

Contribución al mecanismo de formación de poros de sticholisina I, una proteína formadora de poros de la anémona *Stichodactyla helianthus*, mediante el empleo de mutantes de Cys en zonas funcionalmente relevantes de la proteína

Autora principal
Aisel Valle Garay¹.

Otros autores

Isabel Fabiola Pazos Santos¹, Aracelys López Castillo¹, María Eliana Lanio Ruiz¹, Mayra Tejuca Martínez¹, Yadira de la Patria Hervis¹, David Pentón¹, Carlos Álvarez Valcárcel¹.

Colaboradores

MSc. Amaury Pupo Meriño¹, MSc. Ángel Rafael Ramírez Ramírez¹, Dra. Diana Martínez Cruz-Bustillo¹, Dr. Eduardo Horjales², Dr. Eduardo Lissi³, Dr. Eduardo M.Cilli⁴, Dr. Fabio Dyszy⁵, MSc. Iscel Díaz¹, MSc. Javier Alvarado-Mesén⁶, Dr. Javier Campos Gómez⁷, Dr. Joao Alexandre R.G. Barbosa⁸, Dra. Lesly Calderón Jiménez¹, Lic. Liem Canet Santos¹, Dra. Lila R.Castellanos-Serra⁹, MSc. Loany Calvo¹⁰, MSc. Lohans Pedrera Puentes¹, Dra. Mey Ling Reytor González¹, Dr. Rafael Fando⁷, Dra. Shirley Schreier⁵, Dr. Tirso Pons Hernández¹, MSc. Víctor Pérez Barzaga¹, Dra. Vivian Morera Córdova⁹, Lic. Rubén del Valle García¹, Lic. Felipe Adonis Escalona Rodríguez¹, Lic. Frieda Aina Ndapewa Amapindi¹, Lic. Luis Benito Pérez Socas¹, Lic. German de Armas Guitart¹.

Entidad ejecutora principal

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

Entidades participantes

²Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

³Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile.

⁴Instituto de Química, UNESP-Universidad Estadual Paulista, São Paulo, Brasil.

⁵Instituto de Química, Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁶Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Costa Rica.

⁷Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba.

⁸Departamento de Biología Celular, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Brasília, Brasil.

⁹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

¹⁰Centro Inmunología Molecular, La Habana, Cuba.

AutorU para correspondencia

Aisel Valle Garay

Calle 25 #455 e/ J e I, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba, CP 10 400

Teléfono: 832 4830

Fax: 832 1321

e-mail: aiselvalle@fbio.uh.cu

Resumen

Sticholisina I (St I) es una citolisina producida por la anémona marina *Stichodactyla helianthus*, que se caracteriza por formar poros oligoméricos en membranas naturales y artificiales. En este trabajo se describe la obtención por vía recombinante en *Escherichia coli* (*E. coli*) de una variante recombinante de St I (St Ir), así como su caracterización conformacional y funcional. Estos trabajos permitieron reducir el impacto ecológico que provoca la obtención de St I a partir de las anémonas como fuente natural y además realizar mutagénesis sitio-específica para su caracterización funcional. La ausencia de Cys en St I facilitó la introducción de este residuo aminoacídico, por mutagénesis dirigida, en zonas funcionalmente importantes de la toxina. En el trabajo se sustituyeron por Cys en St Ir de forma independiente, los aminoácidos Glu² y Phe¹⁵ (localizados en el segmento de los primeros treinta aminoácidos que participan en la formación del canal) y la Arg⁵², Pro⁸⁰ y Trp¹¹¹ (en la región de interacción con las membranas). Así, se obtuvieron y purificaron de *E. coli* cinco proteínas mutadas: StI E2C, StI F15C, StI R52C, StI P80C y StI W111C. Los estudios de caracterización espectroscópicos permitieron establecer que las sustituciones aminoacídicas no provocaron cambios conformacionales en los mutantes con respecto a St Ir. Los monómeros de StI E2C, StI R52C y StI P80C mostraron capacidades similares de unión a las membranas en comparación con la variante recombinante. StI F15C mostró un ligero incremento en su capacidad de interacción con las membranas mientras que StI W111C resultó la de menor capacidad de unión. La capacidad formadora de poros de los monómeros, medida en vesículas liposomales y membrana eritrocitaria, resultó similar entre StI E2C, StI F15C y St Ir. Sin embargo, la actividad lítica de StI R52C, StI P80C y StI W111C disminuyó con respecto a St Ir. Los agregados diméricos por enlace disulfuro en StI R52C y StI W111C disminuyeron la actividad biológica de las proteínas. Una de las novedades científicas más importante del presente trabajo radica en que se demuestra que la presencia de agregados diméricos estabilizados por enlace disulfuro, en StI E2C, incrementa la actividad biológica formadora de poros tanto en vesículas liposomales como en eritrocitos. Estos resultados demuestran, por primera vez, que la unión covalente de los extremos aminos de St I potencia la formación de poros funcionales por un mecanismo hasta ahora desconocido. En la investigación se aportan nuevos elementos sobre la importancia de los residuos Glu², Phe¹⁵, Arg⁵², Pro⁸⁰ y Trp¹¹¹ en las etapas de unión inicial a las membranas y de formación de poros durante el mecanismo lítico. Por último, la obtención de los mutantes de Cys abre las posibilidades para el marcaje de St I con sondas de espín o sondas fluorescentes para estudiar el mecanismo de formación de poros mediante las espectroscopias de resonancia paramagnética electrónica (EPR) y de fluorescencia, y sustentan otras aplicaciones nanobiotecnológicas actualmente en desarrollo en nuestro grupo de trabajo.

