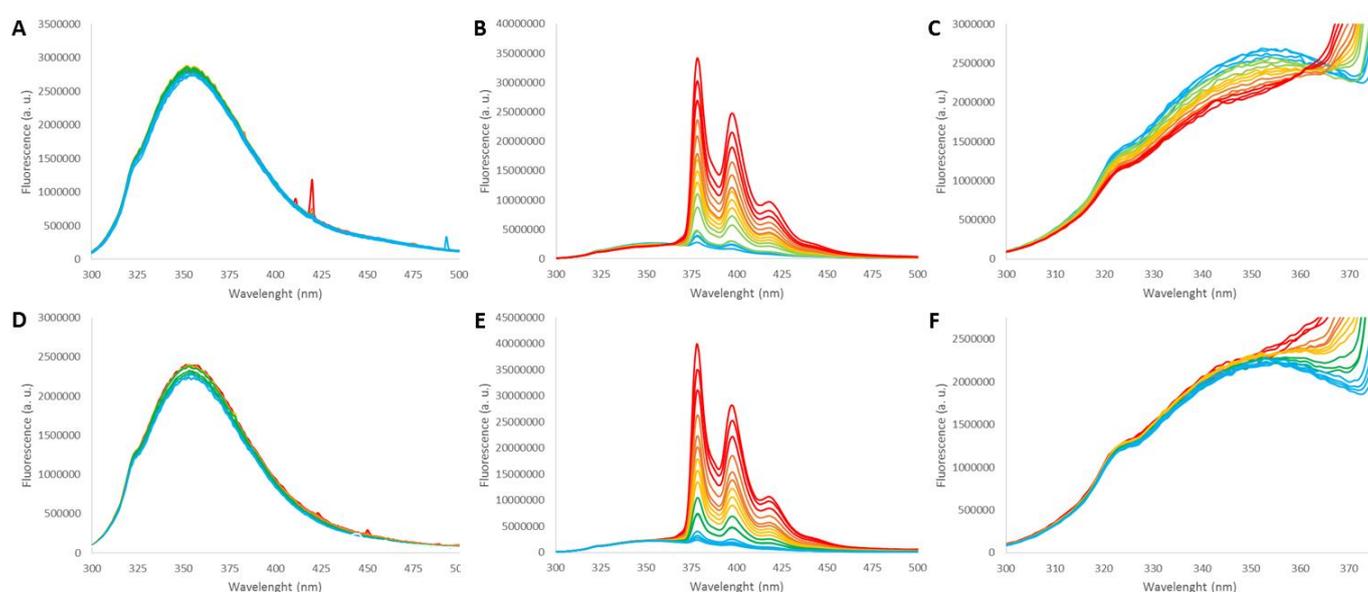
	ACT	PF
DOPC	27,3353	30,8762
DOPC:Chol 2:1	29,1748	30,9753
DOPC:Chol 1:1	31,2241	32,3801

**Tabla 4.1: Valores de presión lateral crítica la toxina salvaje ACT y el mutante PF en monocapas de diferentes composiciones lipídicas.**

Para confirmar esta mayor tendencia por parte de la toxina salvaje de insertarse en membranas que contienen colesterol se realizaron estudios de interacción entre la toxina y el lípido mediante FRET (Xu *et al*, 2014). Para ello se analizó mediante fluorimetría los cambios en la fluorescencia intrínseca de la proteína en presencia de

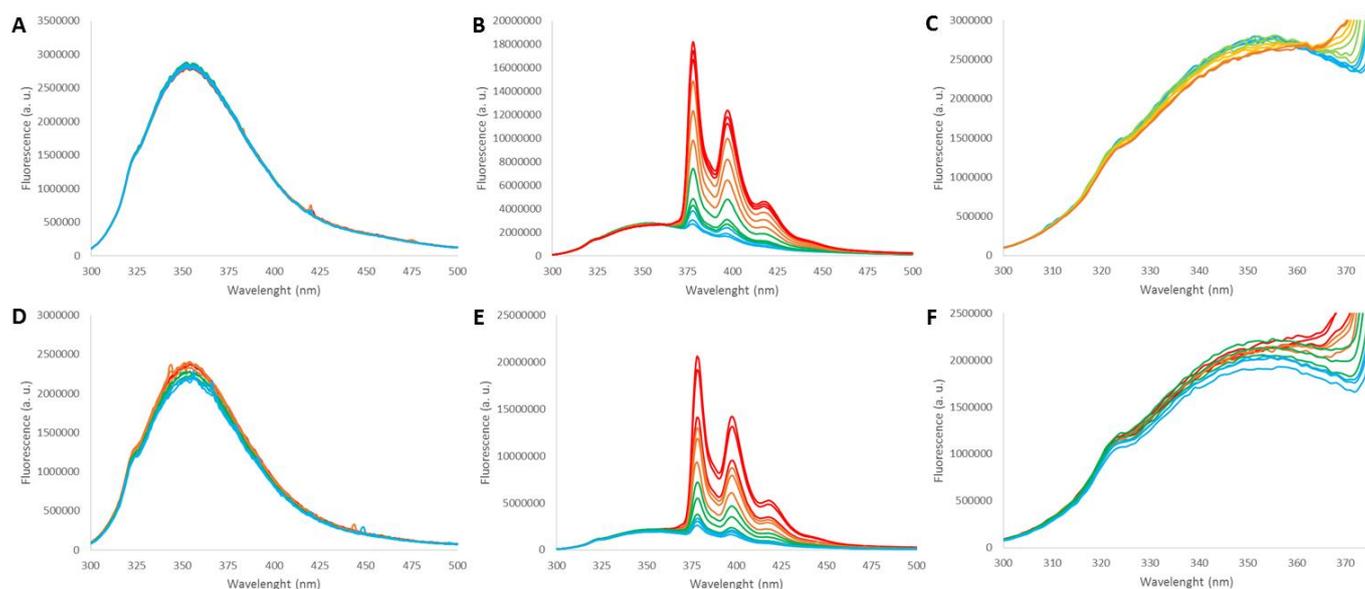
diferentes concentraciones de liposomas con y sin pireno en su membrana excitando la muestra a 295 nm. La unión de la toxina a la membrana provocaría una interacción dipolar de rango corto entre el donador (los triptófanos de la proteína) y el aceptor, disminuyendo la señal de emisión de los triptófanos entre 300 y 360 nm.

Primero se analizaron posibles cambios en la emisión de fluorescencia por parte de la ACT tras su unión a liposomas. Tal y como se esperaba no se apreciaron cambios sustanciales en los espectros de emisión al unirse a liposomas de DOPC (**Figura 4.4A**) y DOPC:Chol 1:1 (**Figura 4.4D**). La incubación de la toxina con liposomas marcados con pireno, en cambio, provocó una disminución de la señal de los triptófanos en ambas condiciones, siendo ésta gradual en el caso de los liposomas puros de DOPC (**Figuras 4.4B y 4.4C**) e importante incluso a bajas concentraciones de lípido en liposomas con colesterol (**Figuras 4.4E y 4.4F**).



**Figura 4.4: Estudio del *binding* de la ACT a membranas de liposomas mediante FRET.** Por una parte se incubaron 100 nM de ACT con diferentes concentraciones de liposomas de DOPC (A) o DOPC:Chol 1:1 (D) en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH8) y así como liposomas de la misma composición lipídica marcados con 1% de *pyrene-PE* (B y C para DOPC y E y F para DOPC:Chol 1:1). Tras 5 minutos de incubación a 37°C se recogieron espectros de fluorescencia entre 300 y 500 nm excitando la muestra a 290 nm, con los *slits* de excitación y emisión establecidos en 3 nm. Los cambios de color de los espectros de azul a rojo indican un aumento de la concentración de liposomas de 2,5 a 200  $\mu$ M.

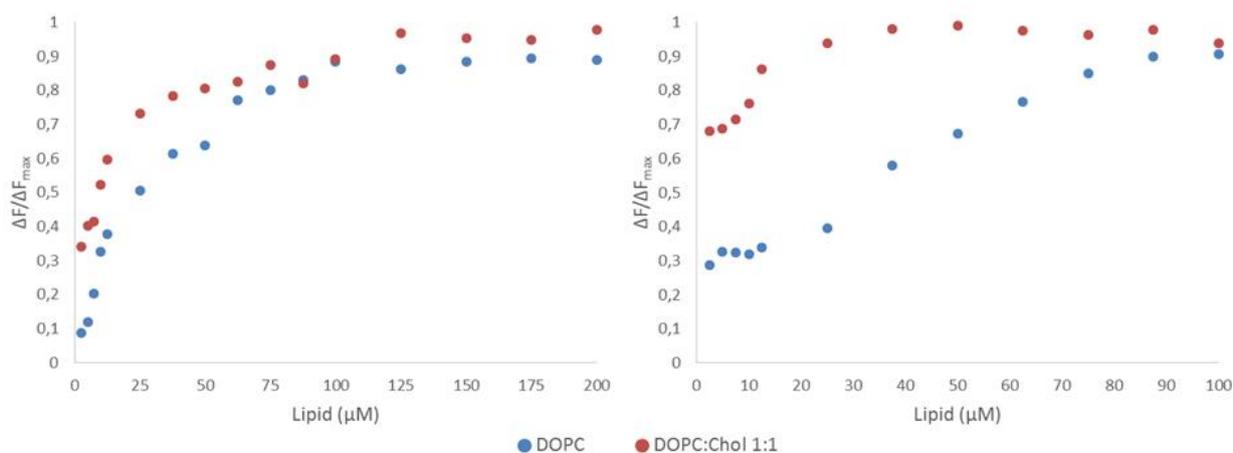
Por otra parte, en el caso del mutante formador de poros tampoco se observó un cambio en su espectro de emisión al incubarlo con vesículas libres de pireno (**Figura 4.5A y 4.5D**). En cambio, a diferencia de lo observado con la ACT, tampoco se registraron disminuciones importantes en la señal de la fluorescencia intrínseca del mutante al incubarlo con vesículas marcadas, independientemente de realizar la incubación con liposomas de DOPC (**Figuras 4.5B y 4.5C**) o DOPC:Chol 1:1 (**Figuras 4.5E y 4.5F**).



**Figura 4.5: Estudio del *binding* del mutante PF a membranas de liposomas mediante FRET.** Por una parte se incubaron 100 nM del mutante PF con diferentes concentraciones de liposomas de DOPC (A) o DOPC:Chol 1:1 (D) en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH8) y así como liposomas de la misma composición lipídica marcados con 1% de *pyrene-PE* (B y C para DOPC y E y F para DOPC:Chol 1:1). Tras 5 minutos de incubación a 37°C se recogieron espectros de fluorescencia entre 300 y 500 nm excitando la muestra a 290 nm, con los *slits* de excitación y emisión establecidos en 3 nm. Los cambios de color de los espectros de azul a rojo indican un aumento de la concentración de liposomas de 2,5 a 100  $\mu$ M.

Al representar los datos obtenidos mediante un modelo de unión de tipo Langmuir (**Figura 4.6**) se pudieron calcular las constantes de asociación ( $K_D$ ) para ambas toxinas, para así determinar si existen diferencias entre ambas composiciones. Teniendo en cuenta que la fracción de lípido disponible en la capa externa de una vesícula de 100 nm de diámetro es de 0,52 (Vogel *et al*, 2000), los valores que se calcularon para la ACT fueron de 9,31  $\mu$ M y 4,03  $\mu$ M para los liposomas de DOPC y DOPC:Chol 1:1, mientras que para el mutante PF los valores fueron 3,95  $\mu$ M y 3,07  $\mu$ M respectivamente. Estos

datos indicarían una mayor afinidad tanto de la ACT como del mutante PF por las membranas con colesterol.



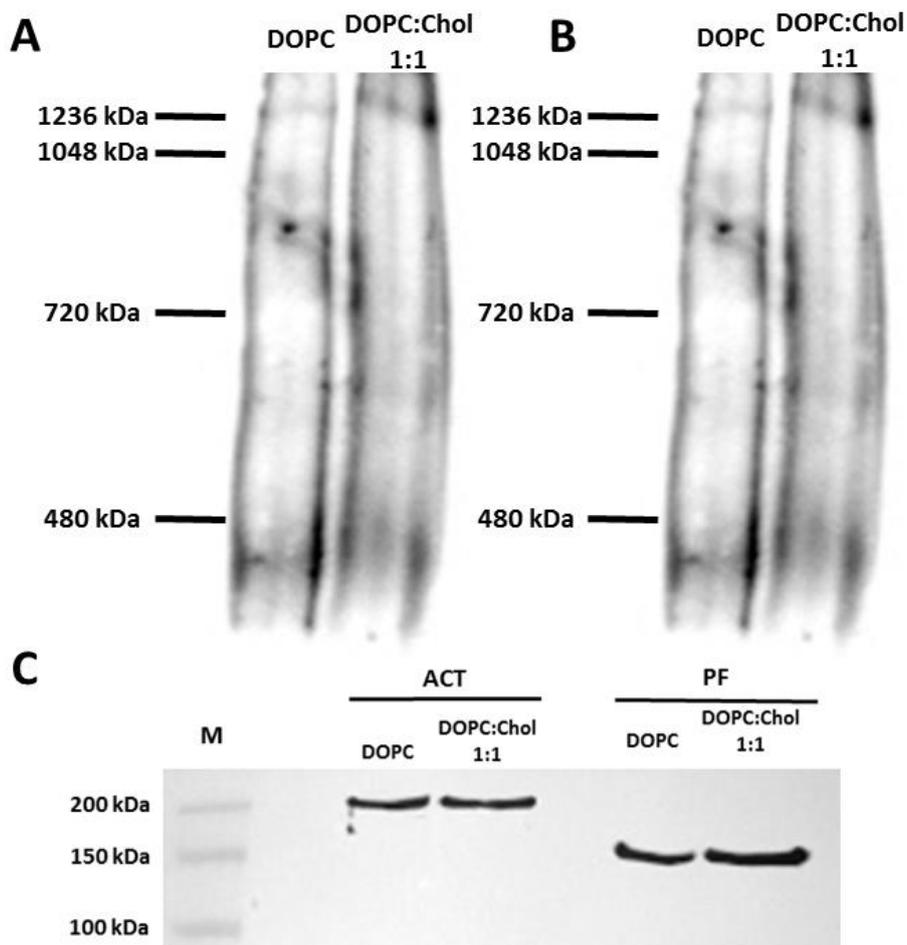
**Figura 4.6: Análisis de la unión a membranas de la ACT y el mutante PF usando el modelo de unión de tipo Langmuir.** En la figura se representan las curvas de unión tanto para la ACT (panel de la izquierda) como del mutante PF (panel de la derecha) en ambas composiciones lipídicas.

### 4.2.3. Estudio de la oligomerización de la ACT y el mutante PF en membranas modelo

Tras determinar los oligómeros que forman tanto la ACT como su mutante PF en solución así como la mayor tendencia por parte de ambas toxinas de unirse a membranas con colesterol se procedió al análisis de los oligómeros que forman ambas proteínas en membranas de liposomas.

La incubación de liposomas de DOPC y DOPC:Chol con la ACT y el mutante a una relación proteína:lípido de 1:1000 indicó en el caso de la ACT la formación de tres tipos de oligómeros, los cuales no difieren dependiendo de la composición lipídica (**Figura 4.7A**), los cuales corresponderían a tamaños de 1219 kDa, 726 kDa y 557 kDa. En el caso del mutante PF, el mismo tipo de incubación y el mismo análisis reveló la formación de dos estructuras diferentes tanto en liposomas de DOPC como de DOPC:Chol 1:1. El análisis de los oligómeros formados determinó que el tamaño aparente de las bandas correspondería a 1355 kDa y 469 kDa (**Figura 4.7B**). Para determinar las unidades monoméricas tanto de los oligómeros identificados en condiciones nativas se realizó

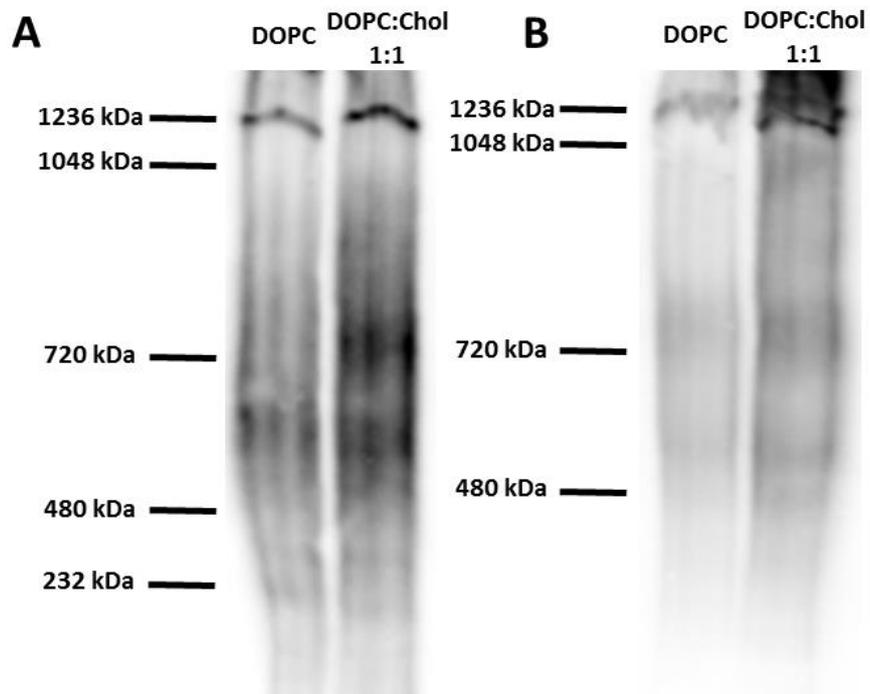
paralelamente una electroforesis desnaturante de las muestras cargadas en los geles BN-PAGE. En la **figura 4.7C** se puede observar el análisis realizado en un gel SDS-PAGE en combinación con un Western Blot marcando tanto la ACT como el mutante PF con el anticuerpo 9D4. En ambas toxinas y composiciones lipídicas analizadas solo existe una unidad monomérica de los oligómeros, siendo ésta en el caso de la toxina salvaje un monómero de 200 kDa y en el caso del mutante un monómero de un tamaño aparente de 150 kDa.



**Figura 4.7: Estudio de la oligomerización de la ACT y el mutante PF en membranas de liposomas.** En la figura se representan las bandas de la toxina salvaje (A) y del mutante PF (B) marcadas con el anticuerpo 9D4 tras realizar una incubación durante 30 minutos a 37°C con liposomas de DOPC (A) o DOPC:Chol 1:1 (B) en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH8) a una relación proteína:lípido 1:1000 y separar los oligómeros en un gel BN-PAGE en gradiente de acrilamida 3-12%, así como la electroforesis desnaturante de las muestras nativas en un gel SDS-PAGE al 8,5% de acrilamida (C).

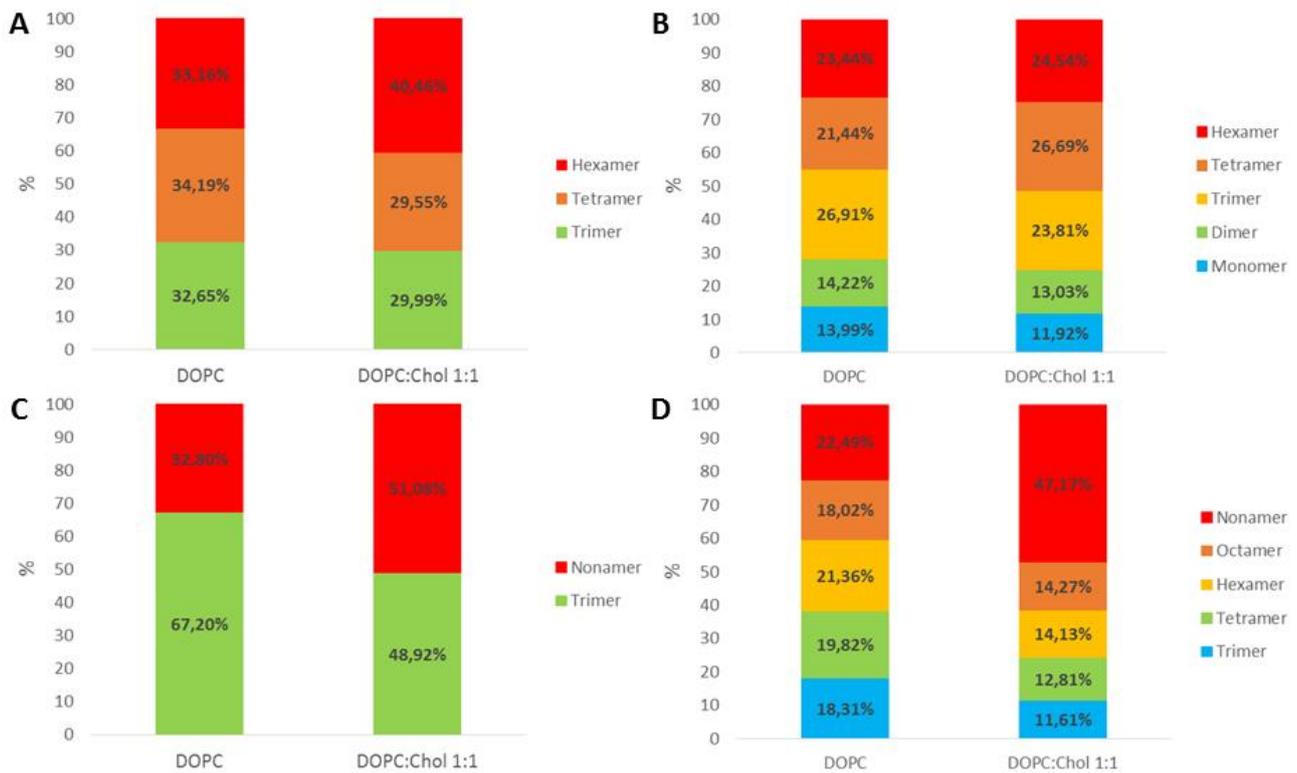
Tras conocer la unidad monomérica de ambas toxinas se pudo determinar que los procesos de autoasociación de la toxina salvaje ACT producen tres tipos de oligómeros: hexámeros (banda de 1219 kDa), tetrámero (correspondiente a la banda de 726 kDa) y trímero (banda de 557 kDa). Mientras tanto, en el caso del mutante PF los dos oligómeros observados corresponderían a nonámero (correspondiente a la banda de 1355 kDa) y trímero (banda nativa de 469 kDa).

Para determinar si el proceso de oligomerización es dependiente de la concentración de toxina se procedió al mismo análisis en condiciones nativas tras realizar incubaciones de 30 minutos con liposomas a una relación proteína:lípido de 1:2000. En la **figura 4.8A** se puede observar que a concentraciones más bajas la ACT es capaz de formar aparte de las estructuras mencionadas anteriormente (hexámero, tetrámero y trímero) dos estructuras oligoméricas nuevas correspondientes al dímero y al monómero. Por otra parte, en el caso del mutante PF se visualizaron también tres oligómeros adicionales, siendo estos correspondientes al octámero, tetrámero y tetrámero (**Figura 4.8B**).



**Figura 4.8: Estudio de la oligomerización de la ACT y el mutante PF en membranas de liposomas.** En la figura se representan las bandas de la toxina salvaje (A) y del mutante PF (B) marcadas con el anticuerpo 9D4 tras realizar una incubación durante 30 minutos a 37°C con liposomas de DOPC (A) o DOPC:Chol 1:1 (B) en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH8) a una relación proteína:lípido 1:2000 y separar los oligómeros en un gel BN-PAGE en gradiente de acrilamida 3-12%.

