



CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2020

La unión y formación de poros de las actinoporinas están determinadas por las propiedades fisicoquímicas de la membrana

Carlos Manuel Álvarez Valcárcel ^{1,4*} <https://orcid.org/0000-0002-9640-3474>

Lohans Pedrera Puentes ¹ <https://orcid.org/0000-0003-3639-1480>

Carmen Soto Febles ¹ <http://orcid.org/0000-0002-8767-8740>

Javier Alvarado Mesén ^{1,2} <https://orcid.org/0000-0001-8448-9621>

Uris L. Ros Quincoces ¹ <https://orcid.org/0000-0002-8889-0145>

María E. Lanio Ruíz ^{1,4} <http://orcid.org/0000-0002-1364-3713>

Aisel Valle Garay ¹ <https://orcid.org/0000-0001-6947-1087>

María Laura Fanani ³ <http://orcid.org/0000-0002-9495-124X>

Fabiola Pazos Santos ¹ <https://orcid.org/0000-0002-9502-2186>

Pedro Alberto Valiente Flores ¹ <https://orcid.org/0000-0002-4776-6017>

Ana María Hernández Vázquez ^{1,5} <https://orcid.org/0000-0003-2111-1677>

Yadira de la Patria Hervis Valdés ¹ <https://orcid.org/0000-0003-4890-9021>

¹ Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba

² Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica

³ Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina

⁴ Titular de la Academia de Ciencias de Cuba. La Habana, Cuba

⁵ Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba

*Autor para la correspondencia: calvarez@fbio.uh.cu

RESUMEN

Palabras clave

actinoporinas; proteínas formadoras de poro; fluidez; membranas modelo; fases lipídicas

Introducción. Las actinoporinas (AP) son proteínas formadoras de poro (PFP) que se asocian a membranas conduciendo a la muerte celular. Sticholysinas I y II (St, StI/II) se encuentran entre las AP más potentes descritas en la naturaleza. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de la composición lipídica y dinámica de la membrana en la unión y formación de poros por StI/II y nigrelisina (Ngr), una nueva AP aquí descrita. **Métodos.** La unión y formación de poros se estudiaron mediante membranas modelo combinadas con espectroscopía de fluorescencia y microscopía. **Resultados y discusión.** St y Ngr se unen y permeabilizan preferencialmente membranas que contienen esfingomielina (SM) cuando se compara con fosfatidilcolina (PC), debido a la presencia, en SM, de la unidad de fosfocolina de PC más la unidad ceramida (Cer). StI reconoce a Cer y a gangliósidos, aunque en menor extensión. En términos de propiedades dinámicas, StI penetra preferencialmente membranas con elevada movilidad lateral y adecuado nivel de SM. StI permeabiliza más eficientemente membranas con esteroides además de SM. Los bordes de la coexistencia de dominios lipídicos no constituyen un factor determinante para su unión y actividad. La heterogeneidad molecular de las membranas, más allá de la presencia de dominios, favorece la actividad de AP. Conclusiones. Estos estudios explican la relevancia de SM, otros lípidos de base Cer y esteroides a la actividad de St, Ngr, y por extensión, a las AP. Desde una perspectiva dinámica, una fase altamente fluida y moderadamente enriquecida en SM y esteroides constituye una plataforma ideal para la formación de poros por AP.



Binding and pore-formation by actinoporins are determined by membrane physicochemical properties

ABSTRACT

Keywords

actinoporins; pore-forming proteins; fluidity; model membranes; lipid phases

Introduction. Actinoporins (AP) are pore-forming proteins (PFPs) that readily bind to membranes leading to cell death. Sticholysins I and II (St, StI/II) are among the most potent AP described in nature. This proposal aimed to characterize the influence of lipid composition and dynamic properties of membranes on binding and pore-formation by StI/II and nigrelisin (Ngr), a novel AP here described. **Methods.** Binding and pore-formation were studied using model membranes such as liposomes and lipidic monolayers combined with fluorescence spectroscopy and microscopic techniques. **Results and Discussion.** St and Ngr bind and preferentially permeabilize membranes containing sphingomyelin (SM) over phosphatidylcholine (PC). This is explained by the presence of the PC phosphocholine unit plus a ceramide moiety (Cer) in SM. StI also recognizes Cer and gangliosides although to a lesser extent. In terms of dynamic properties, StI penetrates preferentially membranes with high lateral mobility and moderately enriched in SM. Also, StI permeabilizes more efficiently membranes containing sterols, in addition to SM. The appearance of borders resulting from lipidic domains coexistence is not a determining factor for binding or activity in membranes. Indeed, the activity is enhanced by membrane molecular heterogeneity beyond the presence of lipidic domains. As a conclusion these studies explain the relevance of SM and sterols for St, Ngr, and by extension, to APs binding to membrane and explain the contribution of other Cer-based lipids to their activity. In dynamic terms, a highly fluid phase, and moderately enriched in SM and sterols, is an ideal platform for the formation of pores in the membrane for AP.