Comunicación corta

Las actinoporinas son proteínas formadoras de poros (PFP) que se encuentran en las secreciones tóxicas de las anémonas de mar, las cuales son animales que pertenecen al orden Actiniaria (Kem 1988; Anderluh y Maček, 2002). Estas PFP se caracterizan por ser cadenas polipeptídicas monoméricas solubles en agua, resistentes a la proteólisis y tener puntos isoeléctricos generalmente superiores a 9,0. Se insertan espontáneamente en las membranas lipídicas que contienen esfingomiélna (SM, del inglés Sphingomyelin) para formar poros oligoméricos (Álvarez y cols., 2009; Kristan y cols., 2009).

Las estructuras tridimensionales (3D) de las actinoporinas se caracterizan por un núcleo central de hojas- β intercaladas (NCH- β) (en inglés, sandwich- β), dos hélices- α (Figura 1) (Mancheño y cols., 2003; Tanaka y cols., 2015) y un sitio de unión interfacial (SUI) mediante el cual interactúa con las membranas (Bakrač y cols., 2008) (Figura 1B). La primera hélice- α (hélice α 1) es anfipática, se localiza en el segmento del extremo amino (primeros 30 aminoácidos) y se ha sugerido que puede separarse del NCH- β para formar las paredes del poro (Mancheño y cols., 2003; Tanaka y cols., 2015). La segunda hélice- α (hélice α 2) se encuentra cercana al extremo carboxilo y forma parte del SUI (Bakrač y cols., 2008; Mechaly y cols., 2011) (Figura 1).

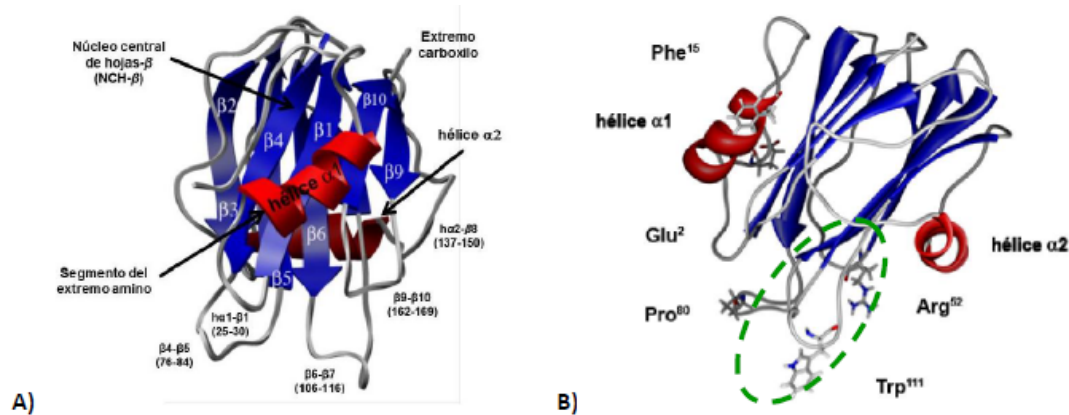


Figura 1. Elementos estructurales de las actinoporinas.

Representación en cintas de la estructura de St I (PDB: 2KS4). En rojo, se representan las hélices- α , en azul las hojas- β y en gris las estructuras no periódicas. **A)** Representación de la molécula de St I donde se muestran el segmento del extremo amino (primeros 30 aminoácidos), el núcleo central de hojas- β (NCH- β) y los lazos de la zona de interacción con la membrana donde se especifica el intervalo de las posiciones de los aminoácidos que lo forman (García-Linares y cols., 2013). **B)** Representación de la molécula de St I donde se muestran los aminoácidos Glu², Phe¹⁵, Arg⁵², Pro⁸⁰ y Trp¹¹¹ que fueron sustituidos por Cys. Con una elipse de línea verde discontinua se indica la región del sitio de unión interfacial (SUI). Las figuras se realizaron con el programa UCSF Chimera para Windows (Pettersen y cols., 2004).

En el Centro de Estudios de Proteínas (CEP) de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana se han caracterizado dos actinoporinas: sticholisina I (St I) y sticholisina II (St II) purificadas de la anémona *Stichodactyla helianthus* del Mar Caribe (Lanio y cols., 2001). A pesar de la gran cantidad de estudios realizados con las actinoporinas, en la actualidad se desconocen muchos detalles moleculares del mecanismo molecular mediante el cual forman poros en las membranas. Existe consenso alrededor de un mecanismo de formación de poros de varias etapas según

se representa en la Figura 2 (Alegre-Cebollada y cols., 2007; Mechaly y cols., 2011; Tanaka y cols., 2015).