Para determinar la abundancia de cada oligómero se realizó un análisis densitométrico de las bandas resueltas por electroforesis nativa. Gracias a este análisis se determinó que en el caso de la ACT a concentraciones bajas la población de distintas estructuras oligoméricas es amplia (de monómero a hexámero), con proporciones relativas parecidas entre ellas aunque con una ligera tendencia a ser más abundantes los oligómeros de mayor tamaño molecular en presencia de colesterol (**Figura 4.9B**). Esta tendencia se ve fortalecida si se aumenta la concentración de toxina, desapareciendo en el proceso el monómero y el dímero en ambas composiciones lipídicas (**Figura 4.9A**). En el caso del mutante PF ocurre lo mismo, perdiendo los oligómeros intermedios (tetramero, hexámero y octámero) a medida que se aumenta la concentración de toxina de una relación proteína:lípido 1:2000 (**Figura 4.9D**) a 1:1000 (**Figura 4.9C**), indicando que quizás el trímero y el nonámero son las estructuras más estables de este mutante. Así mismo, la capacidad oligomerizadora del colesterol en este caso es más evidente, siendo el oligómero de mayor tamaño, es decir, el nonámero, la estructura más abundante al aumentar la concentración molar de este lípido. El análisis de estos datos indicarían una cooperación entre la concentración de toxina y la presencia de colesterol en la membrana que estimularía la oligomerización de la toxina, formando en el proceso estructuras de mayor tamaño molecular.



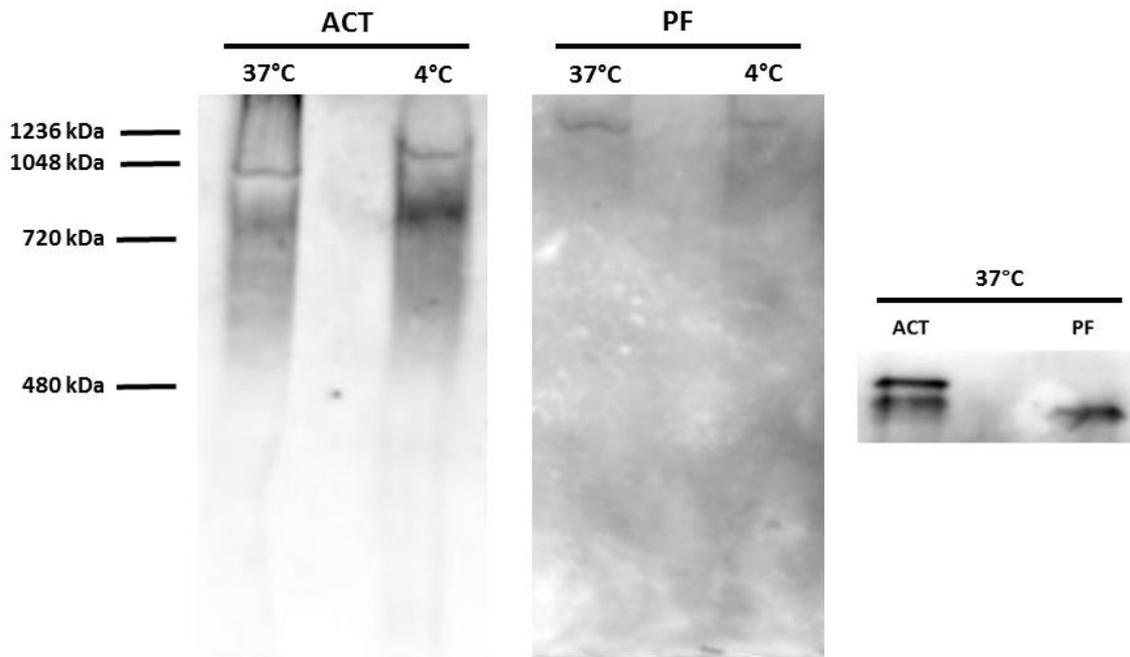
**Figura 4.9: Análisis densitométrico del grado de oligomerización de la ACT y el mutante PF en liposomas.** En la figura se representan en porcentajes la abundancia relativa de cada estructura oligomérica formadas tanto por la ACT y el mutante PF en liposomas de DOPC y DOPC:Chol 1:1 a una relación proteína:lípido 1:1000 (A y C) y 1:2000 (B y D).

#### 4.2.4. Estudio de la oligomerización de la ACT y el mutante PF en macrófagos J774A.1

Una vez establecido el grado de oligomerización en membranas modelo se procedió al estudio de los oligómeros en membranas de macrófagos J774A.1. Para ello se realizaron geles nativos de muestras en las que se incubaron las células con 20 nM de ACT o el mutante PF durante 5 minutos a 37°C por una parte e incubadas con las mismas concentraciones de toxina pero a 4°C durante 30 minutos para evitar la translocación y corte del dominio catalítico, debido a que este proceso solo ocurre a temperaturas superiores a 15°C (Rogel *et al*, 1992).

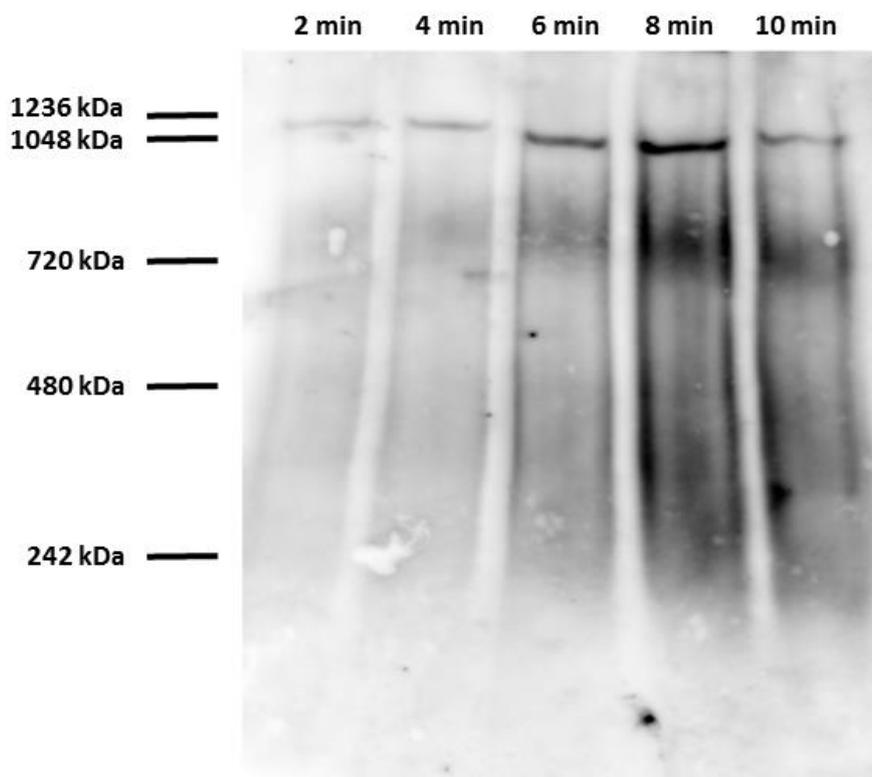
Las bandas obtenidas mediante BN-PAGE en las células tratadas con la toxina salvaje se observaron en ambas temperaturas de incubación una banda de alto tamaño molecular bien resuelta, así como una serie de bandas difusas de diferentes tamaños. Esta banda

bien resuelta tendría un tamaño aproximado de 992 kDa en el caso de las células incubadas a 37°C, siendo esta banda de 1146 kDa en las células incubadas a 4°C. En el caso del mutante PF, en cambio, se observa una única banda con un tamaño molecular de 1388 kDa aproximadamente tanto en células incubadas a 37°C como a 4°C. En el caso de las toxinas incubadas a 4°C los tamaños moleculares de la ACT y el mutante PF son de 200 kDa y 150 kDa aproximadamente. Teniendo en cuenta estos datos se puede determinar que la banda de mayor tamaño de la ACT correspondería a un hexámero, mientras que la banda del mutante concuerda con la masa molecular que tendría un nonámero. Estos datos, por tanto, coinciden con el grado de oligomerización observado en membranas modelo. La diferencia, por tanto, radica en los oligómeros obtenidos en las células incubadas a 37°C, en los que los procesos de translocación y corte producirían monómeros de diferente tamaño molecular. Para determinar si éste es el caso, se realizó un gel desnaturizante SDS-PAGE de las muestras de 37°C cargadas en la electroforesis nativa. Se pudo observar que mientras que en el caso del mutante se observa una única banda de 150 kDa, confirmando los cálculos realizados previamente, en la muestra de la ACT se observan dos bandas, una de 200 kDa y otra de aproximadamente 150 kDa. Estos datos indicarían que en el caso de la toxina salvaje los oligómeros podrían estar formados de una mezcla de monómeros procesados y sin procesar (**Figura 4.10**).



**Figura 4.10: Estudio de la oligomerización de la toxina salvaje ACT y el mutante PF en membranas de macrófagos J774A.1.** Por una parte se representan los oligómeros resueltos mediante un gel BN-PAGE en gradiente de acrilamida 3-12% combinado con una transferencia húmeda e incubación con el anticuerpo primario 9D4 en macrófagos J774A.1 incubados durante 5 minutos a 37°C con 35 nM de ACT y 20 nM de PF a 37°C y 4°C (izquierda), así como el análisis mediante electroforesis desnaturalizante de las muestras incubadas a 37°C (derecha).

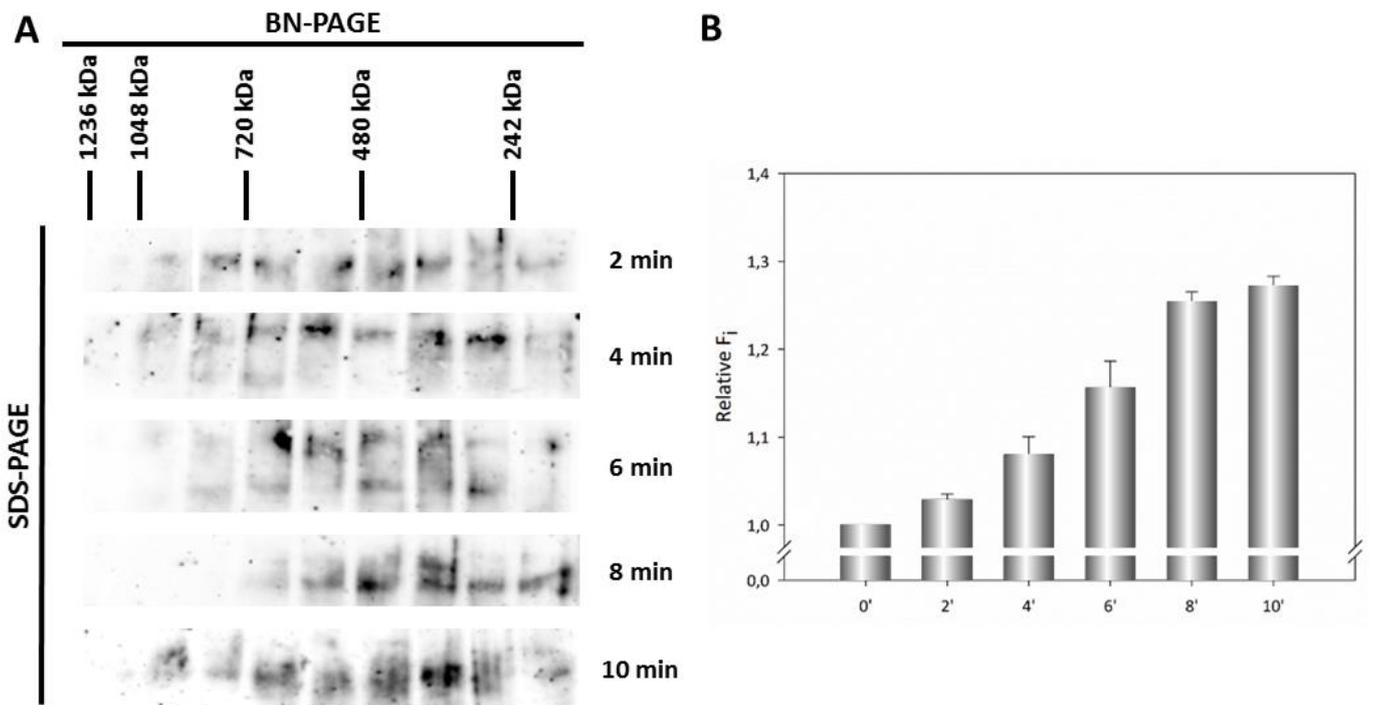
Tras la observación de los cambios de masa molecular de los oligómeros al incubar la ACT a diferentes temperaturas, se analizó si esos cambios también se observan al incubar la toxina salvaje con macrófagos a diferentes tiempos. En los datos obtenidos mediante electroforesis nativa se observó que las bandas de los oligómeros identificados por el anticuerpo primario 9D4 van disminuyendo de tamaño a medida que pasa el tiempo, tanto los oligómeros de mayor tamaño como las manchas de menor tamaño molecular. Adicionalmente, únicamente el oligómero de mayor tamaño molecular registrado a los 2-4 minutos de incubación tiene un tamaño molecular aproximado de 1200 kDa, el cual concuerda con el observado en la incubación de la ACT a 4°C (**Figura 4.11**). Estos datos podrían indicar un procesamiento de los monómeros presentes en los oligómeros a medida que pasa el tiempo, provocando mediante este proceso oligómeros de menor tamaño a medida que el dominio catalítico va translocándose y cortándose.



**Figura 4.11: Oligomerización de la ACT en macrófagos J774A.1 a diferentes tiempos de incubación.** Se incubaron células con 20 nM de ACT a 37°C a diferentes tiempos, muestras que tras su procesamiento se cargaron en un gel nativo BN-PAGE en gradiente de acrilamida 3-12%. La identificación de la toxina se realizó mediante *Western Blot* incubando la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo primario monoclonal 9D4.

Para confirmar esta hipótesis se cortaron las diferentes bandas de cada una de las incubaciones y se cargaron en un gel desnaturalizante SDS-PAGE, realizando una electroforesis 2D BN-PAGE/SDS-PAGE para determinar las unidades monoméricas de los oligómeros resueltos nativamente. En el análisis se observó que a los 2 minutos hay una única unidad monomérica para todos los oligómeros, siendo ésta de 200 kDa. Tras 4 minutos de incubación en los oligómeros de mayor tamaño empieza a visualizarse bandas de 150 kDa aproximadamente adicionales a las de 200 kDa, mientras que los oligómeros de menor tamaño mantienen únicamente la unidad monomérica de mayor tamaño. A los 6 minutos, en cambio, se empieza a observar en esos oligómeros de baja masa molecular el monómero procesado de 150 kDa, mientras que en los oligómeros de mayor tamaño no solo empieza a desaparecer el monómero original de 200 kDa siendo predominante el de 150 kDa, sino que incluso no se llega a identificar ninguno de

ellos. Por último, a los 8 minutos la banda procesada de 150 kDa es casi la única que se llega a resolver en todos los oligómeros, para a los 10 minutos ser éste el único que se identifica en todos los casos, a medida que las bandas monoméricas de los oligómeros de mayor tamaño siguen desapareciendo gradualmente (**Figura 4.12A**). El patrón de procesamiento de coincide con la permeabilización de las membranas de los macrófagos hacia el yoduro de propidio, indicando que la formación de un poro lítico ocurre a medida que se transloca y se corta el dominio catalítico (**Figura 4.12B**).

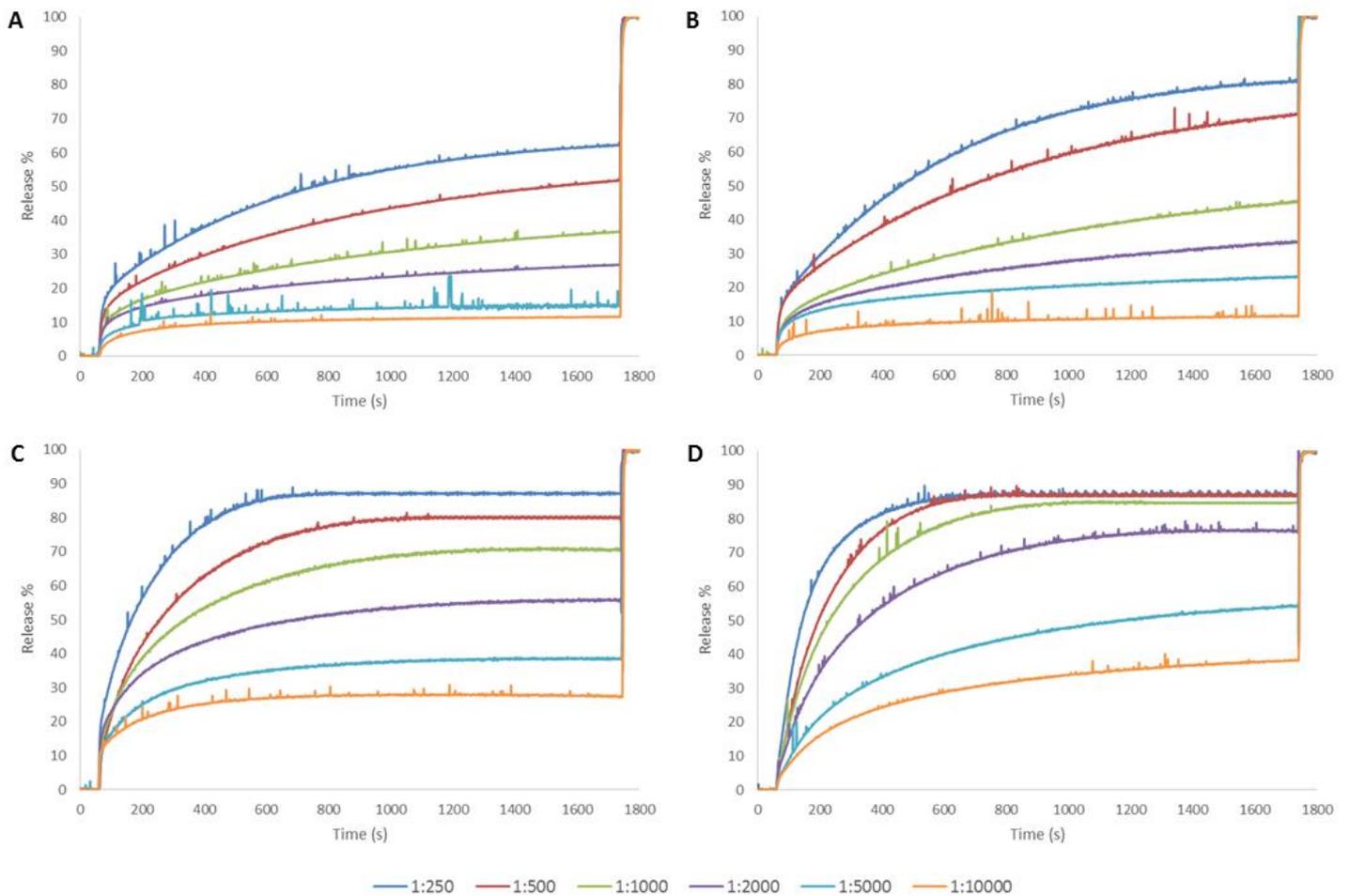


**Figura 4.12: Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE de los oligómeros producidos por la ACT en macrófagos J774A.1 a diferentes tiempos previamente resueltos por electroforesis nativa BN-PAGE.** Se recuperaron las bandas de proteína obtenidos mediante BN-PAGE en gradiente del 3 al 12% de acrilamida y se incubaron los trozos de gel con el buffer de carga y se corrieron en un gel SDS-PAGE de 8,5% de acrilamida. La identificación de las bandas se realizó mediante *Western Blot* incubando la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo monoclonal 9D4 (A). En paralelo, se realizó un ensayo de permeabilización mediante yoduro de propidio de macrófagos incubados a los mismos tiempos. En la imagen (B) se representan los datos relativos de fluorescencia obtenidos en cada condición respecto a células control (sin toxina).

#### **4.2.5. Análisis de la actividad formadora de poros producida por la toxina ACT y el mutante PF**

Tras determinar que en membranas con colesterol existe una mayor tendencia a unirse por parte de la toxina así como de una mayor tendencia a oligomerizarse, se pasó a estudiar la permeabilización de los poros producidos por la toxina adenilato ciclasa y el mutante PF en membranas modelo. Para ello se encapsularon solutos fluorescentes en liposomas de diferentes composiciones lipídicas, los cuales se incubaron a 37°C con diferentes concentraciones de toxina.

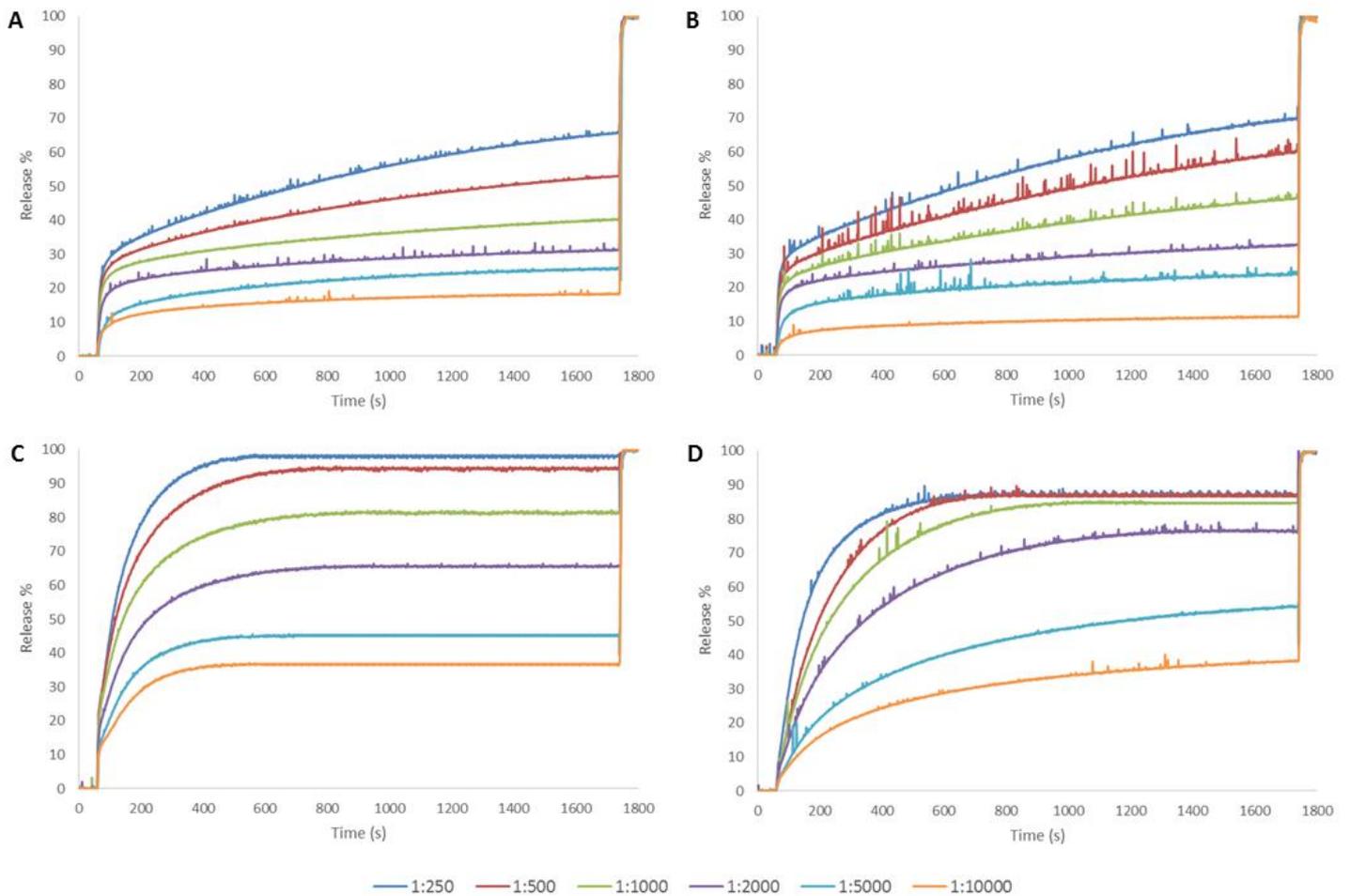
En el caso de la ACT se puede observar que a medida que se aumenta la proporción de colesterol a las membranas aumenta la liberación de ANTS/DPX. Así mismo, la cinética de la liberación de los solutos fluorescentes es más rápida cuanto más colesterol haya en las membranas. Por último, como era esperable, el grado de liberación de ambas moléculas es dependiente de la concentración incorpore a la mezcla, obteniendo valores mayores cuanto mayor cantidad de toxina se añada a las vesículas (**Figura 4.13**). Así mismo, observando los porcentajes de liberación finales tras media hora de incubación de los liposomas con la toxina se puede determinar que a partir de un 33% de concentración molar de colesterol en la bicapa lipídica (liposomas de DOPC:Chol 2:1) se observa un salto cualitativo en los valores de fluorescencia registrada respecto a los que contienen un 25% de este lípido (composición lipídica DOPC:Chol 3:1), obteniendo saturaciones a concentraciones cada más bajas a mayor presencia de colesterol en la membrana (**Figura 4.15A**).



