



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

***Avances en la interacción de Alfa Hemolisina de E. coli con  
glóbulos rojos humanos: potencial uso del dominio  
N-terminal en la construcción de inmunotoxinas***

---

**Tesista: Lic. Lucía Cané**

**Directora: Dra. Vanesa Herlax**

**Codirectora: Dra. Sabina Maté**

**Año: 2023**

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, se realizó en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), bajo la dirección de la Dra. Vanesa Herlax y la codirección de la Dra. Sabina Maté. Recibí una beca doctoral del CONICET que me permitió desarrollar la presente tesis.

## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer a Vanesa y a Sabina por confiar en mí y darme la posibilidad de hacer este proyecto, por dirigirme y acompañarme.

Al INIBIOLP, el CONICET, las Facultades de Cs. Médicas y de Cs. Exactas de la UNLP por brindarme el espacio y los recursos necesarios para desarrollar mi tesis.

A mis compañeras de grupo, anteriores y actuales, Lucre, Romi V., Meli y Kenia, por hacer los días de laboratorio más entretenidos, por contestar mis dudas, ayudarme con protocolos y más.

A mis amigas, Marli, Romi G. y Sofi, por acompañarme siempre, divertirme, aconsejarme, y hacer de las dificultades anécdotas.

A todos los integrantes del instituto, en especial a Marianela, Romi B. y Boris, por ayudarme, prestarme reactivos y solucionarme problemas siempre que lo necesité.

A mis amigos de la vida, Mili, Mati, Dani, Sofi, Caro, Dai, por escucharme y estar siempre.

A mis viejos por enseñarme que la educación es el camino, por empujarme hacia adelante y ayudarme a crecer.

A mis hermanos, por ser mis cómplices, mis amigos y estar siempre.

A mi abuela por prender velas siempre que lo necesité y por ser feliz cuando yo soy feliz.

*Dedicada a mi amiga incondicional,  
La coca*

## Resumen

Nuestro grupo de trabajo se especializa en el estudio del mecanismo de acción de alfa hemolisina, una toxina extracelular secretada por cepas uropatógenicas de *Escherichia coli*. En particular, esta tesis doctoral, se basa en el estudio de la interacción de HlyA con glóbulos rojos humanos. Glicoforina se postuló como proteína receptora de HlyA en glóbulos rojos, aunque existen resultados contradictorios al respecto. Al estudiar la actividad de HlyA, en eritrocitos carentes de glicoforina A y B, observamos que no presentaba diferencias respecto de la actividad en glóbulos rojos normales, por lo que nos propusimos estudiar la presencia de otra proteína receptora mediante la técnica de *Far Western Blot*.

Por otro lado, previamente nuestro grupo demostró que HlyA interacciona directamente con colesterol, lo cual facilita la oligomerización de la toxina en membrana y la subsecuente lisis de los glóbulos rojos. En la secuencia de la toxina se encontraron secuencias CRAC (Cholesterol Recognition/interaction Aminoacid Consensus sequence) y CARC (de igual secuencia, pero en sentido contrario). A partir de estos resultados se sintetizaron péptidos con secuencias CRAC y CARC, presentes en el dominio de inserción en la membrana y en la región entre los ácidos grasos de HlyA. Los péptidos se sintetizaron mediante la técnica de síntesis química en fase sólida (SPPS) y se caracterizó su interacción con membranas con diferente porcentaje de colesterol por técnicas como *Surface Plasmon Resonance* (SPR), monocapas de Langmuir y simulaciones de dinámica molecular.

Los resultados obtenidos a partir del estudio de la interacción de HlyA con la membrana, nos permitieron plantear el uso de distintos dominios de la toxina como herramientas terapéuticas. Específicamente, planteamos el uso de un péptido correspondiente a un sitio CRAC entre los ácidos grasos para inhibir la actividad lítica de la toxina; y un péptido correspondiente al dominio de inserción de la toxina para la construcción de una inmunotoxina. Para esto último se lo conjugó químicamente a anti-trop-2 (anticuerpo que reacciona contra una proteína de

membrana sobreexpresada en células tumorales), mostrando actividad citotóxica en células tumorales de mama (MCF-7).

En conclusión, los resultados obtenidos desde la investigación básica aportan conocimiento sobre la interacción de HlyA con glóbulos rojos humanos y su mecanismo de acción. Además, esta caracterización bioquímica-biofísica permitió el diseño de terapias alternativas para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por cepas uropatógenicas de *Escherichia coli* y proponer el diseño de una inmunotoxina para el tratamiento del cáncer de mama.

## Abreviaturas y Símbolos

<b>DO</b>	Densidad óptica
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>GnHCl</b>	Cloruro de Guanidinio
<b>GP</b>	Glicoforina
<b>GR</b>	Glóbulos rojos
<b>HlyA</b>	Alfa-hemolisina
<b>ASH</b>	Albúmina sérica humana
<b>ITU</b>	Infecciones del tracto urinario
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de equilibrio de disociación
<b>LB</b>	Luria Bertani (Tryptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L)
<b>ProHlyA</b>	Prohemolisina
<b>RBC</b>	NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,5 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,50 mM, CaCl <sub>2</sub> 1,32 mM, MgSO <sub>4</sub> 1,91 mM, glucosa 5 mM, pH 7.4 a 25 °C, 300 mOsm
<b>RTX</b>	<i>Repeats in Toxin</i>
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>SPR</b>	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
<b>TC</b>	Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4 a 25 °C
<b>UPEC</b>	cepas uropatogénicas de <i>Escherichia coli</i>
<b>PO</b>	Parámetro de orden

## Índice

<b>Agradecimientos</b>	<b>iii</b>
<b>Resumen</b>	<b>v</b>
<b>Abreviaturas y Símbolos</b>	<b>vii</b>
<b>Índice</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>xiii</b>
<b>Capítulo 1. Introducción general</b>	<b>1</b>
1.1 Alfa hemolisina de <i>Escherichia coli</i> : síntesis y estructura	2
1.2 Cepas uropatogénicas de <i>Escherichia coli</i>	6
1.3 Rol de HlyA en la patogénesis	10
1.4 Mecanismo de acción de HlyA en glóbulos rojos	11
1.5 Objetivos generales	14
<b>Capítulo 2. Materiales y métodos generales</b>	<b>15</b>
2.1 Declaración ética	16
2.2 Purificación de HlyA y ProHlyA	16
2.3 Aislamiento de glóbulos rojos humanos	17
2.4 Purificación de membranas de glóbulos rojos humanos	17
2.5 Ensayos de actividad hemolítica	17
2.6 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	18
2.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE	18
2.8 <i>Western Blot</i>	19
2.9 Análisis estadístico	20

### **PARTE 1: AVANCES EN LA INTERACCIÓN DE ALFA HEMOLISINA DE *E. COLI* CON GLÓBULOS ROJOS HUMANOS**

---

<b>Capítulo 3. Rol de la interacción HlyA-glicoforina en el mecanismo de acción de la toxina en glóbulos rojos humanos</b>	<b>22</b>
3.1 Introducción	23
3.2 Materiales y Métodos	25
3.2.1. Purificación de HlyA, ProHlyA y HlyA $\Delta$ 914-936	25
3.2.2. Ensayos de actividad hemolítica	25
3.2.3. Medidas de resonancia de plasmones superficiales	26
3.2.4. <i>Far Western Blot</i>	31
3.3 Resultados	34
3.3.1. Actividad hemolítica de HlyA en presencia de anticuerpos anti-GPs	34
3.3.2. Ensayo de unión de HlyA, ProHlyA y HlyA $\Delta$ 914-936 a GPA	36
3.3.3. Cinética de hemólisis de glóbulos rojos humanos GPA $^{-/-}$ /GPB $^{-/-}$ con HlyA	39
3.3.4. <i>Far Western Blot</i>	41
3.4 Discusión	44
<b>Capítulo 4. Interacción de péptidos CRAC y CARC de HlyA con sistemas modelo de membrana</b>	<b>46</b>
4.1 Introducción	47
4.1.1. Relevancia de la región comprendida entre los ácidos grasos de HlyA.	48
4.1.2. Relevancia del dominio de inserción en membrana de HlyA	50
4.2 Materiales y Métodos	52
4.2.1. Síntesis Peptídica en fase sólida	52
4.2.2. Control de calidad de los péptidos	54
4.2.3. Dicroísmo circular	54
4.2.4. Monocapas de Langmuir	55
4.2.5. Ensayos de SPR	57
4.2.6. Simulaciones de Dinámica Molecular	60
4.2.7. Hemólisis e inhibición de la actividad de HlyA por los péptidos	62

4.2.8.	Medidas de $\text{Ca}^{+2}$ intracelular en glóbulos rojos humanos	62
4.3	Resultados	63
4.3.1.	Síntesis de péptidos CRAC o CARC derivados de HlyA	63
4.3.2.	Inserción de los péptidos en monocapas de Langmuir	66
4.3.3.	Ensayos de SPR entre los péptidos y bicapas lipídicas	67
4.3.4.	Simulaciones de Dinámica Molecular de los péptidos con bicapas lipídicas	70
4.3.5.	Actividad lítica de los péptidos e inhibición de la actividad de HlyA	77
4.3.6.	Medidas de $\text{Ca}^{+2}$ intracelular en glóbulos rojos tratados con los péptidos	79
4.4	Discusión	82
4.4.1.	Interacción de PEP 1 con membranas - rol del colesterol	82
4.4.2.	Interacción de PEP 2 con membranas - rol del colesterol	84

## **PARTE 2: APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE HLYA**

---

<b>Capítulo 5.</b>	<b>Estudio del efecto inhibitorio de un péptido CRAC sobre la actividad hemolítica de HlyA</b>	<b>87</b>
5.1	Introducción	88
5.2	Materiales y métodos	90
5.2.1.	Cinética de inhibición de hemólisis	90
5.2.2.	Ensayos de unión a membranas de glóbulos rojos	91
5.2.3.	Ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)	91
5.3	Resultados	95
5.3.1.	Inhibición de la actividad hemolítica de HlyA por PEP 1	95
5.3.2.	Unión de HlyA a membranas de glóbulos rojos en presencia de PEP1	97
5.3.3.	Inhibición de la oligomerización de HlyA en presencia de PEP 1	98
5.4	Discusión	100

<b>Capítulo 6. Construcción de una inmunotoxina compuesta por una región citotóxica de HlyA y anti-trop-2</b>	<b>103</b>
6.1 Introducción	104
6.1.1. Inmunotoxinas formadoras de poros para el tratamiento de tumores sólidos	106
6.1.2. Biomarcadores de tumores sólidos	107
6.2 Materiales y Métodos	109
6.2.1. Cultivo de líneas celulares	109
6.2.2. Medidas de viabilidad celular	109
6.2.3. Clonado del dominio de inserción de HlyA	110
6.2.4. Purificación del dominio de inserción de HlyA	116
6.2.5. Construcción de la inmunotoxina	117
6.3 Resultados	119
6.3.1. Actividad citotóxica de PEP 2 en la línea celular MCF-7	119
6.3.2. Clonado del dominio de inserción de HlyA	120
6.3.3. Expresión y purificación del dominio de inserción de HlyA	122
6.3.4. Actividad hemolítica y citotóxica del péptido	126
6.3.5. Construcción de la inmunotoxina	128
6.3.6. Actividad citotóxica de la inmunotoxina	129
6.4 Discusión	132
<b>Capítulo 7. Conclusiones y perspectivas</b>	<b>135</b>
<b>Anexos</b>	<b>137</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>139</b>

## Lista de tablas

Tabla 1. Principales factores de virulencia de las cepas uropatogénicas de <i>Escherichia coli</i> . .....	8
Tabla 2. Valores de las constantes de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) entre GPA y ASH inmovilizadas, y HlyA, HlyA $\Delta_{914-936}$ y ProHlyA expresadas en nM.....	38
Tabla 3. Proteínas identificadas por espectrometría de masas de las bandas obtenidas en el Far Western Blot. ....	43
Tabla 4. Incremento de la presión superficial de monocapas de POPC y POPC:Cho 2:1 en presencia de los péptidos. ....	67
Tabla 5. Digestión con enzimas de restricción del inserto y del plásmido aceptor. ....	115
Tabla 6. Ligación del plásmido e inserto. ....	115
Tabla 7. Valores de IC50 en GR humanos y en las líneas MCF-7 y Jurkat de HlyA, PEP 2, el dominio de inserción y la inmunotoxina.....	133

## Lista de figuras

Figura 1. Dominios y estructura de HlyA de <i>E. coli</i> . .....	5
Figura 2. Pasos de la patogénesis de las infecciones del tracto urinario. ....	9
Figura 3. Técnica de Resonancia de plasmones superficiales.....	30
Figura 4. Esquema de la técnica de Far Western Blot. ....	33
Figura 5. Cinética de hemólisis inducida por HlyA en glóbulos rojos humanos preincubados con diferentes anticuerpos anti-GP.....	35
Figura 6. Ensayos de SPR entre GPA y ASH con variantes de HlyA. ....	37
Figura 7. Actividad hemolítica de HlyA en presencia de ASH. ....	38
Figura 8. Cinética de hemólisis de glóbulos rojos humanos GPA <sup>-/-</sup> /GPB <sup>-/-</sup> tratados con HlyA.....	40
Figura 9. Far western blot de glóbulos rojos humanos tratados con HlyA.....	42
Figura 10. Localización de sitios CRAC y CARC en un esquema de HlyA. ....	48
Figura 11. Diagrama de los pasos de la síntesis peptídica en fase sólida. ....	52
Figura 12. Diagrama de la Balanza de Langmuir. ....	56
Figura 13. Gráficos representativos de los experimentos de SPR. ....	59
Figura 14. Alineamiento múltiple de distintos dominios de HlyA con otras toxinas RTX.....	64
Figura 15. Caracterización de los péptidos sintetizados. ....	65
Figura 16. Ensayos de SPR: interacción de PEP 1 y PEP 2 con bicapas de distinta composición lipídica. ....	68
Figura 17. Comparación entre las K <sub>D</sub> de PEP 1 y PEP 2.....	69
Figura 18. Perfiles de densidad de masa de las distintas membranas con y sin péptidos.....	72

Figura 19. Modulación de los parámetros de orden de fosfolípidos y distribución del colesterol en presencia de PEP 1 y PEP 2. ....	73
Figura 20. Imágenes de simulaciones de membranas de POPC:Cho (2:1) en presencia y ausencia de los péptidos.....	74
Figura 21. Interacción entre los péptidos y las moléculas de colesterol de la membrana de POPC:Cho (2:1). ....	76
Figura 22. Hemólisis de los péptidos e inhibición de la actividad de HlyA por la presencia de los péptidos.....	78
Figura 23. Medidas de $Ca^{+2}$ intracelular en glóbulos rojos humanos. ....	81
Figura 24. Esquema de las incubaciones realizadas para los ensayos de inhibición con PEP 1, creado con BioRender.com. ....	90
Figura 25. Inhibición de la actividad lítica de HlyA por PEP 1.....	96
Figura 26. Inhibición de la unión de HlyA a membranas de glóbulos rojos por PEP 1. ....	98
Figura 27. Inhibición de la oligomerización de la toxina por PEP 1.....	99
Figura 28. Esquema de los pasos de clonado molecular del dominio de inserción de HlyA.....	111
Figura 29. Mapa del sitio de clonado del plásmido pet28a.....	112
Figura 30. Citotoxicidad de PEP 2 en la línea celular MCF-7.....	120
Figura 31. Clonado del dominio de inserción de HlyA.....	122
Figura 32. Secuencia aminoacídica resultante de la traducción in silico del plásmido recombinante generado. ....	123
Figura 33. Expresión y purificación del dominio de inserción de HlyA. ....	125
Figura 34. Actividad citolítica del péptido en glóbulos rojos humanos y en la línea celular MCF-7.....	127
Figura 35. Construcción de la inmunotoxina. ....	129

Figura 36. Actividad citotóxica de la inmunotoxina en células MCF-7..... 130

Figura 37. Actividad citotóxica de la inmunotoxina en células Jurkat..... 131

# Capítulo 1. Introducción general

---

## 1.1 Alfa hemolisina de *Escherichia coli*: síntesis y estructura

---

La toxina alfa hemolisina (HlyA), secretada por cepas uropatógenicas de *Escherichia coli* (UPEC), es un miembro representativo de la familia de toxinas RTX (del inglés *Repeat in toxin*) (Welch 1991). Esta familia de citolisinas se ha clasificado en dos grupos, las hemolisinas, que presentan un amplio rango de células *target*, y las leucotoxinas que presentan una mayor especificidad respecto al tipo celular y especie (Lally *et al.* 1999, Linhartova *et al.* 2015). La toxina más estudiada dentro del grupo de las hemolisinas es HlyA de *E. coli*, LtxA de *A. actinomycetemcomitans* es el prototipo de las leucotoxinas (Benz 2020). La toxina-hemolisina de la adenilato ciclase (CyaA) de *Bordetella Pertussi* presenta características de ambos grupos, por lo que también se ha estudiado ampliamente y puede considerarse como el prototipo de la familia RTX (Linhartova *et al.* 2010). Por otro lado, en 1999 se descubrió un tercer grupo de toxinas RTX, que se denominó MARTX (Multifunctional autoprocesing RTX) (Lin *et al.* 1999). La característica más llamativa de estas toxinas es su gran tamaño, ya que poseen secuencias de más de 3000 aminoácidos, el prototipo representativo de este grupo es MARTX<sub>Vc</sub> de *Vibrio cholerae* (Kudryashov *et al.* 2008).

Los miembros de esta familia de toxinas, secretadas por bacterias gram-negativas comparten ciertas características como: (i) un dominio anfipático compuesto por  $\alpha$ -hélices (Hyland *et al.* 2001); (ii) residuos de lisina conservados que son acilados por RtxC (Issartel *et al.* 1991, Stanley *et al.* 1994, Stanley *et al.* 1998); (iii) un dominio conservado de repeticiones de un nonapéptido cuya secuencia consenso es X-(L/I/F)-X-G-X-G-(N/D)-D, que forman sitios de unión al calcio y dan el nombre a la familia de toxinas (Goñi *et al.* 1998, Welch 2001) y (iv) una secuencia señal de secreción en el extremo C-terminal (Gray *et al.* 1989).

Respecto de HlyA en particular, su síntesis, maduración y secreción están determinadas por el operón *hlyCABD*, que codifica también a las proteínas HlyC,

HlyB y HlyD (Felmlee *et al.* 1985, Issartel *et al.* 1991, Nieto *et al.* 1996, Koronakis *et al.* 1997). El gen estructural *HlyA* codifica un polipéptido inactivo de 110 kDa, llamado prohemolisina (ProHlyA). En el citoplasma de *E. coli*, ProHlyA es modificada postraduccionalmente, mediante la unión covalente de ácidos grasos, dando lugar a la toxina activa. Esta modificación es catalizada por la aciltransferasa HlyC, y consiste en la transferencia de ácidos grasos de distinta longitud de cadena, más comúnmente de 14, 15 y 17 carbonos, a los grupos  $\epsilon$ -amino de dos lisinas internas de HlyA (Issartel *et al.* 1991, Stanley *et al.* 1994, Stanley *et al.* 1998, Lim *et al.* 2000, Worsham *et al.* 2001, Worsham *et al.* 2005).

Posteriormente, HlyA es exportada por un sistema de secreción de tipo 1 dependiente de ATP, utilizado usualmente por bacterias gram-negativas para translocar proteínas a través de la membrana interna y externa. En primer lugar, HlyA entra en contacto con un complejo preformado en la membrana interna de HlyB-HlyD, luego HlyD interacciona con TolC (una proteína de membrana externa) permitiendo la apertura del poro y la secreción de HlyA al medio extracelular (Koronakis *et al.* 1991, Koronakis *et al.* 1995, Koronakis *et al.* 2000).

Una vez que HlyA se encuentra en el medio extracelular ocurre el 2do paso de activación de la toxina, debido a que la alta concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  en este medio induce el plegamiento de HlyA en su conformación activa. El dominio RTX de unión a calcio al entrar en contacto con el ion, estabiliza y compacta toda la toxina, mediante interacciones de largo alcance (Sanchez-Magraner *et al.* 2007, Sánchez-Magraner *et al.* 2010). La presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  es indispensable para la actividad hemolítica de la toxina (Boehm *et al.* 1990).

A continuación, se describirá lo que se conoce hasta la fecha sobre los distintos dominios y regiones de HlyA, esquematizados en la Figura 1 A:

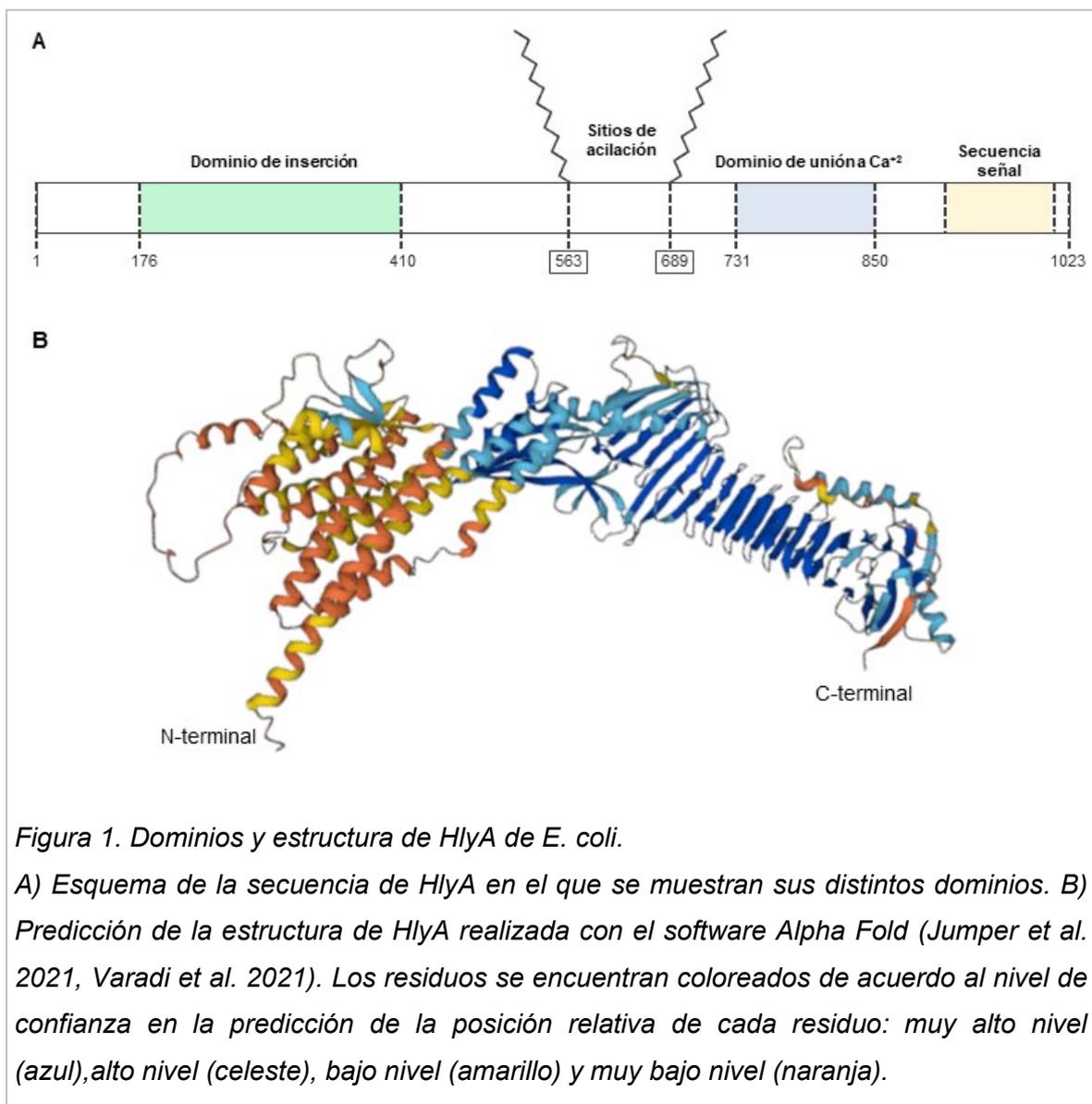
- La región que abarca los residuos 176 a 410 de HlyA se identificó como la responsable de la inserción de la toxina en bicapas lipídicas (Hyland *et al.*

2001, Schindel *et al.* 2001), que según predicciones informáticas contiene 8  $\alpha$ -hélices transmembrana anfipáticas (Ludwig *et al.* 1991). Este dominio será descrito en detalle en el Capítulo 4 (sección 4.1.2).