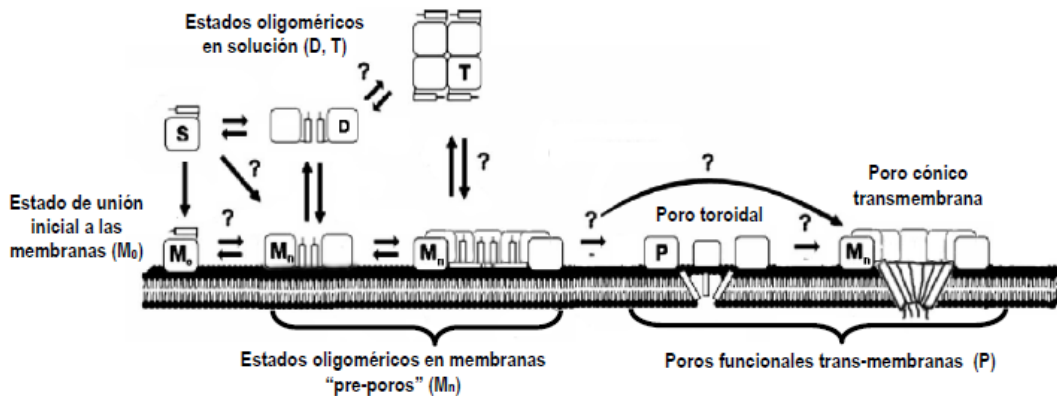


Figura 2: Esquema resumen de las etapas en los mecanismos de formación de poros propuestos para las actinoporinas

Los monómeros están dibujados con cuadrados que representan el NCH- β y el SUI, más un rectángulo adicional que representa la hélice- α del segmento del extremo amino. Los dímeros (D) se representan por la unión de dos monómeros a través de las regiones del extremo amino. S: monómero soluble, T: multímeros solubles, en este caso se representa un tetrámero, M₀: monómero unido a la membrana, M_n: estados "pre-poros" multiméricos (número de monómeros no determinado) unidos a la membrana y no conductores. P: poro toroidal. Para simplificar la representación de los estados "pre-poros" oligoméricos y de los poros solamente se dibujaron algunos de los monómeros. La Figura fue modificada a partir de los modelos de mecanismos propuestos por Alegre-Cebollada y cols. (2007), Mechaly y cols. (2011), Tanaka y cols., 2015 y tomando en cuenta los resultados obtenidos por nuestro grupo en la caracterización de los mutantes de Cys de St Ir.

En una primera etapa, los monómeros de las actinoporinas se unen a la membrana a través del SUI (Bakrač y cols., 2008). En la segunda etapa ocurre un cambio en la conformación del segmento del extremo amino que lo separa del NCH- β y se produce la oligomerización en estados "pre-poros" (Hong y cols., 2002; Tanaka y cols., 2015). En la tercera etapa, otro cambio de conformación extiende el segmento del extremo amino de cada uno de los monómeros sobre la superficie de la membrana (Malovrh y cols., 2003; Mancheño y cols., 2006). Y por último, en la cuarta etapa, los segmentos del extremo amino de los monómeros penetran en la membrana en una conformación helicoidal para la formación del poro (Álvarez y cols., 2001; Mechaly y cols., 2011; Tanaka y cols., 2015). Actualmente existen tres propuestas diferentes de la arquitectura del poro funcional: el poro toroidal formado por las hélice α 1 de cuatro monómeros y las cabezas polares de los lípidos (Mancheño y cols., 2003; Álvarez y cols., 2009), y los poros transmembrana nonamérico (Mechaly y cols., 2011) y octamérico (Tanaka y cols., 2015) formados por la contribución de las hélice α 1 de nueve y ocho monómeros, respectivamente (Figura 2). St I y St II poseen actividad lítica y citotóxica frente a eritrocitos de diferentes especies (Álvarez y cols., 2009) y sobre el parásito *Giardia duodenalis* (Tejuca y cols., 1999). En los últimos años han servido de base en la construcción de inmunotoxinas (Tejuca y cols., 2009) y para el diseño de sistemas de liberación de macromoléculas al citosol celular (Lanio y cols., 2010).

Actualmente en el CEP se desarrollan dos proyectos relacionados con las aplicaciones biotecnológicas de estas toxinas en colaboración con el Centro de Inmunología Molecular (CIM), por lo que dilucidar el mecanismo molecular de formación de poros por las actinoporinas es una cuestión esencial que puede contribuir a una mayor

eficacia en las potenciales aplicaciones biomédicas y biotecnológicas de esta familia de proteínas.

La combinación de las técnicas espectroscópicas y la mutagénesis sitio-específico ha constituido una metodología acertada en el estudio del mecanismo de formación de poros de las actinoporinas. La caracterización de un número importante de mutantes de la actinoporina Equinatoxina II (Eq II) de la anémona *Actinia equina* y de St II, permitió sugerir que el SU1 está involucrado en la interacción de las toxinas con las membranas y que la hélice $\alpha 1$ anfipática forma las paredes del poro transmembrana (Alegre Cebollada y cols., 2007). Sin embargo, aún no se ha demostrado la importancia de muchos de los residuos localizados en estas dos regiones. La ausencia de cisteína (Cys) en las actinoporinas brinda la ventaja de su introducción para el marcaje sitio-específico de la proteína con sondas de espin paramagnéticas o sondas fluorescentes a través de los grupos sulfhidrilos. Por estas razones existe un predominio de los mutantes de Cys ($\approx 80\%$) en las actinoporinas cuya caracterización funcional ha permitido analizar la importancia de las diferentes posiciones sustituidas en la unión a las membranas y la formación del poro (Malovrh y cols., 2003; Hong y cols., 2002; Kristan y cols., 2004; Bakrač y cols., 2008). En esta investigación se diseñaron y produjeron cinco mutantes de Cys de St I en regiones relevantes funcionalmente para la formación del poro: StI E2C y StI F15C (en la secuencia del extremo amino), y StI R52C, StI P80C y StI W111C (en la región de interacción con las membranas).