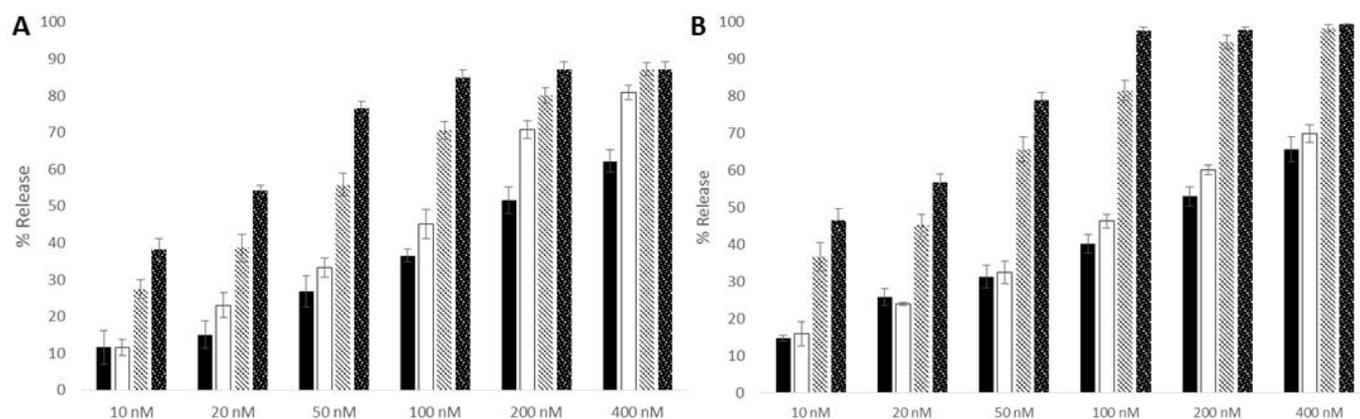
**Figura 4.13: Cinéticas de liberación de contenidos fluorescentes encapsulados en vesículas por parte de la toxina ACT.** Se incubaron 100  $\mu\text{M}$  de liposomas de las composiciones lipídicas DOPC (A), DOPC:Chol 3:1 (B), DOPC:Chol 2:1 (C) y DOPC:Chol 1:1 (D) con 400 nM (relación proteína:lípido 1:250), 200 nM (relación proteína:lípido 1:500), 100 nM (relación proteína:lípido 1:1000), 50 nM (relación proteína:lípido 1:2000), 20 nM (relación proteína:lípido 1:5000) o 10 nM (relación proteína:lípido 1:10000) de ACT en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH8) a 37°C en constante agitación. La liberación de ANTS se cuantificó en un espectrofluorímetro *Fluorolog-3*, excitando la muestra a 360 nm y recogiendo la emisión a 520 nm, con ambos monocromadores fijados a 5 nm. La toxina se añadió a los 60 segundos de comenzar la cinética, mientras que el Tritón X-100 0,1% se añadió durante los últimos 60 segundos.

En los liposomas incubados con el mutante PF se observó al igual que con la ACT que el colesterol favorece la liberación de contenidos fluorescentes, a pesar de que la liberación es mayor que con la toxina salvaje. Así mismo, a diferencia de la ACT, el mutante PF presenta en los liposomas de DOPC y DOPC:Chol 2:1 unas cinéticas en las que la mayor parte de los solutos fluorescentes se liberan durante los primeros minutos

de la cinética, saturándose los registros de fluorescencia rápidamente, mientras que en el caso de la toxina salvaje la liberación era más gradual tras un pequeño incremento rápido durante los primeros segundos. Por encima de un 33% de colesterol presente en la membrana, en cambio, los perfiles de las cinéticas y los porcentajes de liberación no difieren mucho de los observados en las cinéticas de la ACT (**Figura 4.14**). Al igual que ocurría en el caso de la toxina salvaje los porcentajes de liberación son dependientes de la concentración de proteína añadida a los liposomas, así como la mayor presencia de colesterol en la membrana de los liposomas favorece la liberación de contenidos fluorescentes, saturándose con mayor rapidez a bajas concentraciones de PF. En casi la totalidad de todas las condiciones estudiadas el mutante PF presenta unos valores de liberación mayores que la ACT, salvo en el caso de concentraciones altas de toxinas en la composición lipídica DOPC:Chol 3:1, donde la toxina salvaje supera los valores obtenidos por el mutante, y en concentraciones bajas de ambas toxinas en liposomas de DOPC, donde no existen diferencias significativas entre ellas (**Figura 4.15B**).

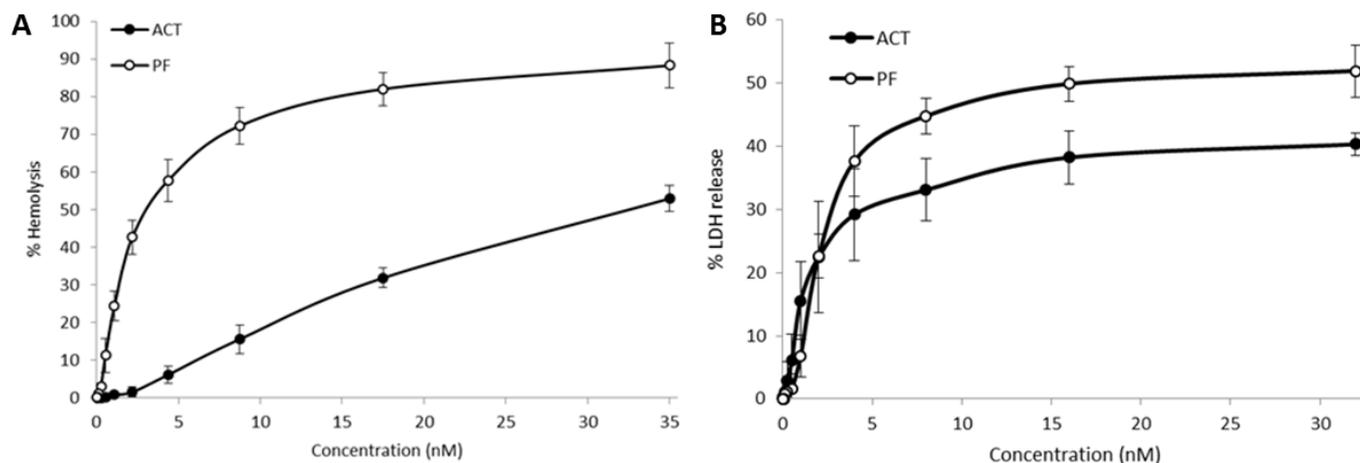


**Figura 4.14: Cinéticas de liberación de contenidos fluorescentes encapsulados en vesículas por parte de la toxina PF.** Se incubaron 100  $\mu\text{M}$  de liposomas de las composiciones lipídicas DOPC (A), DOPC:Chol 3:1 (B), DOPC:Chol 2:1 (C) y DOPC:Chol 1:1 (D) con 400 nM (relación proteína:lípido 1:250), 200 nM (relación proteína:lípido 1:500), 100 nM (relación proteína:lípido 1:1000), 50 nM (relación proteína:lípido 1:2000), 20 nM (relación proteína:lípido 1:5000) o 10 nM (relación proteína:lípido 1:10000) de PF en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH8) a 37°C en constante agitación. La liberación de ANTS se cuantificó en un espectrofluorímetro Fluorolog-3, excitando la muestra a 360 nm y recogiendo la emisión a 520 nm, con ambos monocromadores fijados a 5 nm. La toxina se añadió a los 60 segundos de comenzar la cinética, mientras que el Tritón X-100 0,1% se añadió durante los últimos 60 segundos.



**Figura 4.15: Comparación de los porcentajes finales de liberación de la toxina salvaje ACT y el mutante PF en liposomas de diferentes composiciones lipídicas.** En la figura se representan los valores de liberación de la sonda fluorescente ANTS por parte de diferentes concentraciones de ACT (A) y PF (B) tras una incubación de 30 minutos a 37°C en constante agitación.

Por último se estudió si esa mayor capacidad lítica del mutante PF respecto a la ACT era trasladable a células. Para ello se realizó por una parte un ensayo de hemólisis con eritrocitos de carnero y otra un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en macrófagos J774A.1. En el primero de los casos en todo el rango de concentraciones se observó una mayor capacidad lítica de la PF respecto a la mostrada por la toxina salvaje (**Figura 4.16A**). En el caso de los ensayos de citotoxicidad, en cambio, se observó una mayor liberación de LDH por parte de la PF a concentraciones bajas, mientras que a altas la ACT demuestra una mayor liberación de esta enzima (**Figura 4.16B**). En este caso puede deberse a que a altas concentraciones en el caso de la toxina salvaje existe una sinergia entre la capacidad formadora de poros y la toxicidad producida por la conversión de ATP en cAMP, obteniendo valores más altos de citotoxicidad. Por tanto, se puede concluir que el mutante PF posee una mayor actividad lítica tanto en membranas modelo como en células.



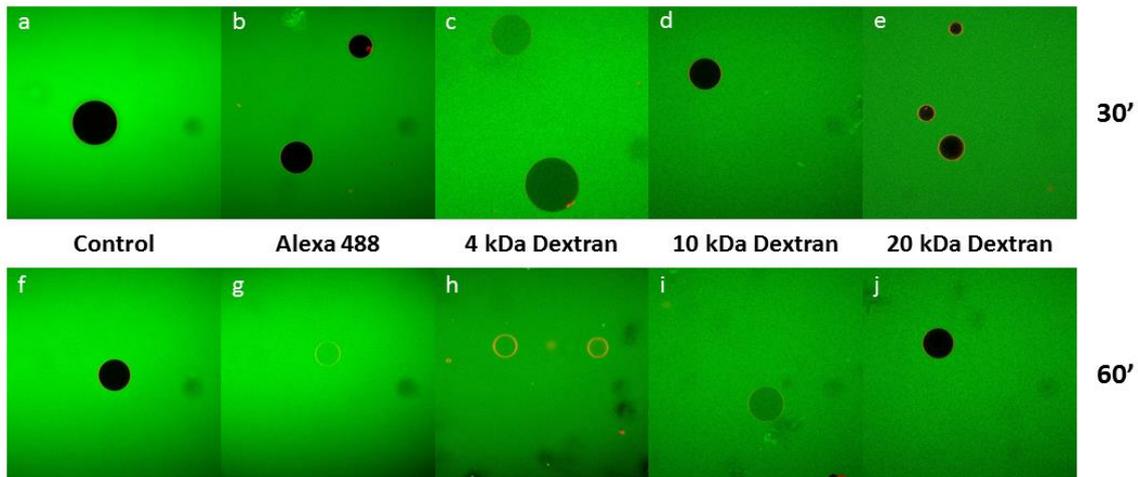
**Figura 4.16: Determinación de la capacidad lítica de la ACT y el mutante PF en células.** En la imagen se representa por una parte los porcentajes de hemólisis tras incubar eritrocitos de carnero con diluciones seriadas 1:2 de ambas toxinas durante 4,5 h a 37°C en constante agitación (A), mientras que por otra parte se representan los porcentajes de liberación de LDH de macrófagos J744A.1 incubados con diluciones seriadas 1:2 de ambas toxinas durante 2 horas a 37°C (B).

#### 4.2.6. Determinación del diámetro de los poros formados por la ACT y el mutante PF en vesículas unilamelares gigantes (GUV) mediante microscopía confocal

Para investigar en detalle el mecanismo de formación de poros por parte de ambas toxinas se utilizó la metodología de vesículas unilamelares gigantes, la cual consiste en cuantificar la permeabilización provocada por la toxina hacia sondas de diferentes diámetros hidrodinámicos. Para ello se incubaron vesículas unilamelares gigantes (GUVs) marcadas con *rhodamine-PE* al 0,5% de concentración molar con 200 nM de ACT o PF a temperatura ambiente, observando la permeabilización tras 30 y 60 minutos de incubación mediante microscopía confocal.

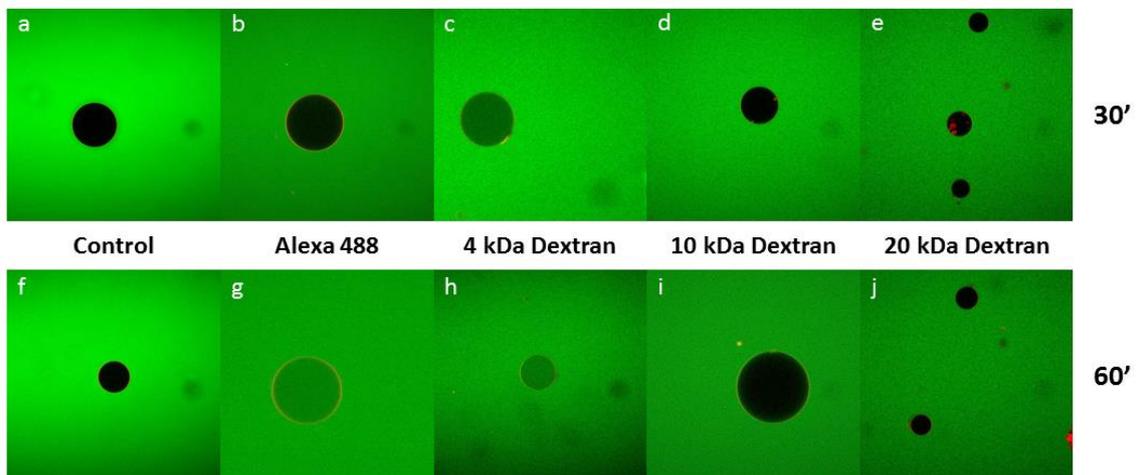
En las vesículas gigantes control (sin toxina) se pudo observar una falta de señal de fluorescencia tanto a los 30 minutos como a la hora, indicando que las vesículas son impermeables a las sondas (**Figuras 4.17a y 4.17f**). En el caso de los GUVs incubados con ACT, tras 30 minutos se observó una baja o nula permeabilización de las vesículas hacia todas las sondas probadas (**Figuras 4.17b-e**), aunque tras 60 minutos de incubación se observaron diferentes grados de permeabilización hacia las sondas fluorescentes *Alexa*

488, 4 kDa Dextran y 10 kDa Dextran (Figuras 4.17g-i), manteniéndose impermeables hacia la sonda 20 kDa Dextran (Figura 4.17j).



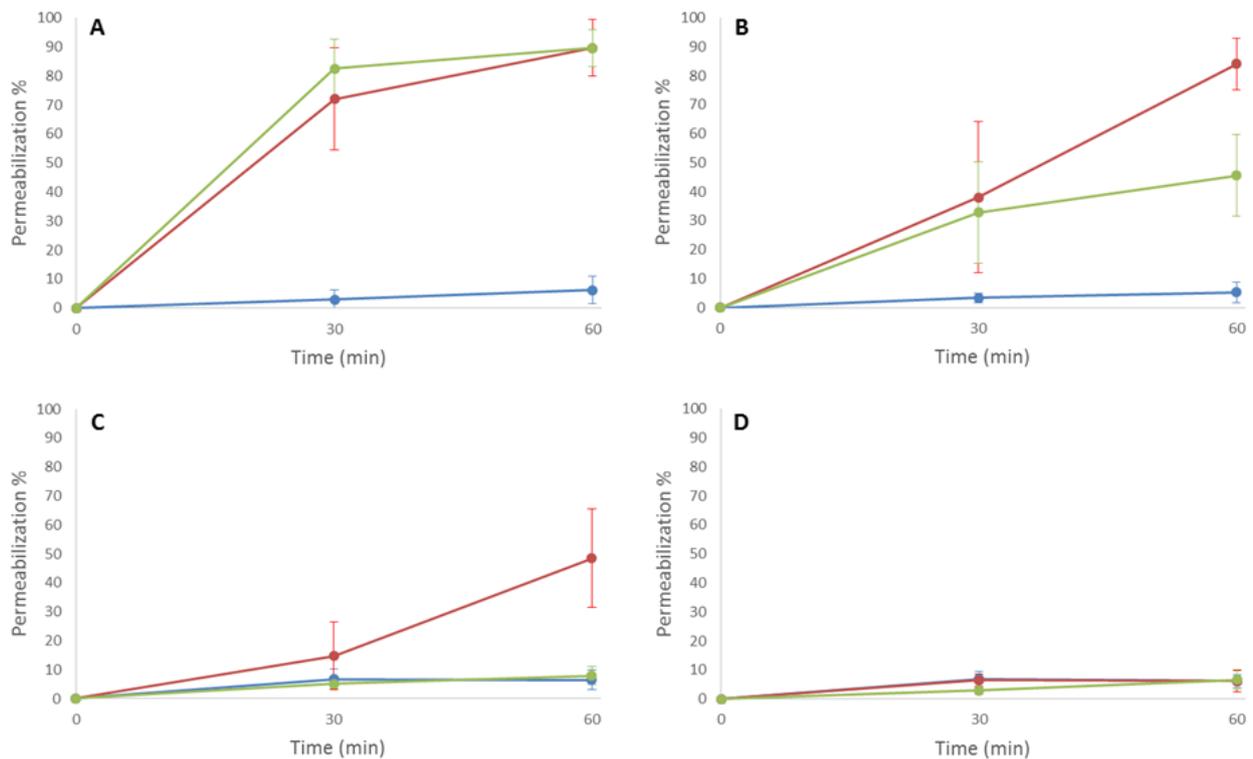
**Figura 4.17: Efecto de la ACT en la permeabilización de vesículas unilamelares gigantes de DOPC hacia diferentes sondas fluorescentes.** Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal *Nikon Eclipse TE-2000* a los 30 y a los 60 minutos tras incubar los GUVs de DOPC marcados con un 0,5% de concentración molar de *rhodamine-PE* (en rojo) en ausencia (a y f) o presencia de 200 nM de ACT a temperatura ambiente en presencia de las sonda fluorescentes (en verde) *Alexa 488* (b y g), 4 kDa Dextran (c y h), 10 kDa Dextran (d y i) y 20 kDa Dextran (e y j).

En las vesículas incubadas con el mutante formador de poros se observaron datos parecidos, es decir, una baja permeabilización hacia todas las sondas fluorescentes probadas tras 30 minutos de incubación (Figuras 4.18b-e), visualizando tras una hora un grado variable de sonda internalizada hacia el *Alexa 488* y 10 kDa Dextran (Figuras 4.18g-h), pero no hacia las sondas 10 kDa Dextran y 20 kDa Dextran (Figuras 4.18i-j).



**Figura 4.18: Efecto del mutante PF en la permeabilización de vesículas unilamelares gigantes de DOPC hacia diferentes sondas fluorescentes.** Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal *Nikon Eclipse TE-2000* a los 30 y a los 60 minutos tras incubar los GUVs de DOPC marcados con un 0,5% de concentración molar de *rhodamine-PE* (en rojo) en ausencia (a y f) o presencia de 200 nM de PF a temperatura ambiente en presencia de las sonda fluorescentes (en verde) *Alexa 488* (b y g), *4 kDa Dextran* (c y h), *10 kDa Dextran* (d y i) y *20 kDa Dextran* (e y j).

Para confirmar el análisis visual de los datos de permeabilización de las vesículas de DOPC frente a ambas toxinas se calcularon los porcentajes de permeabilización medios para cada una de las sondas en las condiciones probadas. Se observó que la sonda fluorescente *Alexa 488* presenta una rápida permeabilización en GUVs incubados tanto con ACT como por el mutante PF. En el otro extremo, los controles libres de toxina, las vesículas incubadas con la toxina salvaje en presencia de *FITC-20 kDa Dextran* y los GUVs incubados con el mutante PF con *FITC-10 kDa Dextran* y *FITC-20 kDa Dextran* se obtuvieron porcentajes cercanos al 0% de permeabilización. En el resto de condiciones, en cambio, los porcentajes de permeabilización se encuentran en valores intermedios, presentando unos porcentajes de liberación con un ascenso gradual en el tiempo (**Figura 4.19**).



**Figura 4.19: Porcentajes medios de permeabilización de vesículas unilamelares grandes de DOPC.** En esta gráfica se representan los porcentajes de permeabilización de GUVs libres de toxina (azul), incubados con 200 nM de ACT (línea roja) o 200 nM del mutante PF (línea verde) hacia las sondas fluorescentes *Alexa 488* (A), *FITC-4 kDa Dextran* (B), *FITC-10 kDa Dextran* (C) y *FITC-20 kDa Dextran* (D). Los porcentajes se determinaron respecto a los datos obtenidos tras 30 minutos y 60 minutos de incubación de la mezcla a temperatura ambiente.