INTRODUCCIÓN

Las actinoporinas (AP) son proteínas formadoras de poro (PFP) producidas por las anémonas marinas que experimentan cambios conformacionales resultantes en la formación de poros en la membrana celular.^(1,2) Este mecanismo transcurre a través de la unión a la membrana, transferencia del extremo amino hacia la interfase lipídica y oligomerización de los protómeros.^(3,4) Sticholysinas I y II (StI/II), producidas por la anémona *Stichodactyla helianthus*,⁽⁵⁻⁷⁾ se encuentran entre las AP más potentes descritas en la naturaleza.⁽⁸⁾ Debido a su actividad citolítica, las St tienen aplicaciones potenciales en la construcción de inmunotoxinas⁽⁹⁾ y como parte de sistemas de liberación de moléculas al citosol celular.⁽¹⁰⁾ El desarrollo de estas y otras aplicaciones debe acompañarse de un profundo conocimiento de su mecanismo de acción, así como de las propiedades de la membrana que modulan su actividad.⁽¹¹⁾

Las St muestran gran afinidad por la esfingomielina (SM),⁽¹²⁻¹⁴⁾ un esfingolípido ubicuo en la membrana de los organismos eucariontes, aunque no se conocen los determinantes estructurales que condicionan este reconocimiento preferencial. Además de SM, fosfatidilcolina (PC) y colesterol (Chol), las membranas celulares contienen otros lípidos en menores cantidades que pudieran modular la unión y

formación de poros por las AP, tales como los esfingolípidos (SL). Adicionalmente a la SM,^(12, 15-19) se ha documentado la contribución de la coexistencia de fases lipídicas a la actividad de las AP,⁽²⁰⁻²²⁾ pero sin resultados concluyentes. La contribución de otros componentes lipídicos,⁽²³⁾ entre ellos los esteroides,⁽²⁰⁻²²⁾ así como las propiedades físicoquímicas que emergen de la composición lipídica de la membrana, y regulan la actividad formadora de poros (AFP), son aún poco comprendidas. No existe suficiente evidencia experimental que permita generalizar cuáles son las plataformas lipídicas más adecuadas para la formación de poros por las AP y en qué medida las propiedades físicoquímicas dependen de su composición. A las St,⁽²⁴⁾ se suma en esta propuesta la caracterización de la AFP de nigrelisina (Ngr), una AP de la anémona por *Anthopleura nigrescens*,^(25,26) que comparte rasgos estructurales y funcionales con las St y permite extender el espectro de las conclusiones aquí descritas a otros miembros de la familia de las AP.

MÉTODOS

Las St se purificaron a partir del cuerpo de *S. helianthus*.⁽²⁴⁾ Ngr se identificó⁽²⁵⁾ y posteriormente se obtuvo mediante técnicas de biología molecular a partir de *A. nigrescens*.⁽²⁶⁾ La unión a sistemas lipídicos y a membranas modelos se llevó a cabo

mediante: inmunotinción en placa delgada (IPD),^(27,28) asociación con monocapas lipídica⁽²⁹⁾ y unión a liposomas.^(28,30) La influencia de la coexistencia de fases lipídicas se analizó mediante microscopía de epifluorescencia,⁽²⁹⁾ de ángulo de Brewster^(30,31) o en modo fluorescente mediante microscopía óptica.⁽³⁰⁾ La AFP se evaluó mediante la liberación de un fluoróforo al medio extravascular⁽²⁸⁾ o por la pérdida de contraste de fase de vesículas.^(30,31)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La unión y actividad permeabilizante de StII y Ngr a las membranas está condicionada por su composición lipídica

Estos estudios permitieron describir los determinantes estructurales que condicionan la mayor unión de StII a la SM cuando se compara con PC. A pesar de que ambos fosfolípidos comparten el mismo grupo de cabeza polar, la fosforilcolina (POC), el reconocimiento por StII y Ngr de la SM fue superior al de PC (figura 1A). Con el objetivo de identificar motivos estructurales de la SM responsables de la mayor afinidad de StII, se realizaron estudios de IPD en presencia de esfingosina (SP), ceramida (Cer) y ácido fosfatídico (PA). La SP y la Cer son compuestos de base esfingoide, mientras el PA deriva del glicerol, todos ellos carecen del grupo POC. StII no reconoció ni a la SP ni al PA; sin embargo, se unió en igual extensión a Cer y a PC, pero en menor medida que a la SM (figura 1B). Esto permitió concluir que la unión preferencial de StII a la SM resulta de contener POC en la cabeza polar y Cer en su región interfacial.

Con el objetivo de estudiar otros derivados de la Cer, se evaluó la unión de StII a los glicosfingolípidos neutros (Gn): glucosil ceramida (G-Cer) y lactosil ceramida (Lac-Cer), y a los glicosfingolípidos ácidos, los gangliósidos (Gs), GM3, GM1 y GD1 (figura 1C). StII no interactuó con los Gn; sin embargo, la presencia de 1 o 2 residuos de ácido siálico en los Gs monosialos: GM3 y GM1 y el disialo: GD1, respectivamente, facilitó el reconocimiento por StII. La asociación de StII con Gs resultó significativamente menor en comparación con la Cer (figura 1C), lo cual subraya el hecho de que los azúcares presentes en los glicosfingolípidos dificultan la interacción de StII con la base Cer. La ausencia de reconocimiento de los Gn por StII pudiera explicarse por la ausencia del grupo POC y como consecuencia del menor acceso de la toxina a la base Cer de los Gn. En contraste, la unión de StII a los Gs fue significativamente mayor que con los Gn, lo cual probablemente se deba a la presencia de ácido siálico que pudiera favorecer las interacciones electrostáticas con los aminoácidos básicos de la proteína. La complejidad estructural de los Gs reduce la asociación de StII con estos lípidos en comparación con la Cer y la SM.⁽²⁸⁾ La asociación preferencial relativa de StII con lípidos individuales observada en IPD, se reprodujo cuando la toxina se enfrentó al sistema más complejo de monocapas lipídicas (figura 2).