Para la obtención de los mutantes se obtuvo la variante recombinante de St I (St Ir), sobre cuya construcción genética se realizaron las sustituciones de forma independiente de los residuos Glu², Phe¹⁵, Arg⁵², Pro⁸⁰ y Trp¹¹¹ por Cys. Los procedimientos experimentales y los resultados relacionados con la obtención, expresión, purificación y caracterización conformacional y funcional de St Ir se pueden consultar en las tesis y publicaciones Valle, (2011); Valle, (2006) y Pazos y cols., (2006). Las estrategias de purificación de todas las actinoporinas recombinantes a partir de *E. coli* involucran más de un paso cromatográfico de purificación (búsqueda bibliográfica tesis Valle, 2011). Sin embargo, aprovechando las propiedades básicas de las actinoporinas frente a las proteínas de *E. coli*, durante la purificación de St Ir se estableció por primera vez, para una actinoporina recombinante, un procedimiento de purificación consistente en un único paso cromatográfico de intercambio catiónico en Carboximetil celulosa CM-52 (Valle, 2011 y Pazos y cols., 2006). Este aspecto tiene relevancia práctica porque permite la obtención rápida, eficaz y económica de este tipo de proteína.

St Ir presentó un residuo de Gln en la posición 16 en lugar de Glu con respecto a St I, pero este cambio no modificó las características conformacionales de la proteína recombinante (Valle, 2011; Valle, 2006 y Pazos y cols., 2006). St Ir y St I mostraron porcentajes de hemólisis iguales con respecto a la concentración de toxina ensayada a los 30 min de ensayo (Valle, 2011). Sin embargo, desde el punto de vista cinético la hemólisis en St Ir fue 1,8 veces más rápida que en St I (Valle, 2006 y Pazos y cols., 2006). La presencia de Gln en la posición 16 de St I presenta un 28% de conservación

en las posiciones equivalentes del resto de las actinoporinas. Es la primera vez que se describe para las sticholisinas que un cambio aminoacídico de la posición 16 de la naturaleza anteriormente descrita no produce modificaciones en la extensión del proceso hemolítico pero si en su cinética por lo que dicha posición pudiera ser relevante en el mecanismo lítico (Valle, 2006 y Pazos y cols., 2006). Con relación a este resultado, recientemente se determinó para la estructura octamérica propuesta para el poro, que el residuo de Asp 17 de fragaceatoxina C (FraC), equivalente al Gln16 de St Ir, tiene importancia en el proceso de oligomerización (Morante y cols., 2015a).

Las sustituciones de forma independiente por Cys de las cinco posiciones aminoacídicas (Glu², Phe¹⁵, Arg⁵², Pro⁸⁰ y Trp¹¹¹) permitió establecer la importancia funcional de estos residuos para la unión a las membranas y la formación de poros por St I. La propuesta de premio resume los resultados que se informaron por primera vez en la literatura científica acerca de la obtención de mutantes de Cys sitio-específicos en las sticholisinas lo cual contribuye a la comprensión de su mecanismo de formación de poros. Los procedimientos experimentales y los resultados relacionados con la obtención, expresión, purificación y caracterización conformacional y funcional de los mutantes de St I - StI E2C, StI F15C, StI R52C, StIP80C y StIW111C- se pueden consultar en las tesis y publicaciones: Pentón, (2007); López, (2009); Valle, (2011); De la Patria, (2013); Valle y cols., (2011); López y cols., (2011); Pentón y cols., (2011) y De la Patria y cols., (2014). En los análisis moleculares realizados mediante espectrometría de masas durante la purificación de estos mutantes se observó que los residuos de Cys podían estar modificados por moléculas como el glutatión mediante enlaces disulfuro (tesis Valle, 2011 y López, 2009). Es por ello que se introdujo una etapa de lavado intermedio con solución amortiguadora suplementada con 0,1 molL⁻¹ del agente reductor β -mercaptoetanol (BM) durante la cromatografía de intercambio iónico antes de la elusión de la proteína (tesis Valle, 2011 y López, 2009). Esta modificación experimental constituye un aporte práctico importante acerca de un procedimiento para eliminar posibles modificaciones que pueden presentar los residuos de Cys en los mutantes de actinoporinas durante el proceso de purificación. De esta forma se garantiza una mayor homogeneidad en las moléculas de proteínas que van a ser caracterizadas conformacional y funcionalmente. Las sustituciones de forma independiente de las cinco posiciones aminoacídicas (Glu², Phe¹⁵, Arg⁵², Pro⁸⁰ y Trp¹¹¹) en St I por Cys no provocaron cambios en las conformaciones 3D de los mutantes en solución y unida a membranas, con respecto a St Ir (De la Patria, 2013; Valle, 2011; Valle y cols., 2011; López y cols., 2011 y Pentón y cols., 2011).