Dado que en la anterior gráfica existe una gran variabilidad en los porcentajes de permeabilización obtenidos, se realizó un análisis clasificando los GUVs por su grado de permeabilización agrupándolos en rangos de 10% de permeabilización. Los resultados se pueden observar en la **figura 4.20**, observando que a los 30 minutos la ACT presenta una alta permeabilización hacia la sonda *Alexa 488*, valores que se amplían tras una hora de incubación. Para la sonda *FITC-4 kDa Dextran*, en cambio, los GUVs se agrupan en torno a un rango de porcentajes de permeabilización bastante amplio (del 0 al 50% de permeabilización) tras 30 minutos de incubación, rango que se desplaza hacia valores altos pasados 60 minutos tras la adición de la toxina. En el caso de la sonda *FITC-10 kDa Dextran*, a la media hora de incubación los GUVs se concentraron en los rangos de porcentajes no superiores al 30%, mientras que tras 60 minutos de incubación los valores subieron ligeramente, agrupándose la mayor parte de ellos en un rango amplio

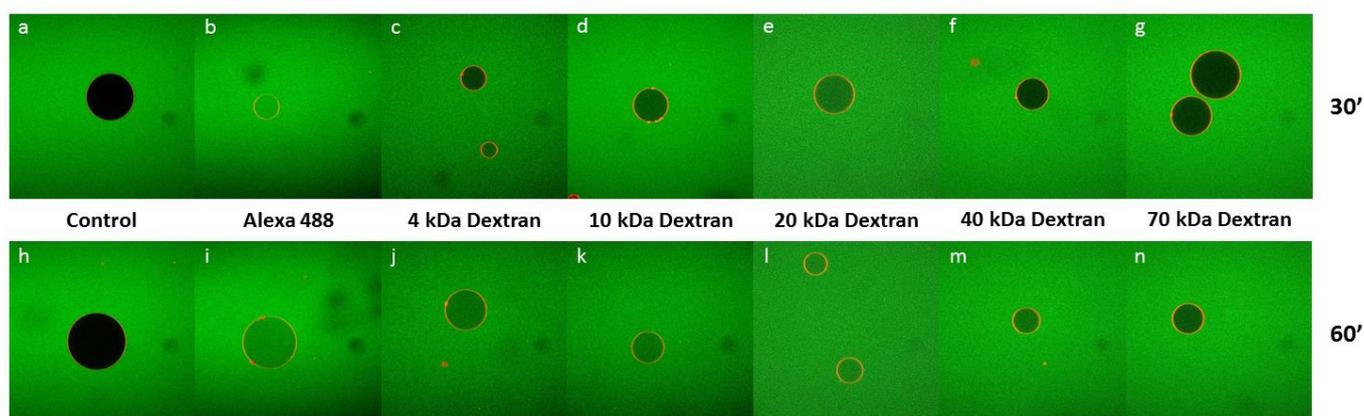
que va del 30 al 60%. Por último, tal y como se pudo apreciar en las imágenes, en ninguno de los tiempos la ACT forma poros de un diámetro suficiente como para permitir el paso de la sonda *FITC-20 kDa Dextran* (**Figura 4.20B**). Los GUVs permeabilizados por el mutante PF en presencia de la sonda *Alexa 488*, en cambio, se agrupan en el rango superior de porcentajes de permeabilización por encima del 50%, superando el 80% tras 60 minutos de incubación. En el caso de la sonda *FITC-4 kDa Dextran* los porcentajes se reducen en torno al 30-40% a los 30 minutos de incubación, mientras que 60 minutos tras la adición de la PF los valores no sufren grandes alteraciones. Por último, los GUVs permeabilizados por el mutante PF, no permitieron el paso ni de la sonda *FITC-10 kDa Dextran* ni *FITC-20 kDa Dextran*, sin sobrepasar en ninguno de los casos valores superiores al 10% (**Figura 4.20C**). Para terminar, los GUVs libres de toxina no mostraron permeabilización respecto a ninguna de las sondas en ninguno de los casos (**Figura 4.20A**).



**Figura 4.20: Distribución de las permeabilizaciones de las vesículas unilamelares grandes de DOPC hacia sondas fluorescentes de diferentes tamaños.** En este gráfico se representa el porcentaje de GUVs totales respecto al porcentaje de permeabilización obtenido en intervalos de 10% de permeabilización para GUVs libres de toxina (A), incubados con 200 nM de ACT (B) o con 200 nM de PF (C) a temperatura ambiente con sondas fluorescentes de diferentes diámetros hidrodinámicos.

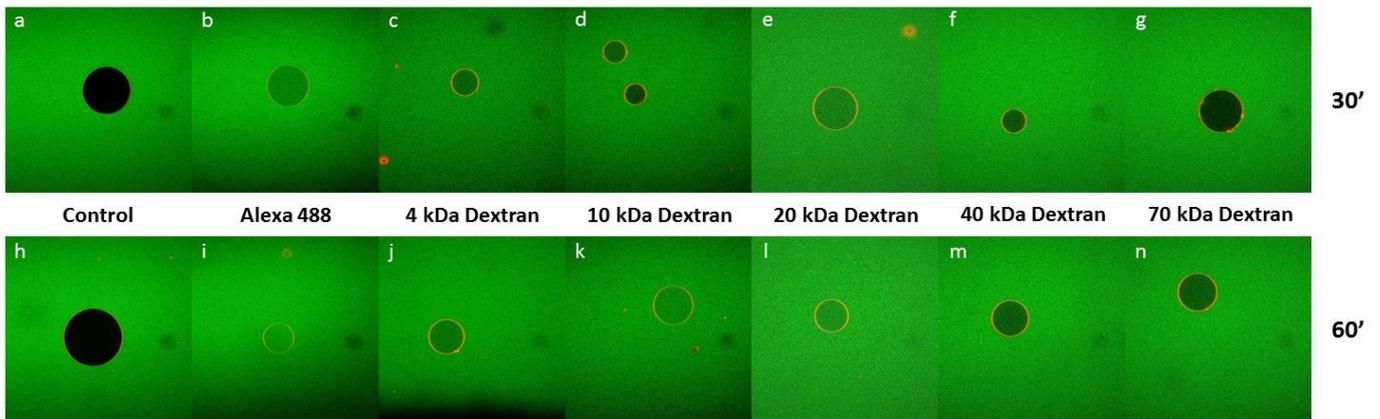
Tras el análisis de la permeabilización de los GUVs de DOPC puro por parte de ambas toxinas se procedió a realizar el mismo estudio en vesículas de DOPC:Chol a una relación molar 1:1. Al igual que con las vesículas de DOPC, no se observó permeabilización hacia ninguna de las sondas en ninguno de los tiempos estudiados (**Figuras 4.21A y 4.21h**). En el caso de la ACT la permeabilización provocada en las vesículas hacia las sondas con un

radio hidrodinámico pequeño fue más alta tras 30 minutos que en el caso de las vesículas de DOPC, pero no solo hacia las sondas estudiadas previamente, sino también permitiendo cierto grado de permeabilización hacia sondas mayores, como *20 kDa Dextran* y *40 kDa Dextran*. Así mismo, la permeabilización sigue una correlación respecto al tamaño de las sondas utilizadas (**Figuras 4.21b-g**). Esta tendencia hacia el paso de sondas de mayor diámetro respecto a los GUVs de DOPC puro se confirmó tras analizar la permeabilización de las vesículas tras 60 minutos de incubación, permitiendo incluso el paso de *70 kDa Dextran* (**Figuras 4.21i-n**). Estos datos indicarían que la ACT es capaz de formar poros de un tamaño mayor en composiciones lipídicas con colesterol, permitiendo el paso de sondas con un diámetro hidrodinámico mayor y una permeabilización más rápida a las de menor tamaño.



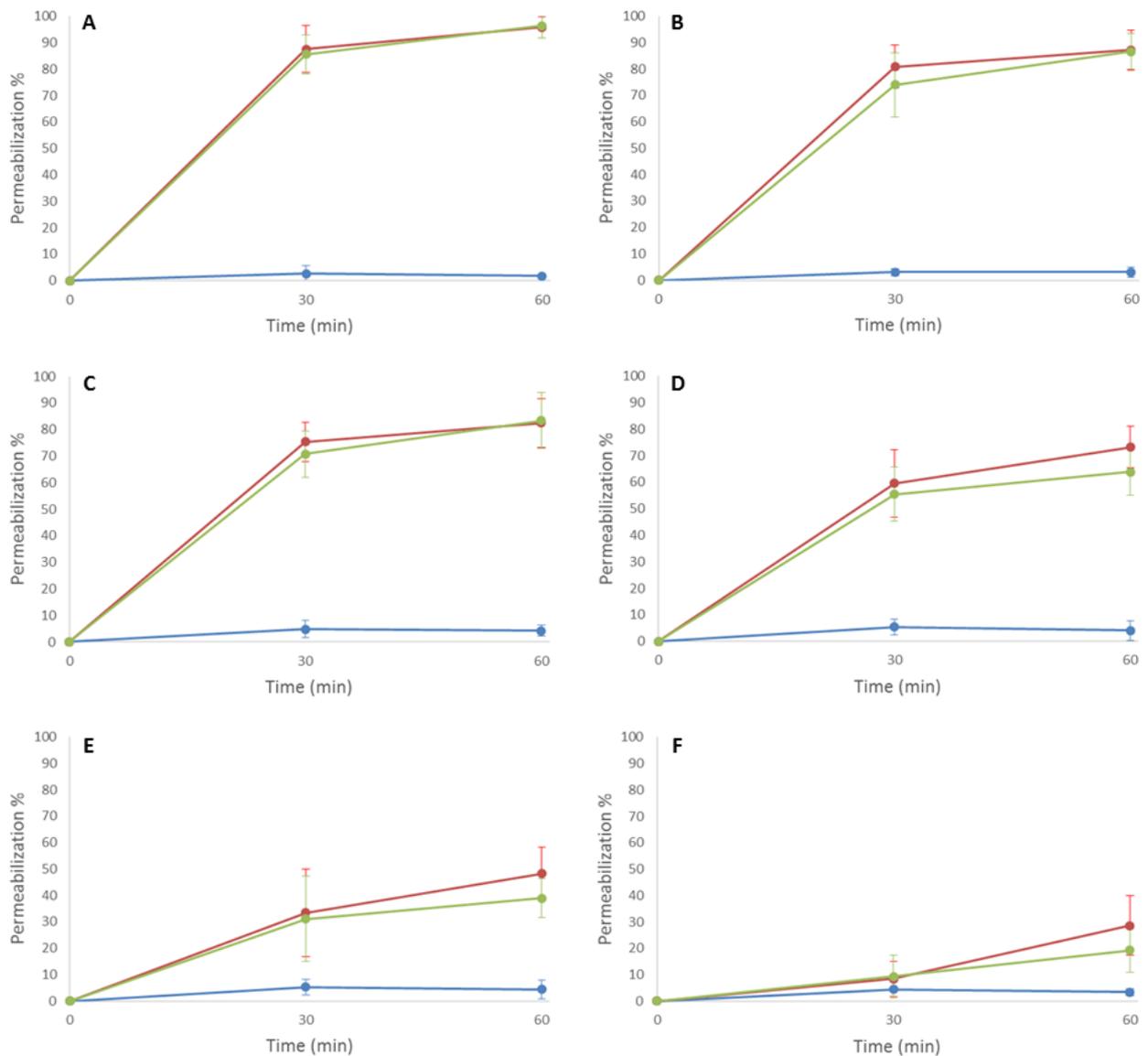
**Figura 4.21: Efecto de la ACT en la permeabilización de vesículas unilamelares gigantes de DOPC:Chol 1:1 hacia diferentes sondas fluorescentes.** Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal *Nikon Eclipse TE-2000* a los 30 y a los 60 minutos tras incubar los GUVs de DOPC:Chol 1:1 marcados con un 0,5% de concentración molar de *rhodamine-PE* (en rojo) en ausencia (a y h) o presencia de 200 nM de ACT a temperatura ambiente en presencia de las sondas fluorescentes (en verde) *Alexa 488* (b y i), *4 kDa Dextran* (c y j), *10 kDa Dextran* (d y k), *20 kDa Dextran* (e y l), *40 kDa Dextran* (f y m) y *70 kDa Dextran* (g y n).

Para ver si esta mayor permeabilización, no solo en cantidad sino también en tamaño, se traslada al mutante PF se realizaron las mismas incubaciones en las mismas condiciones. Tras 30 minutos de incubación no solo se observó la misma tendencia observada en la toxina salvaje (**Figuras 4.22b-g**), sino también a la hora tras la adición del mutante formador de poros a las vesículas (**Figuras 4.22i-n**), confirmando la creación de poros con un mayor diámetro en DOPC:Chol 1:1 respecto a DOPC.



**Figura 4.22: Efecto del mutante en la permeabilización de vesículas unilamelares gigantes de DOPC:Chol 1:1 hacia diferentes sondas fluorescentes.** Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal *Nikon Eclipse TE-2000* a los 30 y a los 60 minutos tras incubar los GUVs de DOPC:Chol 1:1 marcados con un 0,5% de concentración molar de *rhodamine-PE* (en rojo) en ausencia (a y h) o presencia de 200 nM de PF a temperatura ambiente en presencia de la sonda fluorescentes (en verde) *Alexa 488* (b y i), *4 kDa Dextran* (c y j), *10 kDa Dextran* (d y k), *20 kDa Dextran* (e y l), *40 kDa Dextran* (f y m) y *70 kDa Dextran* (g y n).

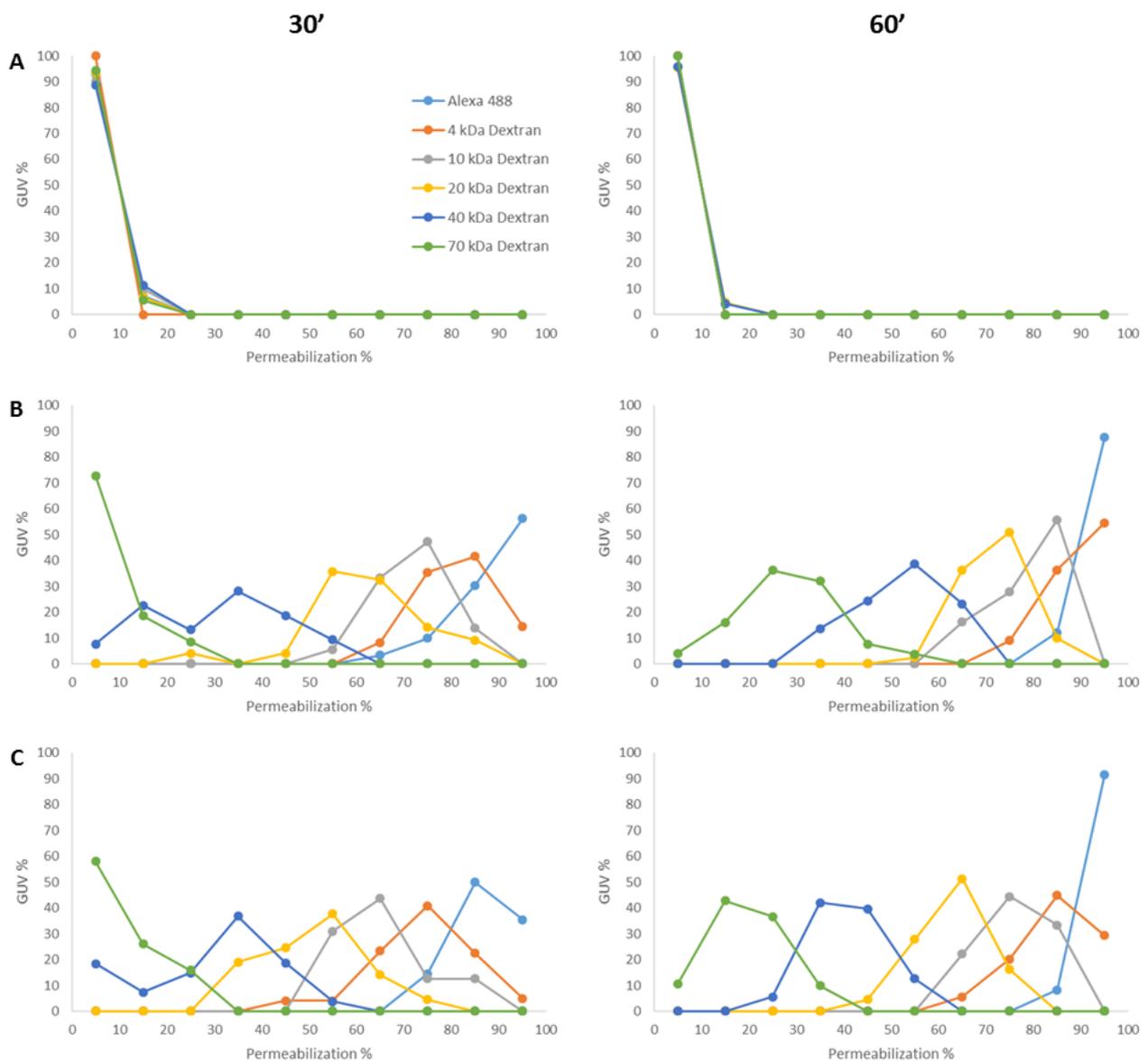
Al analizar los valores de permeabilización medios para cada una de las condiciones se puede observar que la permeabilización de las diferentes sondas utilizadas sigue una cinética en la que la mayor parte del efecto se produce tras 30 minutos de incubación, manteniéndose o aumentando ligeramente la permeabilización tras una hora de incubación. Este patrón de permeabilización se asemeja al determinado en los experimentos de liberación de contenidos fluorescentes encapsulados en liposomas de la misma composición lipídica, en los que la mayor parte de la liberación de ANTS/DPX se daba en los primeros segundos de la cinética. En cambio, a medida que el diámetro hidrodinámico de las sondas aumenta, los valores de permeabilización siguen una cinética más gradual respecto al tiempo, tal y como se observa en los valores obtenidos en las sondas *FITC-40 kDa Dextran* y *FITC-70 kDa Dextran* para ambas toxinas (**Figura 4.23**). A diferencia de los valores de permeabilización así como del diámetro de los poros producidos en membranas modelo obtenidos en los liposomas de DOPC, en los que existían diferencias entre la ACT y el mutante PF, en este caso no existen diferencias significativas entre ambas toxinas, comportándose de la misma manera en bicapas con la composición lipídica DOPC:Chol 1:1.



**Figura 4.23: Porcentajes de permeabilización de vesículas unilamelares grandes de DOPC:Chol 1:1.** En esta gráfica se representan los porcentajes de permeabilización de GUVs libres de toxina (azul), incubados con 200 nM de ACT (línea roja) o 200 nM del mutante PF (línea verde) hacia las sondas fluorescentes *Alexa 488* (A), *FITC-4 kDa Dextran* (B), *FITC-10 kDa Dextran* (C), *FITC-20 kDa Dextran* (D), *FITC-40 kDa Dextran* (E) y *FITC-70 kDa Dextran* (F). Los porcentajes se determinaron respecto a los datos obtenidos tras 30 minutos y 60 minutos de incubación de la mezcla a temperatura ambiente.

Al igual que con los GUVs de DOPC, dada la alta variabilidad entre los porcentajes de permeabilización obtenidos para cada una de las condiciones, tras el análisis de los valores medios para cada condición se estudió la distribución de las vesículas unilamelares gigantes respecto a sus valores de permeabilización. Durante el análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de las vesículas control no se

apreció rastro de sonda fluorescente en el interior de ellas, así que, como era esperable, la totalidad de los GUVs tanto a 30 minutos y a 60 minutos de incubación se concentraron en valores por debajo del 10% (**Figura 4.24A**). En el caso de la ACT (**Figura 4.24B**) y el mutante PF (**Figura 4.24C**) se observa que a los 30 minutos de incubación la permeabilización de las vesículas se concentra en porcentajes superiores al 50% para todas las sondas excepto para los dextranos de 40 kDa y los de 70 kDa, los cuales se posicionan en torno al 30% y al 10% respectivamente. A los 60 minutos tras la adición de la toxina, los valores de todas las condiciones se desplazan hacia porcentajes de permeabilización mayores, tal y como se observaba en los datos obtenidos en los GUVs de DOPC.

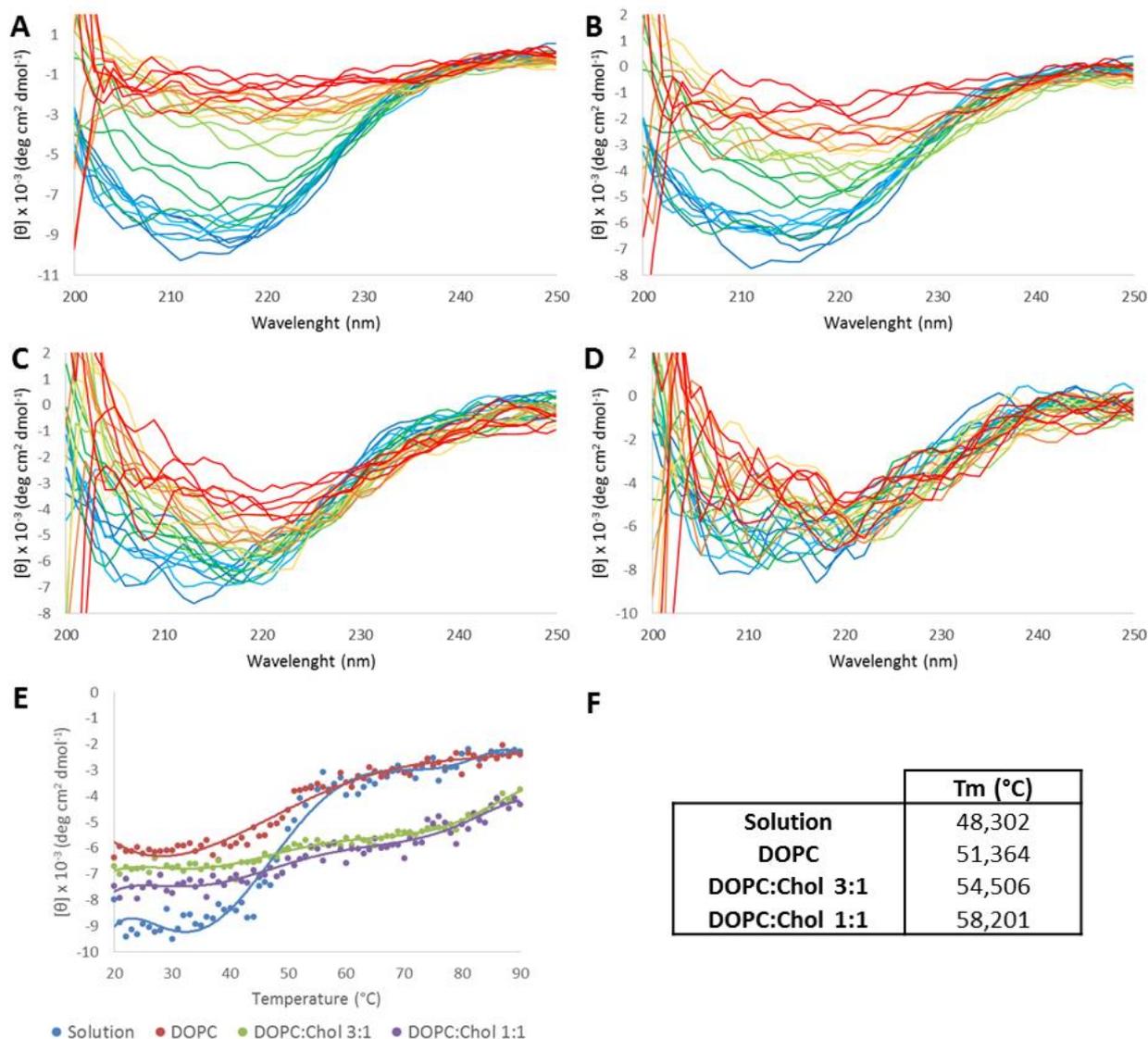


**Figura 4.24: Distribución de las permeabilizaciones de las vesículas unilamelares grandes de DOPC:Chol 1:1 hacia las sondas fluorescentes de distintos tamaños.** En este gráfico se representa el porcentaje de GUVs totales respecto al porcentaje de permeabilización obtenido en intervalos de 10% de permeabilización para GUVs libres de toxina (A), incubados con 200 nM de ACT (B) o con 200 nM de PF (C) a temperatura ambiente con sondas fluorescentes de diferentes diámetros hidrodinámicos.

#### 4.2.7. Análisis de la estabilidad de la ACT y el mutante PF en membranas modelo

Analizando los datos recogidos hasta este momento se especuló que las diferencias en la actividad lítica y el tamaño del poro de la toxina adenilato ciclasa en diferentes composiciones lipídicas pueda deberse a la adopción de diferentes conformaciones en la bicapa lipídica. Para ello, se procedió a estudiar si ambas toxinas producen estructuras con una mayor o menor estabilidad dependiente del entorno lipídico que las rodean.