- Como se describió anteriormente, HlyA se encuentra acilada; los ácidos grasos se encuentran unidos covalentemente a dos lisinas internas presentes en la región central de HlyA (K563 y K689) (Stanley *et al.* 1994). Los sitios de reconocimiento de HlyC se encuentran entre 50 y 80 aminoácidos alrededor de cada residuo de K (Stanley *et al.* 1996). Esta región será descrita en el Capítulo 4 (sección 4.1.1).
- La región de unión a  $\text{Ca}^{+2}$  se encuentra entre los aminoácidos 731 y 850 de HlyA. Consiste en 11-17 repeticiones en tándem de un nonapéptido rico en glicina y aspártico, con la secuencia consenso GGXGXDXUX (X, cualquier residuo; U, residuo hidrofóbico) (Ludwig *et al.* 1988, Boehm *et al.* 1990). La estructura de este dominio se resolvió para otras proteínas de la familia y se encontró que predominan hojas plegadas  $\beta$  (Bauman *et al.* 2006).
- Los últimos 60 residuos del extremo C-terminal de HlyA actúan como señal de transporte, ya que son los responsables de la unión al complejo HlyB-HlyC para su secreción hacia el medio extracelular (Hui *et al.* 2000).

La estructura tridimensional de HlyA no se ha podido resolver hasta el momento, ya que esta no pudo ser cristalizada. Esto es debido a la dificultad que presenta resolver la estructura de proteínas grandes, altamente hidrofóbicas, aciladas y con tendencia a la agregación. Aun así, actualmente existen técnicas de inteligencia artificial que permiten predecir la estructura tridimensional de proteínas. Estas predicciones se basan exclusivamente en la secuencia aminoacídica de la proteína, aun cuando no están disponibles estructuras homólogas, como es el caso de HlyA. En la Figura 1 B se muestra una imagen de la predicción de la estructura de HlyA, realizada mediante el software Alpha Fold

(Jumper *et al.* 2021, Varadi *et al.* 2021). Se puede observar que la región N-terminal está compuesta por hélices  $\alpha$  y la C-terminal por hojas plegadas  $\beta$ , lo cual coincide con las predicciones informáticas y resultados experimentales que se mencionaron anteriormente.



## 1.2 Cepas uropatogénicas de *Escherichia coli*

---

Como se mencionó anteriormente, HlyA es secretada por cepas UPEC. Estas cepas son las responsables del 80% de los casos infecciones del tracto urinario (ITU), que afectan alrededor de 150 millones de personas por año en el mundo (Cavalieri *et al.* 1984, Murray *et al.* 2021, Zagaglia *et al.* 2022). Se estima que alrededor del 40% de las mujeres van a desarrollar ITU a lo largo de sus vidas, y el 30% de ellas sufrirá una reinfección. Las ITU sintomáticas son comúnmente tratadas con antibióticos, pero el aumento de cepas UPEC resistentes y las infecciones recurrentes posicionan a las ITU como un serio problema de salud (Flores-Mireles *et al.* 2015, Murray *et al.* 2021).

Las ITU causan distintos tipos de enfermedades que pueden ser clasificadas clínicamente como complicadas y no complicadas. Las ITU no complicadas ocurren en paciente sanos, donde las bacterias colonizan las células epiteliales de la vejiga (cistitis), y luego pueden o no ascender a los riñones (pielonefritis) (Terlizzi *et al.* 2017, Zagaglia *et al.* 2022). Las ITU complicadas ocurren en pacientes con factores de riesgo individuales como obstrucción urinaria, insuficiencia renal, inmunosupresión, embarazo o el uso de una sonda, entre otros; y pueden dar lugar a casos de bacteriemia y sepsis (Cavalieri *et al.* 1984, Foxman 2010, Zagaglia *et al.* 2022).

Las UPEC expresan distintos factores de virulencia (Tabla 1) que desempeñan un papel fundamental en los distintos pasos de la colonización del huésped, esquematizados en la Figura 2 (Flores-Mireles *et al.* 2015). Las ITU generalmente comienzan cuando UPEC presentes en el área perianal, migran hacia la uretra y luego a la vejiga (Paso 1 y 2). Utilizando estructuras como pili y adhesinas, las bacterias pueden adherirse y colonizar el epitelio de la vejiga (cistitis) (Paso 3). La respuesta inmune del hospedador, particularmente mediante la infiltración de neutrófilos, iniciará su eliminación (Paso 4). Aun así, algunas

bacterias pueden lograr evadir la respuesta inmune del huésped, como por ejemplo, mediante la formación de biofilms (Paso 5 y 6).

Para facilitar su supervivencia las UPEC también liberan toxinas extracelulares como HlyA, el factor necrotizante citotóxico 1 y la citotoxina autotransportadora vacuolante; que pueden alterar las vías de señalización y/o inducir la muerte de la célula *target*, facilitando la capacidad de estos patógenos de colonizar nuevos tejidos (Paso 7) (Wiles *et al.* 2008, Bunduki *et al.* 2021). HlyA es activa contra una gran variedad de tipos celulares como glóbulos rojos (GR), fibroblastos, granulocitos, linfocitos y macrófagos; causando su lisis, necrosis o apoptosis (Cavaliere *et al.* 1982, Bhakdi *et al.* 1990, Welch 2001, Strack *et al.* 2019). En la vejiga, HlyA induce la exfoliación de las células epiteliales, facilitando la colonización de este tejido (Wang *et al.* 2020). La vejiga es un ambiente con baja concentración de hierro y este es un ion necesario para la supervivencia de las bacterias, por lo tanto, la liberación de sideróforos de hierro es también esencial para la colonización de este tejido (Flores-Mireles *et al.* 2015). Luego las bacterias pueden o no ascender al riñón, adhiriéndose nuevamente mediante adhesinas o pili (Paso 8).

Para colonizar el riñón las UPEC pueden causar daño al epitelio mediante la liberación de toxinas (paso 9 y 10). Finalmente, en el caso de que no sean tratadas, las ITU complicadas pueden progresar a casos de bacteriemia, cuando las UPEC logran cruzar la barrera epitelial de los riñones para trasladarse al torrente sanguíneo (Paso 11).

*Tabla 1. Principales factores de virulencia de las cepas uropatogénicas de Escherichia coli.*

<b>Factores de adherencia</b>	Fimbria: S, F1C
	Pili: tipo 1, tipo P
	Adhesinas de la familia Dr
<b>Toxinas</b>	HlyA
	factor necrotizante citotóxico 1
	citotoxina autotransportadora vacuolante
<b>Captación de hierro</b>	Aerobactina
	Enterobactina
	Salmoquelina
	Yersibactina

(Flores-Mireles *et al.* 2015, Terlizzi *et al.* 2017)

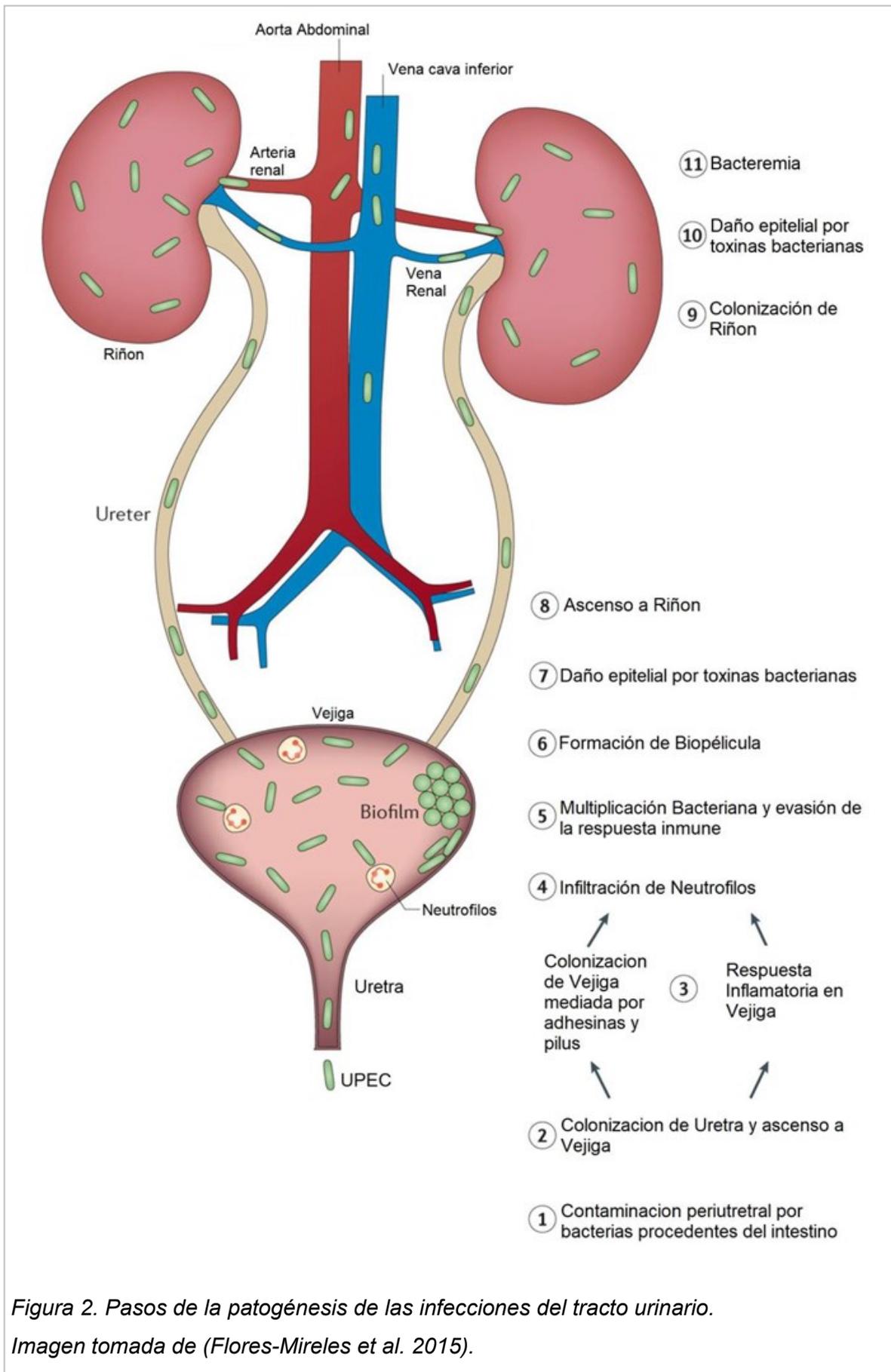


Figura 2. Pasos de la patogénesis de las infecciones del tracto urinario.  
 Imagen tomada de (Flores-Mireles et al. 2015).

### 1.3 Rol de HlyA en la patogénesis

---

Dentro de los factores de virulencia secretados por las UPEC, HlyA es uno de los más importantes, ya que dificulta la adhesión celular, induce la muerte de células uroteliales y la liberación de citoquinas inflamatorias, entre otros efectos (Wang *et al.* 2020).

Se sabe que su expresión está asociada con la severidad de las ITU, ya que hasta un 78% de los aislados de UPEC de casos de pielonefritis o bacteriemia expresan esta toxina (Marrs *et al.* 2005, Wiles *et al.* 2008, Ristow *et al.* 2016). En los casos de pielonefritis, HlyA tiene un rol importante, ya que afecta directamente el epitelio renal (Wang *et al.* 2020, Praetorius 2021). Se sabe que induce en estas células la liberación de ATP, lo cual activa receptores purinérgicos que generan oscilaciones en los niveles de calcio intracelular (Uhlen *et al.* 2000, Christensen *et al.* 2015). Estas oscilaciones inducen finalmente la liberación de citoquinas proinflamatorias (Praetorius 2021).

El daño que genera HlyA en el epitelio renal facilita el pasaje de las UPEC hacia la circulación, causando bacteriemia (Wang *et al.* 2020). Cuando existe una respuesta inmune exacerbada del huésped los casos de bacteriemia pueden derivar en sepsis, y se sabe que HlyA acelera esta transición (Johnsen *et al.* 2019). Los casos de sepsis poseen una mortalidad similar a la de infarto agudo de miocardio, y alrededor de un 25% de ellos son causados por ITU (Johnsen *et al.* 2019, Praetorius 2021).

Dada la gravedad y la prevalencia de los casos de bacteriemia causados por UPEC, y el rol protagónico de HlyA, es que la primera parte de esta tesis está dedicada a profundizar en el estudio del mecanismo de acción de HlyA en GR, con el objetivo de simular una situación de bacteriemia.

#### 1.4 Mecanismo de acción de HlyA en glóbulos rojos

---

Se ha propuesto que el mecanismo de acción de HlyA consta de diferentes pasos: la unión, la inserción y la oligomerización de la toxina en la membrana, que dan lugar a la lisis de la célula blanco (Bakás *et al.* 1996, Bakás *et al.* 1998, Herlax *et al.* 2009, Bakás *et al.* 2012).

La interacción de HlyA con membranas ocurriría en un primer paso de adsorción reversible, mediante la región C-terminal de la toxina; esta interacción estaría regida por interacciones electrostáticas (Sanchez-Magraner *et al.* 2007).

El segundo paso consistiría en una inserción irreversible de la toxina en la membrana plasmática de la célula blanco. Como se describió previamente, la región N-terminal de HlyA sería la que se inserta en la membrana (Hyland *et al.* 2001). Cuando la toxina no se encuentra activada por  $\text{Ca}^{+2}$  y por la unión covalente de los ácidos grasos esta inserción en la membrana es reversible (Bakás *et al.* 1998, Herlax *et al.* 2003, Sanchez-Magraner *et al.* 2006).

Una vez que HlyA está inserta en la membrana ocurriría su oligomerización, proceso que ha podido ser caracterizado solo de manera indirecta. Los ácidos grasos unidos covalentemente a la toxina serían indispensables para la oligomerización, probablemente porque favorecerían la exposición de regiones intrínsecamente desordenadas que promueven la interacción proteína-proteína (Herlax *et al.* 2007, Herlax *et al.* 2009).

Utilizando métodos indirectos se encontró que HlyA sería capaz de formar poros en la membrana, aunque estos no han podido ser visualizados con técnicas de alta resolución como microscopía electrónica o de fuerza atómica, entre otras. Estos poros proteolipídicos serían dinámicos, y su tamaño dependería del tiempo de exposición y de la concentración de HlyA (Welch 1994, Bakas *et al.* 2006).

Por otro lado, se ha descrito que las glicoforinas (GPs) serían las proteínas receptoras de HlyA en GR (Cortajarena *et al.* 2001, Cortajarena *et al.* 2003), aunque existen resultados contradictorios al respecto, que serán abordados en el Capítulo 3.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo demostró que HlyA interactúa más con liposomas y monocapas que contienen colesterol (Vazquez *et al.* 2014); y que su actividad hemolítica disminuye en GR deplecionados de colesterol (Herlax *et al.* 2009). También se encontró que la interacción entre HlyA y el colesterol facilita la inserción de la toxina en las membranas en una conformación tal que permite la oligomerización de la toxina, necesaria para la formación del poro (Herlax *et al.* 2009). Estos resultados indican que este esteroide juega un rol importante en el mecanismo de acción de la toxina. Existen motivos de reconocimiento de colesterol, llamados CRAC (Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus) (Fantini *et al.* 2013) y CARC (de igual secuencia pero orientación opuesta) (Baier *et al.* 2011). En HlyA se identificaron varios de estos motivos (Vazquez *et al.* 2014), que serán descritos en el Capítulo 4.

Además, se sabe que en circulación HlyA se encuentra en bajas concentraciones y en estas condiciones puede inducir respuestas celulares complejas en los GR. Por ejemplo, causa un aumento de los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular, que induce la salida de KCl causando cambios en el volumen celular (Skals *et al.* 2010). En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado también la dinámica entre los cambios de volumen y la lisis inducida por HlyA en GR. Se encontró que HlyA reduce la permeabilidad osmótica para el agua en GR, de forma similar en GR normales y en GR deficientes de AQP1, indicando que HlyA afecta otros mecanismos de transporte de agua y/o la difusión simple a través de la membrana (Saffioti *et al.* 2022). Además, se encontró que el *swelling* causado por HlyA en GR se debe parcialmente a la activación de receptores P2 y está acoplado a la lisis osmótica. Se sabe también que estos cambios de volumen generan la liberación de ATP no lítico que activa receptores purinérgicos como

P2X7 (Skals *et al.* 2009, Denis *et al.* 2019). El aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular también genera otro tipo de cambios biológicos en GR, como por ejemplo la activación de calpaínas y la externalización de fosfatidilserina (Velasquez *et al.* 2015); eventos típicos de los procesos eritóticos.

Aun teniendo en cuenta todos los resultados mencionados, mucho queda por dilucidar sobre el mecanismo de acción de HlyA en GR. Por lo tanto, la presente tesis busca avanzar en el conocimiento sobre la interacción de HlyA con membranas, y las moléculas que podrían facilitar esta interacción. Así como también, aplicar dichos conocimientos para el diseño de terapias basadas en péptidos derivados de HlyA. Para lograrlo se plantearon las siguientes hipótesis:

- Las glicoforinas median el mecanismo lítico y sublítico de HlyA en GR humanos.
- Péptidos CRAC o CARC derivados de HlyA interaccionan específicamente con colesterol.
- Péptidos CRAC o CARC derivados de HlyA inhiben su actividad hemolítica.
- Péptidos derivados de la región N-terminal de HlyA presentan actividad citotóxica y pueden ser utilizados para la construcción de una inmunotoxina.

## 1.5 Objetivos generales

---

La presente tesis está organizada en dos partes, la primera parte corresponde a resultados de investigación básica destinados a profundizar en el conocimiento sobre la interacción de HlyA con glóbulos rojos humanos. Por lo tanto, los objetivos de la Parte 1 de la presente tesis fueron:

- A) Estudiar la interacción entre HlyA y glicoforinas, así como las vías de señalización intracelular activadas por esta interacción en GR humanos (Capítulo 3).
- B) Estudiar la interacción de péptidos CRAC y CARC derivados de HlyA con membranas de distinta composición lipídica y GR (Capítulo 4).

Luego, en la segunda parte se buscó aplicar dichos resultados para el diseño de terapias alternativas para el tratamiento de infecciones causadas por UPEC, y para el tratamiento del cáncer de mama por medio del diseño de una inmunotoxina. Entonces, los objetivos de la Parte 2 de la presente tesis fueron:

- C) Estudiar el efecto inhibitorio de péptidos CRAC y CARC sobre la actividad hemolítica de HlyA (Capítulo 5).
- D) Diseñar, construir y caracterizar una inmunotoxina compuesta por un péptido correspondiente a la región N-terminal de HlyA y un anticuerpo anti-trop-2 (Capítulo 6).

## **Capítulo 2. Materiales y métodos generales**

---

## 2.1 Declaración ética

---

La sangre humana se obtuvo de voluntarios sanos, que dieron su consentimiento. El estudio lo aprobó el Comité de Bioética y Ética de la Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP (COBIMED, Protocolo N°43), de acuerdo con los requerimientos de la Declaración de Helsinki y la legislación argentina sobre salud pública (leyes 25326 y 26529).

## 2.2 Purificación de HlyA y ProHlyA

---

La toxina HlyA se purificó a partir de la cepa de *E. coli* WAM1824, transformada con pSF4000 (construcción recombinante formada por el operón *hlyCABD* clonado en el plásmido vector *pACYC184*) (Welch 1997), (Welch *et al.* 1983). La purificación de ProHlyA se realizó a partir de la cepa WAM783 (*E. coli* DH1 transformada con el plásmido recombinante *pSF4000ΔBamHI*, en el cual una porción del gen *hlyC* se deletionó) (Boehm *et al.* 1990). Ambas cepas fueron gentilmente cedidas por el Dr. Welch (Universidad de Madison, Wisconsin).

Para ser cultivadas, las bacterias se inocularon en 5 ml de medio Luria-Bertani (LB, Triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) con cloranfenicol 20ug/ml y se incubaron durante toda la noche a 37°C con agitación a 180 rpm. Seguidamente, se realizó una dilución 1:100 del cultivo saturado en medio LB con antibiótico. Se continuó con la incubación en las mismas condiciones hasta llegar a la fase de crecimiento logarítmica caracterizada por una DO (Densidad óptica) a 600nm de 0,9-1. Las bacterias se separaron por centrifugación a 6000 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante, que contiene la toxina, se llevó a pH 4,5 (el punto isoeléctrico de la proteína) y se precipitó la proteína con etanol frío (20% v/v final) durante dos días en heladera. Luego, se precipitó la proteína por centrifugación a 14.500 g durante 1h. a 4°C. El pellet se resuspendió en buffer TC (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4 a 25 °C) con GnHCl 6M (Cloruro de Guanidinio) y se almacenó a -20°C.

Luego de cada purificación se corroboró la pureza de la proteína mediante un SDS-PAGE 10% (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*), se cuantificó por el método de Bradford (Bradford 1976) y en el caso de HlyA se evaluó su actividad hemolítica.

### **2.3 Aislamiento de glóbulos rojos humanos**

---

La sangre se obtuvo de voluntarios sanos, se la centrifugó a 1500g durante 5 min, a 20 °C. El plasma, las plaquetas y los leucocitos se descartaron. Los GR aislados se resuspendieron en buffer TC con CaCl<sub>2</sub> 10 mM, se lavaron tres veces, y se diluyeron al hematocrito final correspondiente.

### **2.4 Purificación de membranas de glóbulos rojos humanos**

---

A 1,5 ml de GR humanos limpios se agregaron 40 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4) y se mantuvo a 4°C durante 30 min, para permitir su lisis osmótica. Luego se centrifugó a 14500 g durante 10 min. Este procedimiento se repitió hasta obtener un pellet blanco. Las membranas se resuspendieron en 3 ml de buffer TC y se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford 1976).

### **2.5 Ensayos de actividad hemolítica**

---

La actividad hemolítica se calculó mediante la disminución de la luz dispersada (*light scattering*) a 595 nm. En placas de 96 pocillos se realizó la dilución seriada de 100 µl de proteína en 100 µl de buffer TC suplementado con CaCl<sub>2</sub> 10 mM. Como control negativo se utilizó buffer sin toxina y como control positivo buffer suplementado con tritón-X100. Luego se añadieron 100 µl de GR humanos 4% v/v, por lo tanto, el hematocrito final fue de 2% v/v. La placa se incubó a 37 °C durante 30 min y se midió la DO a 595nm.

El porcentaje de hemólisis se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hemólisis} = \left( \frac{DO0 - DOx}{DO0 - DO100} \right) * 100$$

Donde DO0 es la DO del control negativo, DOx del pocillo incógnita y DO100 del control positivo.

## 2.6 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

---

El método de Bradford se basa en la interacción del colorante azul de Coomassie con residuos aromáticos y residuos básicos de las proteínas, produciendo un desplazamiento del máximo de absorción de 465 a 595 nm (Bradford 1976). El reactivo de Bradford se preparó con 50 ml de etanol (95%), 100 ml de ácido fosfórico (85%) y 100 mg de azul de Coomassie brillante G-250 (Sigma) para un volumen final de 1l, filtrando las veces necesarias para eliminar los residuos sólidos no disueltos. En los ensayos se mezclaron 5 µl de muestra con 250 µl de reactivo Bradford. Después de 15 min. se midió la DO a 595 nm. La curva patrón se realizó con seroalbúmina bovina disuelta en buffer TC.

## 2.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE

---

La separación de proteínas según su peso molecular se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE), utilizando el método de Laemmli (Laemmli 1970). Se trata de un sistema vertical discontinuo que consiste en dos geles contiguos: el gel separador (*resolving*) por debajo y el gel de apilamiento (*stacking*) por encima. Ambos tienen diferente diámetro de poro, pH y fuerza iónica. Esta discontinuidad actúa concentrando grandes volúmenes de muestra en el gel de apilamiento, resultando en una mejor resolución final. En todos los geles realizados se utilizó una concentración de 4 % p/v de acrilamida (malla de poro no limitante) para el gel de apilamiento, y diversas concentraciones para el gel separador: 8, 12 % p/v y gradientes 4-20%

p/v de acrilamida. Se utilizaron separadores de geles de 0,75 mm. Junto a las muestras, en todas las corridas electroforéticas se sembró un estándar de peso molecular, (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad). Las corridas se realizaron a voltaje constante de 100 mV en una cuba electroforética Mini Protean II, Bio Rad, con una fuente de poder Power 200-2.0, Bio Rad. Las proteínas se tiñeron con Coomassie Blue.