Mancheño y cols. (2003) propusieron que la carga positiva de la Arg⁵¹, aminoácido que forma parte del SUI en StII podía estabilizar la unión de la toxina a la membrana mediante interacciones electrostáticas con la carga negativa de la fosforilcolina. Bakrač y cols., (2008) al sustituir el Trp¹¹² del SUI de Eqt II mediante mutagénesis sitio-específica demostró la importancia de este residuo en el reconocimiento específico de la SM. Es por ello que las sustituciones de la Arg⁵² de St I (equivalente de la Arg⁵¹ de St II) y del Trp¹¹¹ de St I (equivalente del Trp¹¹² de Eqt II) por Cys permitieron evaluar la

hipótesis de la participación de estos residuos en el reconocimiento de la membrana y la formación de poros.

Los resultados obtenidos demostraron experimentalmente que la sustitución de la Arg⁵² de St I (equivalente de la Arg⁵¹ de St II) por Cys no cambió la capacidad de St I de interactuar con membranas de vesículas lipídicas, sin embargo, disminuyó su actividad formadora de poros en vesículas y eritrocitos humanos. Estos resultados indican que el residuo Arg⁵² es importante para las etapas subsiguientes a la unión a la membrana y que conducen a la formación de un poro funcional (Valle, 2011; Valle y cols., 2011 y López y cols., 2011). Los resultados permitieron proponer que, de existir alguna interacción electrostática entre la Arg⁵² y la POC, como fue sugerido por Mancheño y cols. (2003), dicha interacción no va a ser determinante en la unión de la toxina a la membrana. La sustitución de la Arg⁵² por Cys en St I disminuyó entre 3-4 veces su actividad lítica frente a eritrocitos humanos y en 50 veces su capacidad permeabilizante en liposomas cargados con fluoróforo (Valle, 2011; Valle y cols., 2011 y López y cols., 2011).

La sustitución del Trp¹¹¹ de St I por Cys provocó una disminución de 8 veces la actividad hemolítica de la toxina frente a eritrocitos humanos (Pentón y cols., 2011). La disminución de la capacidad lítica del mutante se debió a una pérdida en su habilidad de interacción con las membranas lo cual está en correspondencia con la identificación de la participación del Trp¹¹¹ de St I en la interacción con los lípidos de micelas, según estudios de espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (Castrillo y cols., 2010; López-Castilla y cols., 2013). Nuestros resultados constituyen el primer informe experimental que corrobora la importancia del Trp¹¹¹ del sitio de unión a POC de St I en la unión a las membranas y la formación de poros. Los procedimientos experimentales y los resultados relacionados con la obtención, expresión, purificación y caracterización funcional del mutante StIW111C se pueden consultar en la publicación: Pentón y cols., (2011) y la tesis Pentón, (2007). La formación espontánea de estructuras homodiméricas estabilizadas por enlace disulfuro de este mutante permitió su purificación mediante técnicas cromatográficas y su caracterización conformacional y funcional. Los resultados están en correspondencia con todo lo anteriormente descrito.

La región estructural de las actinoporinas menos estudiada es la de los lazos localizados hacia la región de interacción con la membrana, los cuales se ha sugerido que pueden ser importantes en el proceso de unión y de reacomodo estructural que ocurre durante el despliegue del extremo amino para la formación del poro (Kristan y cols., 2004; Pardo-Cea y cols., 2011; García-Linares y cols., 2013; López-Castilla y cols., 2013; Tanaka y cols., 2015). Uno de los lazos de mayor flexibilidad conformacional en St I es el β 4- β 5 (76-84) (Figura 1A) (Pardo-Cea y cols., 2011; López-Castilla y cols., 2013; Tanaka y cols., 2015), el cual presenta el residuo de Pro⁸⁰, estrictamente conservado en la secuencia de las actinoporinas. La sustitución de la Pro⁸⁰ de St I por Cys permitió evaluar su importancia en el reconocimiento de la membrana. Los resultados mostraron que el cambio de Pro⁸⁰ por Cys disminuyó ligeramente la afinidad de la toxina por las membranas, lo suficiente como para disminuir en 2,6 veces y en 18 veces su capacidad permeabilizante de vesículas y su

actividad hemolítica, respectivamente (tesis De la Patria, 2013; De la Patria y cols., 2014). Estos resultados constituyen la primera evidencia experimental que sugiere que el residuo de Pro⁸⁰ en el lazo β 4- β 5 próximo al sitio de unión interfacial es importante para la función lítica de la toxina. Probablemente este residuo participa en un evento o etapa posterior a la unión inicial de la toxina a las membranas y previa a la formación del poro funcional, tales como el acomodo adecuado de la toxina en la membrana o la oligomerización.

Kristan y cols., (2007), propusieron que los primeros cinco aminoácidos del segmento del extremo amino de Eq τ II participan en el anclaje de la hélice α 1 en la cara “trans” de la membrana donde la carga negativa del Asp3 es crucial para definir las características electrofisiológicas del canal. Para St II, Alegre-Cebollada y cols., (2004) sugirieron la importancia de la Phe¹⁴ en la unión del segmento del extremo amino al NCH- β . En el modelo de poro cónico formado por 9 monómeros de FraC de *Actinia fragacea*, se describe que durante la formación del posible estado “pre-poro”, la Phe¹⁶ participa en una interacción con la Ile59 y Val60 del monómero adyacente (Mechaly y cols., 2011). De manera que las sustituciones en St I del Glu² (carga negativa equivalente del Asp³ de Eq τ II) y de la Phe¹⁵ (equivalente a la Phe¹⁶ de FraC) por Cys, contribuyeron a establecer la importancia funcional de estas dos posiciones durante la formación del poro.