Así, se observó que StII se une e inserta en mayor extensión a monocapas lipídicas de SM en comparación con PC (figura 2A). Por su parte, StII no reconoció al PA (figura 1B y 2B) lo que indica que la unión a PC ocurre principalmente a través del grupo POC. En su conjunto, los resultados en IPD y monocapas lipídicas indican que StII requiere para su unión relevante a la membrana tanto la presencia del grupo POC, presente en PC y SM, como la unidad de Cer característica de la SM.⁽²⁸⁾

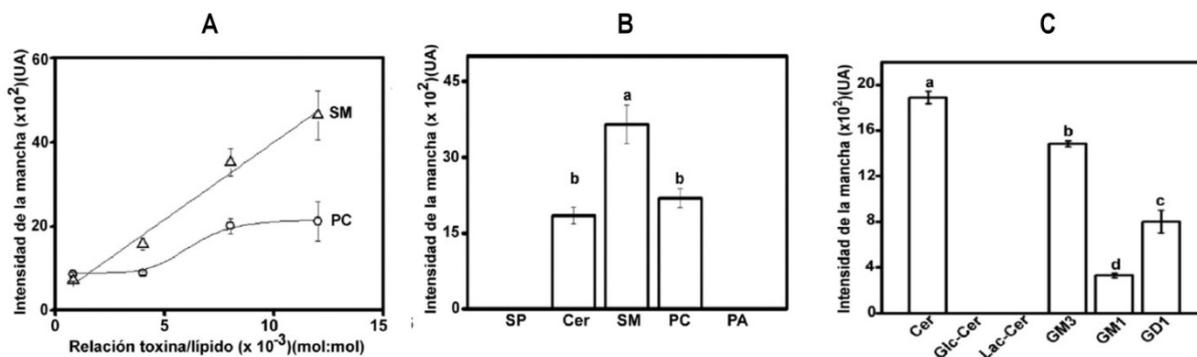


Fig. 1. Reconocimiento de los lípidos por StII mediante IPD. A) Unión de StII a SM y PC a diferentes relaciones molares toxina/lípido. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar (DE) ($n = 3$). Los datos experimentales de la unión de StII con PC se ajustaron a una función sigmoide de Hill ($R^2 = 0,99$), mientras que los correspondientes a la interacción de la toxina con SM, se ajustaron a una línea recta ($R^2 = 0,97$). B) Unión de StII a SP, Cer, SM, PC y PA. Relación molar toxina/lípido 8×10^{-3} . C) Reconocimiento de lípidos derivados de la ceramida por StII mediante IPD. Cer: Ceramida, Glc-Cer: Glucosilceramida, Lac-Cer: Lactosilceramida. GM3, GM1 y GD1 son gangliósidos. Relación molar toxina/lípido 8×10^{-3} . B) y C) Los valores de intensidad de las manchas se muestran en unidades arbitrarias (UA). Las barras muestran la media \pm DE ($n = 5$). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$) mediante la prueba de Tukey *a posteriori*.

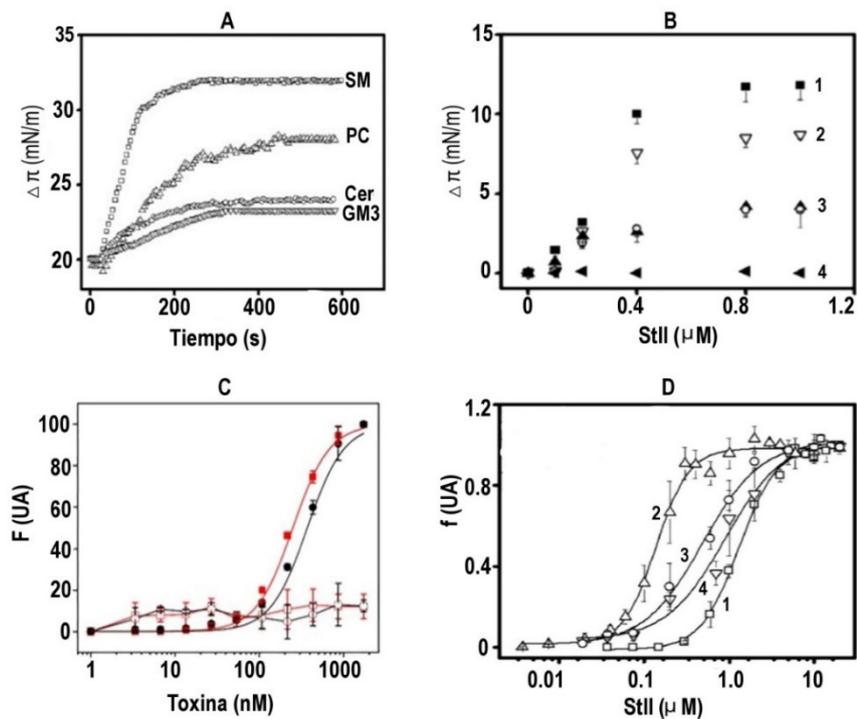


Fig. 2. Unión y actividad permeabilizante de StII y Ngr en sistemas lipídicos complejos. A) Curso temporal del incremento de la presión superficial (π) en monocapas luego de la adición de StII ($0,8 \mu\text{M}$). B) Incremento de $\Delta\pi$ en función de la concentración de toxina en monocapas de SM (1), PC (2), Cer (3) GM 3 (3) y SP, Glc-Cer, PA y Lac-Cer (4). Presión inicial de la monocapa sin toxina: $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. (C) Actividad permeabilizante de StII (símbolos negros) y Ng (símbolos rojos) en liposomas de PC (símbolos abiertos) y PC:SM (1:1, símbolos cerrados) ⁽²⁶⁾ D) Liberación del fluoróforo de liposomas de PC (1), PC:SM, 1:1 (2), PC: Cer, 1:1 (3) y PC:GM3, 1:1 (4). en función de la concentración de StII. Los valores de f (15 min) se normalizaron y las curvas se ajustaron a una función sigmoideal de Hill. En todos los casos $R^2 > 0,94$. Los datos representan la media \pm DE ($n = 5$). Concentración lipídica: $10 \mu\text{M}$. Tampón TBS-NaCl 300 mM, pH 7,4.