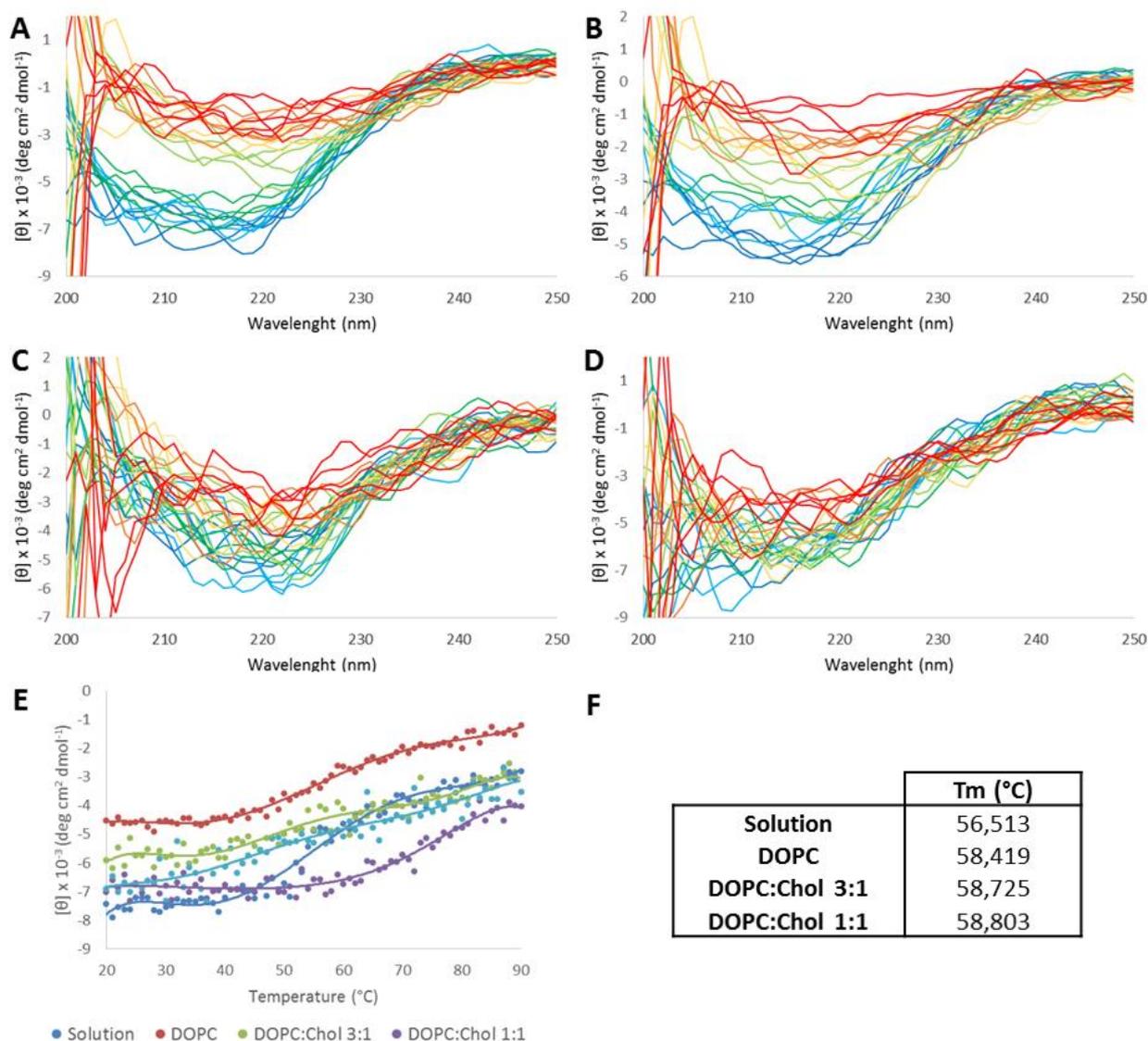
Primero se comprobó si la estabilidad térmica de la toxina adenilato ciclasa se ve alterada según la composición lipídica de la que esté rodeada mediante el análisis de su estructura secundaria por dicroísmo circular (CD). Para ello se crearon proteoliposomas incubando 500 nM de ACT con 250  $\mu$ M de liposomas de diferentes composiciones lipídicas y se realizaron diversos espectros aumentando la temperatura en un rango de temperatura de 20°C a 90°C. En la **figura 4.25** se puede observar que la pérdida de estructura secundaria es importante cuando la toxina se encuentra en solución, pérdida que se minimiza una vez se inserta en membranas lipídicas. Aun así, existen diferencias significativas en el mantenimiento de la estructura secundaria dependiendo del entorno lipídico, dado que a medida que se aumenta el porcentaje de colesterol en la membrana la estabilidad de la estructura secundaria de la proteína frente al aumento de la temperatura es mayor, llegando a ser es pérdida mínima en proteoliposomas de DOPC:Chol 1:1. Analizando las curvas de estabilidad (**Figura 4.25E**) y las temperaturas medias (**Figura 4.25F**) se puede observar que la temperatura media se incrementa de 48,3°C en solución a 51,3°C en liposomas de DOPC, sugiriendo que la unión de la toxina a la bicapa lipídica se traduce en una mayor protección a la desnaturalización térmica. Adicionalmente, esa protección se ve favorecida a medida que se aumenta la concentración de colesterol en la membrana, llegando a valores de 56,03°C con un 50% de concentración molar de este lípido.



**Figura 4.25: Análisis mediante dicroísmo circular (CD) de la estabilidad térmica de la ACT en liposomas de diferentes composiciones lipídicas.** En esta figura por una parte se representan de azul oscuro a rojo espectros recogidos cada 2,5°C en un rango de temperatura de 20°C a 90°C en un espectropolarímetro *JASCO J-810 Spectropolarimeter* de proteoliposomas obtenidos tras una incubación de 30 minutos a 37°C en constante agitación de 500 nM de ACT en solución (A) o con 250 µM de liposomas de DOPC (B), DOPC:Chol 3:1 (C) y DOPC:Chol 1:1 (D) en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH8). Por otra parte se representan las curvas de transición del estado nativo al estado desnaturado de la ACT en las diferentes condiciones analizadas (E), así como las temperaturas medias de las curvas de transición (T<sub>m</sub>) (F).

Un comportamiento parecido se observó para el mutante formador de poros PF al incubar la proteína en liposomas de diferentes composiciones lipídicas, dado que la estabilidad de la estructura secundaria del mutante aumenta a medida que se aumenta

el porcentaje de colesterol en la membrana, siendo en solución la condición en la que está más expuesta a la desnaturalización producida por el aumento de la temperatura. Aun así, este aumento de la protección no es tan evidente ni brusca dado que el aumento de protección solo es de 2°C (de 56°C a 58°C), mientras que entre las diferentes composiciones lipídicas las temperaturas medias se mantienen estables en torno a los 58°C (**Figura 4.26**).

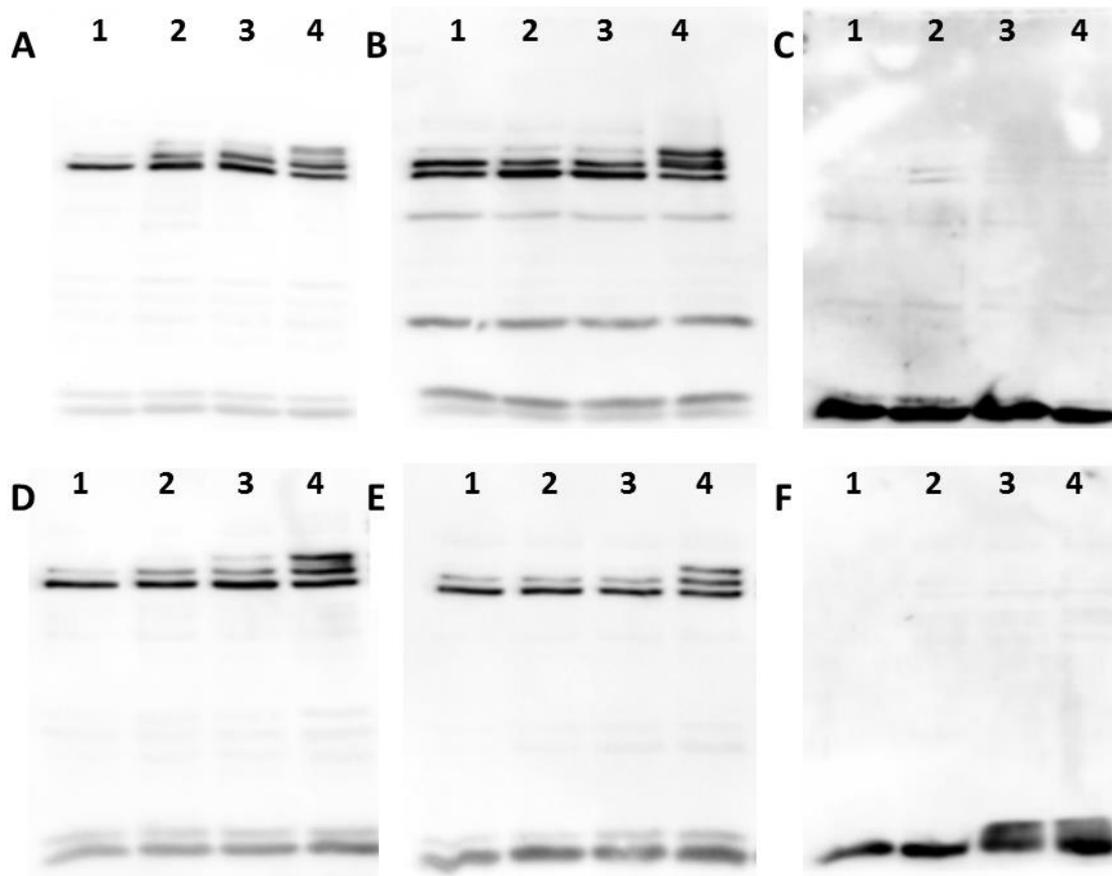


**Figura 4.26: Análisis mediante dicroísmo circular (CD) de la estabilidad térmica del mutante PF en liposomas de diferentes composiciones lipídicas.** En esta figura por una parte se representan de azul oscuro a rojo espectros recogidos cada 2,5°C en un rango de temperatura de 20°C a 90°C en un espectropolarímetro *JASCO J-810 Spectropolarimeter* de proteoliposomas obtenidos tras una incubación de 30 minutos a 37°C en constante agitación de 500 nM de PF en solución (A) o con 250 µM de liposomas de DOPC (B), DOPC:Chol 3:1 (C) y DOPC:Chol 1:1 (D) en tampón de hemólisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH8). Por otra parte se representan las curvas de transición del estado nativo al estado desnaturado del mutante formador de poros en las diferentes condiciones analizadas (E), así como las temperaturas medias de las curvas de transición (T<sub>m</sub>) (F).

Por último, se estudió los posibles cambios en la accesibilidad por parte de proteasas a los puntos de corte de la toxina dependiendo de la composición lipídica de la que se encuentre rodeado, lo cual indicaría diferentes orientaciones o grados de inserción en la

bicapa lipídica. Para ello se crearon proteoliposomas incubando durante 30 minutos a 37°C tanto la toxina salvaje como el mutante PF con liposomas de diferentes composiciones lipídicas (DOPC, DOPC:Chol 3:1, DOPC:Chol 2:1 y DOPC:Chol 1:1). Tras la incubación se añadió tripsina, dejando que actuara durante 10 minutos y se cargaron las mezclas en un gel desnaturizante SDS-PAGE al 8,5% de acrilamida, detectando las bandas producidas por la proteólisis mediante el anticuerpo monoclonal 9D4 tras transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa por *Western Blot*. Tal y como se ha visto antes en presencia de colesterol la presión lateral crítica en monocapas aumenta en el caso de las dos proteínas. Esto puede deberse no solo a una mayor inserción sino también a un cambio conformacional en las proteínas (Graham *et al*, 1979), quizás hacia estructuras terciarias competentes dirigidas a la lisis de la membrana.

En la **figura 4.27** se puede observar que a medida que se aumenta la presencia de colesterol en la membrana de las vesículas la aparición de bandas de mayor tamaño molecular se ve aumentada, tanto en el caso de la ACT como en el del mutante PF, tanto a relaciones proteína:lípido de 1:250 (**Figuras 4.27A y 4.27D**) como de 1:1000 (**Figuras 4.27B y 4.27E**). Adicionalmente, la aparición de las bandas de mayor masa molecular sigue una correlación positiva respecto al aumento de concentración molar en los liposomas. Por tanto, estos datos indicarían que en membranas con colesterol la exposición de los puntos de corte hacia la proteasa (en este caso la tripsina) se ve reducida, produciendo trozos de proteína de mayor tamaño molecular. Todo lo contrario a lo que ocurre a relaciones proteína:lípido 1:2500 (**Figuras 4.27C y 4.27F**), donde previamente se había determinado una menor presencia de oligómeros de mayor tamaño molecular, en las que la proteólisis de ambas proteínas en todas las composiciones lipídicas es completa. Estos datos confirmarían el hecho de que no solo el colesterol sino también la concentración de toxina añadida favorece la formación de estructuras oligoméricas capaces de permeabilizar la membrana.



**Figura 4.27: Proteólisis parcial de proteoliposomas de la toxina adenilato ciclasa y el mutante PF.** En la figura se representan las bandas de proteína obtenidas tras incubar la toxina salvaje y el mutante PF en solución (1) o en liposomas de DOPC (2), DOPC:Chol 2:1 (3) o DOPC:Chol 1:1 (4) a una relación proteína:lípido 1:250 (A y D), 1:1000 (B y E) o 1:2500 (C y F) y proteolizados con una concentración final de 16,8  $\mu$ M de tripsina durante 10 minutos a 10°C en constante agitación. Las muestras se corrieron posteriormente en un gel SDS-PAGE al 8,5% de acrilamida, las proteínas transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante transferencia semiseca y reconocidas mediante *Western Blot* por el anticuerpo monoclonal 9D4.

### 4.3. DISCUSIÓN

Con anterioridad, se ha determinado que la toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* puede autoasociarse en solución. Mediante experimentos de cromatografía de exclusión molecular se obtuvieron picos de 200 kDa, correspondientes al monómero, o de masas moleculares superiores a 1000 kDa, los cuales se consideraron agregados. La presencia de dímeros e incluso estructuras de masas moleculares mayores se estableció gracias a experimentos realizados mediante FRET, dado que la baja resolución obtenida de las separaciones mediante cromatografía de tamizado molecular no fueron

suficientes para detectar estos estados oligoméricos mayores producidos por la toxina (Lee *et al*, 2005).

En esta tesis se establece mediante esa misma técnica, la cromatografía de exclusión molecular, que la toxina salvaje forma dímeros y trímeros en solución, mientras que el mutante PF se autoasocia formando trímeros durante el proceso. Este hallazgo se refuerza tras observar mediante electroforesis nativa por BN-PAGE la presencia de masas moleculares aparentes que se corresponderían a los observados por cromatografía de exclusión molecular. Así mismo, parece que la concentración de toxina no condiciona el grado de oligomerización de la toxina en solución, dado que en todo el rango de concentraciones cargadas en la electroforesis nativa se observan los mismos estados oligoméricos tanto de la ACT como del mutante PF.

La razón de que otros grupos no hayan detectado estas formas oligoméricas puede deberse a la ausencia de calcio durante todo el proceso de separación por cromatografía de tamizado. Mediante dicróismo circular y resonancia magnética nuclear (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) se ha establecido que a concentraciones de calcio submicromolares la toxina adenilato ciclasa adopta una conformación nativa desordenada, mientras que a concentraciones milimolares la toxina adopta una estructura terciaria plegada. Dado que las concentraciones submicromolares son comunes en los citosoles de las bacterias se ha propuesto que la secreción mediante la maquinaria de secreción T1SS a través de la cual la bacteria secreta la ACT ocurre en una conformación desordenada, logrando posteriormente en el medio extracelular una estructura plegada al encontrarse con concentraciones milimolares (Chenal *et al*, 2009). Por tanto, el análisis de los procesos de oligomerización de la ACT en solución en ausencia de calcio puede ser interesante en los procesos tempranos de los mecanismos citotóxicos de la toxina, pero una vez secretada por la bacteria al medio extracelular el calcio, aparte de ser un requerimiento para el correcto plegamiento de la ACT, parece imprescindible en la activación de los procesos de oligomerización llevados a cabo por la toxina en condiciones solubles.

En el caso de las toxinas formadoras de poros se ha determinado que el entorno lipídico en el que éstas se insertan es una condición esencial para poder llevar a cabo sus actividades citotóxicas. En general, las moléculas lipídicas son más accesibles en

membranas fluidas debido a razones esteéricas. Así mismo, mientras que cuando una toxina formadora de poros se une específicamente a dominios ésta normalmente no reconoce una especie lipídica individual, sino una distribución de lípidos específica, como agrupaciones de esfingomiélinea o complejos esfingomiélinea/colesterol. Por último, en ciertos casos el entorno lipídico en el que se inserte la proteína puede facilitar su oligomerización, así como la inserción de sus dominios transmembrana (Rojko *et al*, 2015).

En el caso de la  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, se ha establecido que su unión a membranas solo ocurre si en las membranas están presentes lípidos con fosfocolinas como cabezas polares (ya sean fosfatidilcolinas o esfingomiélinas) y que su unión se ve favorecida si hay colesterol presente en la membrana (Watanabe *et al*, 1987). En el caso de la  $\alpha$ -hemolisina de *Escherichia coli* se diferencian dos estados de unión por parte de la proteína a las membranas dependiendo de la composición lipídica: una en la que la adsorción es reversible y otra en la que la toxina se inserta irreversiblemente, situación que se ve favorecida en membranas fluidas y con bajas concentraciones de colesterol (Bakás *et al*, 1996). En el caso de la toxina ACT se ha descrito con anterioridad que la translocación de su dominio catalítico se produce en las balsas lipídicas (*lipid rafts*) de las membranas celulares, a donde se movilizan tras su unión a la integrina CD11b/CD8 (Bumba *et al*, 2010).

En esta tesis se ha establecido que mientras que la ACT tiene una mayor tendencia a insertarse en membranas en cuya composición lipídica haya colesterol el mutante PF no parece mostrar esa misma tendencia hacia ese lípido. Esta observación se sustenta en que las presiones laterales críticas obtenidas en monocapas de DOPC con diferentes relaciones molares de colesterol indican una mayor tendencia de la inserción (Marsh, 1996) de la toxina salvaje cuanto mayor sea el porcentaje de colesterol presente en la membrana. En el caso del mutante PF esas diferencias en los valores de presiones laterales críticas respecto al porcentaje de colesterol que contiene la monocapa no se dan de una forma tan evidente, por lo que se puede concluir que el mutante PF no tiene preferencias de inserción en función de la composición lipídica.

Esta diferencia entre la tendencia a la inserción entre la ACT y el mutante PF se confirma al observar el *binding* de la toxina salvaje a membranas lipídicas por FRET, dado que una

mayor transferencia de energía es indicativo de una mayor inserción en la membrana (You *et al*, 2008). En estos experimentos se puede deducir que la ACT tiene una mayor tendencia a insertarse en membranas con colesterol, dado que la incubación de una concentración fija de toxina con bajas concentraciones de liposomas marcados con pireno se traduce en una mayor reducción de la fluorescencia de los triptofanos en liposomas con colesterol. Los datos obtenidos con el mutante PF, en cambio, mantienen la observación previa de no haber cambios de la inserción de esta proteína dependiendo de la composición lipídica de la membrana.

Esta diferencia entre ambas proteínas puede explicarse en que el mutante PF solo comprime el dominio formador de poros, por lo que dado que la única función disponible de la proteína es la de formar poros, su inserción no dependa de la composición lipídica de la membrana. La ACT, en cambio, al tener el dominio catalítico que debe translocar a través de la membrana sí que sea una proteína más selectiva con el entorno lipídico en el que se inserta para poder llevar a cabo ese proceso de la manera más efectiva posible.

En cuanto a la oligomerización en membranas modelo de la toxina adenilato ciclasa se podría esperar un mayor grado de oligomerización en membranas con mayor porcentaje de colesterol en su composición lipídica debido a que, como se ha mencionado anteriormente, ésta parece unirse con mayor afinidad a ese tipo de membranas. Sorprendentemente, según los datos obtenidos mediante electroforesis nativa, se aprecian los mismos oligómeros en membranas de DOPC y en las que tienen una composición lipídica de DOPC:Chol 1:1, formando en ambos casos un trímero, un tetrámero y un hexámero en el caso de la ACT y un trímero y un nonámero en el caso del mutante PF. Estos grados de oligomerización en entornos lipídicos concuerdan con los observados en solución, dado que en el caso de la ACT la formación del tetrámero y del hexámero pueden ser el resultado de la mezcla de los dímeros y trímeros observados en solución, mientras que el nonámero que forma la PF podría formarse de la unión de tres trímeros. Por tanto, se puede concluir que la composición lipídica no favorece la oligomerización de la toxina adenilato ciclasa, lo cual la diferencia de otras toxinas como la  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus*, en la que se ha establecido que existe una mayor

tendencia hacia la oligomerización en membranas ricas en esfingomiélin respecto a las ricas en fosfatidilcolina (Schwiering *et al*, 2013).

La interpretación de la oligomerización en membranas de macrófagos J774A.1 en cambio es más compleja, debido a que se juntan los diferentes procesos que sufre la toxina en células, donde ocurren simultáneamente los procesos de unión, oligomerización, translocación del dominio catalítico, corte de este dominio y reparación de los poros por parte de la toxina. En los datos obtenidos mediante geles nativos se puede observar que la ACT, antes de darse los procesos de translocación y corte, forma hexámeros en la membrana celular, tal y como se puede observar al incubar las células con toxina a 4°C, condiciones en las que no ocurren los procesos de translocación y corte del dominio catalítico (Rogel *et al*, 1992). En macrófagos incubados con el mutante PF, en cambio, se puede observar que en ambos casos los oligómeros formados son los mismos, equivalentes a un nonámero dado su tamaño molecular. Estos datos concuerdan con los obtenidos en membranas modelo, salvo que en el caso de los macrófagos la formación de los oligómeros de mayor tamaño molecular se ve favorecido.