## **2.8 Western Blot**

---

La técnica de *Western Blot* permite la identificación de una proteína específica en una muestra. Consiste en la separación de las proteínas presentes en la muestra, mediante SDS-PAGE, y su transferencia a una membrana sólida, de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Finalmente, la proteína buscada se detecta mediante la utilización de anticuerpos específicos.

En todos los casos la transferencia se realizó mediante una corriente eléctrica de 100V por 1 h. Luego, se bloquearon los sitios de la membrana no ocupados por proteína con una solución de bloqueo, 3% p/v de leche descremada en buffer TC, durante 2 hs a temperatura ambiente en agitación suave. Para detectar la proteína buscada se agregó el anticuerpo primario (generalmente anti-HlyA 1/500 en solución de bloqueo), y se incubó durante toda la noche a 4°C. Luego, se realizaron 6 lavados de 5 min cada uno con buffer TC. Finalmente, se agregó el anticuerpo secundario (anti-rabbit conjugado a HRP, Jackson ImmunoResearch) en una dilución 1/45.000 en solución de bloqueo y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Luego, las membranas se revelaron utilizando un sustrato quimioluminiscente de HRP (ImmobilonWestern, Millipore) y se obtuvieron imágenes utilizando el sistema de imágenes ChemiDoc MP (Bio-rad, Hercules, CA, EE.UU.). Las imágenes se analizaron con el software ImageLab de BIORAD para determinar el peso molecular de las bandas visualizadas o cuantificarlas por DO.

## **2.9 Análisis estadístico**

---

Se utilizó la prueba t de Student para comparar distintos grupos experimentales. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $P < 0.05$  (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

---

**PARTE 1: AVANCES EN LA INTERACCIÓN DE  
ALFA HEMOLISINA DE *E. COLI* CON  
GLÓBULOS ROJOS HUMANOS**

---

## **Capítulo 3. Rol de la interacción HlyA-glicoforina en el mecanismo de acción de la toxina en glóbulos rojos humanos**

---

### 3.1 Introducción

---

Como se mencionó anteriormente, HlyA pertenece a una clase de toxinas que actúa sobre una amplia variedad de tipos celulares, como GR, leucocitos, células epiteliales, entre otros, de diferentes hospedadores, como seres humanos, bovinos y murinos (Welch 2001). Es posiblemente, por esta razón, que la caracterización de un receptor de superficie específico para la toxina produjo resultados contradictorios. En linfocitos se demostró que HlyA y muchas otras RTX utilizan la familia de  $\beta 2$  integrinas como receptores de superficie, uniéndose a oligosacáridos presentes en el receptor (Lally *et al.* 1997, Dileepan *et al.* 2005, Dileepan *et al.* 2007, Morova *et al.* 2008). Las  $\beta 2$  integrinas son receptores de superficie compuestos por una subunidad  $\alpha$  variable (CD11a/CD11d) y una subunidad  $\beta$  (CD18). HlyA en particular se une a la región extracelular de la subunidad  $\beta$  de LFA-1 (CD11a/CD18) (*lymphocyte function-associated antigen-1*), la señalización intracelular mediada por esta subunidad no es necesaria para la actividad de la toxina, pero su presencia es suficiente para aumentar la actividad citotóxica de HlyA (Ristow *et al.* 2019). El dominio de la toxina responsable de dicha interacción todavía no se ha dilucidado.

Respecto de la presencia de un receptor para HlyA en la superficie de GR, los resultados son contradictorios. Hasta el momento GP era considerada receptor de HlyA en GR, de acuerdo con los experimentos de Cortajarena *et al.* que se realizaron utilizando GR de caballo (Cortajarena *et al.* 2001). Encontraron que la unión de HlyA a GPs disminuye significativamente por la tripsinización de las membranas, lo que sugiere un mecanismo mediado por un receptor proteico; y que GPs purificadas de los GR y reconstituidas en liposomas aumentaron significativamente la sensibilidad de los liposomas a HlyA. Más tarde, propusieron a la región comprendida entre los residuos 914-936 de HlyA como la responsable de la unión a GP (Cortajarena *et al.* 2003). En oposición a la existencia de un receptor se encontró que HlyA desorganiza liposomas libres de proteínas

(Ostolaza *et al.* 1993). Además, se encontró que HlyA se une de forma no saturable a GR de conejo y a granulocitos, lo que indicaría que la toxina no interacciona con un receptor específico (Eberspacher *et al.* 1989, Valeva *et al.* 2005). Contrariamente, se encontró que la unión entre HlyA y GR de carneros es saturable indicando la presencia de un receptor (Bauer *et al.* 1996).

Por otro lado, durante los últimos años en nuestro grupo de investigación se estudió la interacción entre HlyA y GR humanos a concentraciones sublétricas, cuyos efectos se describieron en la introducción general (Velázquez *et al.*, 2015, Denis *et al.*, 2019, Strack *et al.*, 2019). Curiosamente, muchos de estos efectos se observaron también en GR tratados con ligandos que interactúan con GP. Por ejemplo, la unión de lectinas y autoanticuerpos (anti-Pr) a GP produce una disminución en la deformabilidad de los GR y el ingreso de Na<sup>+</sup> produciendo posteriormente la lisis (Brain, Prevost, Pihl, & Brown, 2002). Chasis *et al.* demostraron que esta disminución en la deformabilidad es causada por la unión de GP a proteínas del citoesqueleto, luego de su interacción con ligandos (Chasis, Mohandas, & Shohet, 1985). Más recientemente se demostró que la unión de anticuerpos anti-GP induce un aumento intracelular de especies reactivas del oxígeno que, a su vez, desencadenan múltiples respuestas que conducen a la activación de caspasa-3, liberación de ATP, y aumento de la fosforilación de banda 3 (Khoory *et al.*, 2016). Los efectos similares de HlyA y anticuerpos anti-GP en los GR pueden ser meras coincidencias o implicar que la unión de HlyA a GP es necesaria para que se desencadenen las respuestas létricas y sublétricas que produce la toxina.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es determinar si GP es receptor específico de HlyA en GR humanos, y si está involucrada en el proceso hemolítico de la toxina. Para lograr este objetivo se realizaron ensayos de inhibición de hemólisis con anticuerpos anti-GPA/GPB, se estudió la actividad de HlyA en GR GPA<sup>-/-</sup>/GPB<sup>-/-</sup> y se realizaron ensayos de SPR entre HlyA y GP. Finalmente, se realizó un ensayo de Far Western Blot.

## 3.2 Materiales y Métodos

---

### 3.2.1. Purificación de HlyA, ProHlyA y HlyA $\Delta$ 914-936

La purificación de HlyA y ProHlyA se realizó como se describió en Materiales y métodos generales (sección 2.2). HlyA $\Delta$ 914-936 se purificó de igual manera, a partir de la cepa de *E. coli* BL21 transformada con el operón *hlyCABD* con una delección de la región 914-936 en el gen de HlyA, subclonado en el plásmido pSU124 (Cortajarena *et al.* 2003). El plásmido fue gentilmente donado por la Dra. Ostolaza (Universidad del País Vasco, Bilbao, España).

### 3.2.2. Ensayos de actividad hemolítica

Los ensayos de actividad hemolítica de HlyA en presencia de anticuerpos se realizaron de manera similar a lo descrito en Materiales y Métodos generales (sección 2.5), con la diferencia de que los GR se preincubaron con diferentes diluciones de anticuerpos (1:50, 1:100, 1:200 y 1:1000) durante 1 h, antes de agregarse a la microplaca con HlyA. Se utilizaron los anticuerpos: nanoanticuerpo iH4 (Habib *et al.* 2013), anti-GPA (BD 559943) y anti GPA-GPB (Novus Biologicals, NB 120-6396). El porcentaje de hemólisis a los 30 min. se obtuvo de la manera descrita en sección 2.5.

Además, se realizaron ensayos de actividad hemolítica de HlyA en presencia de ASH (Albúmina sérica humana). Los ensayos se realizaron preincubando la toxina con ASH (0,1% y 1% p/v) durante 1 h a 37°C, antes del agregado de los GR.

También se realizaron ensayos de actividad hemolítica de HlyA en GR humanos GPA<sup>-/-</sup>/GPB<sup>-/-</sup>, de forma similar a como se describe en materiales y métodos generales (sección 2.5). Los GR humanos GPA<sup>-/-</sup>/GPB<sup>-/-</sup>, homocigotas M<sup>k</sup>M<sup>k</sup> deficientes en GPA y GPB, fueron donados por *Osaka Red Cross Blood Center*. Estos se colectaron y congelaron en el Centre National de Référence pour

les Groupes Sanguins (París). Antes del análisis, los GR criopreservados se lavaron tres veces con el medio isosmótico RBC (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,32 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,91 mM, glucosa 5 mM, pH 7.4 a 25 °C, 300 mOsm).

El porcentaje de GR se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% GR = 100 - \% Hemólisis$$

Luego las curvas de porcentaje de GR en función del tiempo se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$\% GR = \frac{R_p}{e^{f t}} + (100 - R_p) \frac{a + 1}{e^{b t} + a}$$

Donde  $R_p$ ,  $a$ ,  $b$  y  $f$  son parámetros y  $t$  indica la variable tiempo.  $R_p$  indica la proporción de la curva que no se encuentra en fase *lag*, el parámetro  $a$  se relaciona con la duración de la fase *lag*, y los valores de  $f$  y  $b$  están relacionados con la velocidad de hemólisis. El mejor valor para estos parámetros se obtuvo usando el método de cuadrados mínimos. Una vez ajustada la ecuación se utilizó para calcular el parámetro  $t_{50}$  que hace referencia al tiempo necesario para alcanzar un 50% de hemólisis, el error estándar se calculó utilizando el método delta (Oehlert 1992). El ajuste matemático descrito se realizó en colaboración con el Dr. Nicolás Saffioti (INQUIFIB).

### 3.2.3. Medidas de resonancia de plasmones superficiales

La técnica de resonancia de plasmones superficiales (SPR) se utilizó en el presente trabajo de tesis para estudiar la interacción entre biomoléculas. Las ventajas que presenta esta técnica son: que no se necesita marcar las biomoléculas de interés, que se puede estudiar tanto la asociación como la disociación de moléculas en tiempo real y que se utilizan bajas concentraciones de muestra (Šakanovič *et al.* 2019). En el campo de la biología es especialmente

útil para medir la afinidad y cinética de las interacciones entre macromoléculas, con una gran sensibilidad. Para el estudio de macromoléculas en solución se utiliza la configuración Kretschmann, en la cual el material a investigar se deposita sobre una película metálica que se encuentra directamente sobre un prisma dieléctrico (Figura 3 A).

La técnica de SPR consiste en un haz de luz polarizada que incide sobre la superficie metálica y es reflejada. Los fotones de luz polarizada interactúan con los plasmones superficiales (electrones libres del metal) induciendo su resonancia y generando una reducción de la intensidad de la luz reflejada. El ángulo al cual la intensidad de la luz reflejada es mínima se llama ángulo de resonancia. El índice de refracción en la superficie del metal varía con la adsorción de moléculas en esta superficie, generando un cambio en el ángulo de resonancia; como se observa en la Figura 3 B. Cuando se mide el cambio del ángulo de resonancia en función del tiempo (sensograma de SPR), se obtiene información en tiempo real de la adsorción de moléculas en la superficie metálica (Figura 3 C).

En este caso se inmovilizó sobre la superficie de oro glicoforina A o albúmina (ASH) y en la fase móvil se inyectó HlyA, HlyA<sup>Δ914-936</sup> o ProHlyA. Las medidas se realizaron en el equipo MP-SPR BioNavis SPR Navi™ 200 (Tampere, Finlandia) usando un láser de 785nm y un rango de escaneo de 60-72 grados. Este equipo contiene un sistema de detección de doble canal, por lo que se realizaron duplicados en paralelo en ambas celdas de flujo independiente. Se utilizaron sustratos de oro comerciales (SPR102-AU, Bionavis™).

**Preparación de los sustratos de oro.** Antes de cada medida, los sustratos de oro se lavaron con NH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (1:1:2) a 90 °C durante 5 min. Luego se enjuagaron con agua MilliQ y posteriormente con etanol absoluto. Inmediatamente después los sustratos se incubaron en una solución de ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) 50 μM por un período de aprox. 20 hs. Luego de

este período se obtuvieron monocapas auto-ensambladas ordenadas de MUA. Se realizó un enjuague exhaustivo con etanol absoluto y se secó la superficie con un flujo de N<sub>2</sub>. Los sustratos Au-MUA estuvieron listos para ser colocados en el equipo.

**Inmovilización de las proteínas.** La inmovilización de ASH y GPA (Sigma Aldrich) a la superficie de MUA se realizó por medio de una reacción de acoplamiento carbodiimida. En primer lugar, los grupos carboxilos de la superficie de MUA se activaron por una mezcla de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC) 0,1 M y N-hidroxisuccinimida (NHS) 0,05 M a un flujo de 10  $\mu$ L/min, para dar esteres de succinimida reactivos. Luego las proteínas se inyectaron a un flujo de 10  $\mu$ L/min y a una concentración de 20  $\mu$ g/mL. La inmovilización de las mismas sobre la superficie se produce mediante la interacción entre los grupos amino de las proteínas y los esteres de la superficie del sustrato. Se realizaron ensayos utilizando distintos buffers para estudiar en cual se lograba la mayor cantidad de proteína inmovilizada. Como resultado ASH se inmovilizó en buffer PBS pH 7 y GPA en buffer de acetato pH 6,55. Luego la superficie se bloqueó y los esteres de succinimida libres se desactivaron, usando etanolamina 1M a pH 8,5. Se realizó un lavado con agua MilliQ y se equilibró el sistema con buffer TC con CaCl<sub>2</sub> 10 mM, el que se usó posteriormente en el experimento. La cantidad de proteína inmovilizada se calculó como el cambio en el ángulo mínimo ( $\Delta\theta_{SPR}$ ) y se utilizó para normalizar la señal de SPR en los experimentos de unión proteína-proteína.

**Medidas de SPR.** Luego de la inmovilización de ASH o GP a las superficies, se inyectaron HlyA, HlyA <sup>$\Delta$ 914-936</sup> y ProHlyA a distintas concentraciones (entre 1,25 y 10 nM en buffer TC), a un flujo de 10  $\mu$ L/min, durante 10 min, a 23°C. Pasados 5 min de estabilizada la señal de SPR se regeneró la superficie durante 1 min con NaOH 0.1 M para ASH, y HCl 0.1 M para GP. Cada medida se realizó por duplicado, y la constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) se calculó utilizando el procedimiento desarrollado por Kausaite

*et al.* (Kausaite *et al.* 2007). En resumen, las curvas de asociación se ajustaron con la función exponencial:

$$R_t = E(1 - e^{-Kst}) + R_0$$

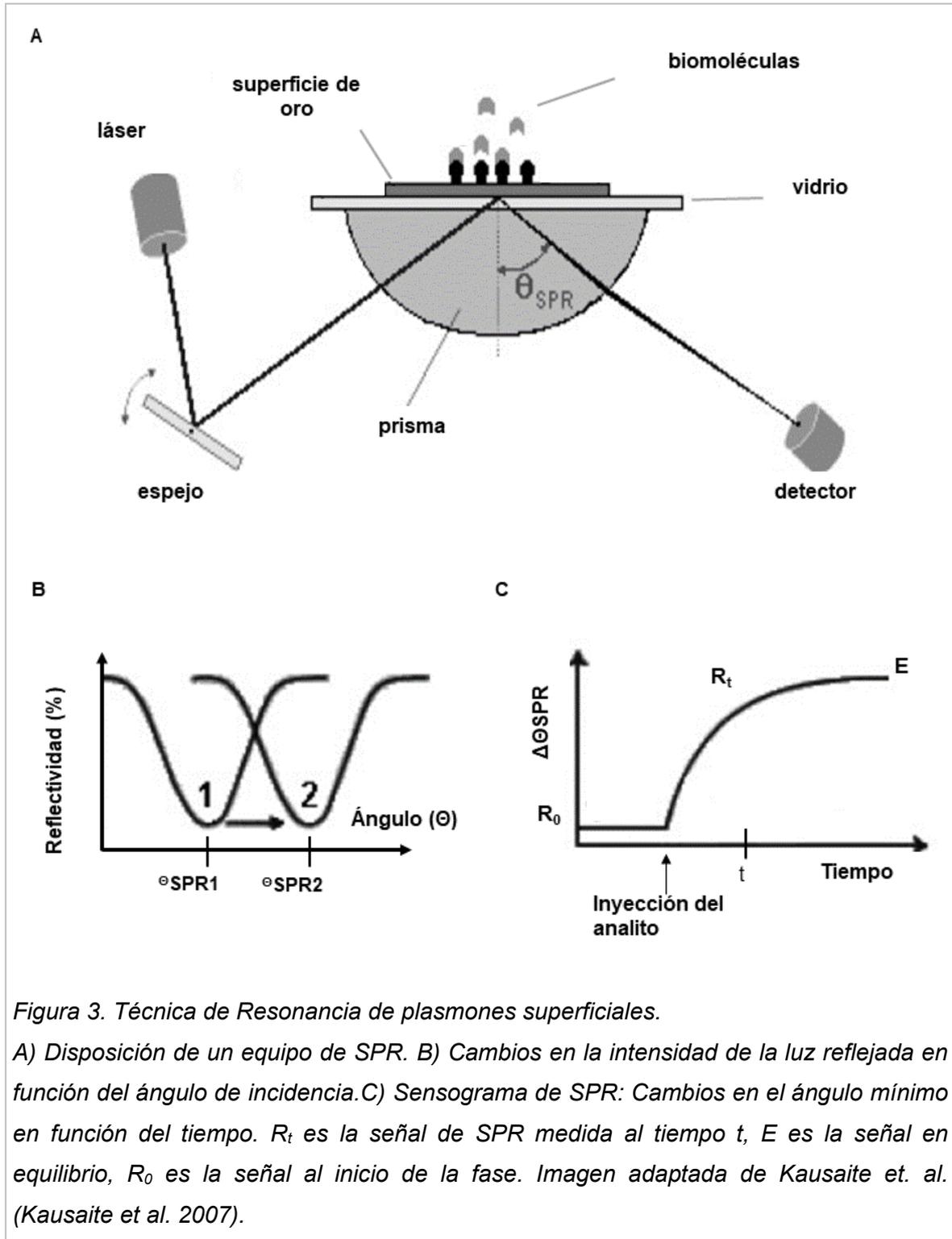
donde  $R_t$  es la señal de SPR medida al tiempo  $t$ ,  $E$  es la señal en equilibrio,  $R_0$  es la señal al inicio de la fase. Los valores de  $K_s$  se obtuvieron luego de ajustar las curvas de asociación con la función BoxLucas1 (Origin software).

Se graficó  $K_s$  en función de la concentración del analito ( $[C]$ ) para obtener la constante de asociación ( $K_a$ ) y la constante de disociación ( $K_d$ ), teniendo en cuenta que:

$$K_s = K_a [C] + K_d$$

Finalmente,  $K_D$  se calculó como el cociente entre  $K_d$  y  $K_a$ .

Los experimentos de SPR se realizaron, en colaboración con la Dra. Antonieta Daza-Millone del Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), La Plata.



#### **3.2.4. Far Western Blot**

La técnica de *Far Western Blot* se utiliza para estudiar interacciones proteína-proteína. Esta técnica es una versión modificada de un *Western Blot* convencional. En la Figura 4 se muestra un esquema de la técnica, en el cual se utiliza como ejemplo la interacción entre proteínas A y B. La técnica consiste en separar las proteínas A mediante un SDS-PAGE y transferirlas a una membrana (nitrocelulosa o PVDF). Luego la membrana se incuba con una solución que contiene la proteína de interés B. La detección de la posible interacción proteína-proteína se realiza utilizando anticuerpos contra la proteína B.

Para realizar este experimento, se obtuvieron membranas de GR humanos como se describe en materiales y métodos generales (sección 2.4). Luego, se sembraron 5 y 20  $\mu\text{g}$  de proteínas en un SDS-PAGE en gradiente 4-20%. Se realizaron 2 geles en simultaneo, uno se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y el otro se tiñó con Coomassie Blue coloidal. La membrana se bloqueó durante 1h con leche descremada al 3% en buffer TC. Luego, se cortó por la mitad; una parte se incubó con HlyA 1 $\mu\text{M}$  en el mismo buffer y la otra solo con buffer. Ambas se incubaron durante 24 hs a 4°C. Luego, se realizaron 3 lavados con buffer TC y se incubaron las membranas durante la noche con anti-HlyA 1/500 a 4°C. Pasado ese tiempo, se volvieron a lavar las membranas 3 veces con buffer TC y se incubaron con anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Jackson ImmunoResearch) 1/45.000 por 1 h a temperatura ambiente. Luego, las membranas se revelaron utilizando un sustrato quimioluminiscente de HRP (Immobilon, Millipore). Las imágenes se analizaron con el software ImageLab de BIORAD para determinar el peso molecular de las bandas visualizadas. Finalmente, se compararon los pesos moleculares de las bandas reactivas en la membrana con las bandas del gel teñido por Coomassie blue. Estas bandas se cortaron del gel y se enviaron para su análisis por espectrometría de masa al Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM), Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Las proteínas de las bandas recortadas se digirieron con tripsina en el gel, los péptidos generados se separaron por cromatografía líquida (LC) utilizando el equipo EASY-nLC 1000 LC system (Thermo Scientific). Las muestras se cargaron a un flujo constante de 300 nl/min en una columna EASY-Spray (C18, 2  $\mu\text{m}$ , 100A, 75  $\mu\text{m}$   $\times$  150 mm) (Thermo Scientific), luego del enriquecimiento se eluyeron con un gradiente lineal de 7–95% del solvente B (acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico) durante 75 min con un flujo constante de 300 nl/min. El sistema EASY nLC se acopló al Orbitrap Q Exactive (Thermo Scientific). En el Orbitrap se adquirieron espectros de masa ( $m/z$  400-2000) con una resolución de 70.000 tras la acumulación de  $3e^6$  iones. Los 12 iones peptídicos más intensos se fragmentaron mediante disociación colisional de alta energía. La identificación y cuantificación proteica se realizó con el software Proteome Discoverer (Version 1.4.1.14) con la base de datos Sequest HT contrastada con la base de datos de Uniprot Homo sapiens. La tolerancia de masas para péptidos precursores se estableció en 10 ppm, con una tolerancia para la masa de fragmentos de 0,05 Da. La especificidad de la enzima tripsina se estableció con un máximo de dos errores de corte. Se consideraron dos modificaciones: carbamidometilación de cisteína fija y oxidación de metionina variable. La tasa de detección falsa se estableció en 1% con un mínimo de dos péptidos de alta confianza para la cuantificación.