Con el objetivo de explicar la mayor afinidad de StII por la SM con respecto a la PC, desde el punto de vista estructural, se modeló la estructura tridimensional de cada complejo StII:lípido y se realizaron simulaciones de dinámica molecular. El análisis de la estructura promedio de los complejos StII:lípido predijo la formación de 2 enlaces de hidrógeno estables entre StII y la SM y solo 1, menos estable, con la PC lo cual puede explicar la mayor afinidad de StII por SM. ⁽²⁸⁾

Las St permeabilizan células y vesículas lipídicas mediante la formación de poros oligoméricos ^(11,12,23) por consiguiente, la unión competente a la membrana conduce a la liberación de los contenidos solubles al medio externo. ^(23,31) Consistente con los resultados de unión, tanto StII como Ngr permeabilizaron de manera más rápida y eficaz liposomas que contenían SM (figura 2C, D). ⁽²⁸⁾

La unión y la AFP en liposomas de PC: Cer y PC:GM3 fueron significativamente superiores a la de liposomas formados solo por PC, posiblemente por la contribución del esfingolípido a las propiedades interfaciales (figura 2D). Sin embargo, la actividad fue menor que en las vesículas formadas por PC:SM (figura 2D) debido a la mayor penetración de StII a las mem-

branas que contenían SM, en contraste con la asociación más superficial en el resto de las composiciones lipídicas. ⁽²⁸⁾

Efecto de la estructura y dinámica de la membrana (estado de fase, fluidez y presencia de dominios lipídicos) en la unión y en la AFP de las AP

Existe escasa información referida al efecto de la estructura y dinámica de la membrana en la unión y AFP de las AP.

Estudios en monocapas lipídicas en la interfase aire: agua: Efecto de la proporción de SM, de la longitud de cadena y las insaturaciones de los ácidos grasos de la PC sobre la unión de StI

Con este fin, se combinaron estudios de incorporación de StI a monocapas con diferente proporción de SM acompañados de una caracterización de propiedades físicas del sistema.

En monocapas, la velocidad inicial y la eficacia de incorporación de StI se potenciaron en mezclas equimolares de PC:SM y disminuyeron cuando la mezcla se encontraba enriquecida en cualquiera de estos componentes. La escasa afinidad de StI por las monocapas con bajas proporciones

de SM (menor e igual que 30 mol %) pudiera explicarse por su rol esencial en la interacción de las StI con las membranas. ^(19,29,32,33) El aumento de la proporción de SM por encima de 50 mol % provocó la disminución de la velocidad y de la extensión de la unión de StI a las monocapas, lo que probablemente se encuentre asociado al aumento de la viscosidad de los filmes a altas proporciones de SM. Esto es crucial en el proceso de penetración de la toxina en la monocapa, debido a que su inserción debe provocar el desplazamiento lateral de los componentes lipídicos y su reacomodo. Estos procesos pueden estar favorecidos en una fase fluida y fácilmente deformable tal como el líquido expandido (LE) en monocapas que contienen hasta 50 mol % de SM y limitados en aquellas con difusión lateral restringida de sus componentes (mayor que 50 mol % de SM). ⁽²⁹⁾

La disminución de la longitud de cadena de los ácidos grasos y la presencia del doble enlace en las cadenas hidrocarbonadas de la PC provocan la disminución de las interacciones de van der Waals entre las cadenas acílicas de moléculas vecinas, lo que redundaría en membranas más fluidas. ⁽³⁴⁾ Se emplearon monocapas lipídicas que contenían proporciones equimolares de SM y PC saturadas con longitudes de cadena

de 14 (DMPC), 16 (DPPC), 18 (DSPC) y 20 (DAPC) átomos de C. Para estudiar el efecto de las insaturaciones se empleó la DOPC que contiene una insaturación en configuración *cis* entre los átomos de C 9 y 10 en las 2 cadenas de ácidos grasos. Se seleccionaron las mezclas equimolares de PC:SM puesto que esta proporción resultó óptima para la unión de StI en el sistema de monocapas lipídicas. La coexistencia de fases (LE/Líquido condensada (LC)) no fue el factor determinante de la mayor asociación de StI a monocapas de PC:SM (50:50). De hecho, las monocapas de DPPC:SM y DSPC:SM mostraron dominios y, consecuentemente interfases, ausentes en las que contenían DMPC y DOPC, organizadas únicamente en fase LE; sin embargo, en todas, StI se unió de modo similar. ⁽²⁹⁾

La microscopía de epifluorescencia permitió demostrar que frente a la coexistencia de fases LE/LC, StI prefiere la fase LE, más fluida, incluso en aquellos casos en que la fase LC, más compacta, se encuentra más enriquecida en SM (figura 3). ⁽²⁹⁾ Estos resultados enfatizan que la velocidad y la eficacia de asociación de StI a las monocapas de PC:SM dependen del adecuado balance entre el contenido de SM en la mezcla y la fluidez del sistema lipídico y no de la coexistencia de fases, como se postuló para la Eqt II. ⁽²¹⁾