En análisis de oligomerización en macrófagos incubados con toxina a 37°C presenta una mayor dificultad dado que en estas condiciones para determinar el grado de oligomerización hay que tener en cuenta los procesos de translocación y corte del dominio catalítico, procesos que ocurren a tiempos cortos. En los datos obtenidos en macrófagos incubados a 37°C durante 5 minutos el menor tamaño del oligómero de mayor masa molecular en comparación con el obtenido a 4°C podría indicar la pérdida del dominio catalítico, dado que la translocación y el corte por parte de la calpaína son procesos rápidos en el tiempo (Uribe *et al*, 2013). Así mismo la aparición de manchas en todo el rango del gel de las muestras incubadas a 37°C durante 5 minutos indicaría una posible formación de oligómeros de diferentes tamaños producidos mediante la posible agregación de las unidades *monoméricas* formadas por la toxina en solución (es decir, dímeros y trímeros), los cuales podrían estar sufriendo simultáneamente el corte del dominio AC. El análisis de las unidades monoméricas de la toxina mediante electroforesis 2D apuntaría en esta dirección, es decir, que la oligomerización y el procesamiento del dominio catalítico son dos procesos que ocurren simultáneamente

en las membranas celulares. Los datos obtenidos a tiempos se podrían interpretar mediante el siguiente esquema:

- A tiempos cortos se dan los procesos de autoasociación de las unidades monoméricas de la toxina, dando lugar a oligómeros cuyos componentes todavía no han afrontado el procesamiento del dominio catalítico, tal y como se observa en los geles SDS-PAGE tras dos minutos de incubación, donde solo se observa la banda de 200 kDa.
- A tiempos medios, la banda procesada ( $\approx 150$  kDa) empieza a visualizarse únicamente en los oligómeros de mayor tamaño (incubaciones de 4 minutos), indicando que el corte del dominio catalítico es más rápido cuanto mayor grado de oligomerización experimente la proteína. Este procesamiento se amplía minutos más tarde a todo el rango de tamaños moleculares, tal y como se aprecia en las incubaciones de 6 minutos.
- A tiempos largos, en cambio, el corte de los primeros 400 aminoácidos de la proteína está llegando a su fin en todos los oligómeros formados, persistiendo la banda de 200 kDa en los oligómeros de menor tamaño molecular, debido posiblemente al *lag* en el procesamiento sufrido por éstos en comparación con los de mayor tamaño. Este procesamiento llega a su fin tras 8-10 minutos de incubación tras la adición de la toxina, dado que en el último de los geles SDS-PAGE únicamente se observa la banda de 150 kDa. Adicionalmente se puede deducir que tras 8-10 minutos de incubación la activación de los procesos de reparación de los macrófagos empieza a entrar en juego, dado que se observa la desaparición de las bandas de los monómeros que forman los oligómeros de mayor tamaño.

En el anterior capítulo se ha determinado que la responsable de la translocación del dominio catalítico es una mezcla entre la actividad fosfolipasa A intrínseca de la proteína y la estabilidad estructural del dominio transmembrana de la proteína, formando un posible poro proteolipídico. El hecho de que el transporte de este dominio a través de la membrana ocurra más rápido en los oligómeros de mayor tamaño podría indicar que la autoasociación entre las unidades monoméricas facilitarían la creación de esa estructura proteolipídica a través de la que se translocan esos primeros 400

aminoácidos. Aun así no es una condición excluyente dado que ese proceso también ocurre en los oligómeros de menor tamaño, habiendo únicamente diferencias temporales.

Para interpretar en conjunto todos estos datos obtenidos con la toxina adenilato ciclasa el análisis de los procesos de oligomerización que llevan a cabo otras toxinas formadoras de poros puede ser de utilidad. Dentro de este tipo de toxinas se diferencian dos modelos diferentes de autoensamblaje hasta la formación de la estructura estable, diferenciadas según su estructura secundaria. En el caso de las toxinas  $\alpha$ -helicoidales la mayoría de los mecanismos involucran la inserción de un monómero en la membrana de la célula diana a la que le sigue la suma de más unidades hasta formar un oligómero estable. Este es el caso de la actinoporina equinotoxina II (EqII), una toxina formadora de poros  $\alpha$ -helicoidal para la que se ha propuesto un modelo de oligomerización en el que se inserta en las membranas la región N-terminal de un monómero al que le sigue la adición de sucesivos monómeros hasta formar un poro activo (Rojko *et al*, 2013). Este mismo proceso se ha descrito para otra toxina  $\alpha$ -helicoidal, la fragaceatoxina C (FraC), en la que la correcta orientación del monómero inicial que se inserta en la membrana lipídica activa la adición de más monómeros hasta formar un nonámero (Mechaly *et al*, 2011).

Éste es un proceso que parecen no seguir las toxinas formadoras de poros con estructuras secundarias de hoja  $\beta$ , en las que la tónica general es la formación de la estructura oligomérica previa a su inserción en las membranas lipídicas. El modelo propuesto para la citolisina de *Vibrio cholerae* se basa en la unión de un monómero soluble a la membrana, seguido de una oligomerización alrededor de ese monómero formando un preporo, el cual en última instancia se inserta en la membrana tras sufrir cambios conformacionales transformándolo en un poro transmembrana (Löhner *et al*, 2009).

Podríamos estar por tanto ante un proceso de oligomerización en membranas resultado de una autoasociación de los oligómeros que previamente se forman en medios solubles en los que se inserta uno de los oligómeros formados en solución, los cuales también se observan en membranas lipídicas, a los que se les van añadiendo más unidades hasta formar unos oligómeros estables. Los datos obtenidos de la oligomerización de la toxina

adenilato ciclasa en membranas modelo parece indicar que el proceso de oligomerización es una combinación de los dos modelos, en la que se mezcla una formación de oligómeros previa a la inserción en membranas vista en toxinas hoja  $\beta$  con la adición de unidades adicionales de toxina a una estructura insertada inicial característica de las toxinas formadoras de poros  $\alpha$ -helicoidales. A pesar de que no se conozca la estructura exacta de la toxina adenilato ciclasa debido a que los intentos de cristalización de la ACT no han sido fructíferos sí que se han predicho cinco segmentos con hélices  $\alpha$  transmembrana potenciales (502-522, 529-549, 571-591, 607-627 y 678-698) en la región hidrofóbica de la toxina (Osicková *et al*, 1999), por lo que la adición de unidades a una mínima estructura insertada en la membrana encajaría con los modelos propuestos para otras toxinas  $\alpha$ -helice.

A diferencia de otras toxinas de la familia RTX, la toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* es bastante promiscua, pudiendo insertarse, intoxicar y lisar con distintos grados de eficiencia diferentes tipos celulares (Welch, 2001). A pesar de que la ACT no discrimina entre lípidos ni tiene necesidad de receptores específicos en la membrana para llevar a cabo su actividad citotóxica, la presencia de la integrina CD11b/CD18 y ciertas composiciones lipídicas pueden favorecer esos efectos.

Observando los datos de liberación de contenidos fluorescentes se puede determinar que la presencia de colesterol en la membrana aumenta considerablemente la permeabilización de la membrana hacia las moléculas ANTS y DPX. Estos datos coinciden con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio, en los que se demostró que la presencia de lípidos que inducen curvatura negativa a la membrana (fosfatidiletanolaminas y colesterol por ejemplo) incrementa la actividad lítica de la toxina, mientras que lípidos que provocan curvatura positiva reducen el flujo causado por la ACT (Martín *et al*, 2004).

En esta tesis se ha descrito una nueva función para la toxina adenilato ciclasa: la actividad fosfolipasa A. Uno de los productos de la reacción producida por esta actividad son las lisofosfatidilcolinas, lípidos que promueven la curvatura positiva de las membranas (Alonso *et al*, 2000). Esos menores porcentajes de liberación en liposomas de DOPC respecto a los obtenidos en presencia de colesterol pueden deberse en parte a que la toxina tiene mayor cantidad de substrato disponible, produciendo mayores

cantidades de lisofosfatidilcolinas. Esta mayor presencia del lípido se traduciría en una menor liberación de contenidos fluorescentes en este tipo de liposomas, provocando una especie de autoinhibición de la actividad formadora de poros.

Aun así, este posible efecto autoinhibitorio parece limitado respecto a la cantidad de toxina que es añadida a la mezcla, dado que se ha podido determinar que mientras en liposomas con baja concentración de colesterol en su composición lipídica (liposomas de DOPC y DOPC:Chol 3:1) la liberación final tras 30 minutos de ANTS/DPX a bajas concentraciones es menor que la observada en el mutante formador de poros, a altas concentraciones los valores de ambas toxinas se igualan. En liposomas con alta presencia de este lípido (DOPC:Chol 2:1 y DOPC:Chol 1:1) se obtienen porcentajes finales de liberación parecidos por parte de ambas proteínas en todo el rango de concentraciones analizado. Esto podría indicar que existe por parte de la toxina una concentración crítica en la que la formación de poros se ve favorecida y que ese requerimiento se reduzca a medida que se aumenta la proporción de colesterol en la membrana.

Una de las posibles razones de una mayor liberación de contenidos fluorescentes en membranas con colesterol puede deberse a diferentes diámetros en el tamaño del poro de la toxina. En esta tesis se ha establecido mediante permeabilización de vesículas unilamelares gigantes (GUVs) hacia sondas fluorescentes de diferentes tamaños que en membranas compuestas únicamente por DOPC la ACT permite la permeabilización de dextranos de 10 kDa, pero no los de 20 kDa, mientras que la permeabilización producida por el mutante PF es sensiblemente inferior dado que la permeabilización que permite llega hasta los dextranos de 4 kDa. Dado que para cada una de las sondas utilizadas se han establecido unos radios hidrodinámicos de 0,5 nm para Alexa Fluor 488, 1,40 nm para FITC-4 kDa Dextran, 2,30 nm para FITC-10 kDa Dextran, 3,30 nm para FITC-20 kDa Dextran, 4,50 nm para FITC-40 kDa Dextran y 6,00 nm para FITC-70 kDa Dextran en membranas de eritrocitos (Zitzer *et al*, 1997), se puede determinar que en membranas de DOPC la toxina salvaje forma poros de un diámetro entre 4,6 y 6,6 nm, mientras que el mutante PF forma poros de entre 2,8 y 4,6 nm de diámetro. En membranas con un 50% de relación molar de colesterol, en cambio, esos diámetros se duplican de tamaño produciendo poros con diámetros superiores a los 12 nm, tanto para la ACT como para

el mutante PF. Estos datos no concuerdan con los determinados previamente para la ACT previamente, en los que gracias a la observación de que en presencia de sacarosa la hemólisis de eritrocitos es inhibida osmóticamente se estableció un diámetro de poro entre 0,6 y 0,8 nm (Masin *et al*, 2013).

Esa mayor liberación de contenidos fluorescentes cuanto mayor presencia de colesterol haya en la membrana de las vesículas puede deberse por tanto a que los poros que forman tanto la ACT como el mutante PF, tal y como indican los datos de permeabilización obtenidos en vesículas unilamelares gigantes, poseen un mayor radio hidrodinámico. La formación de poros más grandes podría achacarse a una formación de oligómeros de mayor tamaño molecular en la membrana por parte de ambas toxinas, pero tal y como se ha determinado mediante electroforesis nativa en este trabajo no se han observado diferencias en el grado de oligomerización dependiendo de la composición lipídica. Por tanto, la mayor permeabilización y el mayor diámetro hidrodinámico dependiente de la composición lipídica no se pueden asociar a esos procesos, por lo que la razón de esos cambios en el diámetro habría que buscarla en otra explicación.

La respuesta puede estar en la adopción de conformaciones diferentes en presencia y ausencia de colesterol en la membrana, en la que la presencia de colesterol en la bicapa lipídica favorezca una mayor inserción de la toxina en la membrana, situación que se ha descrito previamente en este trabajo. Para la proteína de membrana exterior A de *Escherichia coli*, por ejemplo, se ha observado que la composición lipídica de la bicapa lipídica y la estructura química de los lípidos (longitud de la cadena lipídica, grado de insaturaciones y la cabeza polar) tienen un rol importante en la estabilización de las proteínas de membrana, dado que la estabilidad térmica de la proteína disminuye en presencia de fosfolípidos de cadena corta (Hong *et al*, 2004).

Para determinar si existen dos conformaciones u orientaciones de la toxina respecto a la membrana se realizaron dos tipos de análisis: dicroísmo circular y proteólisis parcial. Los datos de estabilidad térmica de la estructura secundaria recogidos mediante dicroísmo circular indican que en presencia de colesterol la toxina se encuentra más protegida de la desnaturalización térmica, dado que los datos indican que la pérdida de  $\alpha$ -helicidad en las curvas de transición térmica y de la estructura secundaria de la

proteína recogiendo espectros de dicroísmo circular respecto al aumento de la temperatura es menor cuanto mayor porcentaje de colesterol haya en la membrana.

Así mismo, los experimentos de proteólisis parcial con diferentes enzimas digestivas se han utilizado previamente en el análisis de la inserción y la orientación de proteínas de membrana en bicapas lipídicas. Cuando una proteína de membrana es incorporada a las vesículas lipídicas la membrana protege en núcleo de la proteína y solo los residuos hidrofílicos de la proteína quedan expuestos a la solución. Dado que los sitios de corte están localizados asimétricamente en la estructura de la proteína el corte provocado por las enzimas producen un set diferente de fragmentos proteicos (Tunuguntla *et al*, 2013). La diferente accesibilidad a los puntos de corte presentes en la secuencia de la toxina por parte de la tripsina dependiendo de la proporción de colesterol presente en la membrana indica o bien una mayor inserción en la bicapa o diferentes orientaciones en las diversas composiciones lipídicas. Por tanto, la presencia de dos conformaciones diferentes se ve reforzada por el análisis de proteólisis parcial mediante tripsina de la toxina incubada en liposomas de diferentes composiciones lipídicas, al obtener bandas de mayor tamaño a medida que se aumenta la cantidad de colesterol en la composición lipídica de los liposomas.

Una vez establecido que el colesterol proporciona a la toxina un entorno favorable hacia la formación de poros con una estabilidad y protección mayor que en membranas sin presencia de este lípido, se analizó cuál de las dos características que concede este lípido, el grosor y la rigidez, tiene mayor importancia en estos efectos. Para ello se utilizó el lípido *1,2-dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholine* o 22:1PC en sustitución del colesterol, el cual otorga el mismo grosor a la membrana lipídica. La presencia del lípido 22:1PC en la misma proporción que el colesterol en liposomas de DOPC acercan más los datos (*binding*, liberación, estabilidad térmica y protección hacia la proteólisis) a los obtenidos en concentraciones altas de colesterol, pero sin llegar a igualarlos completamente. Parece ser que el aumento del grosor de la membrana favorece la orientación o la creación de una conformación en la que la formación de poro es prevalente, pero no es suficiente para llegar a completar plenamente esa transición como se consigue la presencia de colesterol. Por lo tanto se puede deducir que ambas

características (grosor y rigidez) son importantes para favorecer una conformación o posicionamiento en la que la formación de poro tiene una mayor importancia.

Estudios previos han demostrado que la composición lipídica es importante para la integridad estructural y el correcto funcionamiento de las proteínas de membrana: pueden estabilizar las proteínas de membrana, guiar el ensamblaje o directamente estar involucradas en el mecanismo molecular de la propia proteína, ya sea en su actividad enzimática o procesos de transporte a través de la membrana (Palsdottir *et al*, 2004).

Por tanto, teniendo en cuenta todos los datos presentados en este capítulo, podríamos estar hablando de dos conformaciones u orientaciones diferentes de la toxina adenilato ciclasa. La primera de ellas la adoptaría en presencia de proporciones altas de colesterol en la membrana, en la que contaría con un mayor grado de inserción en la bicapa lipídica protegida de la proteólisis parcial y con una estabilidad más robusta de la estructura secundaria de la proteína respecto a la desnaturalización provocada por la temperatura. Esta conformación tendería más hacia la formación de poros en la membrana, siendo éstos de un mayor diámetro hidrodinámico presentando liberaciones de contenidos fluorescentes mayores y más rápidos, con cinéticas y porcentajes de liberación más cercanos a los observados por el mutante formador de poros. La segunda de las conformaciones, en cambio, ocurriría en presencia de membranas sin colesterol o a bajas concentraciones de este lípido. En este caso estaríamos hablando de una conformación que se une a la membrana lipídica pero con menor inserción en ella, estando menos protegida hacia la proteólisis y la desnaturalización provocada por la temperatura, así como adoptando una estructura menos lítica con un menor tamaño de poro y liberaciones de contenidos fluorescentes menores. Estos dos grados diferentes de inserción se observarían en los datos de FRET, donde la transferencia de energía entre los triptófanos de la toxina y el pireno presente en la membrana es mayor en liposomas con colesterol, indicando un mayor contacto entre la membrana y la toxina en bicapas de esta composición lipídica.

Así mismo, puede que esta segunda conformación esté más dirigida hacia la translocación del dominio catalítico a través de la membrana, dado que uno de los efectos o consecuencias de ese proceso, el *flip flop*, se ve reducido en liposomas con una composición lipídica de DOPC:Chol 1:1. Estas dos conformaciones pueden estar

influenciadas por diferentes orientaciones de la proteína respecto a la membrana lipídica. Aun así la composición lipídica no es el único factor a tener en cuenta para decantarse por una u otra conformación, ya que al tener en cuenta los datos de liberación, en composiciones lipídicas en las que la formación de poros no sea favorecida (es decir, en membranas con bajas concentraciones de colesterol), esta limitación sea superada mediante el aumento de la cantidad de toxina. Por último, los datos de tripsinización parcial en liposomas con alto contenido de colesterol indicarían que en las membranas puede darse una combinación de ambas conformaciones, donde la proteólisis de la toxina en zonas ricas de colesterol darían como resultado las bandas de mayor tamaño que no se identifican en proteoliposomas libres de este lípido, mientras que en zonas más fluidas con porcentajes de colesterol bajos darían las mismas bandas que las obtenidas en liposomas con poco colesterol en su composición lipídica.

# Capítulo 5

## Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se proponen las siguientes conclusiones:

1. La toxina adenilato ciclasa es una fosfolipasa A (ACT-PLA) calcio-dependiente, generando tanto *in vitro* como *in vivo*, ácidos grasos libres y los correspondientes lisoderivados.
2. La ACT posee homología de secuencia con fosfolipasas A de la familia de las patatinas, y comparte con éstas dos motivos hidrolasa conservados el motivo G-X-S-X-G/S y un segundo motivo D-X-G/A. La **Ser 606** localizada en la región hidrofóbica y el **Asp 1079** localizado en la región de unión a calcio, forman parte del centro catalítico de la actividad PLA de la ACT. La mutación puntual de dichos residuos, o su inhibición farmacológica, inhiben la actividad esterasa de la toxina.
3. La actividad PLA está directamente implicada en la translocación del dominio catalítico adenilato ciclasa (dominio AC) a través de la membrana celular en macrófagos. Postulamos que la acumulación local de lisofosfatidilcolina, con curvatura positiva, alrededor de las moléculas de toxina, generaría en la membrana discontinuidades hidrofílicas de naturaleza toroide, a través de las cuales tendría lugar el trasvase directo del dominio AC desde el exterior hasta el interior celular. No descartamos que la actividad PLA pueda también ser necesaria para permitir o favorecer la inserción del dominio *linker* en la bicapa. La dependencia por  $Ca^{2+}$  mostrada por la actividad PLA explicaría el requerimiento estricto del proceso de translocación por este catión divalente.
4. Como consecuencia de su implicación en la translocación, la actividad PLA está involucrada en la citotoxicidad inducida por la ACT en células.
5. La ACT puede formar en membranas asociaciones oligoméricas de arquitectura heterogénea (líneas, arcos, anillos cerrados) que poseen características toroides y que permeabilizan las células. Dichos poros no son estáticos, sino que su tamaño depende del tiempo de incubación, de la concentración de toxina unida y de la composición lipídica de la bicapa, pudiendo llegar a formar lesiones cuyo tamaño permite la entrada de solutos fluorescentes de gran tamaño, como los dextranos de alto peso molecular (4 kDa Dextran, 20 kDa Dextran...).

6. La inserción de ACT para formar el poro podría seguir un mecanismo “no-concertado” con una oligomerización secuencial, en el que las lesiones de ACT podrían formarse tras la unión de monómeros de toxina que formarían inicialmente pequeños “poros”, permeables quizás a iones, que irían creciendo progresivamente en tamaño al ir uniéndose más monómeros de toxina, pudiendo formar lesiones de mayor tamaño, permeables a solutos más grandes.
7. La etapa limitante en la formación del poro de la ACT podría ser la de la inserción de la cadena polipeptídica en la bicapa lipídica o adopción de una conformación competente previa, y necesaria, a la etapa de oligomerización. El colesterol podría actuar como catalizador para este proceso, facilitando la inserción y/o oligomerización de ACT y promoviendo una mayor y más rápida permeabilización.

# Capítulo 6

## Referencias

- Almeida PF, Pokorny A. 2009. Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell-penetrating peptides: from kinetics to thermodynamics. *Biochemistry*, 48(34): 8083-8093.
- Almeida PF, Pokorny A. 2012. Comprehensive Biophysics: Interactions of Antimicrobial Peptides with Lipid Bilayers. *Comprehensive Biophysics*, Volume 5, Chapter 10: 189-222.
- Alonso A, Goñi FM, Buckley JT. 2000. Lipids favoring inverted phase enhance the ability of aerolysin to permeabilize liposome bilayers. *Biochemistry*, 39(46): 14019-14024.
- Alouf JE. 2001. Pore-forming bacterial toxins: an overview. *Pore-Forming Toxins*: 1-14.
- Álvarez C, Mancheño JM, Martínez D, Tejuca M, Pazos F, Lanio ME. 2009. Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. *Toxicon*, 54(8): 1135-1147.
- Amara S, Delorme V, Record M, Carrière F. 2012. Inhibition of phospholipase A<sub>1</sub>, lipase and galactolipase activities of pancreatic lipase-related protein 2 by methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP). *Biochim Biophys Acta*, 1821(11): 1379-1385.
- Anderluh G, Dalla Serra M, Viero G, Guella G, Macek P, Menestrina G. 2003. Pore formation by equinatoxin II, a eukaryotic protein toxin, occurs by induction of nonlamellar lipid structures. *J Biol Chem*, 278(46): 45216-45223.
- Anderluh G, Lakey JH. 2008. Disparate proteins use similar architectures to damage membranes. *Trends Biochem Sci*, 33(10): 482-490.
- Anderson DM, Sato H, Dirck AT, Feix JB, Frank DW. 2015. Ubiquitin activates patatin-like phospholipases from multiple bacterial species. *J Bacteriol*, 197(3): 529-541.
- Antonini V, Pérez-Barzaga V, Bampi S, Pentón D, Martínez D, Dalla Serra M, Tejuca M. 2014. Functional characterization of sticholysin I and W111C mutant reveals the sequence of the actinoporin's pore assembly. *PLoS One*, 9(10): e110824.
- Apellániz B, Nieva JL, Schwille P, García-Sáez AJ. 2010. All-or-none versus graded: single-vesicle analysis reveals lipid composition effects on membrane permeabilization. *Biophys J*, 99(11): 3619-3628.
- Aune TE, Aachmann FL. 2010. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85(5): 1301-1313.
- Babiychuk EB, Draeger A. 2015. Defying death: Cellular survival strategies following plasmalemmal injury by bacterial toxins. *Semin Cell Dev Biol*, 45: 39-47.
- Bachelet M, Richard MJ, François D, Polla BS. 2002. Mitochondrial alterations precede *Bordetella pertussis*-induced apoptosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 32(2): 125-31.
- Bakás L, Ostolaza H, Vaz WL, Goñi FM. 1996. Reversible adsorption and nonreversible insertion of *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin into lipid bilayers. *Biophys J*, 71(4): 1869-1876.