La sustitución de Phe¹⁵ por Cys en St Ir aumentó en 1,3 veces la capacidad de interacción del mutante StI F15C con monocapas lipídicas y en un 6% su interacción con bicapas lipídicas de vesículas de POPC:SM (85:15), con respecto a St Ir (Valle, 2011). StI F15C mostró, durante su asociación con las membranas de las vesículas, los mismos rasgos conformacionales que St Ir (Valle, 2011). Las posibles explicaciones a este resultado pudieran estar relacionadas con la probable participación del residuo Phe¹⁵ en la estabilización del segmento del extremo amino al NCH- β (Alegre-Cebollada y cols. 2004), o más recientemente acerca de su papel en la oligomerización según los modelos de poro nonamérico (Mechaly y cols., 2011) y octamérico (Tanaka y cols., 2015; Morante y cols., 2015a y 2015b). De tal forma que la sustitución de Phe¹⁵ por Cys pudiera estar facilitando el despliegue del segmento del extremo amino o el proceso de oligomerización entre los monómeros en la membrana, incrementando su interacción aparente con respecto a St Ir. Este constituye el primer informe experimental acerca de que la sustitución de Phe¹⁵ de St I por Cys aumente su capacidad de unión a monocapas lipídicas y membranas de vesículas de POPC: SM (85:15), sin modificar la actividad formadora de poros de esta proteína, por lo que la posición es importante en las etapas iniciales de su interacción con las membranas.

Los resultados presentados demuestran que los monómeros de los diferentes mutantes dimerizan mediante formación de enlace disulfuro, cuestión poco estudiada en la literatura hasta el momento (Valle, 2011 y Pentón y cols., 2011). StI W111C y StI P80C tienen la mayor tendencia a formar agregados diméricos por enlace disulfuro en correspondencia con el mayor grado de exposición de sus residuos de Cys (>90%). Le siguen en orden StI E2C y StI R52C donde el grado de exposición de sus Cys también

va disminuyendo. En el caso de StI F15C prácticamente no se observa dimerización (Valle, 2011 y De la Patria, 2013).

Funcionalmente los dímeros de StI W111C y de StI R52C no interactúan con las membranas y en consecuencia pierden la capacidad de formar poros (Pentón y cols., 2011), probablemente porque en la interacción proteína-proteína participan los SUI impidiendo la interacción con membranas (Valle, 2011). Los monómeros de StI E2C mostraron similar capacidad de formación de poros con respecto a St Ir, por tanto el cambio aminoacídico de Glu² por Cys no modificó la actividad funcional de la proteína recombinante. Sin embargo, cuando la muestra de StI E2C estuvo compuesta por aproximadamente un 46% de agregados diméricos estabilizados por enlace disulfuro, se observó un incremento de ≈ 6 veces en la capacidad de formación de poros (Valle, 2011). De los Ríos y cols. (1999), demostraron en St II la existencia de un equilibrio monómero-tetrámero en solución, y a partir de estos estudios surgió la interrogante de si estos oligómeros pre-formados podían participar directamente en la formación de poros (Figura 2). Una novedad científica de este trabajo consiste en que, por primera vez, se demuestra que agregados preformados en solución de St I, específicamente agregados diméricos del mutante StI E2C estabilizados por enlace disulfuro, son capaces de potenciar la actividad formadora de poros de esta toxina. Por tal motivo, el mutante StI E2C y sus estructuras diméricas pudieran constituir potenciales herramientas para el estudio del proceso de oligomerización durante el mecanismo de formación de poros.

La importancia teórica de este trabajo radica en sus aportes al conocimiento acerca de la importancia que tienen los aminoácidos Glu², Phe¹⁵, Arg⁵², Pro⁸⁰ y Trp¹¹¹ para la unión a las membranas y para la formación del poro funcional de St I y -por extensión- para el resto de las actinoporinas. Estos resultados constituyen un aporte al conocimiento del mecanismo de formación de poros de las sticholysinas en las membranas en la medida en que esclarece el papel de los aminoácidos Glu², Phe¹⁵, Arg⁵², Pro⁸⁰ y Trp¹¹¹ localizados en regiones funcionalmente importantes de estas toxinas en el proceso de unión a las membranas y la formación del poro funcional.

Referencias Bibliográficas

Todos los resultados presentados forman parte de las siguientes tesis de maestría (4), doctorado (1) y artículos científicos (6):

- [1] De la Patria (2013) "Obtención y marcaje con sonda paramagnética electrónica del mutante StI P80C de Sticholysina I, actinoporina de *Stichodactyla helianthus*". Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. Autora: Lic. Yadira de la Patria Hervis Valdés. Tutores: Dr. Aisel Valle Garay y Dra. Isabel Fabiola Pazos Santos. Tesis de maestría.
- [2] Valle (2011) "Importancia de los residuos aminoacídicos Glu², Phe¹⁵ y Arg⁵² de la Sticholysina I, una toxina de *Stichodactyla helianthus*, en la unión y la formación de poros en las membranas". Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

Autor: MSc. Aisel Valle Garay. Tutores: Dra. Isabel Fabiola Pazos Santos y Dra. María Eliana Lanio Ruiz. Asesor: Dr. Tirso Pons Hernández. Tesis de doctorado.