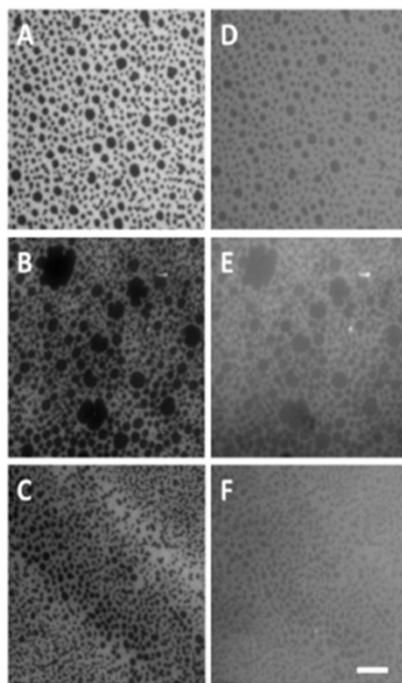


Fig. 3. Localización topográfica de StI en monocapas lipídicas con coexistencia de fases LE/LC. Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia de monocapas lipídicas transferidas a soportes sólidos. Composición lipídica: A y D) DSPC:eSM (50:50), B y E) SM 18:0:POPC (70:30), C y F) SM 18:0/SM 18:1 (70:30) conteniendo en todos los casos Rho-PE (1 mol %). La columna de la izquierda (A-C) muestra imágenes de las monocapas lipídicas visualizadas a través de un filtro para la λ de emisión de la rodamina (610 nm) y la columna de la derecha (D-F) muestra los mismos campos visualizados a través de un filtro para la λ de emisión de Alexa 488 con la cual se encontraba marcada StI. Cada imagen es representativa de dos experimentos realizados independientemente. La barra blanca mostrada en F representa 10 μm y es equivalente para todas las fotos. π_0 : 20 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$; concentración de la mezcla StI-Alexa: StI 1:5 (mol:mol): 0,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; TBS-145 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, pH 7,4; T: 23 \pm 2 C. ⁽²⁹⁾

Estudios en sistemas liposomales: efecto de la proporción de SM, de la longitud de cadena y las insaturaciones de la PC en la actividad funcional de StI

Los resultados de los estudios con sistemas liposomales fueron, en general, consistentes con los hallazgos en monocapas. Así, la afinidad de StI por los liposomas aumentó con la presencia de SM y resultó máxima en vesículas que contenían de 30 mol % a 70 mol % de SM. La AFP de StI fue máxima en la mezcla equimolar de PC:SM y disminuyó significativamente cuando predominaron la PC o la SM. El incremento de la proporción de SM en la membrana pudiera disminuir la fluidez de la bicapa lo que dificultaría las etapas de oligomerización e inserción del extremo amino de StI en la membrana. Aquellos liposomas que contenían una baja proporción de SM (menor o igual que 15 mol %) fueron permeabilizados en menor extensión o no permeabilizados (0 mol %) por la acción de StI, debido a la menor afinidad de la toxina por sistemas con pequeña proporción o carentes de SM, como demostramos en monocapas y en bicapas (figura 2C) que coincide con los hallazgos previamente descritos para otras AP. ^(23,31)

Con vistas a profundizar en el efecto de la fluidez en la actividad funcional de StI, se estudió su unión y actividad permeabilizante en vesículas unilaminares pequeñas (SUV) de PC:SM de las mismas composiciones que las empleadas en los estudios de unión a monocapas. La afinidad de StI fue similar por todas las vesículas que contenían las PC saturadas de 14, 16, y en menor medida, la de 18 átomos de C. ⁽³⁵⁾ En correspondencia con los resultados de unión a monocapas, StI presentó menor afinidad por los liposomas que contenían la PC de mayor número de átomos de C. ⁽²⁰⁾ En contraste, StI resultó más afín por los liposomas que contenían la PC insaturada en comparación con la PC saturada de igual número de C. ⁽³⁵⁾

Por otra parte, la actividad permeabilizante en los SUV disminuyó significativamente con el aumento de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas. A su vez, los liposomas que contenían PC insaturada fueron más sensibles a la acción de StI que los que contenían la PC saturada de igual longitud de cadena. Así, los liposomas de DMPC:SM y DOPC:SM, caracterizados por la mayor fluidez resultaron más sensibles a la acción de StI. ⁽³⁵⁾

A partir de análisis de los resultados de unión se infirió que la mayor actividad permeabilizante de StI en las vesículas que contienen DMPC o DOPC es consecuencia de diferencias en una etapa del mecanismo de formación de poros posterior a la unión de la toxina a la membrana. Por otro lado, a pesar de que se ha argumentado que la coexistencia de fases y las interfases laterales, derivadas de dicha coexistencia, favorecen la afinidad de estas toxinas por la membrana, ^(20-22,36,37)

nuestros resultados apoyan la idea de que su existencia no es determinante para la unión y la permeabilización en membranas de PC:SM sino la disponibilidad de SM en un ambiente fluido.

Los esteroides incrementan la unión y la actividad permeabilizante de StI independientemente de su capacidad de generar coexistencia de fases

Se emplearon monocapas y liposomas formados por mezclas ternarias de DOPC: SM: esteroles (1:1:1) (figura 4) que contenían Chol o ergosterol (Erg), promotores de la formación de fases líquido ordenadas en membranas fosfolipídicas o CIn que inhibe su formación. ⁽³⁸⁾ La inclusión de Chol y Erg en sistemas de DOPC:SM promovió la coexistencia de fases líquidas LE/LC tanto en monocapas lipídicas como sus equivalentes Ld/Lo en bicapas, en contraposición con la CIn donde solo pudo visualizarse una fase líquida continua (LE/Ld, figura 4I). ⁽³⁵⁾

La inclusión de los esteroides en la mezcla de DOPC:SM favoreció la unión toxina-membrana y su AFP en el orden Chol mayor que Erg mayor e igual que CIn mayor que PC:SM (figura 4). StI siguió el mismo comportamiento en monocapas y bicapas que contenían esteroides. Se ha demostrado que la fase más fluida es la plataforma más adecuada para la AFP de las AP. ⁽³⁹⁾ La AFP de StI en las membranas que contenían Chol fue mayor que aquellas que contenían Erg. (figura 4). ⁽³⁵⁾