- Bakás L, Veiga MP, Soloaga A, Ostolaza H, Goñi FM. 1998. Calcium-dependent conformation of *E. coli*  $\alpha$ -haemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis. *Biochim Biophys Acta*, 1368(2): 225-234.
- Bauche C, Chenal A, Knapp O, Bodenreider C, Benz R, Chaffotte A, Ladant D. 2006. Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem*, 281(25): 16914-16926.
- Baumann U, Wu S, Flaherty KM, McKay DB. 1993. Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *EMBO J*, 12(9): 3357-3364.
- Barlic A, Gutiérrez-Aguirre I, Caaveiro JM, Cruz A, Ruiz-Argüello MB, Pérez-Gil J, González-Mañas JM. 2004. Lipid phase coexistence favors membrane insertion of equinatoxin-II, a pore-forming toxin from *Actinia equina*. *J Biol Chem*, 279(33): 34209-34216.
- Barry EM, Weiss AA, Ehrmann IE, Gray MC, Hewlett EL, Goodwin MS. 1991. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J Bacteriol*, 173(2): 720-726.
- Basler M, Knapp O, Masin J, Fiser R, Maier E, Benz R, Sebo P, Osicka R. 2007. Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem*, 282(17): 12419-12429.
- Bauche C, Chenal A, Knapp O, Bodenreider C, Benz R, Chaffotte A, Ladant D. 2006. Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem*, 281(25): 16914-16926.
- Bellalou J, Sakamoto H, Ladant D, Geoffroy C, Ullmann A. 1990. Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect Immun*, 58(10): 3242-3247.
- Benke S, Roderer D, Wunderlich B, Nettels D, Glockshuber R, Schuler B. 2015. The assembly dynamics of the cytolytic pore toxin ClyA. *Nat Commun*, 6: 6198.
- Benz R, Maier E, Ladant D, Ullmann A, Sebo P. 1994. Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 269(44): 27231-27239.
- Benson MA, Schmalzer KM, Frank DW. 2010. A sensitive fluorescence-based assay for the detection of ExoU-mediated PLA<sub>2</sub> activity. *Clin Chim Acta*, 411(3-4):190-197.
- Bergkessel M, Guthrie C. 2013. Chemical transformation of yeast. *Methods Enzymol*, 529:311-320.
- Betsou F, Sebo P, Guiso N. 1993. CyaC-mediated activation is important not only for toxic but also for protective activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun*, 61(9): 3583-3589.

- Blenner MA, Shur O, Szilvay GR, Cropek DM, Banta S. 2010. Calcium-induced folding of a  $\beta$  roll motif requires C-terminal entropic stabilization. *J Mol Biol*, 400(2): 244-256.
- Böttcher CJF, van Gent CM, Pries C. 1961. A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Anal Chim Acta*, 24: 203-204.
- Bordet J, Gengou O. Le microbe de la coqueluche. *Annales de l'Institut Pasteur*, 20: 731-741.
- Bouchez V, Guiso N. 2015. *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, vaccines and cycles of whooping cough. *Pathog Dis*, 73(7), pii: ftv055.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Braun RJ, Kinkl N, Beer M, Ueffing M. 2007. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem*, 389(4): 1033-1045.
- Brockman H. 1999. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr Opin Struct Biol*, 9(4): 438-443.
- Brummelman J, Veerman RE, Hamstra HJ, Deuss AJ, Schuijt TJ, Sloots A, Kuipers B, van Els CA, van der Ley P, Mooi FR, Han WG, Pinelli E. 2015. *Bordetella pertussis* naturally occurring isolates with altered lipooligosaccharide structure fail to fully mature human dendritic cells. *Infect Immun*, 83(1): 227-238.
- Bumba L, Masin J, Fiser R, Sebo P. 2010. *Bordetella* adenylate cyclase toxin mobilizes its  $\beta_2$  integrin receptor into lipid rafts to accomplish translocation across target cell membrane in two steps. *PLoS Pathog*, 6(5): e1000901.
- Bumba L, Masin J, Macek P, Wald T, Motlova L, Bibova I, Klimova N, Bednarova L, Veverka V, Kachala M, Svergun DI, Barinka C, Sebo P. 2016. Calcium-Driven Folding of RTX Domain  $\beta$ -Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts. *Mol Cell*, 62(1): 47-62.
- Calvez P, Bussi eres S, Eric Demers, Salesse C. 2009. Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers. *Biochimie*, 91(6): 718-733.
- Cannella SE, Ntsogo Engu en  VY, Davi M, Malosse C, Sotomayor P erez AC, Chamot-Rooke J, Vachette P, Durand D, Ladant D, Chenal A. 2017. Stability, structural and functional properties of a monomeric, calcium-loaded adenylate cyclase toxin, CyaA, from *Bordetella pertussis*. *Sci Rep*, 7: 42065.
- Cascales E, Buchanan SK, Duch e D, Kleanthous C, Lloub es R, Postle K, Riley M, Slatin S, Cavard D. 2007. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(1): 158-229.
- Carbonetti NH. 2010. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol*, 5(3): 455-469.

- Carbonetti NH. 2015. Contribution of pertussis toxin to the pathogenesis of pertussis disease. *Pathog Dis*, 73(8): ftv073.
- Carbonetti NH. 2016. *Bordetella pertussis*: new concepts in pathogenesis and treatment. *Curr Opin Infect Dis*, 29(3): 287-294.
- Cerny O, Kamanova J, Masin J, Bibova I, Skopova K, Sebo P. 2015. *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Blocks Induction of Bactericidal Nitric Oxide in Macrophages through cAMP-Dependent Activation of the SHP-1 Phosphatase. *J Immunol*, 194(10): 4901-4913.
- Cerny O, Anderson KE, Stephens LR, Hawkins PT, Sebo P. 2017. cAMP Signaling of Adenylate Cyclase Toxin Blocks the Oxidative Burst of Neutrophils through Epac-Mediated Inhibition of Phospholipase C Activity. *J Immunol*, 198(3): 1285-1296.
- Chenal A, Guijarro JI, Raynal B, Delepierre M, Ladant D. 2009. RTX calcium binding motifs are intrinsically disordered in the absence of calcium: implication for protein secretion. *J Biol Chem*, 284(3): 1781-1789.
- Confer DL, Eaton JW. 1982. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science*, 217(4563): 948-950.
- Contreras FX, Villar AV, Alonso A, Kolesnick RN, Goñi FM. 2003. Sphingomyelinase activity causes transbilayer lipid translocation in model and cell membranes. *J Biol Chem*, 278: 37169-37174.
- Contreras FX, Sánchez-Magraner L, Alonso A, Goñi FM. 2010. Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes. *FEBS Lett*, 584(9): 1779-1786.
- Coote JG. 1992. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 8(2): 137-161.
- Cordero CL, Kudryashov DS, Reisler E, Satchell KJ. 2006. The Actin cross-linking domain of the *Vibrio cholerae* RTX toxin directly catalyzes the covalent cross-linking of actin. *J Biol Chem*, 281(43): 32366-32374.
- Cosentino K, García-Sáez AJ. 2014. Mitochondrial alterations in apoptosis. *Chem Phys Lipids*, 181: 62-75.
- Cosentino K, Ros U, García-Sáez AJ. 2016. Assembling the puzzle: Oligomerization of  $\alpha$ -pore forming proteins in membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1858(3): 457-466.
- Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. 2016. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(7): pdb.prot087163.
- Deamer D, Bangham AD. 1976. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim Biophys Acta*, 443(3): 629-634.

- Dessen A, Tang J, Schmidt H, Stahl M, Clark JD, Seehra J, Somers WS. 1999. Crystal structure of human cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell*, 97(3): 349-360.
- Drolle E, Kučerka N, Hoopes MI, Choi Y, Katsaras J, Karttunen M, Leonenko Z. 2013. Effect of melatonin and cholesterol on the structure of DOPC and DPPC membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1828(9): 2247-2254.
- Dunne A, Ross PJ, Pospisilova E, Masin J, Meaney A, Sutton CE, Iwakura Y, Tschopp J, Sebo P, Mills KH. 2010. Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs T<sub>H</sub>17 responses and protection against *Bordetella pertussis*. *J Immunol*, 185(3): 1711-1719.
- Dynarowicz-Łątka P, Dhanabalan A, Oliveira ON Jr. 2001. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. *Adv Colloid Interface Sci*, 91(2): 221-293.
- Eby JC, Ciesla WP, Hamman W, Donato GM, Pickles RJ, Hewlett EL, Lencer WI. 2010. Selective translocation of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin across the basolateral membranes of polarized epithelial cells. *J Biol Chem*, 285(14): 10662-10670.
- Eby JC, Gray MC, Mangan AR, Donato GM, Hewlett EL. 2012. Role of CD11b/CD18 in the process of intoxication by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*, 80(2): 850-859.
- Eby JC, Gray MC, Warfel JM, Paddock CD, Jones TF, Day SR, Bowden J, Poulter MD, Donato GM, Merkel TJ, Hewlett EL. 2013. Quantification of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* in vitro and during respiratory infection. *Infect Immun*, 81(5): 1390-1398.
- Eby JC, Gray MC, Hewlett EL. 2014. Cyclic AMP-mediated suppression of neutrophil extracellular trap formation and apoptosis by the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun*, 82(12): 5256-5269.
- Eeman M, Deleu M. 2010. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 14(4): 719-736.
- Ehrmann IE, Gray MC, Gordon VM, Gray LS, Hewlett EL. 1991. Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *FEBS Lett*, 278(1): 79-83.
- Ehrmann IE, Weiss AA, Goodwin MS, Gray MC, Barry E, Hewlett EL. 1992. Enzymatic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* is not required for hemolysis. *FEBS Lett*, 304(1): 51-56.
- El-Azami-El-Idrissi M, Bauche C, Loucka J, Osicka R, Sebo P, Ladant D, Leclerc C. 2003. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem*, 278(40): 38514-38521.
- Epand RM, D'Souza K, Berno B, Schlame M. 2015. Membrane curvature modulation of protein activity determined by NMR. *Biochim Biophys Acta*, 1848(1 Pt B): 220-228.

- Fathi B, Harvey AL, Rowan EG. 2013. The effect of temperature on the effects of the phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins  $\beta$ -bungarotoxin and taipoxin at the neuromuscular junction. *Toxicon*, 70: 86-89.
- Felmlee T, Pellett S, Welch RA. 1985. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J Bacteriol*, 163(1): 94-105.
- Fiser R, Masín J, Basler M, Krusek J, Spuláková V, Konopásek I, Sebo P. 2007. Third activity of *Bordetella* adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b<sup>+</sup> monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem*, 282(5): 2808-2820.
- Fiske CH, SubbaRow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem*, 66: 375-400.
- Fontana A, de Laureto PP, Spolaore B, Frare E, Picotti P, Zamboni M. 2004. Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim Pol*, 51(2): 299-321.
- Förster T. 2012. Energy migration and fluorescence. 1946. *J Biomed Opt*, 17(1): 011002.
- Fradin C, Satsoura D, Andrews DW. 2009. Punching Holes in Membranes: How Oligomeric Pore-Forming Proteins and Lipids Cooperate to Form Aqueous Channels in Membranes. *Biomembrane Frontiers, Handbook of Modern Biophysics*: 223-262.
- Fuchs B, Süß R, Schiller J. 2010. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog Lipid Res*, 49(4): 450-475.
- Fuchs B, Süß R, Teuber K, Eibisch M, Schiller J. 2011. Lipid analysis by thin-layer chromatography – a review of the current state. *J Chromatogr A*, 1218(19): 2754-2774.
- Fuertes G, García-Sáez AJ, Esteban-Martín S, Giménez D, Sánchez-Muñoz OL, Schwille P, Salgado J. 2010. Pores formed by Bax $\alpha$ 5 relax to a smaller size and keep at equilibrium. *Biophys J*, 99(9): 2917-2925.
- Fukui A, Horiguchi Y. 2004. *Bordetella* dermonecrotic toxin exerting toxicity through activation of the small GTPase Rho. *J Biochem*, 136(4): 415-419.
- Garcia PS, Chieppa G, Desideri A, Cannata S, Romano E, Luly P, Rufini S. 2012. Sticholysin II: a pore-forming toxin as a probe to recognize sphingomyelin in artificial and cellular membranes. *Toxicon*, 60(5): 724-733.
- García-Sáez AJ, Buschhorn SB, Keller H, Anderluh G, Simons K, Schwille P. 2011. Oligomerization and pore formation by equinatoxin II inhibit endocytosis and lead to plasma membrane reorganization. *J Biol Chem*, 286(43): 37768-37777.
- Gaspar AH, Machner MP. 2014. VipD is a Rab5-activated phospholipase A<sub>1</sub> that protects *Legionella pneumophila* from endosomal fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(12): 4560-4565.
- Gentschev I, Dietrich G, Goebel W. 2002. The *E. coli*  $\alpha$ -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol*, 10(1): 39-45.

- Ghosh M, Tucker DE, Burchett SA, Leslie CC. 2006. Properties of the Group IV phospholipase A<sub>2</sub> family. *Prog Lipid Res*, 45(6): 487-510.
- Gilbert RJ, Dalla Serra M, Froelich CJ, Wallace MI, Anderluh G. 2014. Membrane pore formation at protein-lipid interfaces. *Trends Biochem Sci*, 39(11): 510-516.
- Gilbert RJ. 2016. Protein-lipid interactions and non-lamellar lipidic structures in membrane pore formation and membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*, 1858(3): 487-499.
- Givan AL. 2011. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol*, 699: 1-29.
- Glaser P, Danchin A, Ladant D, Barzu O, Ullmann A. 1988a. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J Exp Clin Med*, 13 Suppl: 239-252.
- Glaser P, Ladant D, Sezer O, Pichot F, Ullmann A, Danchin A. 1988b. The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2(1): 19-30.
- Glaser P, Sakamoto H, Bellalou J, Ullmann A, Danchin A. 1988c. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J*, 7(12): 3997-4004.
- Glaser P, Elmaoglou-Lazaridou A, Krin E, Ladant D, Bârzu O, Danchin A. 1989. Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by site-directed mutagenesis. *EMBO J*, 8(3): 967-972.
- Gonzalez MR, Bischofberger M, Pernot L, van der Goot FG, Frêche B. 2008. Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cell Mol Life Sci*, 65(3): 493-507.
- Gordon VM, Leppla SH, Hewlett EL. 1988. Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase toxin but not that of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun*, 56(5): 1066-1069.
- Gouaux E. 1997. Channel-forming toxins: tales of transformation. *Curr Opin Struct Biol*, 7(4): 566-573.
- Goyard S, Šebo P, Ullmann A. 1992. Adenylate Cyclase-Haemolysin Toxin of *Bordetella Pertussis*: Regulation of Expression and Activity. *Molecular and Cell Biology Updates, Adenine Nucleotides in Cellular Energy Transfer and Signal Transduction*: 357-364.
- Graham DE, Phillips MC. 1979. Proteins at liquid interfaces. II. Adsorption isotherms. *J Colloid Interface Sci*, 70: 415-426.
- Gray M, Szabo G, Otero AS, Gray L, Hewlett E. 1998. Distinct mechanisms for K<sup>+</sup> efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *J Biol Chem*, 273(29): 18260-18267.
- Gray MC, Ross W, Kim K, Hewlett EL. 1999. Characterization of binding of adenylate cyclase toxin to target cells by flow cytometry. *Infect Immun*, 67(9): 4393-4399.

- Gray MC, Lee SJ, Gray LS, Zaretzky FR, Otero AS, Szabo G, Hewlett EL. 2001. Translocation-specific conformation of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* inhibits toxin-mediated hemolysis. *J Bacteriol*, 183(20): 5904-5910.
- Greenfield NJ. 2006. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*, 1(6): 2876-2890.
- Gregory SM, Cavanaugh A, Journigan V, Pokorny A, Almeida PF. 2008. A quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles by the antimicrobial peptide cecropin A. *Biophys J*, 94(5): 1667-1680.
- Gregory SM, Pokorny A, Almeida PF. 2009. Magainin 2 revisited: a test of the quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles. *Biophys J*, 96(1): 116-131.
- Gross MK, Au DC, Smith AL, Storm DR. 1992. Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional *cyaA* toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(11): 4898-4902.
- Guermontprez P, Khelef N, Blouin E, Rieu P, Ricciardi-Castagnoli P, Guiso N, Ladant D, Leclerc C. 2001. The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the  $\alpha_M\beta_2$  integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med*, 193(9): 1035-1044.
- Guo Q, Shen Y, Lee YS, Gibbs CS, Mrksich M, Tang WJ. 2005. Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J*, 24(18): 3190-3201.
- Hackett M, Guo L, Shabanowitz J, Hunt DF, Hewlett EL. 1994. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science*, 266(5184): 433-435.
- Hackett M, Walker CB, Guo L, Gray MC, Van Cuyk S, Ullmann A, Shabanowitz J, Hunt DF, Hewlett EL, Sebo P. 1995. Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 270(35): 20250-20253.
- Haney EF, Nathoo S, Vogel HJ, Prenner EJ. 2010. Induction of non-lamellar lipid phases by antimicrobial peptides: a potential link to mode of action. *Chem Phys Lipids*, 163(1): 82-93.
- Hanski E, Farfel Z. 1985. *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration. *J Biol Chem*, 260(9): 5526-5532.
- Harris JR, Palmer M. 2010. Cholesterol specificity of some heptameric beta-barrel pore-forming bacterial toxins: structural and functional aspects. *Subcell Biochem*, 51: 579-596.
- Hayashi N, Matsubara M, Takasaki A, Titani K, Taniguchi H. 1998. An expression system of rat calmodulin using T7 phage promoter in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 12(1): 25-28.

- Hegerle N, Guiso N. 2013. Epidemiology of whooping cough & typing of *Bordetella pertussis*. *Future Microbiol*, 8(11): 1391-1403.
- Hegerle N, Guiso N. 2014. *Bordetella pertussis* and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 13(9): 1135-1146.
- Hewlett E, Wolff J. 1976. Soluble adenylate cyclase from the culture medium of *Bordetella pertussis*: purification and characterization. *J Bacteriol*, 127(2): 890-898.
- Hewlett EL, Donato GM, Gray MC. 2006. Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP! *Mol Microbiol*, 59(2): 447-459.
- Holland IB, Schmitt L, Young J. 2005. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol*, 22(1-2): 29-39.
- Hong H, Tamm LK. 2004. Elastic coupling of integral membrane protein stability to lipid bilayer forces. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(12): 4065-4070.
- Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR. 1985. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim Biophys Acta*, 812(1): 55-65.
- Housley NA, Winkler HH, Audia JP. 2011. The *Rickettsia prowazekii* ExoU homologue possesses phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>), PLA<sub>2</sub>, and lyso-PLA<sub>2</sub> activities and can function in the absence of any eukaryotic cofactors in vitro. *J Bacteriol*, 193(18): 4634-4642.
- Iacovache I, van der Goot FG, Pernot L. 2008. Pore formation: an ancient yet complex form of attack. *Biochim Biophys Acta*, 1778(7-8): 1611-1623.
- Iacovache I, Bischofberger M, van der Goot FG. 2010. Structure and assembly of pore-forming proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 20(2): 241-246.
- Ishitsuka R, Kobayashi T. 2007. Cholesterol and lipid/protein ratio control the oligomerization of a sphingomyelin-specific toxin, lysenin. *Biochemistry*, 46(6): 1495-1502.
- Jang H, Connelly L, Arce FT, Ramachandran S, Kagan BL, Lal R, Nussinov R. 2013. Mechanisms for the Insertion of Toxic, Fibril-like  $\beta$ -Amyloid Oligomers into the Membrane. *J Chem Theory Comput*, 9(1): 822-833.
- Jiménez-Atiéndzar M, Cabanes J, Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F, Pérez-Gilabert M. 2003. Determination of the phospholipase activity of patatin by a continuous spectrophotometric assay. *Lipids*, 38(6): 677-682.
- Karimova G, Fayolle C, Gmira S, Ullmann A, Leclerc C, Ladant D. 1998. Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the in vivo delivery of CD8<sup>+</sup> T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21): 12532-12537.

- Karst JC, Sotomayor Pérez AC, Guijarro JI, Raynal B, Chenal A, Ladant D. 2010. Calmodulin-induced conformational and hydrodynamic changes in the catalytic domain of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Biochemistry*, 49(2): 318-328.
- Karst JC, Barker R, Devi U, Swann MJ, Davi M, Roser SJ, Ladant D, Chenal A. 2012. Identification of a region that assists membrane insertion and translocation of the catalytic domain of *Bordetella pertussis* CyaA toxin. *J Biol Chem*, 287(12): 9200-9012.
- Karst JC, Ntsogo Enguéné VY, Cannella SE, Subrini O, Hessel A, Debard S, Ladant D, Chenal A. 2014. Calcium, Acylation, and Molecular Confinement Favor Folding of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase CyaA Toxin into a Monomeric and Cytotoxic Form. *J Biol Chem*, 289(44): 30702-30716.
- Kelly SM, Jess TJ, Price NC. 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*, 1751(2): 119-139.
- Khelef N, Zychlinsky A, Guiso N. 1993. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun*, 61(10): 4064-4071.
- Khelef N, Guiso N. 1995. Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol Lett*, 134(1): 27-32.
- Killian JA, von Heijne G. 2000. How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem Sci*, 25(9): 429-434.
- Knapp O, Maier E, Polleichtner G, Mašín J, Sebo P, Benz R. 2003. Pore formation by adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*: effect of calcium and calmodulin. *Biochemistry*, 42(26): 8077-8084.
- Knapp O, Maier E, Masín J, Sebo P, Benz R. 2008. Pore formation by the *Bordetella* adenylate cyclase toxin in lipid bilayer membranes: role of voltage and pH. *Biochim Biophys Acta*, 1778(1): 260-269.
- Ku B, Lee KH, Park WS, Yang CS, Ge J, Lee SG, Cha SS, Shao F, Heo WD, Jung JU, Oh BH. 2012. VipD of *Legionella pneumophila* targets activated Rab5 and Rab22 to interfere with endosomal trafficking in macrophages. *PLoS Pathog*, 8(12): e1003082.
- Kurien BT, Scofield RH. 2006. Western blotting. *Methods*, 38(4): 283-293.
- Kurien BT, Scofield RH. 2009. Introduction to protein blotting. *Methods Mol Biol*, 536: 9-22.
- Ladant D, Michelson S, Sarfati R, Gilles AM, Predeleanu R, Bârză O. 1989. Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 264(7): 4015-4020.
- Ladant D, Ullmann A. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol*, 7(4): 172-176.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.

- Lafont F, Abrami L, van der Goot FG. 2004. Bacterial subversion of lipid rafts. *Curr Opin Microbiol*, 7(1): 4-10.
- Landeta O, Landajuela A, García-Saez A, Basañez G. 2015. Minimalist Model Systems Reveal Similarities and Differences between Membrane Interaction Modes of MCL1 and BAK. *J Biol Chem*, 290(27): 17004–17019
- Laoide BM, Ullmann A. 1990. Virulence dependent and independent regulation of the *Bordetella pertussis* *cya* operon. *EMBO J*, 9(4): 999-1005.
- Lasic DD. 1995. Mechanisms of Liposome Formation. *J Liposome Res*, 5(3): 431-441.
- Lecher J, Schwarz CK, Stoldt M, Smits SH, Willbold D, Schmitt L. 2012. An RTX transporter tethers its unfolded substrate during secretion via a unique N-terminal domain. *Structure*, 20(10): 1778-1787.
- Lee SJ, Gray MC, Guo L, Sebo P, Hewlett EL. 1999. Epitope mapping of monoclonal antibodies against *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun*, 67(5): 2090-2095.
- Lee SJ, Gray MC, Zu K, Hewlett EL. 2005. Oligomeric behavior of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin in solution. *Arch Biochem Biophys*, 438(1): 80-87.
- Lee JH, Kim MW, Kim BS, Kim SM, Lee BC, Kim TS, Choi SH. 2007. Identification and characterization of the *Vibrio vulnificus* *rtxA* essential for cytotoxicity in vitro and virulence in mice. *J Microbiol*, 45(2): 146-152.
- Lin W, Fullner KJ, Clayton R, Sexton JA, Rogers MB, Calia KE, Calderwood SB, Fraser C, Mekalanos JJ. 1999. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(3): 1071-1076.
- Linhartová I, Bumba L, Mašín J, Basler M, Osička R, Kamanová J, Procházková K, Adkins I, Hejnová-Holubová J, Sadílková L, Morová J, Sebo P. 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev*, 34(6): 1076-1112.
- Lins L, Decaffmeyer M, Thomas A, Brasseur R. 2008. Relationships between the orientation and the structural properties of peptides and their membrane interactions. *Biochim Biophys Acta*, 1778(7-8): 1537-1544.
- Lio YC, Reynolds LJ, Balsinde J, Dennis EA. 1996. Irreversible inhibition of Ca<sup>(2+)</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> by methyl arachidonyl fluorophosphonate. *Biochim Biophys Acta*, 1302(1): 55-60.
- Löhner S, Walev I, Boukhallouk F, Palmer M, Bhakdi S, Valeva A. 2009. Pore formation by *Vibrio cholerae* cytolysin follows the same archetypical mode as  $\beta$ -barrel toxins from gram-positive organisms. *FASEB J*, 23(8): 2521-2528.
- Lucas M, Gaspar AH, Pallara C, Rojas AL, Fernández-Recio J, Machner MP, Hierro A. 2014. Structural basis for the recruitment and activation of the *Legionella* phospholipase VipD by the host GTPase Rab5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(34): E3514-E3523.