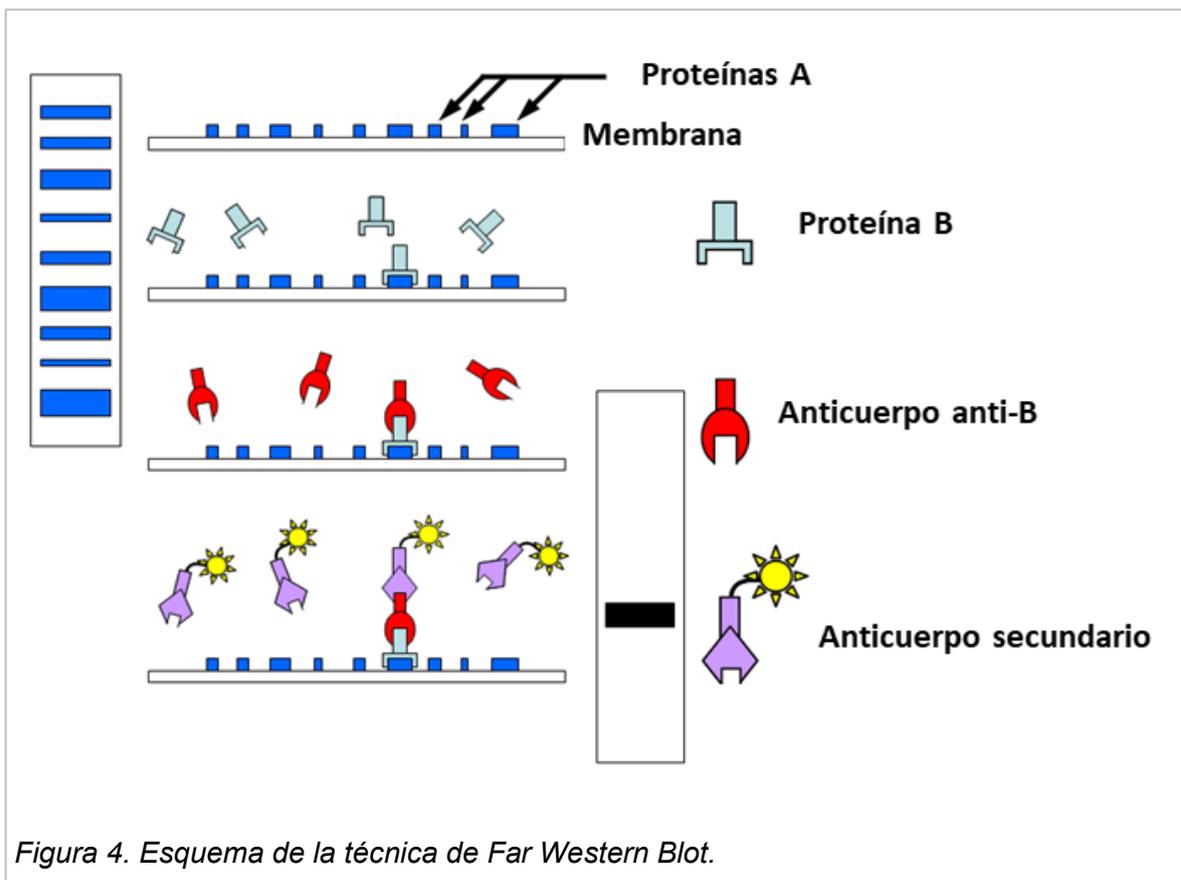


Figura 4. Esquema de la técnica de Far Western Blot.

### 3.3 Resultados

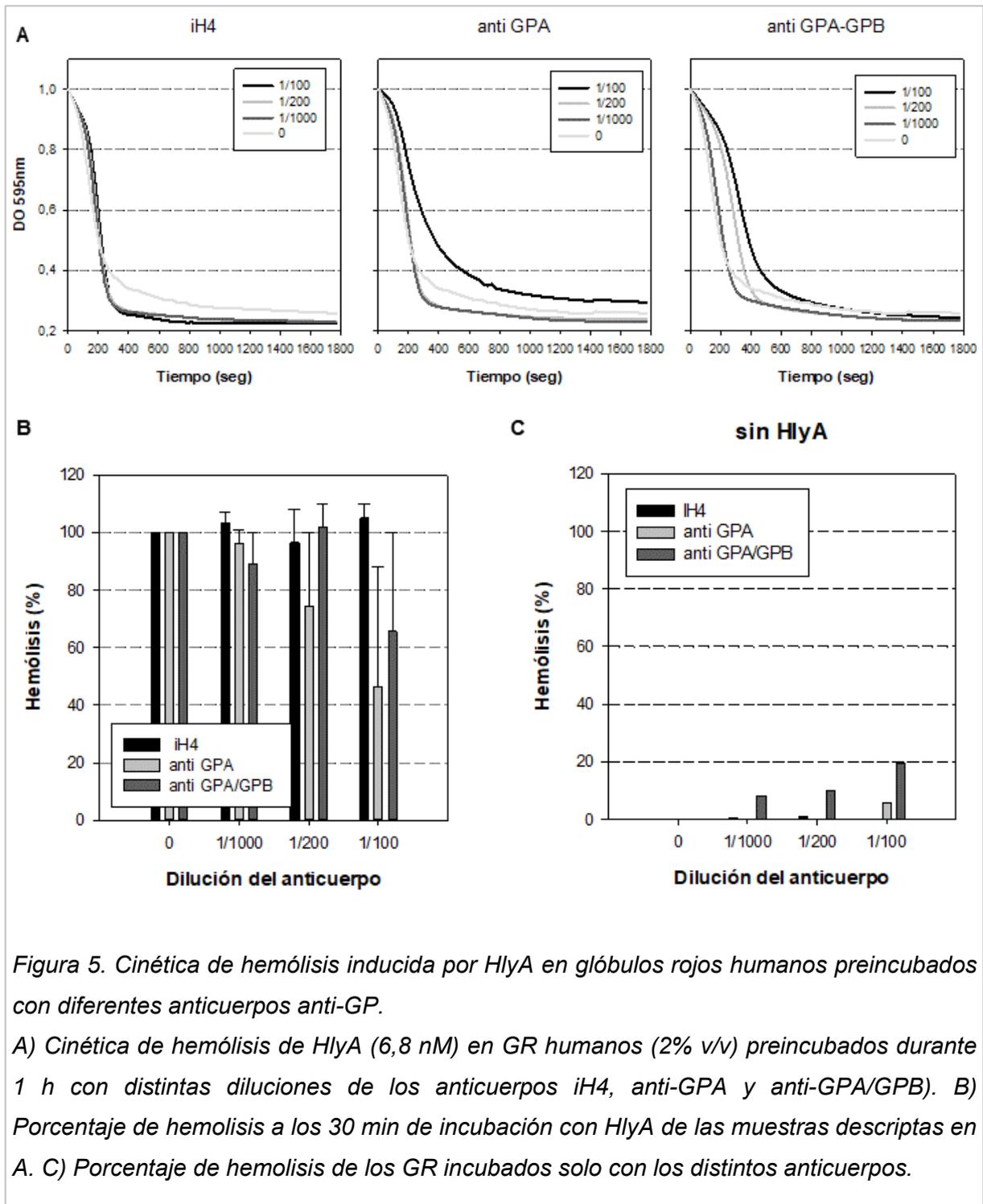
---

#### 3.3.1. Actividad hemolítica de HlyA en presencia de anticuerpos anti-GPs

Para evaluar el posible rol de las GPs en el efecto hemolítico de HlyA en GR humanos, estas células se preincubaron con distintos anticuerpos anti-GP, con el objetivo de bloquear la posible unión HlyA-GP.

Los GR se incubaron con anticuerpos anti-GPA y anti-GPA/GPB, ya que estas GP son las más abundantes en GR humanos (Aoki 2017), y también con un nanoanticuerpo iH4 que se une al epítotope Y<sub>52</sub>PPE<sub>55</sub> del dominio extracelular de GPA (Habib *et al.* 2013). Luego se midió la cinética de hemólisis inducida por HlyA (Figura 5 A).

Los resultados muestran que la unión de iH4 a GPA no afecta la hemólisis de GR humanos por parte de HlyA, mientras que la unión de anti-GPA o anti-GPA/GPB enlentece la cinética de hemólisis causando una reducción no significativa del 15% de la hemólisis a los 30 min (Figura 5 B). Por otro lado, se estudió el efecto hemolítico de los anticuerpos *per se*. La Figura 5 C muestra que altas concentraciones de anticuerpo, 1/200 y 1/100, inducen solo entre un 10 y 20% de hemólisis. En conclusión, la unión de los distintos anticuerpos a GP no afecta significativamente la actividad de HlyA en GR.



### 3.3.2. Ensayo de unión de HlyA, ProHlyA y HlyA<sup>Δ914-936</sup> a GPA

Considerando que los resultados previos parecieran indicar que GP no participa en el mecanismo de acción de HlyA, pero que en la literatura se demostró que GP es receptor de HlyA (Cortajarena *et al.* 2001), se decidió determinar la  $K_D$  entre HlyA y GP mediante la técnica de SPR. Además de calcular la  $K_D$  para HlyA, se calculó también para ProHlyA y HlyA<sup>Δ914-936</sup>. HlyA<sup>Δ914-936</sup> es un mutante de delección de HlyA, al que le falta el dominio caracterizado como de unión a GP (Cortajarena *et al.* 2003). Además de caracterizar la unión de estas variantes con GP, también se determinó la unión a albumina sérica humana (ASH) por ser la proteína más abundante del torrente sanguíneo, a la cual HlyA se une inespecíficamente.

En la Figura 6 se observa la señal de SPR normalizada en función del tiempo, para cada uno de los ensayos. A partir de dichos sensogramas se calcularon las  $K_D$  para cada una de las interacciones (Tabla 2), de acuerdo con lo explicado en materiales y métodos (sección 3.2.3). Los resultados muestran que los valores de  $K_D$  para las tres proteínas con GPA son similares a los de ASH (están en el mismo orden de magnitud), por lo tanto, podemos afirmar que la interacción encontrada no es específica. El hecho de que HlyA interacciona inespecíficamente con ASH se corroboró evaluando la actividad de la toxina en presencia de ASH. Los resultados lo confirman, ya que el porcentaje de hemólisis a los 30 min se ve disminuido por la presencia de ASH 1% (Figura 7).

Por otro lado, ProHlyA (la toxina inactiva) y HlyA interaccionan de manera similar con GPA, lo que indica también que GP no media la actividad hemolítica de HlyA. La  $K_D$  para HlyA<sup>Δ914-936</sup> con GPA es levemente mayor que para HlyA y ProHlyA, aunque la diferencia no es significativa. Además, la  $K_D$  de HlyA<sup>Δ914-936</sup>-GPA es similar a la de HlyA<sup>Δ914-936</sup>-ASH. Por lo tanto, el dominio 914-936 no pareciera participar en una interacción específica entre HlyA y GPA. En resumen, los resultados sugieren que GPA no actúa como receptor de HlyA.

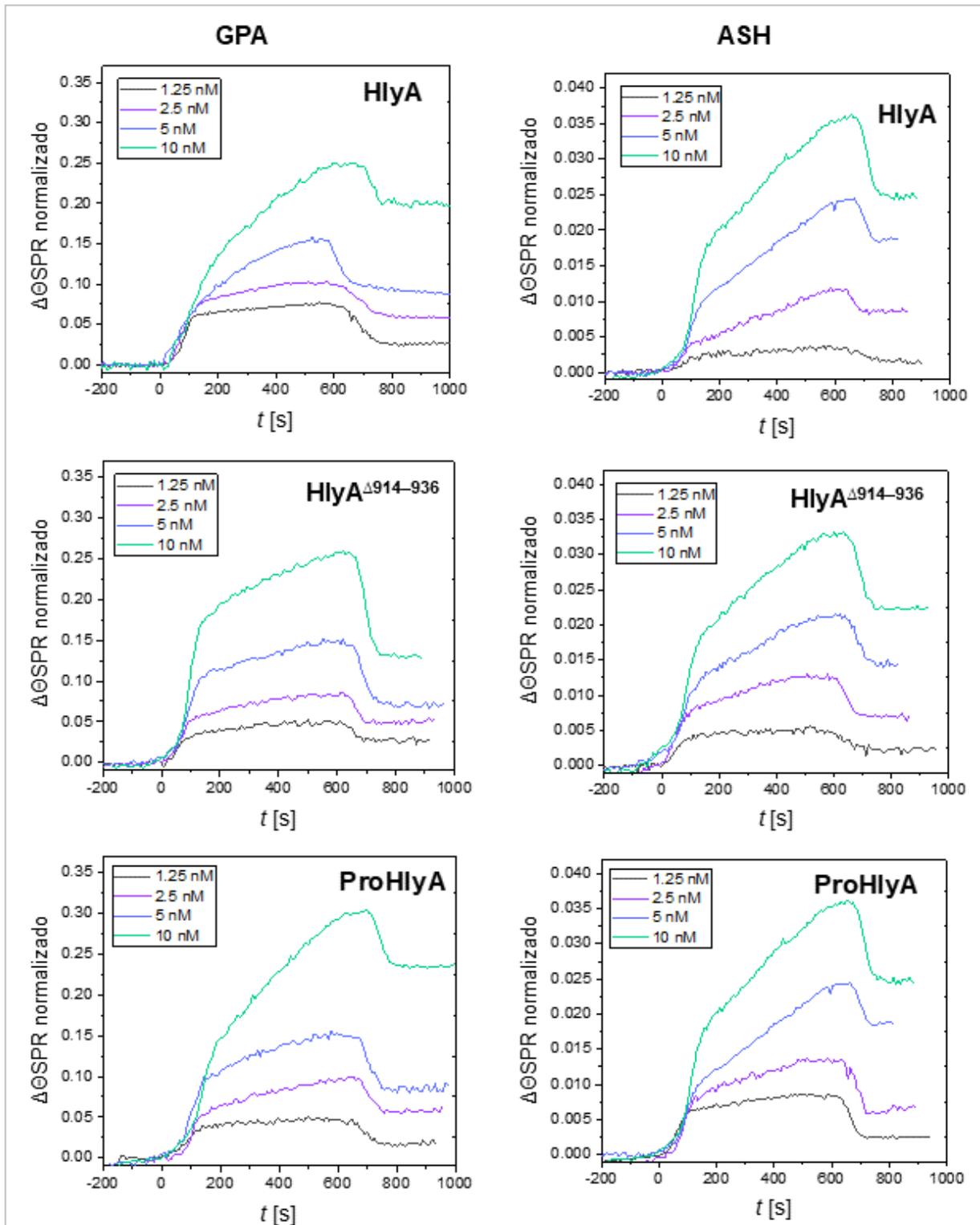


Figura 6. Ensayos de SPR entre GPA y ASH con variantes de HlyA.

Curvas de interacción entre GPA y ASH inmovilizadas con distintas concentraciones (1.25-10 nM) de HlyA, HlyA<sup>Δ914-936</sup> y ProHlyA.

Tabla 2. Valores de las constantes de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) entre GPA y ASH inmovilizadas, y HlyA, HlyA  $\Delta^{914-936}$  y ProHlyA expresadas en nM.

Proteína Inmovilizada	HlyA	HlyA $\Delta^{914-936}$	ProHlyA
GPA humana	16.7 $\pm$ 0.4	29.1 $\pm$ 0.2	10.5 $\pm$ 0.6
ASH	10.7 $\pm$ 0.6	35.5 $\pm$ 0.2	13.4 $\pm$ 0.5

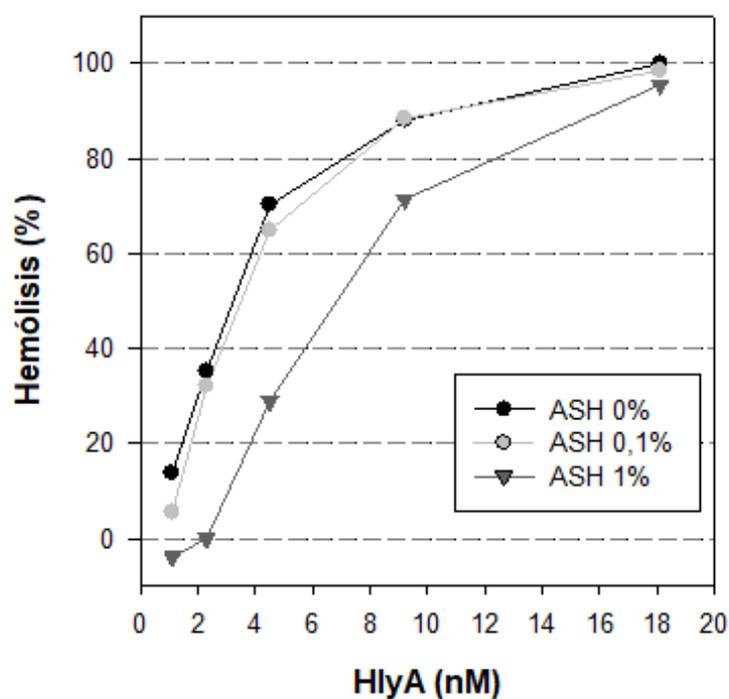


Figura 7. Actividad hemolítica de HlyA en presencia de ASH.

Porcentaje de hemólisis a los 30 min causado por HlyA a distintas concentraciones (1, 1-18,2 nM) en presencia de ASH (0%, 0,1% y 1%).

### 3.3.3. Cinética de hemólisis de glóbulos rojos humanos GPA<sup>-/-</sup>/GPB<sup>-/-</sup> con HlyA

Posteriormente, se decidió estudiar la actividad de HlyA en GR humanos GPA<sup>-/-</sup>/GPB<sup>-/-</sup>, con el objetivo de confirmar si la presencia de GP facilita la actividad hemolítica de la toxina. Este tipo de experimentos se realiza generalmente mediante tratamientos con enzimas proteolíticas, que producen efectos indeterminados en las células. Por lo tanto, la utilización de células como los GR GPA<sup>-/-</sup>/GPB<sup>-/-</sup> que poseen defectos genéticamente determinados (Tate *et al.* 1989) se presenta como una ventaja para efectuar experimentos certeros. Estos GR son un genotipo muy raro, ya que los individuos son completamente deficientes en las proteínas GPA y GPB, y aun así, esta falta no está asociada con ninguna enfermedad. Se sabe que la falta de ácido salicílico es compensada por un aumento en la glicosilación de banda 3, cuya actividad como transportador de sulfato se ve disminuida (Bruce *et al.* 1994).

En la Figura 8 A se observan las cinéticas de hemólisis de HlyA con GR control, congelados y GPA<sup>-/-</sup>/GPB<sup>-/-</sup>. Como los GR GPA<sup>-/-</sup>/GPB<sup>-/-</sup> se conservan congelados, se realizaron dos controles: utilizando GR normales congelados y sin congelar. Los datos se ajustaron a la ecuación empírica descrita en materiales y métodos (sección 3.2.2.). Este ajuste nos permitió obtener el parámetro  $t_{50}$  que representa el tiempo necesario para alcanzar un 50% de hemólisis, para cada concentración de toxina estudiada con los distintos GR (Figura 8 B). Los resultados muestran que a bajas concentraciones de toxina se observa un leve descenso de  $t_{50}$  en los GR GPA<sup>-/-</sup>/GPB<sup>-/-</sup>. Aun así, no se observan diferencias significativas en el parámetro  $t_{50}$  entre los GR control, congelados y GPA<sup>-/-</sup>/GPB<sup>-/-</sup>. Estos resultados nos indican que la velocidad de hemólisis causada por HlyA no se ve afectada por la ausencia de GPA o GPB, confirmando que la actividad de la toxina no depende de la unión a estas GPs.

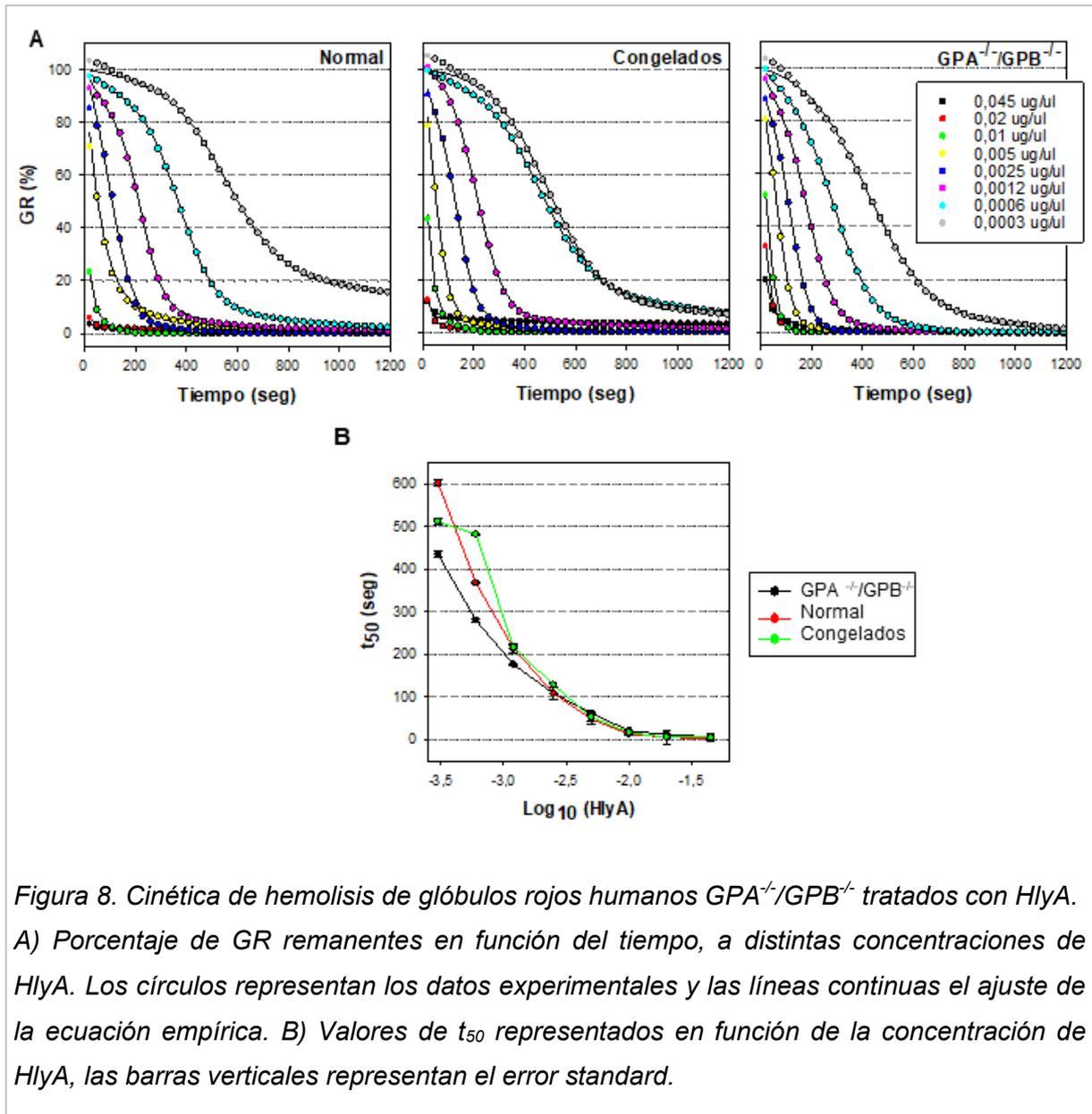


Figura 8. Cinética de hemolisis de glóbulos rojos humanos  $GPA^{-/-}/GPB^{-/-}$  tratados con HlyA. A) Porcentaje de GR remanentes en función del tiempo, a distintas concentraciones de HlyA. Los círculos representan los datos experimentales y las líneas continuas el ajuste de la ecuación empírica. B) Valores de  $t_{50}$  representados en función de la concentración de HlyA, las barras verticales representan el error standard.

### 3.3.4. *Far Western Blot*

Para estudiar la posible interacción entre HlyA y otras proteínas de la membrana de GR humanos se realizó el ensayo de *Far Western Blot*. Como se describió en materiales y métodos (sección 3.2.4.), las proteínas de membrana de los GR se separaron por SDS-PAGE 4-20%. Se realizaron dos geles en las mismas condiciones; uno se tiñó con Coomassie Blue coloidal (Figura 9 A) y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, la cual se incubó con HlyA y se reveló con anti-HlyA (Figura 9 B).

En la Figura 9 B se observa que cuando se siembran 5  $\mu$ g de proteínas totales de membrana de GR, HlyA interacciona con dos proteínas de aproximadamente 131 y 172 kDa (banda B y C), mientras que a mayores concentraciones de proteínas de membranas se observa una tercera banda de 228 kDa (banda A). Por otro lado, no se observa una interacción específica entre GPA y HlyA (calle 3, Figura 9 B), la cantidad de GPA sembrada corresponde a la cantidad de esta proteína en 35  $\mu$ g de proteína total de membrana. Por otro lado, la membrana control que no se incubó con HlyA no presentó ninguna banda, lo que indica que no existe una interacción inespecífica entre los anticuerpos y las proteínas de membrana de GR (la imagen no se muestra). Por lo tanto, estos resultados corroboran que HlyA no interacciona directamente con GPA, pero sí podría interaccionar con otras proteínas de membrana de GR humanos.