Si extrapolamos los resultados obtenidos en monocapas a los de bicapas, resulta tentador especular que la fase Ld de las vesículas que contenían Chol se comporta como una fase más fluida y con menor cohesión lipídica que la fase equivalente de las membranas que contienen Erg. Por consiguiente, una mayor fluidez puede brindar un medio más favorable para la oligomerización y la inserción del N-terminal de StI en las membranas que contienen Chol. Adicionalmente, el área ocupada por la fase LE en las monocapas de DOPC:SM:Chol es menor que el correspondiente en las membranas que contienen Erg, ⁽³⁵⁾ como se describió previamente para bicapas. ⁽³⁸⁾ El confinamiento de StI a un área reducida con una cantidad relativamente elevada de SM ⁽⁴⁰⁾ en una fase menos ordenada pudiera ser una estrategia para reducir el área difusional y facilitar la oligomerización y la inserción del N-terminal de StI en la membrana. Consecuentemente, la AFP de StI, en las vesículas que contienen Chol, es más eficiente debido tanto a la mayor fluidez de la fase Ld como al efecto concentrador sobre StI. En resumen, ambos Chol y Erg, potenciaron la actividad de StI. A diferencia del Chol y Erg, la CIn no favoreció la actividad de StI en todos los sistemas vesiculares, posiblemente debido a su incapacidad de promover la separación lateral de fases. La potenciación de la unión y la actividad permeabilizante de StI promovida por los esteroides parece resultar de la

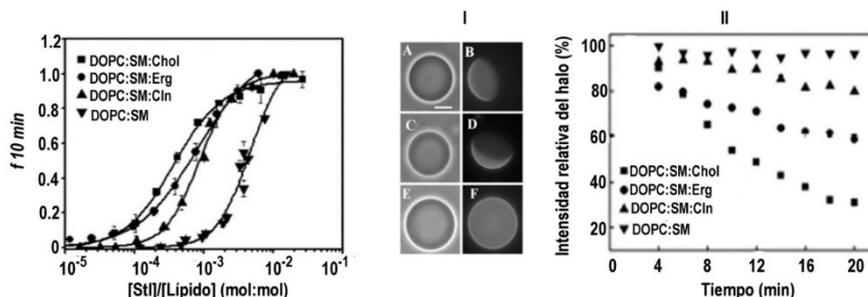


Fig. 4. Efecto de la naturaleza química de los esteroides en la actividad permeabilizante de StI en sistemas vesiculares. Dependencia de la actividad permeabilizante de StI en función de la relación molar lípidos/StI a los 10 min de adicionada la toxina a los SUV. f10 es la proporción de fluoróforo liberado. Cada punto corresponde a la media de tres determinaciones independientes y la barra indica la DE. Las curvas corresponden al ajuste de los datos experimentales a la función sigmoideal de Hill ($R^2 > 0,96$). (I) Visualización de GUV de diferente composición lipídica en contraste de fase y modo fluorescente: DOPC:SM:Chol (1:1:1) (A y B), DOPC:SM:Erg (1:1:1) (C y D) y DOPC:SM:Cln (1:1:1) (E y F) conteniendo en todos los casos 0.2 mol % Rho-PE. La barra escala blanca en A equivale a 20 μm y es representativa para todas las imágenes. Paneles de la izquierda: modo contraste de fase, paneles de la derecha, modo fluorescente. (II) Curvas cinéticas representativas que muestran el % de GUV que experimentan una disminución de contraste de fase después de la adición de StI. Composición lipídica: (■) DOPC:SM:Chol (1:1:1), (●) DOPC:SM:Erg (1:1:1), (▲) DOPC:SM:Cln (1:1:1) y (▼) DOPC:SM (1:1).

mayor heterogeneidad molecular de la membrana que alcanza su máxima expresión en las mezclas que contienen Chol y Erg como resultado de la coexistencia de fases.

Conclusiones

StII reconoció, además de la SM, a la Cer y a los glicoesfingolípidos aniónicos, no así a los neutros. Las simulaciones de dinámica molecular predijeron la formación de dos enlaces de hidrógeno estables con la SM y uno menos estable con la fosfatidilcolina. Asimismo, sugirieron que las interacciones electrostáticas determinan su interacción preferencial con la SM. La condición de equimolaridad de PC y SM, análoga a la encontrada en las membranas citoplasmáticas de las células eucariontes, favorece la unión y formación del poro por StI y Ngr. Bajo esta condición, se alcanza un balance favorable entre la disponibilidad del esfingofosfolípido y la fluidez de la membrana, necesario para la unión y formación de poros.

La AFP de las AP es un fenómeno multifactorial que trasciende el simple reconocimiento de la SM, en el que participan otros lípidos de la membrana de base ceramida que posiblemente modulen este mecanismo en las membranas celulares. Los esteroides constituyen el 3^{er} componente lipídico más abundante en las membranas celulares animales y se les ha atribuido una función reguladora de sus propiedades físicoquímicas. El Chol y el Erg, típicos de animales o levaduras y hongos, respectivamente, inducen la separación lateral de fase en mezclas ternarias con PC y SM. La potenciación de la actividad de StI generada por los esteroides resulta de la heterogeneidad de la membrana e incluye, además de la separación lateral de fases, el grado de hidratación de la cabeza polar y la propensión a formar fases no laminares, entre otros.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a los siguientes investigadores sin los cuales hubiera sido imposible la realización de este trabajo: Frank Solano Campos, Bruno Lomonte Vigliotti, Anaixis del Valle Peña, Ana J. García Sáez, Rafael E. Sánchez Pupo, Rosangela Itri, Andreza Barbosa Gomide, Natalia Wilke y Bruno Maggio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rojko N, Dalla M.P, Maček, G. Anderluh. Pore formation by actinoporins, cytolytins from sea anemones. *Biochim. Biophys. Acta* 2016;1858:446-56.
- Tejuca M, Dalla-Serra C, Potrich C, *et al.* Sizing the radius of the pore formed in erythrocytes and lipid vesicles by the toxin sticholysin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *J. Membr. Biol.* 2016;183:125-35.
- Hong Q, Gutiérrez I, Barlic A, *et al.* Two-step Membrane Binding by Equinatoxin II, a Pore-forming Toxin from the Sea Anemone, Involves an Exposed Aromatic Cluster and a Flexible Helix. *J. Biol. Chem.* 2002;277:41916-24.
- Antonini V, Pérez-Barzaga V, Bampi S, *et al.* Functional Characterization of Sticholysin I and W111C Mutant Reveals the Sequence of the Actinoporin's Pore Assembly. *PLoS One.* 2014;9:e110824.
- Lanio M.E, Morera V, Alvarez C, *et al.* Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon.* 2000;39:187-94.
- Huerta V, Morera V, Guancho Y, *et al.* Primary structure of two cytolytins isoforms from *Stichodactyla helianthus* differing in their hemolytic activity. *Toxicon.* 2001;39:1253-6.
- Martínez D, Campos A.M, Pazos F, *et al.* Properties of StI and StII, two isotoxins isolated from *Stichodactyla helianthus*: A comparison. *Toxicon.* 2001;39:1547-1560.
- Álvarez C, Mancheño J.M, Martínez D, *et al.* Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone

- Stichodactyla helianthus*: Their interaction with membranes. *Toxicon*. 2009;54:1135-47.
9. Tejuca M, Anderluh G, Dalla Serra M. Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon*. 2009;54:1206-14.
 10. Lanio Ruiz ME, Fernández Molina LE, Laborde RJ, et al. Vaccine composition based on sticholysin encapsulated into liposomes. 2014, US 8,697,093 B2.
 11. Alvarez C, Pazos F, Soto C, et al. Pore-forming toxins from sea anemones: from protein-membrane interaction to its implications for developing biomedical applications (129-83p). En: *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*; 31 Elsevier S&T Serials, Books and Textbooks Academic Press, 2020. London, GB (UK), San Diego, CA (USA), Cambridge, MA (USA), Oxford, GB (UK) (Eds. A. Iglič, M. Rappolt y A. J. García-Sáez (214p). ISBN: 978-0-12-820967-7, ISSN: 2451-9634.
 12. Tejuca M, Dalla Serra M, Ferreras M, et al. Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolytin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry*. 1996;35:14947-57.
 13. Anderluh G, Macek P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*. 2002;40:111-24.
 14. Maula T, Isaksson Y.J.E, García Linares S, et al. 2NH and 3OH are crucial structural requirements in sphingomyelin for sticholysin II binding and pore formation in bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2013;1828:1390-95.
 15. Bakrac B, Gutiérrez-Aguirre I, Podlessek Z, et al. Molecular Determinants of Sphingomyelin Specificity of a Eukaryotic Pore-forming Toxin. *J. Biol. Chem.* 2008;283:18665-77.
 16. Bernheimer AW, Avigad LS. Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1976;73:467-71.
 17. De Los Rios V, Mancheño JM, Lanio ME, et al. Mechanism of the leakage induced on lipid model membranes by the hemolytic protein sticholysin II from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Eur. J. Biochem.* 1998;252:284-9.
 18. Bonev B.B, Lam Y, Anderluh G, et al. Effects of the Eukaryotic Pore-Forming Cytolytin Equinatoxin II on Lipid Membranes and the Role of Sphingomyelin. *Biophysical Journal*. 2003;84:2382-92.
 19. Bellomio A, Morante K, Barlic A, et al. Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin from the sea anemone *Actinia fragacea*. *Toxicon*. 2009;54:869-80.
 20. Schön P, García Sáez A.J, Malovrh P, et al. Equinatoxin II permeabilizing activity depends on the presence of sphingomyelin and lipid phase coexistence. *Biophys. J.* 2008;95:691-98.
 21. Barlic A, Gutiérrez Aguirre I, Caaveiro JMM, et al. Lipid Phase Coexistence Favors Membrane Insertion of Equinatoxin-II, a Pore-forming Toxin from *Actinia equina*. *J. Biol. Chem.* 2004;279:34209-16.
 22. Alegre-Cebollada J, Rodríguez-Crespo I, Gavilanes J.G, et al. Detergent-resistant membranes are platforms for actinoporin pore-forming activity on intact cells. *FEBS J.* 2006;273:863-71.
 23. Valcarcel C.A, Dalla Serra M, Potrich C, et al. Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolytins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys. J.* 2001;80:2761-74.
 24. Lanio ME, Morera V, Álvarez C, et al. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*. 2001;39:187-94.
 25. Alvarado Mesén J, Álvarez Y, Pedrera L, Ros U, Lanio M.E, Valle A, Álvarez C. Isolation and partial purification of a hemolytic sphingomyelin inhibitable fraction from the sea anemone *Anthopleura nigrescens*. *Biotechnología Aplicada*. 2014;31(1):53-6.
 26. Alvarado Mesen J, Solano Campos F, Canet L, et al. Cloning, purification and characterization of nigrelysin, a novel actinoporin from the sea anemone *Anthopleura nigrescens*. *Biochimie*. 2019;156:206-23.
 27. Yamaji A, Sekizawa Y, Emoto K, et al. Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein, *J. Biol. Chem.* 1998;273:5300-06.
 28. Soto C, del Valle A, Valiente P.A, et al. Differential binding and activity of the pore-forming toxin sticholysin II in model membranes containing diverse ceramide-derived lipids, *Biochimie*. 2017;138:20-31.
 29. Pedrera L, Fanani ML, Ros U, et al. Sticholysin I-membrane interaction: An interplay between the presence of sphingomyelin and membrane fluidity. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 2014;1838:1752-9.
 30. Alvarez C, Ros U, Valle A, et al. Biophysical and biochemical strategies to understand membrane binding and pore formation by sticholysins, pore-forming proteins from a sea anemone. *Biophys Rev.* 2017. DOI: <https://orcid.org/10.1007/s12551-017-0316-0>
 31. Pedrera L, Gomide A.B, Sánchez R.E, et al. The Presence of Sterols Favors Sticholysin I-Membrane Association and Pore Formation Regardless of Their Ability to Form Laterally Segregated Domains. *Langmuir*. 2015;31:9911-23.
 32. Tejuca M, Serra M.D, Ferreras M, et al. Mechanism of Membrane Permeabilization by Sticholysin I, a Cytolytin Isolated from the Venom of the Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry*. 1996;2960:14947-57.
 33. Drechsler A, Anderluh G, Norton R.S, et al. Solid-state NMR study of membrane interactions of the pore-forming cytolytin, equinatoxin II. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembr.* 2010;1798:244-51.
 34. Koynova R, Caffrey M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta*. 1998;1376:91-145.
 35. Pedrera, L. Influencia de la fluidez y la coexistencia de fases de la membrana en la interacción y actividad formadora de poros de sticholysina I. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana, Julio 2016.
 36. Alegre Cebollada J, Clementi G, Cuniatti M, et al. Silent mutations at the 5'-end of the cDNA of actinoporins from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* allow their heterologous overproduction in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 2007;127:211-21.
 37. Martínez D, Otero A, Alvarez C, et al. Effect of sphingomyelin and cholesterol on the interaction of StII with lipidic interfaces. *Toxicon*. 2007;49:68-81.
 38. Beattie M.E, Veatch S.L, Stottrup B.L, et al. Sterol Structure Determines Miscibility versus Melting Transitions in Lipid Vesicles. *Biophysical Journal*. 2005;89:1760-68.
 39. Rojko N, Cronin B, Danial J.S.H, et al. Imaging the lipid-phase-dependent pore formation of equinatoxin II in droplet interface bilayers. *Biophys. J.* 2014;106:1630-37.
 40. Yasuda T, Tsuchikawa H, Murata M, et al. Deuterium NMR of Raft Model Membranes Reveals Domain-Specific Order Profiles and Compositional Distribution. *Biophys. J.* 2015;108:2502-06.