- Ludwig A, Vogel M, Goebel W. 1987. Mutations affecting activity and transport of haemolysin in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 206(2): 238-245.
- Luo J, Li W, Liu Z, Guo Y, Pu X, Li M. 2015. A sequence-based two-level method for the prediction of type I secreted RTX proteins. *Analyst*, 140(9): 3048-3056.
- Maftah A, Huet O, Gallet PF, Ratinaud HD. 1993. Flow cytometry's contribution to the measurement of cell functions. *Biol Cell*, 78: 85-93.
- Magi B, Liberatori S. 2005. Immunoblotting techniques. *Methods Mol Biol*, 295: 227-254.
- Mancheño JM, Martín-Benito J, Martínez-Ripoll M, Gavilanes JG, Hermoso JA. 2003. Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure*, 11(11): 1319-1328.
- Mariani ME, Madoery RR, Fidelio GD. 2015. Kinetic characterization, optimum conditions for catalysis and substrate preference of secretory phospholipase A<sub>2</sub> from *Glycine max* in model membrane systems. *Biochimie*, 108: 48-58.
- Marsh D. 1996. Components of the lateral pressure in lipid bilayers deduced from HII phase dimensions. *Biochim Biophys Acta*, 1279(2): 119-123.
- Martín C, Requero MA, Masin J, Konopasek I, Goñi FM, Sebo P, Ostolaza H. 2004. Membrane restructuring by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin, a member of the RTX toxin family. *J Bacteriol*, 186(12): 3760-3765.
- Martín C, Gómez-Bilbao G, Ostolaza H. 2010. *Bordetella* adenylate cyclase toxin promotes calcium entry into both CD11b<sup>+</sup> and CD11b<sup>-</sup> cells through cAMP-dependent L-type-like calcium channels. *J Biol Chem*, 285(1): 357-364.
- Maruyama K, Okamoto T, Shimaoka M. 2012. Integrins and Nitric Oxide in the Regulation of Glia Cells: Potential Roles in Pathological Pain. *J Anesth Clin Res*, S7: 008.
- Masin J, Basler M, Knapp O, El-Azami-El-Idrissi M, Maier E, Konopasek I, Benz R, Leclerc C, Sebo P. 2005. Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella* adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry*, 44(38): 12759-12766.
- Masin J, Fiser R, Linhartova I, Osicka R, Bumba L, Hewlett EL, Benz R, Sebo P. 2013. Differences in purinergic amplification of osmotic cell lysis by the pore-forming RTX toxins *Bordetella pertussis* CyaA and *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIA: the role of pore size. *Infect Immun*, 81(12): 4571-4582.
- Masin J, Osicka R, Bumba L, Sebo P. 2015. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a unique combination of a pore-forming moiety with a cell-invading adenylate cyclase enzyme. *Pathog Dis*, 73(8): ftv075.
- Masin J, Osickova A, Sukova A, Fiser R, Halada P, Bumba L, Linhartova I, Osicka R, Sebo P. 2016. Negatively charged residues of the segment linking the enzyme and cytolysin moieties restrict the membrane-permeabilizing capacity of adenylate cyclase toxin. *Sci Rep*, 6: 29137.

- Masure HR. 1992. Modulation of adenylate cyclase toxin production as *Bordetella pertussis* enters human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(14): 6521-6525.
- Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K. 1995. Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. *Biochemistry*, 34(19): 6521-6526.
- Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K. 1996. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*, 35(35): 11361-11368.
- Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Cotter PA, Miller JF. 2001. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front Biosci*, 6: E168-86.
- Mattoo S, Cherry JD. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*, 18(2): 326-382.
- Mechaly AE, Bellomio A, Gil-Cartón D, Morante K, Valle M, González-Mañas JM, Guérin DM. 2011. Structural insights into the oligomerization and architecture of eukaryotic membrane pore-forming toxins. *Structure*, 19(2): 181-191.
- Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. 2014. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol*, 12(4): 274-288.
- Metkar SS, Wang B, Catalan E, Anderluh G, Gilbert RJ, Pardo J, Froelich CJ. 2011. Perforin rapidly induces plasma membrane phospholipid flip-flop. *PLoS One*, 6(9): e24286.
- Metkar SS, Marchioretto M, Antonini V, Lunelli L, Wang B, Gilbert RJ, Anderluh G, Roth R, Pooga M, Pardo J, Heuser JE, Serra MD, Froelich CJ. 2015. Perforin oligomers form arcs in cellular membranes: a locus for intracellular delivery of granzymes. *Cell Death Differ*, 22(1): 74-85.
- Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. 2011. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J Drug Deliv*, 2011: 863734.
- Mobberley-Schuman PS, Weiss AA. 2005. Influence of CR3 (CD11b/CD18) expression on phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun*, 73(11): 7317-7323.
- Moraes I, Evans G, Sanchez-Weatherby J, Newstead S, Stewart PD. 2014. Membrane protein structure determination - the next generation. *Biochim Biophys Acta*, 1838(1 Pt A): 78-87.
- Morova J, Osicka R, Masin J, Sebo P. 2008. RTX cytotoxins recognize  $\beta_2$  integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(14): 5355-5360.
- Mueller M, Grauschopf U, Maier T, Glockshuber R, Ban N. 2009. The structure of a cytolytic  $\alpha$ -helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature*, 459(7247): 726-730.

- Munier H, Bouhss A, Krin E, Danchin A, Gilles AM, Glaser P, Bârzu O. 1992. The role of histidine 63 in the catalytic mechanism of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 267(14): 9816-9820.
- Olson R, Nariya H, Yokota K, Kamio Y, Gouaux E. 1999. Crystal structure of staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel. *Nat Struct Biol*, 6(2): 134-140.
- Osicka R, Osickova A, Hasan S, Bumba L, Cerny J, Sebo P. 2015. *Bordetella* adenylate cyclase toxin is a unique ligand of the integrin complement receptor 3. *Elife*, 4:e10766.
- Osicková A, Osicka R, Maier E, Benz R, Sebo P. 1999. An amphipathic  $\alpha$ -helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels. *J Biol Chem*, 274(53): 37644-37650.
- Osickova A, Masin J, Fayolle C, Krusek J, Basler M, Pospisilova E, Leclerc C, Osicka R, Sebo P. 2010. Adenylate cyclase toxin translocates across target cell membrane without forming a pore. *Mol Microbiol*, 75(6): 1550-1562.
- Otero AS, Yi XB, Gray MC, Szabo G, Hewlett EL. 1995. Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem*, 270(17): 9695-9697.
- Paccani SR, Dal Molin F, Benagiano M, Ladant D, D'Elis MM, Montecucco C, Baldari CT. 2008. Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*, 76(7): 2822-2832.
- Paccani SR, Finetti F, Davi M, Patrussi L, D'Elis MM, Ladant D, Baldari CT. 2011. The *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin binds to T cells via LFA-1 and induces its disengagement from the immune synapse. *J Exp Med*, 208(6): 1317-1330.
- Palsdottir H, Hunte C. 2004. Lipids in membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta*, 1666(1-2): 2-18.
- Parker MW, Feil SC. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol*, 88(1): 91-142.
- Patil YP, Jadhav S. 2014. Novel methods for liposome preparation. *Chem Phys Lipids*, 177: 8-18.
- Phillips RM, Six DA, Dennis DA, Ghosh P. 2003. *In Vivo* Phospholipase Activity of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU and Protection of Mammalian Cells with Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitors. *J Biol Chem*, 278(42): 41326-41332.
- Pojanapotha P, Thamwiriyaasati N, Powthongchin B, Katzenmeier G, Angsuthanasombat C. 2011. *Bordetella pertussis* CyaA-RTX subdomain requires calcium ions for structural stability against proteolytic degradation. *Protein Expr Purif*, 75(2): 127-132.

- Pokorny A, Almeida PF. 2004. Kinetics of dye efflux and lipid flip-flop induced by  $\delta$ -lysin in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic,  $\alpha$ -helical peptides. *Biochemistry*, 43(27): 8846-8857.
- Potter DA, Tirnauer JS, Janssen R, Croall DE, Hughes CN, Fiacco KA, Mier JW, Maki M, Herman IM. 1998. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol*, 141(3): 647-662.
- Prieto L, He Y, Lazaridis T. 2014. Protein arcs may form stable pores in lipid membranes. *Biophys J*, 106(1): 154-161.
- Qin S, Pande AH, Nemeč KN, Tatulian SA. 2004. The N-terminal  $\alpha$ -helix of pancreatic phospholipase A2 determines productive-mode orientation of the enzyme at the membrane surface. *J Mol Biol*, 344(1): 71-89.
- Ralph P, Moore MA, Nilsson K. 1976. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med*, 143(6): 1528-1533.
- Ray S, Taylor M, Banerjee T, Tatulian SA, Teter K. 2012. Lipid rafts alter the stability and activity of the cholera toxin A1 subunit. *J Biol Chem*, 287(36): 30395-30405.
- Rogel A, Schultz JE, Brownlie RM, Coote JG, Parton R, Hanski E. 1989. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme. *EMBO J*, 8(9): 2755-2760.
- Rogel A, Hanski E. 1992. Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J Biol Chem*, 267(31): 22599-22605.
- Rojko N, Kristan KČ, Viero G, Žerovnik E, Maček P, Dalla Serra M, Anderluh G. 2013. Membrane damage by an  $\alpha$ -helical pore-forming protein, Equinatoxin II, proceeds through a succession of ordered steps. *J Biol Chem*, 288(33): 23704-23715.
- Rojko N, Anderluh G. 2015. How Lipid Membranes Affect Pore Forming Toxin Activity. *Acc Chem Res*, 48(12): 3073-3079.
- Rojko N, Dalla Serra M, Maček P, Anderluh G. 2016. Pore formation by actinoporins, cytolysins from sea anemones. *Biochim Biophys Acta*, 1858(3): 446-456.
- Ros U, García-Sáez AJ. 2015. More Than a Pore: The Interplay of Pore-Forming Proteins and Lipid Membranes. *J Membr Biol*, 248(3): 545-561.
- Rose T, Sebo P, Bellalou J, Ladant D. 1995. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem*, 270(44): 26370-26376.
- Rydel TJ, Williams JM, Krieger E, Moshiri F, Stallings WC, Brown SM, Pershing JC, Purcell JP, Alibhai MF. 2003. The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry*, 42(22): 6696-6708.

- Sabelnikov AG. 1994. Nucleic acid transfer through cell membranes: towards underlying mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol*, 62(2): 119-152.
- Sakamoto H, Bellalou J, Sebo P, Ladant D. 1992. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem*, 267(19): 13598-13602.
- Sánchez-Magraner L, Cortajarena AL, Goñi FM, Ostolaza H. 2006. Membrane insertion of *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin is independent from membrane lysis. *J Biol Chem*, 281(9): 5461-5467.
- Sánchez-Magraner L, Viguera AR, García-Pacios M, Garcillán MP, Arrondo JL, de la Cruz F, Goñi FM, Ostolaza H. 2007. The calcium-binding C-terminal domain of *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin is a major determinant in the surface-active properties of the protein. *J Biol Chem*, 282(16): 11827-11835.
- Sato H, Frank DW, Hillard CJ, Feix JB, Pankhaniya RR, Moriyama K, Finck-Barbançon V, Buchaklian A, Lei M, Long RM, Wiener-Kronish J, Sawa T. 2003. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J*, 22(12):2959-2969.
- Sato H, Frank DW. 2004. ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol Microbiol*, 53(5): 1279-1290
- Savva CG, Fernandes da Costa SP, Bokori-Brown M, Naylor CE, Cole AR, Moss DS, Titball RW, Basak AK. 2013. Molecular architecture and functional analysis of NetB, a pore-forming toxin from *Clostridium perfringens*. *J Biol Chem*, 288(5): 3512-3522.
- Schägger H, von Jagow G. 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 199(2): 223-231.
- Scheller EV, Cotter PA. 2015. *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog Dis*, 73(8): ftv079.
- Schlecht G, Loucka J, Najar H, Sebo P, Leclerc C. 2004. Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. *J Immunol*, 173(10): 6089-6097.
- Schwiering M, Brack A, Stork R, Hellmann N. 2013. Lipid and phase specificity of  $\alpha$ -toxin from *S. aureus*. *Biochim Biophys Acta*, 1828(8): 1962-1972.
- Sebo P, Glaser P, Sakamoto H, Ullmann A. 1991. High-level synthesis of active adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* in a reconstructed *Escherichia coli* system. *Gene*, 104(1): 19-24.
- Sebo P, Ladant D. 1993. Repeat sequences in the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin can be recognized as alternative carboxy-proximal secretion signals by the *Escherichia coli*  $\alpha$ -haemolysin translocator. *Mol Microbiol*, 9(5): 999-1009.

- Shaver CM, Hauser AR. 2004. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun*, 72(12): 6969-6977.
- Shen Y, Lee YS, Soelaiman S, Bergson P, Lu D, Chen A, Beckingham K, Grabarek Z, Mrksich M, Tang WJ. 2002. Physiological calcium concentrations regulate calmodulin binding and catalysis of adenyl cyclase exotoxins. *EMBO J*, 21(24): 6721-6732.
- Sheridan SL, Frith K, Snelling TL, Grimwood K, McIntyre PB, Lambert SB. 2014. Waning vaccine immunity in teenagers primed with whole cell and acellular pertussis vaccine: recent epidemiology. *Expert Rev Vaccines*, 13(9): 1081-1106.
- Simpson RJ. 2007. Staining proteins in gels with silver nitrate. *CSH Protoc*: pdb.prot4727.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1): 76-85.
- Smolarsky M, Teitelbaum D, Sela M, Gitler C. 1977. A simple fluorescent method to determine complement-mediated liposome immune lysis. *J Immunol Methods*, 15(3): 255-265.
- Sobko AA, Kotova EA, Antonenko YN, Zakharov SD, Cramer WA. 2004. Effect of lipids with different spontaneous curvature on the channel activity of colicin E1: evidence in favor of a toroidal pore. *FEBS Lett*, 576(1-2): 205-210.
- Sobko AA, Kovalchuk SI, Kotova EA, Antonenko YN. 2010. Induction of lipid flip-flop by colicin E1 - a hallmark of proteolipidic pore formation in liposome membranes. *Biochemistry (Mosc)*, 75(6): 728-733.
- Soloaga A, Veiga MP, García-Segura LM, Ostolaza H, Brasseur R, Goñi FM. 1999. Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol*, 31(4): 1013-1024.
- Sonnen AF, Plitzko JM, Gilbert RJ. 2014. Incomplete pneumolysin oligomers form membrane pores. *Open Biol*, 4: 140044.
- Sotomayor-Pérez AC, Karst JC, Davi M, Guijarro JI, Ladant D, Chenal A. 2010. Characterization of the regions involved in the calcium-induced folding of the intrinsically disordered RTX motifs from the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Mol Biol*, 397(2): 534-549.
- Sotomayor-Pérez AC, Ladant D, Chenal A. 2011. Calcium-induced folding of intrinsically disordered repeat-in-toxin (RTX) motifs via changes of protein charges and oligomerization states. *J Biol Chem*, 286(19): 16997-17004.
- Sotomayor-Pérez AC, Subrini O, Hessel A, Ladant D, Chenal A. 2013. Molecular crowding stabilizes both the intrinsically disordered calcium-free state and the folded calcium-bound state of a repeat in toxin (RTX) protein. *J Am Chem Soc*, 135(32): 11929-11934.

Sotomayor-Pérez AC, Ladant D, Chenal A. 2014. Disorder-to-order transition in the CyaA toxin RTX domain: implications for toxin secretion. *Toxins (Basel)*, 7(1): 1-20.

Specian AF, Serpeloni JM, Tuttis K, Ribeiro DL, Cilião HL, Varanda EA, Sannomiya M, Martínez-López W, Vilegas W, Cólus IM. 2016. LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds. *Cytotechnology*: 1-16.

Srinivas PR. 2012. Introduction to protein electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 869: 23-28.

Subrini O, Sotomayor-Pérez AC, Hessel A, Spiaczka-Karst J, Selwa E, Sapay N, Veneziano R, Pansieri J, Chopineau J, Ladant D, Chenal A. 2013. Characterization of a membrane-active peptide from the *Bordetella pertussis* CyaA toxin. *J Biol Chem*, 288(45): 32585-32598.

Szabo G, Gray MC, Hewlett EL. 1994. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* produces ion conductance across artificial lipid bilayers in a calcium- and polarity-dependent manner. *J Biol Chem*, 269(36): 22496-22499.

Tan SM. 2012. The leucocyte  $\beta_2$  (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties. *Biosci Rep*, 32(3): 241-269.

Teissie J, Golzio M, Rols MP. 2005. Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of?) knowledge. *Biochim Biophys Acta*, 1724(3): 270-280.

Terrones O, Antonsson B, Yamaguchi H, Wang HG, Liu J, Lee RM, Herrmann A, Basañez G. 2004. Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J Biol Chem*, 279(29): 30081-30091.

Touchstone J. 1982. *Advances in Thin-Layer Chromatography*. Wiley: New York.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9): 4350-4354.

Trent MS, Worsham LM, Ernst-Fonberg ML. 1999. HlyC, the internal protein acyltransferase that activates hemolysin toxin: the role of conserved tyrosine and arginine residues in enzymatic activity as probed by chemical modification and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 38(27): 8831-8838.

Tunuguntla R, Bangar M, Kim K, Stroeve P, Ajo-Franklin CM, Noy A. 2013. Lipid bilayer composition can influence the orientation of proteorhodopsin in artificial membranes. *Biophys J*, 105(6): 1388-1396.

Uliyanchenko E. Size-exclusion chromatography - from high-performance to ultra-performance. *Anal Bioanal Chem*, 406(25): 6087-6094.

- Uribe KB, Etxebarria A, Martín C, Ostolaza H. 2013. Calpain-Mediated Processing of Adenylate Cyclase Toxin Generates a Cytosolic Soluble Catalytically Active N-Terminal Domain. *PLoS One*, 8(6): e67648.
- Valcarcel CA, Dalla Serra M, Potrich C, Bernhart I, Tejuca M, Martinez D, Pazos F, Lanio ME, Menestrina G. 2001. Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolysins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys J*, 80(6): 2761-2774.
- Valeva A, Palmer M, Bhakdi S. 1997. Staphylococcal  $\alpha$ -toxin: formation of the heptameric pore is partially cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. *Biochemistry*, 36(43): 13298-13304.
- Veneziano R, Rossi C, Chenal A, Devoisselle JM, Ladant D, Chopineau J. 2013. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin translocation across a tethered lipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(51): 20473-20478.
- Vogel M, Münster C, Fenzl W, Salditt T. 2000. Thermal unbinding of highly oriented phospholipid membranes. *Phys Rev Lett*, 84(2): 390-393.
- Vojtova-Vodolanova J, Basler M, Osicka R, Knapp O, Maier E, Cerny J, Benada O, Benz R, Sebo P. 2009. Oligomerization is involved in pore formation by *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *FASEB J*, 23(9): 2831-2843.
- Waggoner A. 2001. Optical filter sets for multiparameter flow cytometry. *Curr Protoc Cytom*, Chapter 1: Unit 1.5.
- Walde P, Cosentino K, Engel H, Stano P. 2010. Giant vesicles: preparations and applications. *Chembiochem*, 11(7): 848-865.
- Watanabe M, Tomita T, Yasuda T. 1987. Membrane-damaging action of staphylococcal  $\alpha$ -toxin on phospholipid-cholesterol liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 898(3): 257-265.
- Weiss AA, Goodwin MS. 1989. Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect Immun*, 57(12): 3757-3764.
- Welch RA. 1991. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol*, 5(3): 521-528.
- Welch RA. 2001. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. *Curr Top Microbiol Immunol*, 257: 85-111.
- Weston A, Brown MG, Perkins HR, Saunders JR, Humphreys GO. 1981. Transformation of *Escherichia coli* with plasmid deoxyribonucleic acid: calcium-induced binding of deoxyribonucleic acid to whole cells and to isolated membrane fractions. *J Bacteriol*, 145(2): 780-787.
- Westrop GD, Hormozi EK, Da Costa NA, Parton R, Coote JG. 1996. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: proCyaA and CyaC proteins synthesised separately in *Escherichia coli* produce active toxin *in vitro*. *Gene*, 180(1-2): 91-99.

- Wimley WC, Selsted ME, White SH. 1994. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci*, 3(9): 1362-1373.
- Wittig I, Schägger H. 2005. Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics*, 5(17): 4338-4346.
- Wittig I, Braun HP, Schägger H. 2006. Blue native PAGE. *Nat Protoc*, 1(1): 418-428.
- Wittig I, Karas M, Schägger H. 2007. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics*, 6(7): 1215-1225.
- Wittig I, Schägger H. 2008. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics*, 8(19): 3974-3990.
- Wolff J, Cook GH, Goldhammer AR, Berkowitz SA. 1980. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(7): 3841-3844.
- Worsham LM, Langston KG, Ernst-Fonberg ML. 2005. Thermodynamics of a protein acylation: activation of *Escherichia coli* hemolysin toxin. *Biochemistry*, 44(4): 1329-1337.
- Xu XP, Zhai D, Kim E, Swift M, Reed JC, Volkmann N, Hanein D. 2013. Three-dimensional structure of Bax-mediated pores in membrane bilayers. *Cell Death Dis*, 4: e683.
- Xu C, Gu J, Ma X, Dong T, Meng X. 2014. Investigation on the interaction of pyrene with bovine serum albumin using spectroscopic methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 125: 391-395.
- Yandek LE, Pokorny A, Almeida PF. 2009. Wasp mastoparans follow the same mechanism as the cell-penetrating peptide transportan 10. *Biochemistry*, 48(30): 7342-7351.
- You L, Gokel GW. 2008. Fluorescent, synthetic amphiphilic heptapeptide anion transporters: evidence for self-assembly and membrane localization in liposomes. *Chemistry*, 14(19): 5861-5870.
- Zitzer A, Palmer M, Weller U, Wassenaar T, Biermann C, Trantum-Jensen J, Bhakdi S. 1997. Mode of primary binding to target membranes and pore formation induced by *Vibrio cholerae* cytotoxin (hemolysin). *Eur J Biochem*, 247(1): 209-216.