- [3] López (2009) "Obtención y caracterización de dos mutantes de Cys de St I, proteína formadora de poros de la anémona de mar *Stichodactyla helianthus*". Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. Autora: Lic. Aracelys López Castilla. Tutores: MSc. Aisel Valle Garay y Dra. Isabel Fabiola Pazos Santos. Tesis de maestría.
- [4] Pentón (2007) "Diseño, obtención y caracterización de StI W111C, un mutante de Sticholisina I, citolisina de la anémona *Stichodactyla helianthus*". Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. Autor: David Pentón Ribas. Tutora: Dra. Mayra Tejuca Martínez. Asesores: Dr. Javier Campos Gómez y Dr. Tirso Pons Hernández. Tesis de maestría.
- [5] Valle (2006) "Clonación, expresión y caracterización de la sticholisina I recombinante, una citolisina de la anémona *Stichodactyla helianthus*". Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. Autor: Lic. Aisel Valle Garay. Tutor: Dr. Dra. Isabel Fabiola Pazos Santos. Asesores: Dra. Diana Margarita Martínez Cruz-Bustillo y Dr. Javier Campos Gómez. Tesis de maestría.
- [6] Valle, A.; Alvarado-Mesén, J.; Lanio, M.E.; Álvarez, C.; Barbosa, J.A.R.G.; Pazos, I.F. Pazos (2015) The multigene families of actinoporins (part I): Isoforms and genetic structure. *Toxicon*. 103: 176-187.
- [7] De la Patria, Y.; Valle, A.; Canet, L.; Álvarez, C.M.; Lanio, M.E.; Pazos, I. F (2014) Relevance of Pro80 for membrane interaction and pore formation by Sticholysin I, a toxin from *Stichodactyla helianthus* (Anthozoa: Stichodactylidae). *Revista cubana de ciencias biológicas*. 3 (2): 27-40.
- [8] Valle, A.; López-Castilla, A.; Pedrera, L.; Martínez, D.; Tejuca, M.; Campos, J.; Fando, R.; Lissi, E.; Álvarez, C.; Lanio, M.E.; Pazos, F. y Schreier, S. (2011) Cys mutants in functional regions of Sticholysin I clarify the participation of these residues in pore formation. *Toxicon*. 58: 8-17.
- [9] López, A.; Valle, A.; Pedrera, L.; Martínez, D.; Fando, R.; Schreier, S.; Álvarez, C.; Lanio, M.E. y Pazos, F. (2011) The Sticholysin I mutants St I E2C and St I R52C show similar binding to liposomal vesicles but differ in their permeabilizing activity. *Biología Aplicada*. 28(1):13-18
- [10] Pentón, D.; Pérez-Barzaga, V.; Díaz, I.; Reytor, M.L.; Campos, J.; Fando, R.; Calvo, L.; M.Cilli, E.; Morera, V.; Castellanos-Serra, L.R.; Pazos, F.; Lanio, M.E.; Álvarez, C.; Pons, T.; Tejuca, M. (2011) Validation of a mutant of the pore-forming toxin sticholysin-I for the construction of proteinase-activated immunotoxins. *Prot. Engin. Design & Selection*. 24(6): 485–493.
- [11] Pazos, F.; Valle, A.; Martínez, D.; Ramírez, A.; Calderón, L.; Pupo, A.; Tejuca, M.; Morera, V.; Campos, J.; Fando, R.; Dyszy, F.; Schreier, S.; Horjales, E.; Álvarez, C.; Lanio, M.E. y Lissi, E. (2006) Structural and functional characterization of a recombinant

sticholysin I (rSt I) from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*. 12: 1083-1094.

Otras referencias citadas

Alegre-Cebollada, J.; Lacadena, V.; Onaderra, M.; Mancheño, J.M.; Gavilanes, J.G. y Del Pozo, A.M. (2004) Phenotypic selection and characterization of randomly produced non-haemolytic mutants of the toxic sea anemone protein sticholysin II. *FEBS Lett.* 575: 14-18.

Alegre-Cebollada, J.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G.; Martínez del Pozo, A. (2007) Sea Anemone Actinoporins: The transition from a folded soluble state to a functionally active membrane-bound oligomeric pore. *Curr. Prot. Pept. Science*. 8: 558-572.

Álvarez, C.; Mancheño, J.M.; Martínez, D.; Tejuca, M.; Pazos, F. y Lanio, M.E. (2009) Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. *Toxicon*. 54(8): 1135-1147.

Álvarez, C.; Pazos, I.F.; Lanio, M.E.; Martínez, D.; Schreier, S.; Casallanovo, F.; Campos, A.M. y Lissi, E. (2001) Effect of pH on the conformation, interaction with membranes and hemolytic activity of sticholysin II, a pore forming cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*. 39: 539-53.

Anderluh, G. y Maček, P. (2002) Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* 40: 111-24.