Con el objetivo de identificar estas proteínas se realizó espectrometría de masas de las bandas A, B y C. Las proteínas identificadas se encuentran listadas en la Tabla 3. El valor de PSMs (*peptide spectrum matches*) corresponde al número de péptidos derivados de la proteína en cuestión, por lo tanto, está asociado con la abundancia de la proteína en la muestra. Se muestran en la tabla las proteínas que presentaron un valor de PSMs mayor o igual a 10.

Sorprendentemente, las proteínas más abundantes, que se encontraron en las 3 bandas, fueron la espectrina  $\alpha$  y  $\beta$ . Además, fueron las únicas proteínas identificadas en la banda de mayor peso molecular. Este resultado podría indicar que HlyA no interacciona con un receptor específico en la membrana, pero que podría interaccionar con la red de espectrinas luego de insertarse en la membrana.

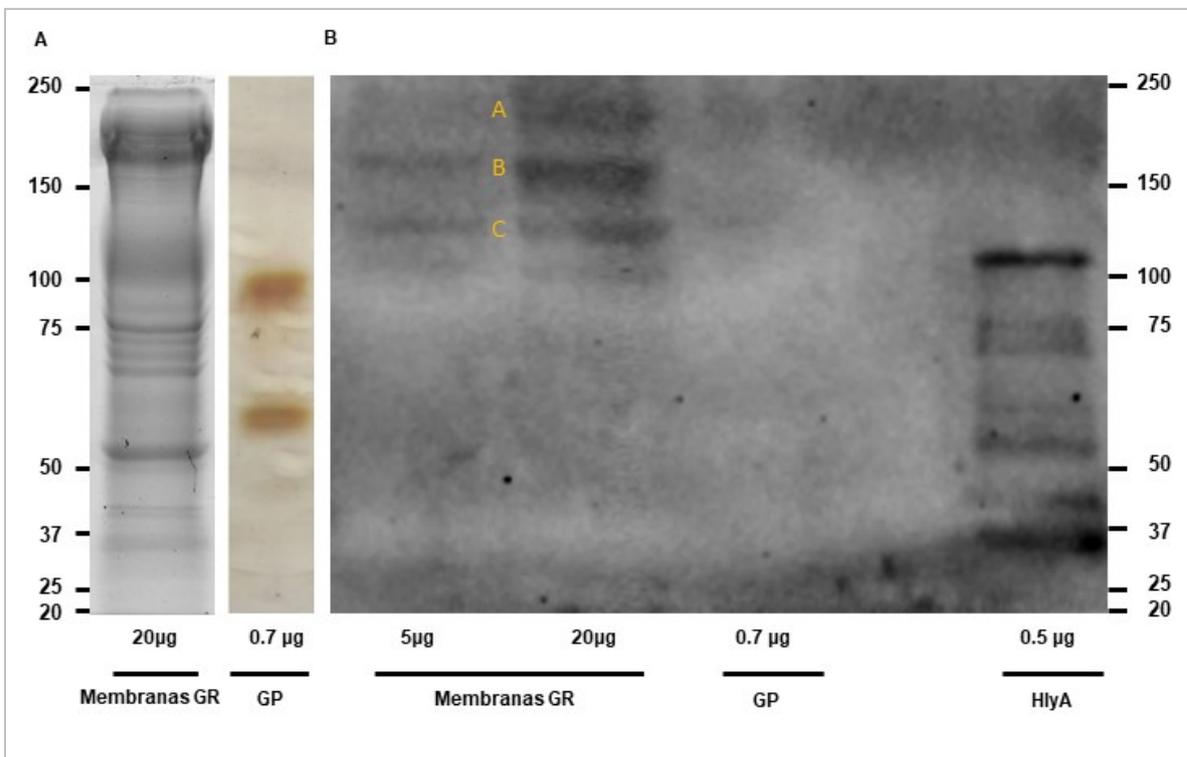


Figura 9. Far western blot de glóbulos rojos humanos tratados con HlyA

A) SDS-PAGE 4-20 % teñido con Coomassie Blue coloidal. La calle de GP se tiñó con plata. B) Membrana de nitrocelulosa incubada con HlyA 1  $\mu$ M, revelada con anti-HlyA. Se indican en amarillo las 3 bandas reactivas (A, B y C).

Tabla 3. Proteínas identificadas por espectrometría de masas de las bandas obtenidas en el Far Western Blot.

<b>Código</b>	<b>Descripción</b>	<b># Péptidos</b>	<b># PSMs</b>	<b>[kDa]</b>
<b>Banda A: 228 kDa</b>				
<b>P11277</b>	Spectrin beta chain	14	15	246,3
<b>P02549</b>	Spectrin alpha chain	10	10	279,8
<b>Banda B: 172 kDa</b>				
<b>P02549</b>	Spectrin alpha chain	70	80	279,8
<b>P11277</b>	Spectrin beta chain	66	80	246,3
<b>P35579</b>	Myosin-9	19	22	226,4
<b>P11215</b>	Integrin alpha-M	18	18	127,1
<b>P16157</b>	Ankyrin-1	16	16	206,1
<b>P02730</b>	Band 3 anion transport protein	10	15	101,7
<b>P07996</b>	Thrombospondin-1	9	10	129,3
<b>Banda C: 131 kDa</b>				
<b>P11277</b>	Spectrin beta chain	74	106	246,3
<b>P02549</b>	Spectrin alpha chain	67	86	279,8
<b>P35579</b>	Myosin-9	27	31	226,4
<b>P07996</b>	Thrombospondin-1	14	18	129,3
<b>P02730</b>	Band 3 anion transport protein	10	14	101,7
<b>P16157</b>	Ankyrin-1	12	13	206,1

### 3.4 Discusión

---

En la Introducción del presente capítulo se mencionaron los reportes bibliográficos que existen hasta el momento respecto de la presencia de un receptor para HlyA en GR. La discrepancia entre los mismos podría deberse a que los ensayos se realizaron con GR provenientes de diferentes especies, cuyos patrones de glicosilación de GPs son diversos (Hamaguchi *et al.* 1972), así como sus composiciones lipídicas (Nelson 1967). Teniendo esto en cuenta es que en el presente capítulo se decidió profundizar en el estudio del posible rol de distintas GPs como receptores de HlyA.

Los resultados de inhibición de hemólisis de HlyA con anticuerpos anti-GPA/GPB muestran que el bloqueo de las GPs no altera la actividad de la toxina significativamente, indicando que esta interacción no es estrictamente necesaria para que ocurra la hemólisis. Además, los resultados de SPR mostraron que las  $K_D$  son similares tanto para la interacción HlyA-ASH como HlyA-GPA, confirmando que la interacción entre HlyA y GPA no es específica. Finalmente, se confirmó que GP no participa del mecanismo de acción de HlyA en GR humanos ya que no se encontró diferencia en las cinéticas de hemólisis entre GR normales y GPA<sup>-</sup>/GPB<sup>-</sup> tratados con HlyA. Estos resultados concuerdan con el hecho de que los GR de conejo, que carecen de glicoforinas, son altamente susceptibles a HlyA (Rauenbuehler *et al.* 1982, Valeva *et al.* 2005, Herlax *et al.* 2010).

Luego, con el objetivo de encontrar otra proteína de membrana de GR que actuara como receptor de HlyA se realizó un experimento de *Far Western Blot*. Los resultados mostraron que en las tres bandas reactivas se encontraron las espectrinas  $\alpha$  y  $\beta$ , siendo además las más abundantes.

Teniendo en cuenta que las GP no funcionan como receptor de HlyA y que no se encontró otra proteína de membrana que interactúe con HlyA, se consideró la posibilidad de que HlyA podría no presentar un receptor específico en GR

humanos. En este sentido, se ha reportado que muchas toxinas bacterianas líticas no requieren de un receptor para insertarse en membranas y pueden insertarse espontáneamente en bicapas lipídicas, como sistema modelo de membranas (Skals *et al.* 2013). Lo cual también se reportó para el caso de HlyA en particular (Goñi *et al.* 1998). Aún en los casos donde pareciera que una proteína receptora específica es indispensable para la actividad de las citolisinas, a mayores concentraciones son activas en ausencia del receptor (Skals *et al.* 2013). En este tipo de caso se ha propuesto que la función de las proteínas descritas como receptoras sea la de mediar una aproximación inicial de la proteína a la membrana y facilitar su inserción (Skals *et al.* 2013), lo que podría también explicar las variaciones en la sensibilidad a HlyA encontradas en GR de distintas especies. Por otro lado, además de las proteínas aproximadoras también se han reportado otro tipo de moléculas, como por ejemplo lípidos, las cuales cumplen una función análoga a la descrita para ciertas proteínas (Skals *et al.* 2013). En el Capítulo 4 se describirá la idea del colesterol como una de las posibles moléculas aproximadoras de HlyA a la membrana.

Los resultados de *Far Western Blot* abren una nueva incógnita, ya que luego de que HlyA se aproxime e inserte en la membrana de GR, esta podría interactuar con la red de espectrinas como una forma de anclarse a la membrana. Las espectrinas actúan como proteínas estructurales y además organizan los microdominios de la membrana plasmática (Machnicka *et al.* 2014). Además, la red de espectrinas, en conjunto con otras proteínas, organizan y controlan la localización y función de proteínas integrales de membrana (Bennett *et al.* 2001). Aunque HlyA no es una proteína integral de membrana, cuando se inserta en la membrana actúa como tal ya que su unión a la membrana es irreversible (Herlax *et al.* 2003). Aún así, teniendo en cuenta que el ensayo de *Far Western Blot* se realizó en condiciones desnaturizantes, la interacción entre HlyA y espectrinas debería confirmarse mediante ensayos en entornos más cercanos al biológico, por ejemplo, evaluando la unión de HlyA en GR depletados de espectrina.

## **Capítulo 4. Interacción de péptidos CRAC y CARC de HlyA con sistemas modelo de membrana**

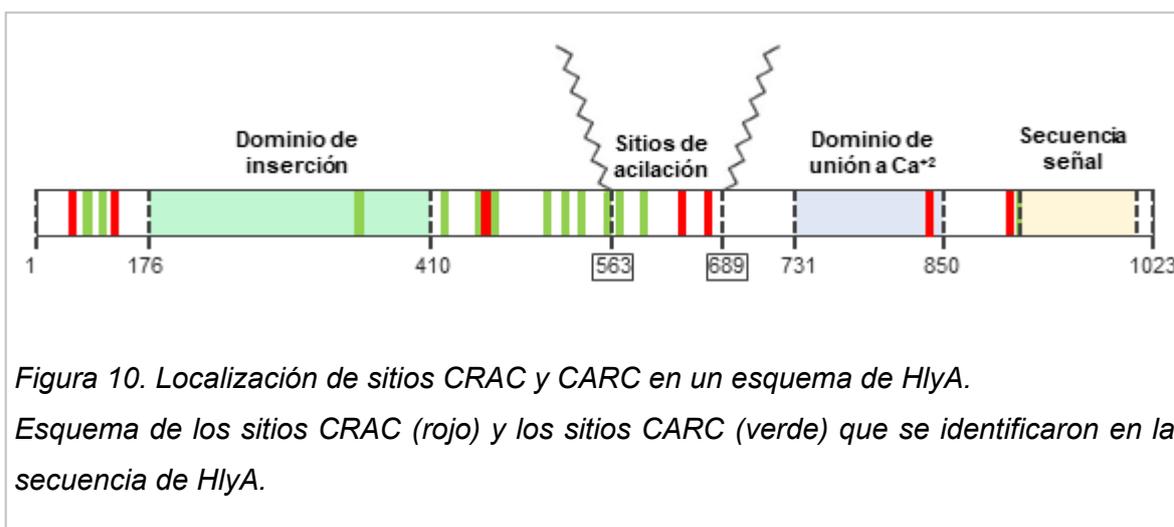
---

## 4.1 Introducción

---

Como se describió anteriormente, HlyA se puede insertar en membranas biológicas en ausencia de un receptor específico (Bhakdi *et al.* 1988). Aun así, existen proteínas de membrana que no funcionan como receptores de una manera estricta pero median una aproximación inicial de diferentes toxinas a la membrana y facilitan su inserción (Skals *et al.* 2013). Se sabe que la presencia de moléculas aproximadoras aumenta el efecto de muchas toxinas, lo que podría tener un gran impacto *in vivo* (Skals *et al.* 2013). Otras moléculas, como lípidos, también funcionan como moléculas aproximadoras, por ejemplo gangliósidos y en particular el colesterol que además se describió como molécula facilitadora de la inserción de diversas toxinas en membranas (Skals *et al.* 2013).

Como se describió en la introducción general, el colesterol juega un rol importante en el mecanismo de acción de la toxina HlyA, ya que interactúa más con liposomas y monocapas que contienen colesterol y su actividad hemolítica disminuye en GR depletados de colesterol (Herlax *et al.* 2009, Vazquez *et al.* 2014). Los motivos de reconocimiento de colesterol, llamados CRAC poseen la secuencia consenso: L/V-(X<sub>1-5</sub>)-Y-(X<sub>1-5</sub>)-R/K. Dicha secuencia consiste en un residuo apolar ramificado (L o V) seguido de un segmento variable que contiene de 1 a 5 residuos de cualquier aminoácido, luego el residuo aromático Y, de nuevo 1-5 residuos de cualquier aminoácido y finalmente un residuo básico (K o R) (Strandberg *et al.* 2003), (Fantini *et al.* 2013). Los sitios CARC, son un dominio similar al CRAC, pero con la orientación opuesta, siendo su secuencia K/R(X<sub>1-5</sub>)-Y/F-(X<sub>1-5</sub>)L/V (Baier *et al.* 2011). El dominio contiene residuos básicos que aseguran la posición correcta del motivo CARC en la interfaz polar/apolar de un dominio transmembrana, exactamente donde se supone que está el colesterol (Fantini *et al.* 2013). Particularmente en HlyA se han identificado 7 sitios CRAC y 13 sitios CARC (Vazquez *et al.* 2014), esquematizados en la Figura 10.



El objetivo de este capítulo es estudiar la interacción de péptidos cuya secuencia corresponde a sitios CRAC o CARC de HlyA con sistemas modelo de membrana con diferente contenido de colesterol. Se utilizaron las técnicas de monocapas de Langmuir, SPR y simulaciones de dinámica molecular (MD). Se seleccionaron sitios CRAC y CARC pertenecientes al dominio de inserción en membranas y a la región comprendida entre los ácidos grasos de HlyA. A continuación, se describen los motivos por los cuales se seleccionaron estos sitios en particular.

#### 4.1.1. Relevancia de la región comprendida entre los ácidos grasos de HlyA.

El papel de los ácidos grasos unidos covalentemente a residuos internos de lisina de HlyA es crucial para la actividad hemolítica de la toxina (Stanley *et al.* 1994). Los ácidos grasos no son necesarios para la adsorción reversible inicial de HlyA en membranas (Soloaga *et al.* 1996) pero sí para la inserción irreversible (Herlax *et al.* 2003) y para la oligomerización de la toxina (Herlax *et al.* 2009). La acilación de ProHlyA induce cambios conformacionales en la proteína soluble, exponiendo secuencias intrínsecamente desordenadas, y permitiendo una conformación del tipo glóbulo fundido (*molten globule*) (Soloaga *et al.* 1996,

Herlax *et al.* 2007). Probablemente, los ácidos grasos juegan un papel en la inserción irreversible de la toxina, debido a que permiten su oligomerización. Otros resultados previos, que apoyan esta hipótesis, son los obtenidos mediante experimentos de espectroscopia infrarroja de reflexión-absorción con modulación de la polarización (PM-IRRAS), que se realizaron en monocapas lipídicas como sistema modelo de membrana (Vazquez *et al.* 2017). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la presencia de los ácidos grasos favorece la cinética de asociación de la proteína, exponiendo dominios críticos de HlyA, cuando se localiza en la interfase aire-agua. Esto podría desempeñar un papel relevante en el anclaje estable y la actividad tóxica de la proteína al facilitar las interacciones proteína-proteína entre los monómeros de la toxina.

También se encontró que la región entre los ácidos grasos (594-640) está expuesta en HlyA, pero es mucho menos accesible en ProHlyA (Moayeri *et al.* 1997). Por otra parte, Ludwig *et al.* (Ludwig *et al.* 1996) demostraron que un mutante de delección de HlyA  $\Delta$ 622-657, que se encuentra doblemente acilado, es hemolíticamente inactivo. Y que el mutante de delección HlyA  $\Delta$ 623-673, también es hemolítica y citotóxicamente inactivo (Pellet *et al.* 1996). También indicaron que un anticuerpo monoclonal cuyo epítipo de unión se encuentra entre los residuos 626-726, inhibe la actividad citotóxica de HlyA (Pellett *et al.* 1990). Por lo tanto, todos estos resultados indican la importancia de la región comprendida entre los sitios de acilación en el mecanismo de acción de la toxina.

En resumen, la acilación de ProHlyA podría generar la exposición de la región entre los sitios de acilación, en la cual existen diversos motivos CRAC y CARC, permitiendo la interacción con colesterol y la oligomerización en membrana. Motivo por el cual en este capítulo se estudiará la interacción de estos sitios con colesterol.

#### 4.1.2. Relevancia del dominio de inserción en membrana de HlyA

Como se describió anteriormente, la unión de HlyA a membranas se produce en dos etapas, primero una adsorción reversible y luego una inserción irreversible (Ostolaza *et al.* 1993, Bakás *et al.* 1996), que da lugar a la oligomerización de la toxina en membrana y a la posterior lisis de la célula blanco (Herlax *et al.* 2009).

Ludwig *et al.*, propusieron un modelo, basado en una simulación *in silico*, que asume que la región altamente hidrofóbica de HlyA entre los aminoácidos 176 y 410 está formada por 8  $\alpha$ -hélices que se insertan en membrana y dan lugar a la formación del poro. De estas  $\alpha$ -hélices, 4 son hidrofóbicas y necesarias para la formación del poro y las otras 4 son hélices anfipáticas cuyo lado polar se ubicaría en la cara interior del poro (Ludwig *et al.* 1991). Estas hélices pueden observarse en el modelado realizado con Alpha Fold (Figura 1 B). Más adelante se comprobó experimentalmente que esa misma región (176-410) es el dominio de la toxina que se inserta en la membrana (Hyland *et al.* 2001, Schindel *et al.* 2001). Ensayos utilizando mutantes puntuales de cisteína marcados con badan, una sonda fluorescente sensible a la polaridad del entorno, indicaron que la secuencia comprendida entre los residuos 172 y 301 presenta un contacto directo con membranas lipídicas durante la formación del poro (Valeva *et al.* 2008). Mediante ensayos con distintos mutantes de delección se demostró que las regiones entre los aminoácidos 299-327 y 366-410 de HlyA (correspondientes a dos de las hélices hidrofóbicas nombradas) son esenciales para la actividad hemolítica de la toxina (Ludwig *et al.* 1991). Se sabe también que el proceso de inserción es independiente de la lisis de la membrana, ya que mutantes totalmente no líticos también son capaces de insertarse en monocapas lipídicas (Sanchez-Magraner *et al.* 2006).

Dentro del dominio de inserción en membranas de HlyA se encontró un sitio CARC que abarca los residuos 341-353, altamente conservado entre las

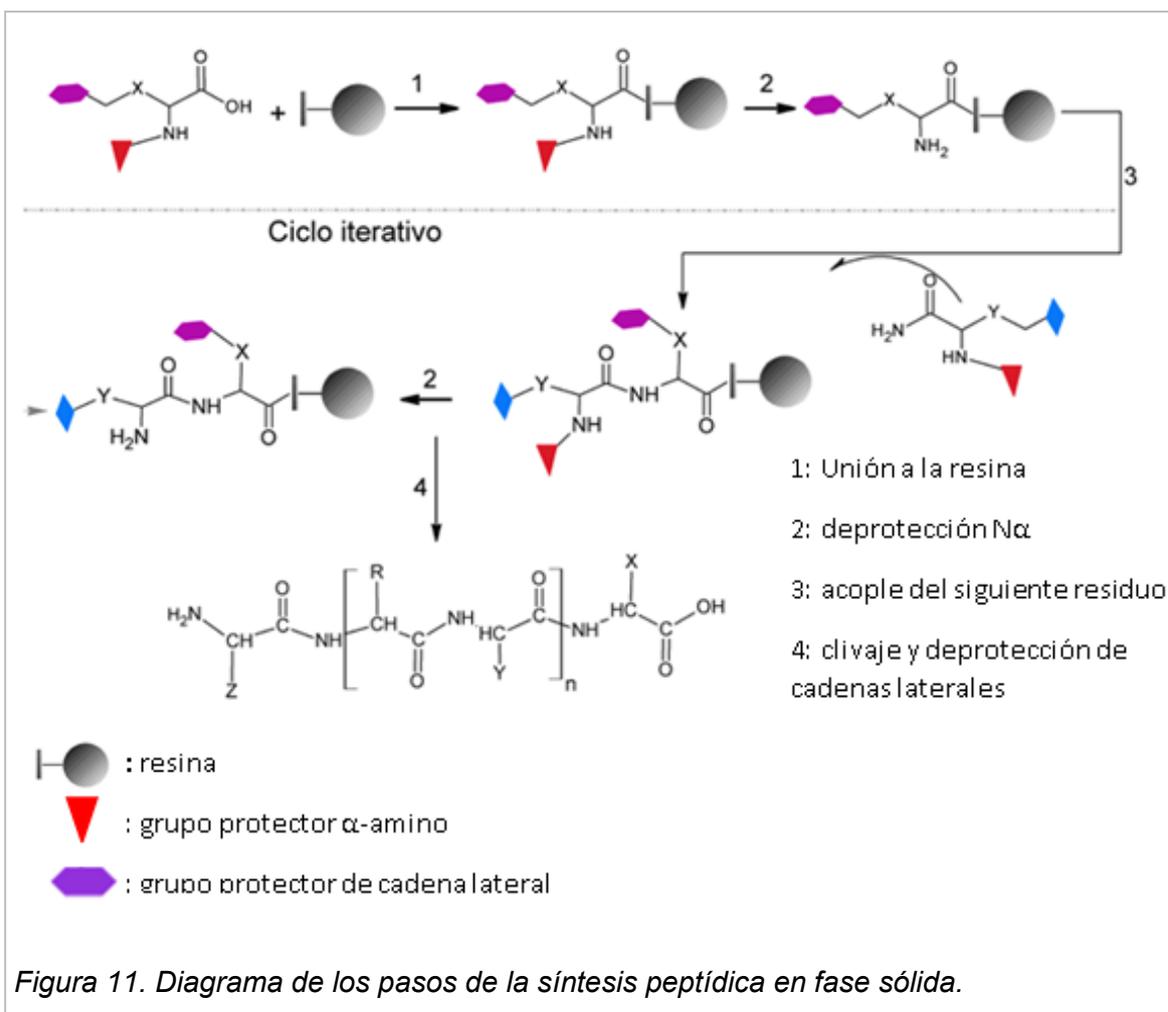
toxinas RTX (Vazquez *et al.* 2014). Teniendo en cuenta el modelo propuesto por Ludwig *et al.* (Ludwig *et al.* 1991), los primeros 4 residuos de este sitio se encontrarían en el extremo N-terminal de una de las  $\alpha$ -hélice transmembrana.

Los antecedentes mencionados muestran la relevancia del dominio de inserción en membrana en el mecanismo de acción de HlyA, motivo por el cual en el presente capítulo se decidió estudiar el sitio CARC presente en este dominio.

## 4.2 Materiales y Métodos

### 4.2.1. Síntesis Peptídica en fase sólida

La síntesis de los péptidos se realizó en una etapa de colaboración con el grupo de la Dra. Fanny Guzmán del Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. Se utilizó la técnica de síntesis química en fase sólida (*solid-phase peptide synthesis*, SPPS). En la Figura 11 se esquematizan los pasos del procedimiento de síntesis.



En primer lugar, se colocaron 40 mg de resina Fmoc Rink Amide en bolsitas de polipropileno. Esta resina permite obtener péptidos con un grupo amida C-terminal y contiene grupos protectores Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo). Para desproteger la resina se incubó en piperidina al 20% (con 10% Tritón X-100 y 1% de N, N-dimetilformamida, DMF) 2 veces durante 10 minutos en agitación constante. Luego se realizaron 3 lavados de 1 minuto con DMF, un lavado de 1 minuto con IPA (isopropil alcohol), un lavado de 2 minutos con azul de bromofenol (1% en DMF), un lavado de 1 minuto con DMF y por último dos lavados de 1 minuto con DCM.