Recibido: 28/05/2021
Aprobado: 22/08/2021

Validación: Carlos M. Álvarez Valcárcel
Visualización: Carlos M. Álvarez Valcárcel, Carmen Soto Febles
Redacción-borrador original: Carlos M. Álvarez Valcárcel, Carmen Soto Febles
Redacción-revisión y edición: Carlos M. Álvarez Valcárcel, Carmen Soto Febles y María E. Lanio

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Conceptualización: Carlos M. Álvarez Valcárcel

Curación de datos: Carlos M. Álvarez Valcárcel, Lohans Pedrera Puentes, Carmen Soto Febles, Javier Alvarado Mesén, Aisel Valle Garay

Análisis formal: Carlos M. Álvarez Valcárcel, Carmen Soto Febles, Lohans Pedrera Puentes, Javier Alvarado Mesén, Pedro A. Valiente Flores

Adquisición de fondos: Carlos M. Álvarez Valcárcel, Lohans Pedrera Puentes, Carmen Soto Febles, Javier Alvarado Mesén

Investigación: Carlos M. Álvarez Valcárcel, Lohans Pedrera Puentes, Carmen Soto Febles, Javier Alvarado Mesén, Aisel Valle Garay, Ana Ma. Hernández Vázquez, Pedro A. Valiente Flores, Yadira P. Hervis Valdés, Uris Ros Quincoces, María L. Fanani

Metodología: Carlos M. Álvarez Valcárcel, Lohans Pedrera Puentes, Carmen Soto Febles, Javier Alvarado Mesén, María Laura Fanani, Uris Ros Quincoces, Fabiola Pazos Santos, Ana Ma. Hernández Vázquez, Yadira P. Hervis Valdés

Administración del proyecto: Carlos M. Álvarez Valcárcel

Recursos: Lohans Pedrera Puentes, Carmen Soto Febles, Javier Alvarado Mesén, María L. Fanani, Uris L. Ros Quincoces

Software: Pedro A. Valiente Flores

Supervisión: Carlos M. Álvarez Valcárcel, María E. Lanio Ruiz, María L. Fanani, Aisel Valle Garay, Ana Ma. Hernández Vázquez, Uris L. Ros Quincoces

Financiación

Este trabajo ha sido financiado por: el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED) a través de la Red (212RT0467). También contribuyeron CONICET (PIP 112-200801-01413), SECyT de la Universidad de Córdoba (05/C578), FONCyT (PICT-2010-0415) de Argentina. Se contó con la financiación de proyecto binacional, CNPq-MES Brasil-Cuba. Lohans Pedrera Puentes recibió una beca UNU-BIOLAC; Carmen Soto Febles y Lohans Pedrera Puentes fueron becarias ELAP del Gobierno de Canadá. Lohans Pedrera Puentes (IFS F/5194-1/2), Javier Alvarado Mesén (F/5205-1/2) y Carmen Soto Febles (IFS F/4617-1/2) recibieron auxilios financieros de la International Foundation for Science (IFS), Suecia. Javier Alvarado Mesén agradece a FEES CONARE y la Universidad Nacional, Costa Rica, por el apoyo brindado (Grants: SIA 0067-13 and SIA 0116-16)

Cómo citar este artículo

Álvarez Valcárcel CM, Pedrera Puentes L, Soto Febles C, Alvarado-Mesén J, *et al.* La unión y formación de poros de las actinoporinas están determinadas por las propiedades fisicoquímicas de la membrana. *An Acad Cienc Cuba [internet]* 2022 [citado en día, mes y año];12(2): e1052. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1052>