Bakrač, B.; Gutiérrez-Aguirre, I.; Podlesek, Z.; Sonnen, A.; Gilbert, R.; Maček, P.; Lakey, J. y Anderluh, G. (2008) Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin. *J.Biol. Chem.* 283: 18665-18677.

Castrillo, I.; Araujo, N.A.; Alegre-Cebollada, J.; Gavilanes, J. G.; Martínez-del-Pozo, A. y Bruix, A. (2010) Specific interactions of sticholysin I with model membranes: An NMR study. *Proteins*. 78:1959–1970.

De los Ríos, V.; Mancheño, J.M.; Martínez del Pozo, A.; Alfonso, C.; Rivas, G.; Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1999) Sticholysin II, a cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*, is a monomertetramer associating protein. *FEBS Lett.* 455: 27-30.

García-Linares, S.; Castrillo, I.; Bruix, M.; Menéndez, M; Alegre-Cebollada; J; Martínez-del-Pozo, A; Gavilanes, J. (2013) Three-dimensional structure of the actinoporin sticholysin I. Influence of longdistance effects on protein function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 532: 39-45.

Hong, Q.; Gutiérrez-Aguirre, I.; Barlič, A.; Malovrh, P.; Kristan, K.; Podlesek, Z.; Maček, P.; Turk, D.; Gonzalez-Mañas, J.M.; Lakey, J.H. y Anderluh, G. (2002) 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.* 277: 41916-24.

- Kem, W.R. (1988) Sea anemone Toxins: structure and action. En: The biology of the nematocyst. New York. Academic Press. p. 375-405.
- Kristan, K.; Podlesek, Z.; Hojnik, V.; Gutiérrez-Aguirre, I.; Gunčar, G.; Turk, D.; González-Mañas, J.; Lakey, J.H.; Maček, P. y Anderluh, G. (2004) Pore formation by Equinatoxin, a Eukaryotic Pore-forming Toxin, Requires a Flexible N-terminal Region and a Stable β -Sandwich. *J. Biol. Chem.* 45. vol 279: 46509-46517.
- Kristan, K.; Viero, G.; Maček, P.; Dalla Serra, M. y Anderluh G. (2007) The equinatoxin N-terminus is transferred across planar lipid membranes and helps to stabilize the transmembrane pore. *FEBS J.* 274: 539-550.
- Kristan, K.C.; Viero, G.; Dalla Serra, M.; Maček, P.; Anderluh, G. (2009) Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon.* 54(8): 1125-1134.
- Lanio M.E.; Lombardero, J.; Fernández, L.; Laborde, R.; Cruz, Y.; Luzardo, M.C.; Mesa, C.; Álvarez, C.; Pazos, F.; Tejuca, M.; Valle, A.; Alonso, M.E. y Canet, L. (2010). Patente CU-2010-144.
- Lanio, M.E.; Morera, V.; Álvarez, C.; Tejuca, M.; Gomez, T.; Pazos, F.; Besada, V.; Martinez, D.; Huerta, V.; Padron, G. y Chavez, M.A. (2001) Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon.* 39: 187-94.
- Malovrh, P.; Viero, G.; Dalla Serra, M.; Podlesek, Z.; Lakey, J.H.; Macek, P.; Menestrina, G. y Anderluh, G. (2003) A novel mechanism of pore-formation: Membrane penetration by the N-terminal amphipathic region of Equinatoxin. *J Biol. Chem.* 278: 22678-22685.
- Mancheño, J.M.; Martín-Benito, J.; Gavilanes, J.G. y Vázquez, L. (2006) A complementary microscopy analysis of Sticholysin II crystals on lipid films: Atomic force and transmission electron characterizations. *Biophys. Chem.* 119(3): 219-23.
- Mancheño, J.M.; Martín-Benito, J.; Martínez-Ripoll, M.; Gavilanes, J.G. y Hermoso, J.A. (2003) Crystal and electron microscopy structures of Sticholysin II actinoporin reveal insight into the mechanism of membrane pore formation. *Structure.* 11: 1319-1328.
- Mechaly, AE; Bellomio, A.; Gil-Cartón, D.; Morante, K.; Valle, M.; González-Mañas, J.M. y Guérin, M.A. (2011) Structural Insights into the Oligomerization and Architecture of Eukaryotic Membrane Pore-Forming Toxins. *Structure.* 19: 181-191.
- Pardo-Cea, M.A.; Castrillo, I.; Alegre-Cebollada, J.; Martínez-del-Pozo, A.; Gavilanes, J.G. y Bruix, M. (2011) Intrinsic local disorder and a network of charge-charge interactions are key to actinoporin membrane disruption and cytotoxicity. *Biomol. NMR Assign.* 4: 69-72.
- Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C. y Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25(13): 1605-1612.

Tejuca, M.; Anderluh, G.; Dalla Serra, M. (2009) Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon*. 54(8): 1206-1214.

Tejuca, M.; Anderluh, G.; Maček, P.; Marcet, R.; Torres, D.; Sarracent, J.; Álvarez, C.; Lanio, M.E.; Dalla Serra, M. y Menestrina, G. (1999) Antiparasite activity of sea-anemone cytolytins on *Giardia duodenalis* and specific targeting with anti-*Giardia* antibodies. *Int. J. Parasitol.* 29: 489-98.