En cada bolsita se sintetizó un péptido con una secuencia dada. Para realizar el primer acople (correspondiente al aminoácido C-terminal) se incubó la resina durante 3 horas con el aminoácido correspondiente (protegido su  $N\alpha$  con Fmoc) y los activadores HBTU (O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetrametil-uronium-hexafluoro-fosfato), oxima y DIEA (diisopropiletilamina); (Paso 1, Figura 11). Se utilizaron 5 excesos molares de aminoácidos y del activador y 1,5 equivalentes de DIEA, respecto de la cantidad de resina y su grado de sustitución (0,59mmol/g).

En el caso de que el aminoácido no se acoplara, se volvió a realizar el acople utilizando primero el activador TBTU (Tetrafluoroborato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazolil)(dimetilamino)-metilen]-N-metilaminio) o en una segunda instancia TCTU (tetrafluoroborato de 2-(6-cloro- 1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio). El correcto acoplamiento de los aminoácidos se verificó mediante el test de Kaiser que cuantifica colorimétricamente los grupos aminos libres (Sarin *et al.* 1981). La desprotección de los aminoácidos se realizó de la misma forma que se describió para la resina.

Luego de realizar todos los pasos de acople y desprotección necesarios (Paso 2 y 3, Figura 11) para completar la síntesis del péptido se procedió a separar el péptido de la resina. Inmediatamente después del último paso de desprotección se dejaron secar las bolsas, se realizó el desprendimiento del

péptido y la remoción de grupos protectores de cadenas laterales con (ácido trifluoroacético/agua/triisopropil silano 95/2.5/2.5) (Paso 4, Figura 11). Luego de 3 horas se procedió a la precipitación del péptido con Metil tert-butil éter frío y agitación fuerte. Por último, se liofilizaron los péptidos.

Para purificar los péptidos se utilizó la columna de fase reversa Clean-Up® CEC18153 C-18 (UCT. Bristol. PA. USA). Primero se cargó el péptido en la columna, y luego se eluyó en un gradiente discontinuo de H<sub>2</sub>O-ACN (acetonitrilo): H<sub>2</sub>O, ACN 15%, ACN 20%, ACN 30%, ACN 60%, ACN 100% y metanol. Por último, se evaporó el solvente de las fracciones en speed-vac y se liofilizó.

#### **4.2.2. Control de calidad de los péptidos**

Para evaluar la pureza de síntesis, las distintas fracciones obtenidas de la columna de fase reversa se analizaron por HPLC utilizando una columna C18 (Water Associates, Milford, MA, USA). Luego cada fracción se analizó por espectrometría de masas para confirmar su peso molecular (ESI MS, Shidmazu 2020). De esta forma se eligieron las fracciones que contuvieran los péptidos puros.

#### **4.2.3. Dicroísmo circular**

La técnica de dicroísmo circular (DC) se basa en la capacidad de absorber diferencialmente la luz circularmente polarizada a izquierda y a derecha de moléculas ópticamente activas, lo que genera una rotación del plano de polarización de la luz.

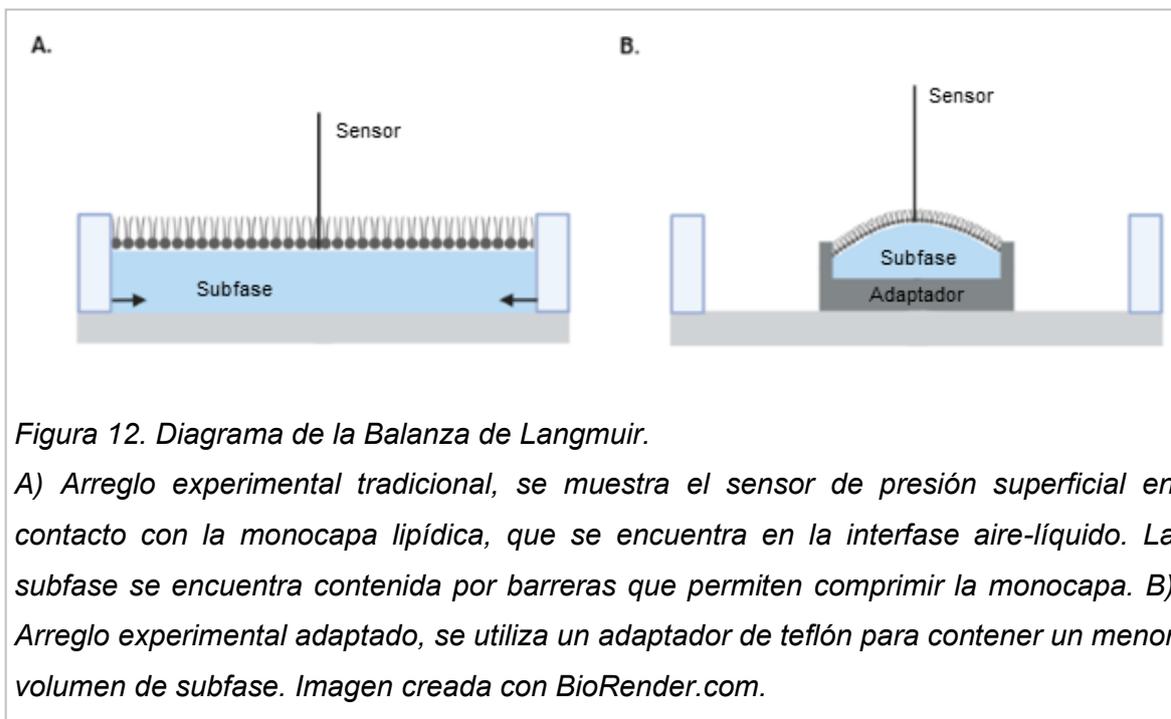
Esta rotación llamada DC generalmente se expresa como elipticidad molar ( $\theta$ ), que es el DC corregido por la concentración de la molécula estudiada. Al variar la longitud de onda ( $\lambda$ ) de la luz incidente, varía el grado de rotación causado por las moléculas quirales, pudiéndose obtener espectros de elipticidad en función de  $\lambda$ . En el caso de las proteínas, los espectros de DC en la región del

UV lejano (180-250 nm), reflejan el arreglo espacial de los enlaces amida de la cadena peptídica estudiada, y pueden ser interpretados para determinar la presencia de estructuras secundarias típicas (hélices  $\alpha$ , hojas  $\beta$ , giros y otros tipos estructurales).

Mediante la técnica de dicroísmo circular (DC) se caracterizó la estructura secundaria de los péptidos. Se midió el DC entre 190–260 nm en un espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Corp., Tokyo, Japan). Los péptidos se disolvieron en PBS o en 2,2,2-trifluoroetanol al 30% (TFE) para las medidas.

#### **4.2.4. Monocapas de Langmuir**

Las monocapas de Langmuir constituyen un sistema modelo de membrana muy sencillo, ya que se asemeja a una de las dos hemicapas de las membranas celulares (Brockman 1999). Por su diseño, esta técnica permite la observación directa del fenómeno de inserción separado de otros cambios en la estructura lipídica, ya que las monocapas no pueden sufrir la reestructuración 3D de la membrana, paso esencial para alterar la permeabilidad de la membrana. Por lo tanto, experimentos con monocapas lipídicas permiten estudiar la etapa de inserción de los péptidos, separada de la etapa posterior de lisis de la membrana (Sanchez-Magraner *et al.* 2006). Las monocapas de Langmuir se forman depositando moléculas anfifílicas en la interfase aire/líquido de una solución (subfase). En este trabajo de tesis se utilizaron lípidos, como fosfolípidos y colesterol, los que se acomodan exponiendo su cabeza polar hacia la subfase acuosa y la cadena hidrocarbonada no polar hacia el aire. La utilización de un alambre de platino permite medir los cambios en la tensión superficial de la interfase aire/líquido, luego de inyectar los péptidos en la subfase (Figura 12 A). La inserción de los péptidos en la monocapa produce un incremento en la tensión superficial. Por lo tanto, esta técnica nos permite estudiar en detalle la inserción de péptidos en monocapas lipídicas de una manera simple y controlada (Giner-Casares *et al.* 2014).



Las medidas de presión superficial se realizaron utilizando una balanza de Langmuir (NIMA Langmuir–Blodgett trough, Model 102M, KSV-NIMA Biolin Scientific) con un alambre de platino como sensor de la presión superficial. Como subfase se utilizaron 500  $\mu$ l de buffer TC 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , depositados en forma de gota sobre un adaptador de teflón (Figura 12 B). Esta adaptación nos permitió utilizar una subfase de menor volumen, y así disminuir la cantidad de péptido a utilizar. Se realizaron los ensayos en monocapas de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-fosfo-colina (POPC) puro y POPC:colesterol (POPC:Cho) en relación molar 2:1 (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL, EE.UU.).

Los lípidos disueltos en cloroformo:metanol (2:1, v/v) se “sembraron” suavemente sobre la superficie de la subfase, hasta obtener una presión de superficie inicial de 25 mN/m. Transcurrido el tiempo necesario para la evaporación del solvente (5-10 min) se inyectaron los péptidos (10  $\mu$ M final) con una micropipeta Hamilton, en el “bulk” o seno de la subfase. Se midió el aumento

en la presión superficial en función del tiempo hasta que la señal se mantuvo estable. Todos los experimentos se realizaron a  $23 \pm 1$  °C y se repitieron al menos tres veces para cada condición.

#### 4.2.5. Ensayos de SPR

Se utilizó la técnica de SPR para analizar la interacción entre los péptidos y membranas, mediante un protocolo novedoso que permite la formación de bicapas lipídicas soportadas estables y reproducibles (*supported lipid bilayer*, SLB) sobre sustratos de oro comerciales (Daza Millone *et al.* 2018).

**Preparación de vesículas unilamelares pequeñas (SUVs).** En primera instancia se prepararon vesículas multilamelares (MLVs) de distintas composiciones: POPC pura y POPC:Cho en relaciones molares 2:1 y 4:1. Para esto se mezclaron las cantidades necesarias de POPC y colesterol (Avanti Polar Lipids) en cloroformo, se evaporaron a sequedad en *speed-vac* (Speed Vac SC110, Savant) y finalmente se rehidrataron en buffer TC, pH 7,4. Luego las MLVs se sonicaron (TB04TA, Testlab, Argentina) durante 30 minutos para formar las SUVs.

**Preparación de los sustratos de oro.** Para la preparación de los sustratos de oro comerciales (SPR102-AU, Bionavis™), estos se lavaron con  $\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$  (1:1:2) a 90 °C durante 5 min, luego se enjuagaron con agua MilliQ y etanol absoluto, y finalmente se secaron con  $\text{N}_2$ . Inmediatamente después se sumergieron en una solución de DL-ditiotreitol (DTT) 50  $\mu\text{M}$  (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) por 30 minutos en oscuridad. De esta manera se obtuvieron los sustratos de oro completamente cubiertos con una monocapa de DTT (Daza Millone *et al.* 2018). Se realizó un enjuague exhaustivo con etanol absoluto y se secó la superficie con un flujo de  $\text{N}_2$ . De esta manera los sustratos Au-DTT estuvieron listos para ser colocados en el equipo.

**Medidas de SPR.** Las medidas de SPR se realizaron en el equipo MP-SPR BioNavis SPR Navi™ 200 (Tampere, Finlandia), que contiene dos láseres independientes (670 y 785nm) y un sistema de detección de doble canal. Las mediciones se realizaron en un rango de escaneo de 59-72 grados, midiendo las curvas de SPR cada 3.5 seg a una temperatura constante de 23°C.

Los sustratos Au-DTT preparados *ex situ* se colocaron en la cámara de flujo del equipo de SPR, se lavaron con un flujo de 500  $\mu\text{l}/\text{min}$  de TC 10 mM  $\text{CaCl}_2$  y luego con una solución acuosa de tritón X-100 durante 1 min a un flujo de 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Las SUVs (0,2 mg/ml) se inyectaron a 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  durante 10 min. De esta manera quedó formada la SLB sobre el sustrato. Las vesículas que no se unieron se lavaron con un flujo alto de TC 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (500  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) y una solución de NaOH 100 mM (1 min a 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). La cantidad de lípidos inmovilizados se midió luego de 10 minutos de estabilizada la señal. Para los ensayos de unión se inyectaron los péptidos en el rango de concentraciones 10-80  $\mu\text{M}$  en buffer TC con 10 mM  $\text{CaCl}_2$  durante 10 minutos a 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Para cada medida se prepararon bicapas lipídicas nuevas y los cambios angulares reportados corresponden al promedio de al menos 2 experimentos independientes. Finalmente, las superficies de Au-DTT se regeneraron con 2 inyecciones consecutivas de Tritón X-100 (1 min a 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) para luego inyectar nuevas suspensiones de SUVs. La Figura 13 muestra un sensograma representativo de los experimentos de SPR para cada composición lipídica.

Los cambios en el ángulo mínimo de SPR ( $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ ) se normalizaron teniendo en cuenta la cantidad de lípido inmovilizado ( $\Delta\theta_{\text{bicapa}}$ ) previo a cada ensayo de unión, y el ángulo de la reflexión interna total (TIR) se restó de cada curva de asociación para eliminar la contribución del búffer a la señal de SPR.

La relación entre la señal de SPR del péptido en equilibrio (Figura 13,  $\Delta\theta_{\text{PEP}}$ ) y la concentración del péptido puede describirse mediante el modelo de Langmuir (Papo *et al.* 2003):

$$\Delta\Theta_{PEP} = \Delta\Theta_{PEP(m\acute{a}x)} * C / (K_D + C)$$

Finalmente, los valores de  $K_D$  se obtuvieron ajustando dicha ecuación a los datos de  $\Delta\Theta_{PEP}$  vs.  $C$  (Figura 13 B), utilizando Origin software.

Los experimentos de SPR se realizaron en colaboración con la Dra. Antonieta Daza-Millone del INIFTA.

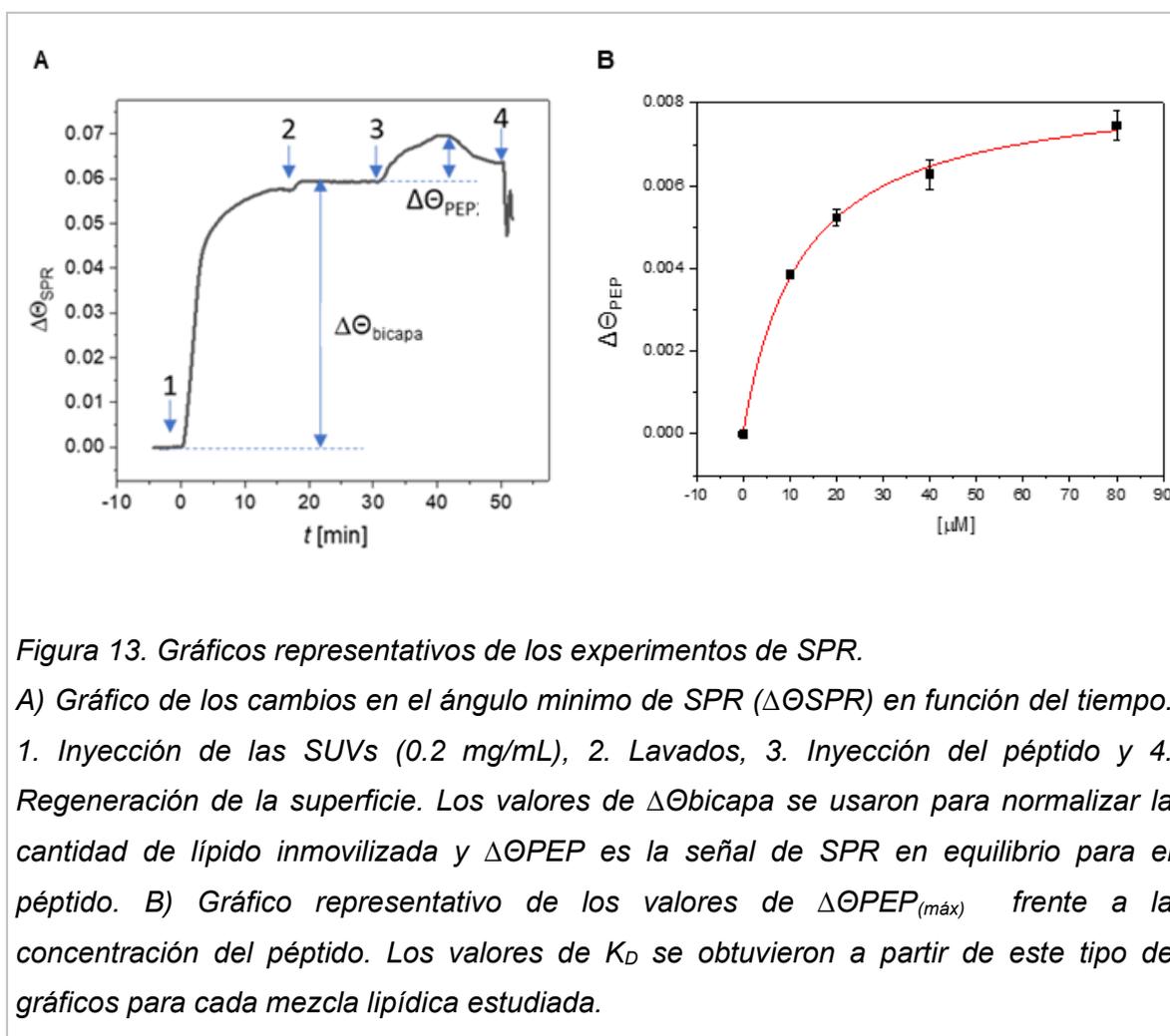


Figura 13. Gráficos representativos de los experimentos de SPR.

A) Gráfico de los cambios en el ángulo mínimo de SPR ( $\Delta\Theta_{SPR}$ ) en función del tiempo. 1. Inyección de las SUVs (0.2 mg/mL), 2. Lavados, 3. Inyección del péptido y 4. Regeneración de la superficie. Los valores de  $\Delta\Theta_{bicapa}$  se usaron para normalizar la cantidad de lípido inmovilizada y  $\Delta\Theta_{PEP}$  es la señal de SPR en equilibrio para el péptido. B) Gráfico representativo de los valores de  $\Delta\Theta_{PEP(m\acute{a}x)}$  frente a la concentración del péptido. Los valores de  $K_D$  se obtuvieron a partir de este tipo de gráficos para cada mezcla lipídica estudiada.

#### 4.2.6. Simulaciones de Dinámica Molecular

La dinámica molecular es una técnica *in silico*, que permite simular la interacción entre átomos y moléculas, modelando su interacción con un campo de fuerza aproximado, y observar su movimiento en el tiempo. Los resultados de la simulación pueden analizarse para obtener variables fisicoquímicas de interés del sistema estudiado.

Se realizaron simulaciones de Dinámica Molecular (DM) de bicapas compuestas por POPC puro y mezclas lipídicas de POPC:Cho (relación molar 4: 1 y 2: 1) en solución acuosa utilizando el paquete de software GROMACS 2022 (Berendsen *et al.* 1995, Lindahl *et al.* 2001, Van Der Spoel *et al.* 2005, Abraham *et al.* 2015, Abraham *et al.* 2018). POPC, Cho y los péptidos se describieron con el campo de fuerza de átomos unidos 53a6 GROMOS-96 (Lindahl *et al.* 2001, Van Der Spoel *et al.* 2005), utilizando la corrección de Berger *et al.* (Berger *et al.* 1997). El agua se modeló utilizando el modelo de carga puntual simple (SPC) (Berendsen *et al.* 1981). Se simularon bicapas modelos compuestas por POPC puro (1:0); POPC:Cho (4:1) o POPC:Cho (2:1) en presencia de 10 moléculas de péptido o en su ausencia, para analizar el comportamiento de la membrana sin péptido. Los sistemas simulados consistieron en una célula replicada periódicamente de  $\sim 60 \times 60 \times 150 \text{ \AA}^3$ , que contenía 64 moléculas de lípidos en cada hemicapa (128 en total) y 10 moléculas de péptidos solvatadas con  $\sim 13000$  moléculas de agua, e iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{+2}$  para obtener 100 mM de NaCl, 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  y un sistema eléctricamente neutro. Las concentraciones de péptidos e iones fueron las mismas que las utilizadas en los experimentos de monocapas y SPR, para poder comparar el comportamiento de los péptidos.

La estructura inicial de los péptidos se obtuvo a partir del software Alpha Fold (Jumper *et al.* 2021, Varadi *et al.* 2021) y el extremo C-terminal se editó manualmente para agregar un grupo amida, y así reproducir las condiciones experimentales.

Las interacciones electrostáticas se trataron con el método “Smooth particle mesh Ewald” (SPME), con la versión de las sumas de Ewald (Darden *et al.* 1993, Essmann *et al.* 1995). En todas las simulaciones, las interacciones de Van Der Waals se ajustaron a 1,5 nm. Las simulaciones se realizaron en el ensamble NPT utilizando el termostato Nose-Hoover. Todo el sistema se acopló a un baño de temperatura con una temperatura de referencia de 298 K, de acuerdo con los ajustes experimentales. La presión se fijó en 1 bar utilizando el baróstato Parrinello-Rahman con un rendimiento semi-isotrópico y un escalado uniforme de los vectores de la caja x-y independiente de z. Todas las longitudes de enlace de las moléculas se restringieron utilizando el algoritmo LINCS. El salto de tiempo para la integración de la ecuación de movimiento fue de 2 fs. Los sistemas se minimizaron y equilibraron. Las simulaciones MD se llevaron a cabo hasta 200 ns después del equilibrio del sistema.

Las trayectorias simuladas se analizaron visualmente a través del software VMD, y también se obtuvieron imágenes de las etapas más representativas. Para un análisis cuantitativo, las propiedades evaluadas se analizaron con el paquete de herramientas de Gromacs software suite, en los diferentes periodos de la trayectoria, como se informa en Resultados. Se realizaron perfiles de densidad de masa en los cuales se muestra la densidad de masa de una molécula en particular en función de la distancia del centro de la bicapa, en el eje z. También se calculó el parámetro de orden (PO) de las cadenas *sn1* (16:0) y *sn2* (18:1) de POPC. El PO es una medida relativa de la movilidad de los enlaces C-H respecto de la bicapa, promediada del conjunto de enlaces y en el tiempo. Es una medida que depende del orden del sistema y de su orientación, por lo que refleja el grado de empaquetamiento de los lípidos en la bicapa. También se evaluó la función de distribución radial ( $g(r)$ ), para calcular el número promedio de cada uno de los aminoácidos de cada péptido que se encuentran a una distancia  $r$  del colesterol.

Las figuras de las simulaciones MD se realizaron con el software VMD (Humphrey *et al.* 1996) y Grace (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>).

#### **4.2.7. Hemólisis e inhibición de la actividad de HlyA por los péptidos**

Los ensayos de inhibición de la actividad hemolítica se realizaron como se describió en la sección de Materiales y métodos generales (sección 2.5), con la diferencia de que en este caso se preincubó HlyA con diferentes concentraciones de PEP 1 o PEP 2 durante 30 minutos a 37°C y a continuación se añadió la solución de GR. La concentración de toxina utilizada fue aquella que produjo un 100% de hemólisis (0,1  $\mu$ M). Las relaciones molares HlyA:Péptido ensayadas fueron 1:0, 1:2 y 1:5.

#### **4.2.8. Medidas de Ca<sup>+2</sup> intracelular en glóbulos rojos humanos**

Los cambios en la concentración de Ca<sup>+2</sup> intracelular en GR humanos causados por los péptidos se midieron por citometría de flujo, utilizando la sonda fluorescente Fluo-4 AM. Al estar esterificada esta sonda puede ingresar a las células, donde esterasas hidrolizan el enlace éster liberándola en el interior celular. Esta sonda tiene la capacidad de aumentar hasta 100 veces su fluorescencia al unirse a Ca<sup>+2</sup>, cuando es excitada a 488 nm.

Para realizar las medidas se incubaron suspensiones de GR (1% [v/v]) con Fluo-4 AM (5 mM) en oscuridad, durante 1 hora a 37°C. A continuación, los GR marcados se incubaron con HlyA (5 nM), PEP 1 (25 y 50 nM), PEP 2 (25 nM y 0,3 mM) o ProHlyA (5 y 50 nM), y las muestras se analizaron a 1, 5, 15 y 30 minutos en un citómetro de flujo Accuri C6™ plus (BD Inc.). El corte de adquisición se fijó en 30.000 eventos.

## 4.3 Resultados

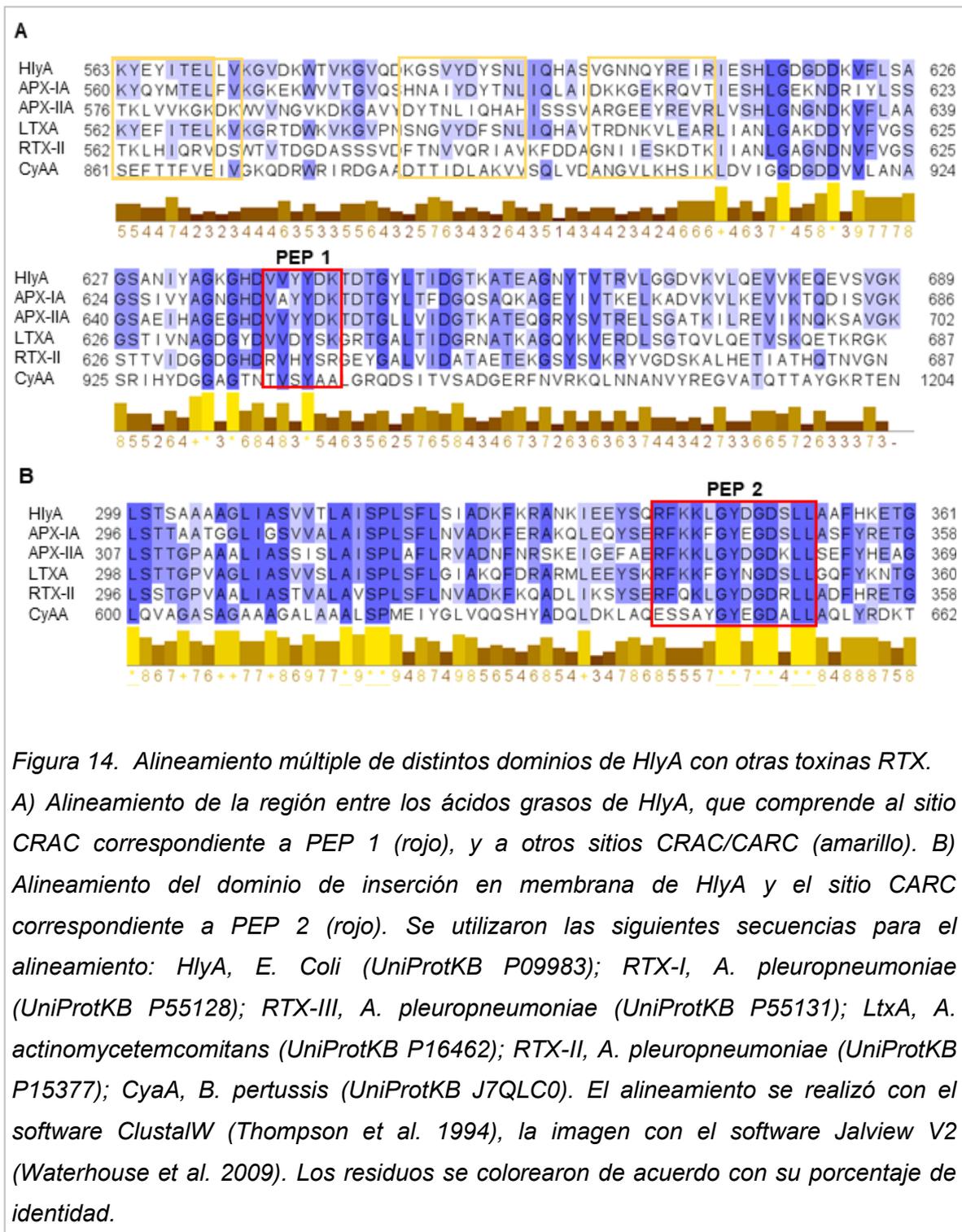
---

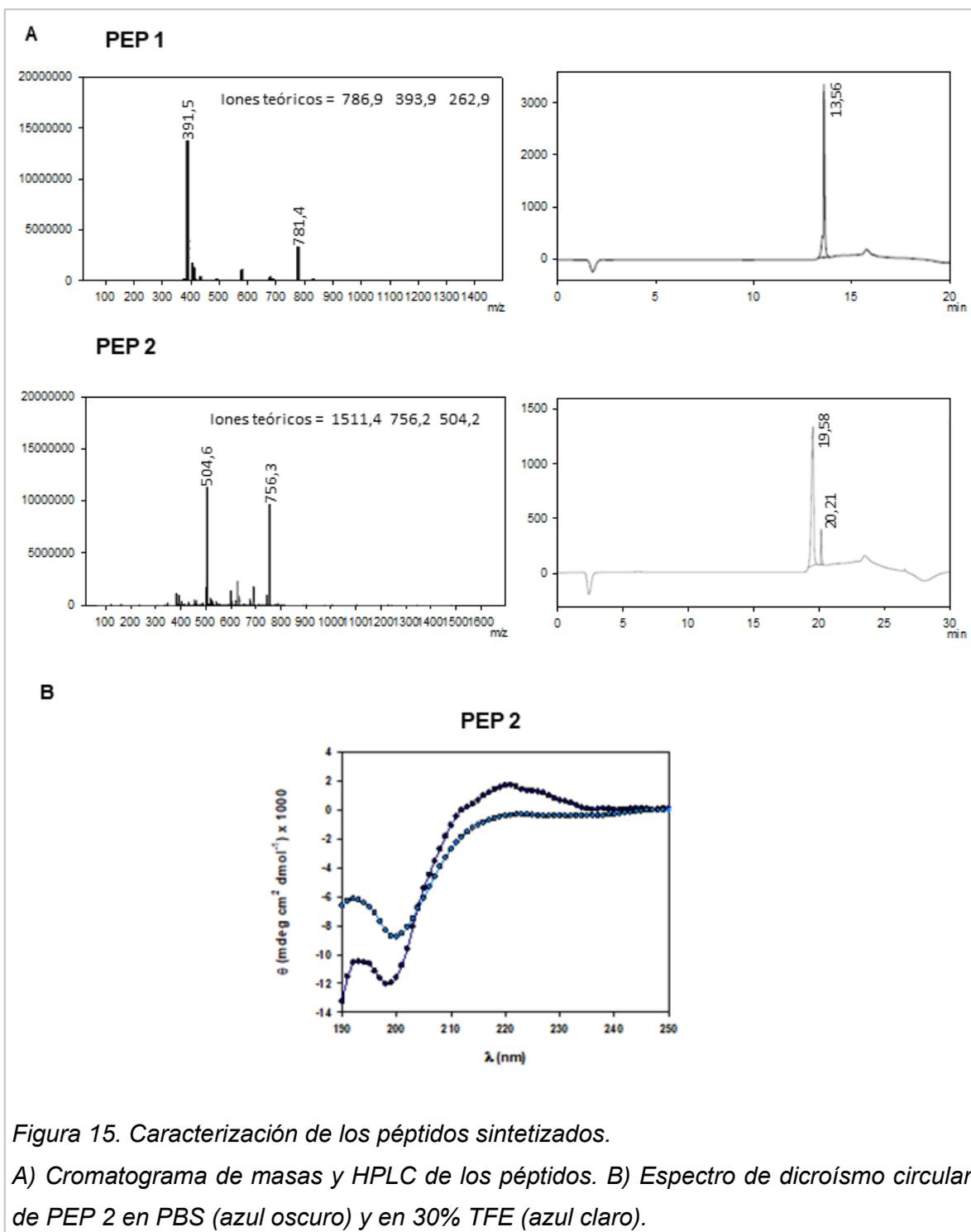
### 4.3.1. Síntesis de péptidos CRAC o CARC derivados de HlyA

Para determinar la secuencia de péptidos CRAC o CARC a sintetizar, para estudiar su interacción con colesterol, se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia de HlyA con otras toxinas representativas de la familia RTX. La Figura 14 A muestra el alineamiento de la secuencia comprendida entre los sitios de acilación de HlyA, en la cual existen 5 sitios CRAC/CARC, de los cuales solo el sitio CRAC 639-644 se encuentra altamente conservado. Por otro lado, en la región de inserción en membrana de HlyA está presente solo un sitio CARC 341-353 también altamente conservado dentro de la familia de toxinas RTX (Figura 14 B). A partir de los resultados del alineamiento se decidió estudiar los siguientes péptidos:

- **PEP 1:** VVYYDK (639-644). Sitio CRAC perteneciente a la región entre los ácidos grasos de HlyA.
- **PEP 2:** RFKKLGYDGDSLL (341-353). Sitio CARC perteneciente al dominio de inserción en membrana de HlyA.

Los péptidos se sintetizaron mediante la técnica de síntesis química Fmoc-SPPS [67], como se describe en la sección de materiales y métodos 4.2.1. La masa molecular de los péptidos resultantes se confirmó por espectrometría de masas, que mostró un producto limpio (Figura 15 A).





La estructura de PEP 2 se analizó por CD en PBS (entorno acuoso) y en TFE al 30% (entorno hidrofóbico). En presencia del buffer PBS, el péptido presentó una estructura de poliprolina II. Esta estructura se caracteriza por ser hélice levógira con tres residuos por vuelta y todos sus enlaces peptídicos en configuración *trans*. La hélice no presenta puentes de hidrógeno, está estabilizada principalmente por interacciones estéricas. Esta estructura se perdió en TFE al 30 % (Figura 15 B). La estructura de PEP 1 no se pudo analizar por esta técnica por ser un péptido de solo 6 aminoácidos.

Luego estudiamos la interacción de PEP 1 y PEP 2 con sistemas modelo de membrana, empleando mezclas lipídicas con distinto contenido de colesterol. Utilizamos distintos sistemas modelos de membrana, ya que nos permiten estudiar interacciones lípido-proteína de una manera simple y en condiciones controladas.

#### **4.3.2. Inserción de los péptidos en monocapas de Langmuir**

Como una primera aproximación al estudio de la interacción de los péptidos con sistemas modelo de membrana, se utilizó la técnica de monocapas de Langmuir. La inserción de los péptidos se estudió en monocapas de POPC y POPC:Cho (2:1) a una presión inicial de 25 mN/m. Esta presión inicial se eligió considerando que representa la presión que corresponde a membranas celulares (Phillips 1972, Marsh 2006).

En la Tabla 4 se muestra el incremento en la presión superficial de las monocapas estudiadas en presencia de ambos péptidos. Se observa que PEP 1 se inserta más en la monocapa de POPC:Cho 2:1 respecto de la de POPC puro, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, la inserción de PEP 2 no presenta diferencias entre las monocapas estudiadas. Estos resultados son alentadores ya que indican que ambos péptidos se insertan en monocapas e interaccionan con los lípidos, por lo que nos permiten continuar estudiando su

interacción con sistemas modelo de membrana, en este caso con bicapas lipídicas.

Tabla 4. Incremento de la presión superficial de monocapas de POPC y POPC:Cho 2:1 en presencia de los péptidos.

	$\Delta P$ 20 min (mN/m) $\pm$ Error Estándar		
	POPC	POPC:Cho (2:1)	$p$
PEP 1	2,59 $\pm$ 0,04	4,67 $\pm$ 0,21	0,01
PEP 2	4,57 $\pm$ 0,84	5,02 $\pm$ 0,65	0,71

#### 4.3.3. Ensayos de SPR entre los péptidos y bicapas lipídicas

Para continuar con el estudio de la interacción de los péptidos con membranas se estudió mediante SPR su interacción con bicapas lipídicas soportadas (SLBs) compuestas por POPC puro o mezclas de POPC:Cho en relaciones molares de 4:1 y 2:1.

En la Figura 16 se muestran los sensogramas de SPR para las bicapas estudiadas, tratadas con diferentes concentraciones de PEP 1 o PEP 2, y las  $K_D$  obtenidas. Además, en la Figura 17 se grafican los valores de  $K_D$  obtenidos para cada péptido con cada una de las distintas mezclas lipídicas. Estos valores indican una mayor interacción de PEP 1 con las membranas que contienen colesterol. Incluso la  $K_D$  de PEP 1 con la membrana de POPC:Cho 2:1 es 3 veces menor que con la membrana de POPC puro. Por otro lado, los resultados indican que las  $K_D$  para PEP 2 con bicapas de POPC puro y POPC:Cho 4:1 son similares, solo para el caso de POPC:Cho 2:1 se observa una interacción levemente mayor.

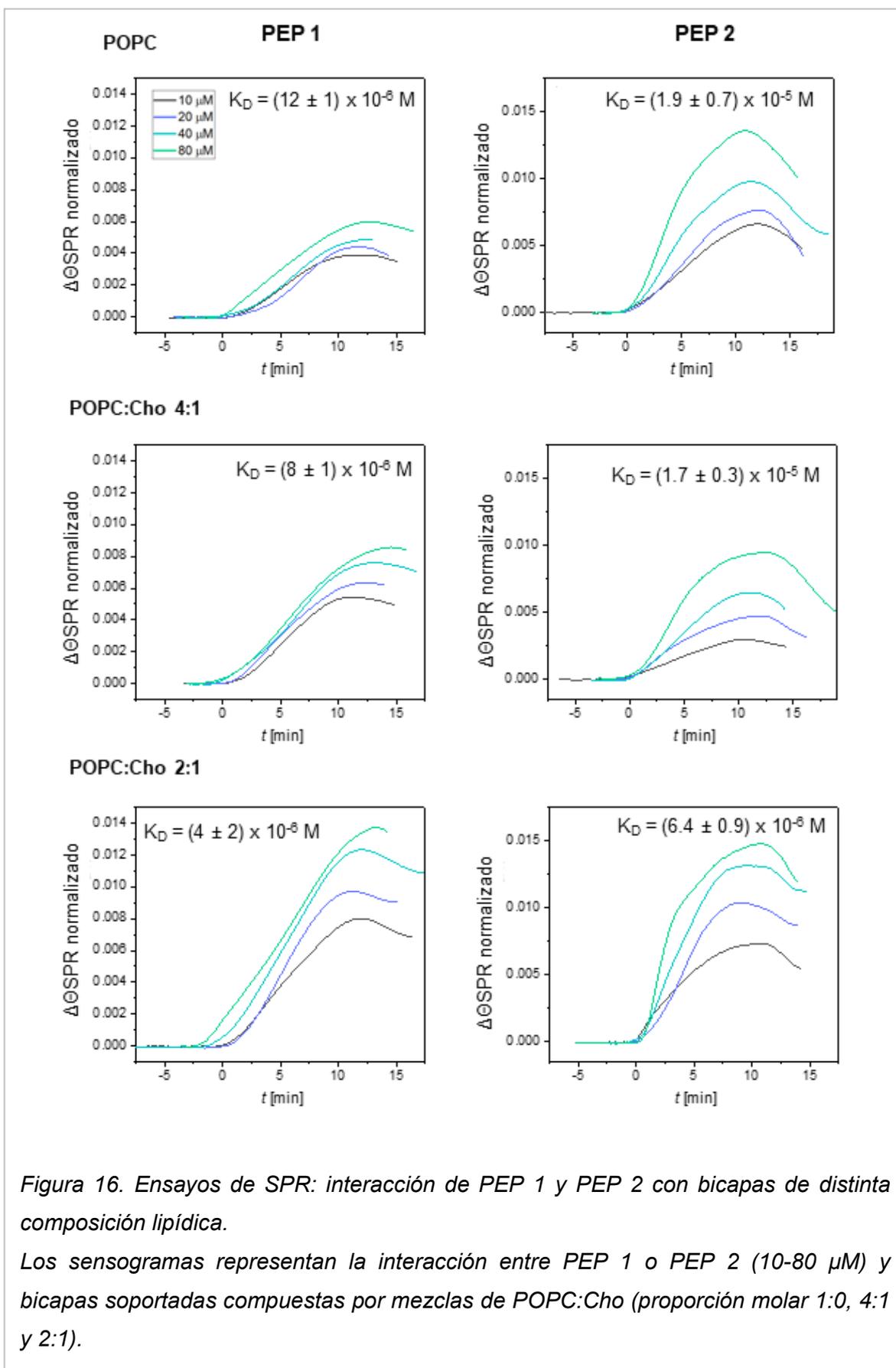
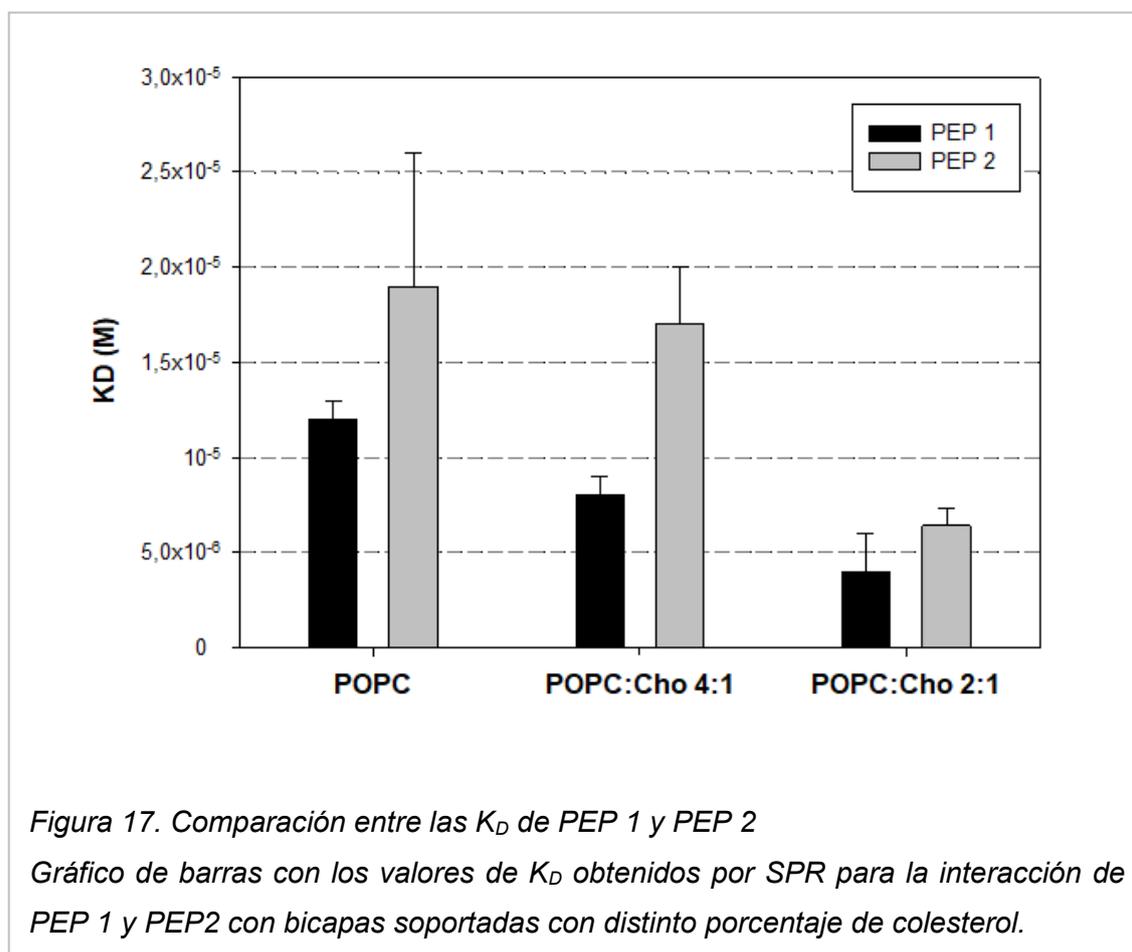


Figura 16. Ensayos de SPR: interacción de PEP 1 y PEP 2 con bicapas de distinta composición lipídica.

Los sensogramas representan la interacción entre PEP 1 o PEP 2 (10-80  $\mu\text{M}$ ) y bicapas soportadas compuestas por mezclas de POPC:Cho (proporción molar 1:0, 4:1 y 2:1).



Los resultados obtenidos mediante SPR concuerdan con los obtenidos mediante la técnica de monocapas de Langmuir (Tabla 4), y nos permiten afirmar que efectivamente PEP 1 interactúa y se inserta más en membranas de POPC:Cho 2:1. Además, se puede observar que PEP 1 interactúa más fuertemente que PEP 2 con todas las bicapas estudiadas (Figura 17).

#### **4.3.4. Simulaciones de Dinámica Molecular de los péptidos con bicapas lipídicas**

Para continuar con el estudio de la interacción de los péptidos con bicapas de POPC:Cho (en relaciones molares 1:0, 4:1 o 2:1), ahora desde un enfoque molecular, se realizaron simulaciones de DM de estas composiciones de membrana en presencia y en ausencia de los péptidos.

Para comparar la tendencia de los péptidos a interactuar o incluso a insertarse en la interfase de la membrana, se calculó el perfil de densidad de masa de los últimos 100 ns a lo largo del eje z de los sistemas simulados (Figura 18).

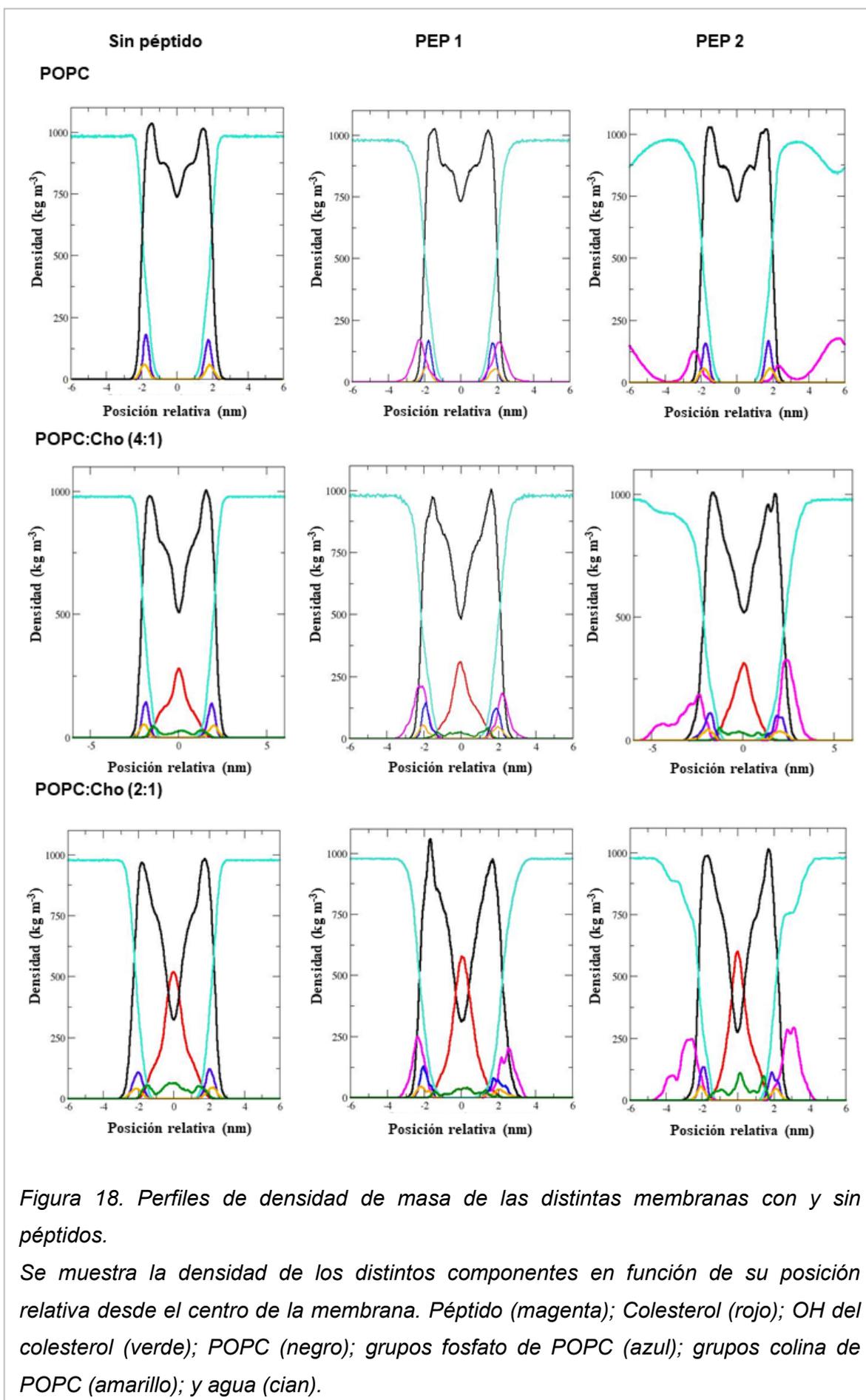
Ambos péptidos mostraron una ligera interacción con la membrana de POPC puro. Aunque se observan diferencias, PEP 1 penetra más en la interfase y PEP 2 presenta una alta localización en la región acuosa. En cambio, en las membranas que contienen colesterol se observa una alta localización de ambos péptidos cerca de la superficie de la bicapa, siendo este efecto más notorio para PEP 1. Es decir que PEP 1 se inserta más en las membranas que contienen colesterol en comparación con PEP 2. Estos resultados coinciden con las  $K_D$  calculadas para ambos péptidos mediante la técnica de SPR (Figura 17).

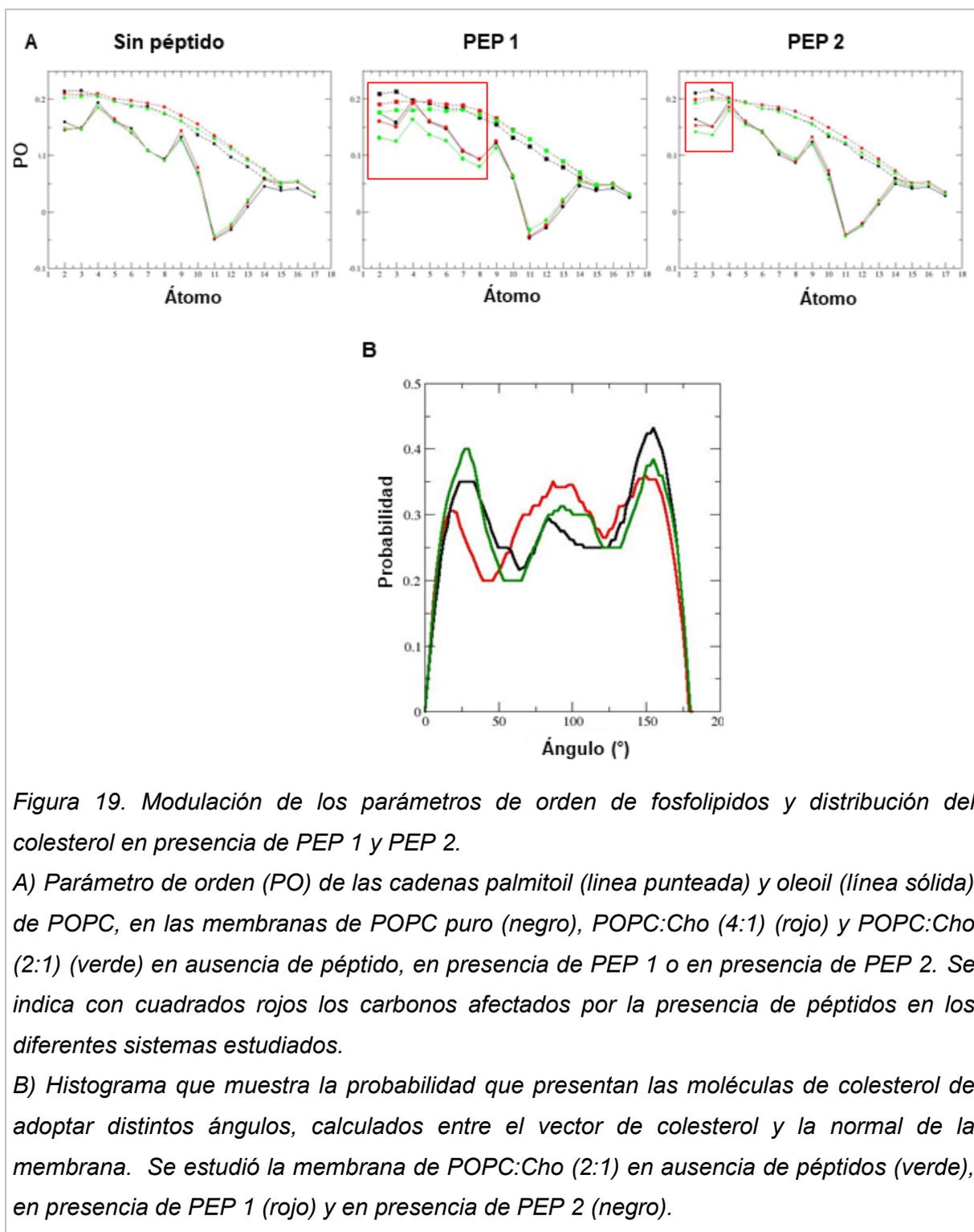
Analizando los péptidos por separado se pueden encontrar diferencias. PEP 2 interacciona más con la membrana de POPC:Cho (4:1), el perfil de densidad del péptido cerca de esta membrana muestra una alta localización del péptido en la región de la interfase con la membrana, lo que genera una internalización de los grupos polares hacia la zona de las colas hidrocarbonadas. También se puede observar una redistribución del colesterol, ya que aumenta su localización en el centro de la membrana, pero su hidroxilo central se encuentra distribuido homogéneamente. Por otro lado, cuando PEP 2 interacciona con la membrana de POPC:Cho (2:1) el péptido se localiza en la región de la interfase,

pero no se observa una redistribución lipídica. Lo cual indica una preferencia de PEP 2 por la membrana de POPC:Cho (4:1).

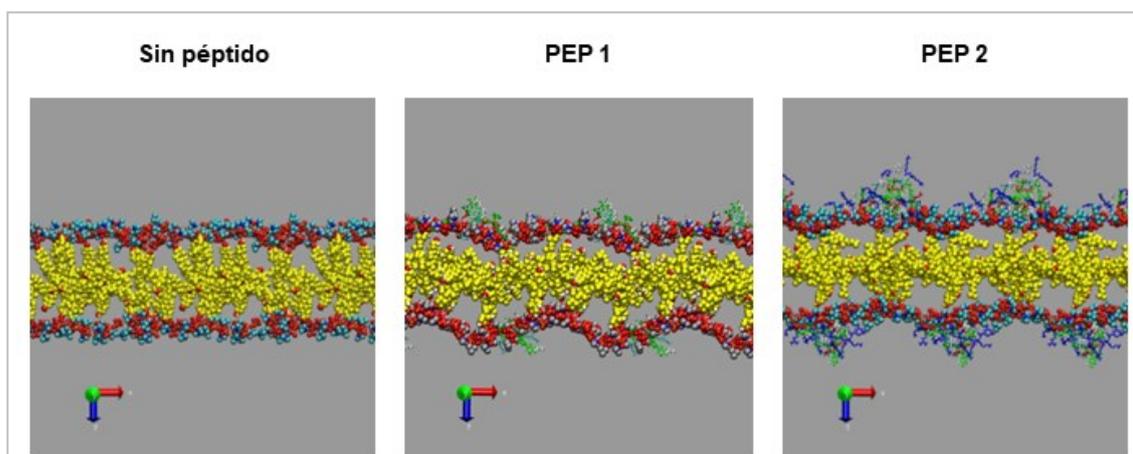
En el caso de PEP 1, se observa una penetración del péptido y una redistribución lipídica en ambas membranas de POPC:Cho (4:1) y (2:1). Además, PEP 1 se localiza más cerca del centro de la membrana que PEP 2. Este efecto se evidencia también por el PO de las colas hidrocarbonadas de POPC, calculado para las diferentes membranas en presencia de ambos péptidos. En la Figura 19 A se puede observar que PEP 1 penetra más profundamente en la membrana, ya que modifica el PO hasta el carbono 6 de la cadena palmitoil y hasta el carbono 9 de la cadena oleoil de las moléculas de POPC. Se observan mayores cambios en el PO en la membrana de POPC:Cho (2:1). En cambio, para el caso de PEP 2, solo se observan cambios en el PO de la cadena palmitoil, hasta el carbono 2.

Luego, teniendo en cuenta la redistribución del colesterol observada previamente en las simulaciones de membranas con los péptidos, se calculó el ángulo formado por el vector del colesterol y la normal de la membrana (eje-z) en la membrana de POPC:Cho (2:1) en presencia y ausencia de los péptidos (Figura 19 B). Los resultados muestran la presencia de tres poblaciones de colesterol, en todos los casos estudiados. En la membrana sin péptidos, el colesterol se observa mayormente en la porción polar de la bicapa, es decir en ángulos cercanos a  $0^\circ$  y a  $180^\circ$ . También se observa una población más pequeña perpendicular al eje-z de la membrana ( $90^\circ$ ). La misma distribución se observa en la membrana en presencia de PEP 2. En cambio, en presencia de PEP 1 se observa un aumento de la población de colesterol perpendicular al eje-z de la membrana ( $90^\circ$ ).





En la Figura 20 se observan imágenes representativas de la interacción de los péptidos con la bicapa de POPC:Cho (2:1), al final de las simulaciones (200 ns). En estas imágenes se puede observar claramente que PEP 1 penetra más en estas membranas que PEP 2 y genera una redistribución del colesterol hacia el centro de la membrana.



*Figura 20. Imágenes de simulaciones de membranas de POPC:Cho (2:1) en presencia y ausencia de los péptidos.*

*Instantáneas representativas del estado final de las simulaciones de membranas de POPC:Cho (2:1) sin péptido, con PEP 1 y con PEP 2 ( $T_f = 200$  ns). Los grupos polares de POPC (grupos fosfato y colina) se representan como bolas VDW; el colesterol se representa también como bolas VDW con sus átomos C en amarillo. El péptido se representa en regaliz, coloreado por la polaridad de sus residuos. El agua y las colas de hidrocarburos no se muestran para mejorar la visualización.*

Teniendo en cuenta la reorganización lipídica, inducida mayormente por PEP 1, es que se estudió una interacción específica entre los péptidos y colesterol en membranas de POPC:Cho (2:1). Se consideraron interacciones significativas cuando las moléculas estaban lo suficientemente cerca ( $< 10\text{\AA}$ ) durante al menos 10 ns. En la Figura 21 A se observa que 5 de las 10 moléculas de PEP 2

estudiadas se encuentran cerca del colesterol. En el caso de PEP 1, 7 de las 10 moléculas estudiadas se encuentran cerca de este esterol. También se puede observar que la interacción entre PEP 1 y colesterol es más estable en el tiempo, ya que la mayoría de estas interacciones duran los 200 ns de la simulación.

Luego, se analizó si existe una interacción específica entre algún aminoácido en particular, con el colesterol. Para esto se calculó la función de distribución radial (Figura 21 B). En el caso de PEP 1, se observa que todos sus aminoácidos se encuentran a una distancia similar al colesterol, por lo tanto, podemos decir que existe una interacción entre PEP 1 y el colesterol. En cambio, para el caso de PEP 2 se observa que solo algunos aminoácidos se encuentran cerca del colesterol, mayormente los aminoácidos de los extremos del péptido.

En resumen, los resultados expuestos hasta el momento indican que PEP 1 presenta más afinidad que PEP 2 por membranas que contienen colesterol. Los resultados de SPR y de simulaciones de DM indican que PEP 1 se inserta más en membranas de POPC:Cho (2:1) e induce una mayor perturbación de los lípidos de la membrana que PEP 2. Además, PEP 1 se localiza cerca del colesterol ( $< 10\text{\AA}$ ) y esta distancia se mantiene estable en el tiempo; lo cual sucede con todos sus aminoácidos por igual.

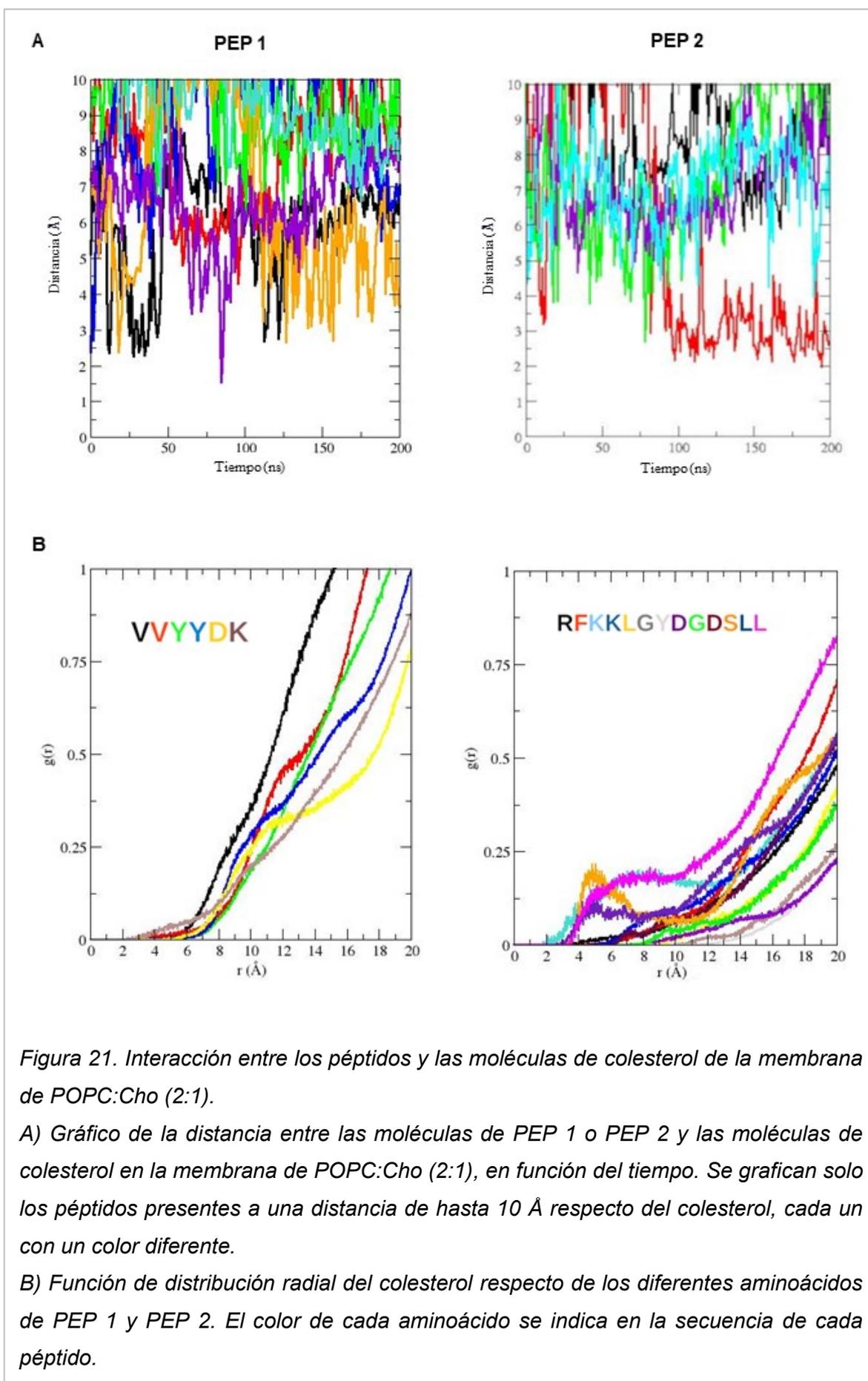


Figura 21. Interacción entre los péptidos y las moléculas de colesterol de la membrana de POPC:Cho (2:1).

A) Gráfico de la distancia entre las moléculas de PEP 1 o PEP 2 y las moléculas de colesterol en la membrana de POPC:Cho (2:1), en función del tiempo. Se grafican solo los péptidos presentes a una distancia de hasta 10 Å respecto del colesterol, cada uno con un color diferente.

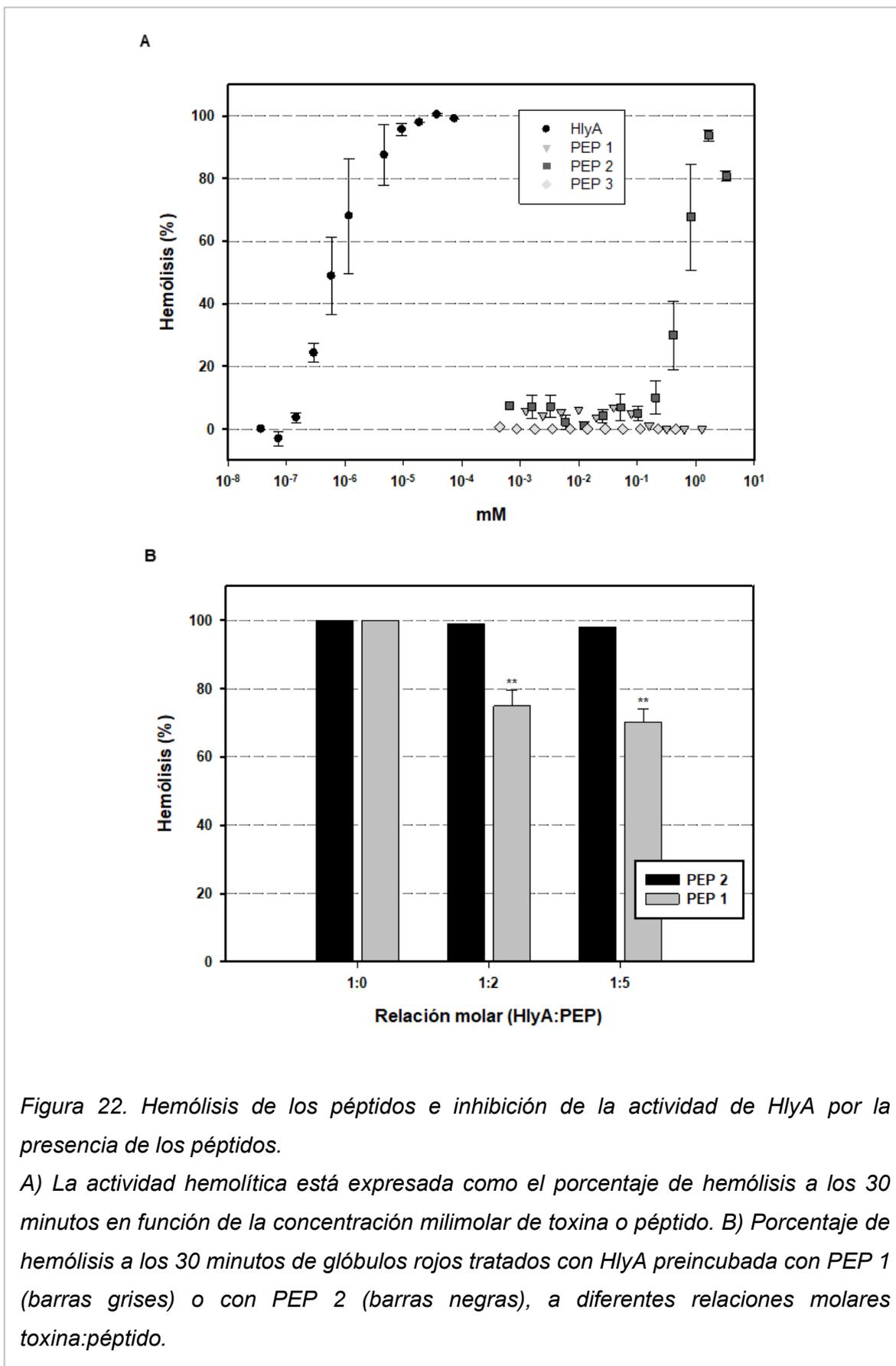
B) Función de distribución radial del colesterol respecto de los diferentes aminoácidos de PEP 1 y PEP 2. El color de cada aminoácido se indica en la secuencia de cada péptido.

#### 4.3.5. Actividad lítica de los péptidos e inhibición de la actividad de HlyA

Teniendo en cuenta que los resultados hasta ahora indican que PEP 1 interacciona preferentemente con membranas con colesterol decidimos estudiar la actividad hemolítica de estos péptidos y su capacidad de inhibir la actividad hemolítica de HlyA.

La Figura 22 A muestra la actividad hemolítica de HlyA y de los péptidos. Los resultados indican que PEP 1 no presenta actividad hemolítica. En cambio, PEP 2 si es hemolítico, aunque la concentración necesaria de péptido para producir un 50% de hemólisis ( $D_{50}$ ) es de 0.5472 mM, siendo varios ordenes de magnitud mayor que el  $D_{50}$  de HlyA ( $3,44 \times 10^{-7}$  mM). Para descartar que la alta concentración de péptido agregada no sea la responsable de la desestabilización de la membrana, también se estudió la actividad de PEP 3, un péptido de igual secuencia que PEP 2 pero con la Y central mutada por A. En el Anexo I se muestran los resultados de HPLC, espectrometría de masas y DC del péptido. Sorprendentemente este péptido no presentó actividad, en las mismas concentraciones que se estudiaron para PEP 2. Esto indica que el efecto lítico de PEP 2 no es inespecífico debido a la alta concentración de péptido utilizada.

Por otro lado, también estudiamos la capacidad de PEP 1 y PEP 2 de inhibir la actividad hemolítica de HlyA. En la Figura 22 B se observa el porcentaje de hemólisis para GR preincubada con PEP 1 o PEP 2 y luego tratados con HlyA en diferentes relaciones molares toxina:péptido. Se puede observar que PEP 2 no inhibe la actividad de HlyA, pero PEP 1 sí. Esta inhibición es dependiente de la concentración de péptido, y llega hasta un 30% en la relación molar toxina:péptido 1:10.



#### 4.3.6. Medidas de $\text{Ca}^{+2}$ intracelular en glóbulos rojos tratados con los péptidos

En los últimos años, en nuestro grupo de trabajo, se demostró que a concentraciones sublépticas, HlyA induce un incremento de calcio intracelular que activa distintas vías de transducción de señales en GR, que conducen a la eriptosis (Velasquez *et al.* 2015, Strack *et al.* 2019). Teniendo esto en cuenta, el incremento de la concentración de calcio intracelular de GR tratados con HlyA y con los péptidos se estudió mediante citometría de flujo, utilizando la sonda sensible a  $\text{Ca}^{+2}$  Fluo-4 AM.

La Figura 23 A muestra los histogramas de fluorescencia obtenidos para los GR tratados con HlyA a concentraciones sublépticas (5 nM) durante 1, 5, 15 y 30 minutos. Como hemos demostrado anteriormente (Strack *et al.* 2019), HlyA induce un aumento de la concentración de calcio intracelular en los primeros 5 minutos, y luego se observa una disminución de la concentración de calcio debido a la permeabilización de la membrana. Por otro lado, se estudió también la actividad de PEP 1, como este no induce hemólisis se estudiaron concentraciones 5 y 10 veces mayores que las de HlyA. La Figura 23 B resume el porcentaje de células con un incremento en la concentración de calcio intracelular para los GR tratados con HlyA (5 nM) y PEP 1 (25 y 50 nM) a diferentes tiempos. Se puede observar que el péptido induce un incremento de la concentración de calcio sólo en algunas células. Este resultado nos sorprendió ya que habíamos visto que PEP 1 no era lítico *per se*, considerando que el aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  es un proceso préltico. Por lo tanto, decidimos medir el incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  de ProHlyA, la toxina no acilada, que es hemolíticamente inactiva. La Figura 23 B muestra que ProHlyA no induce un aumento de calcio intracelular. Resumiendo, este resultado confirma la interacción de PEP 1 con las membranas de los GR, ya que induce un aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular en aproximadamente el 30% de las células tratadas, aunque indudablemente esta interacción no es suficiente para producir la lisis celular.

Se estudiaron también los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular en GR tratados con concentraciones sublétricas de PEP 2. Se utilizó la concentración que producía un 15 % de hemólisis de acuerdo con los resultados de la Figura 22 (0,3 mM), así como también una concentración 5 veces mayor a la que se utilizó para HlyA (25 nM). Los resultados muestran que PEP 2 produce un ligero aumento en la concentración intracelular de calcio de los GR (Figura 23). Aun así, HlyA produce un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  15 veces mayor que el péptido. Por lo tanto, aunque HlyA y PEP 2 son hemolíticos, podemos inferir que el mecanismo por el que PEP 2 causa hemólisis es distinto al de la toxina.

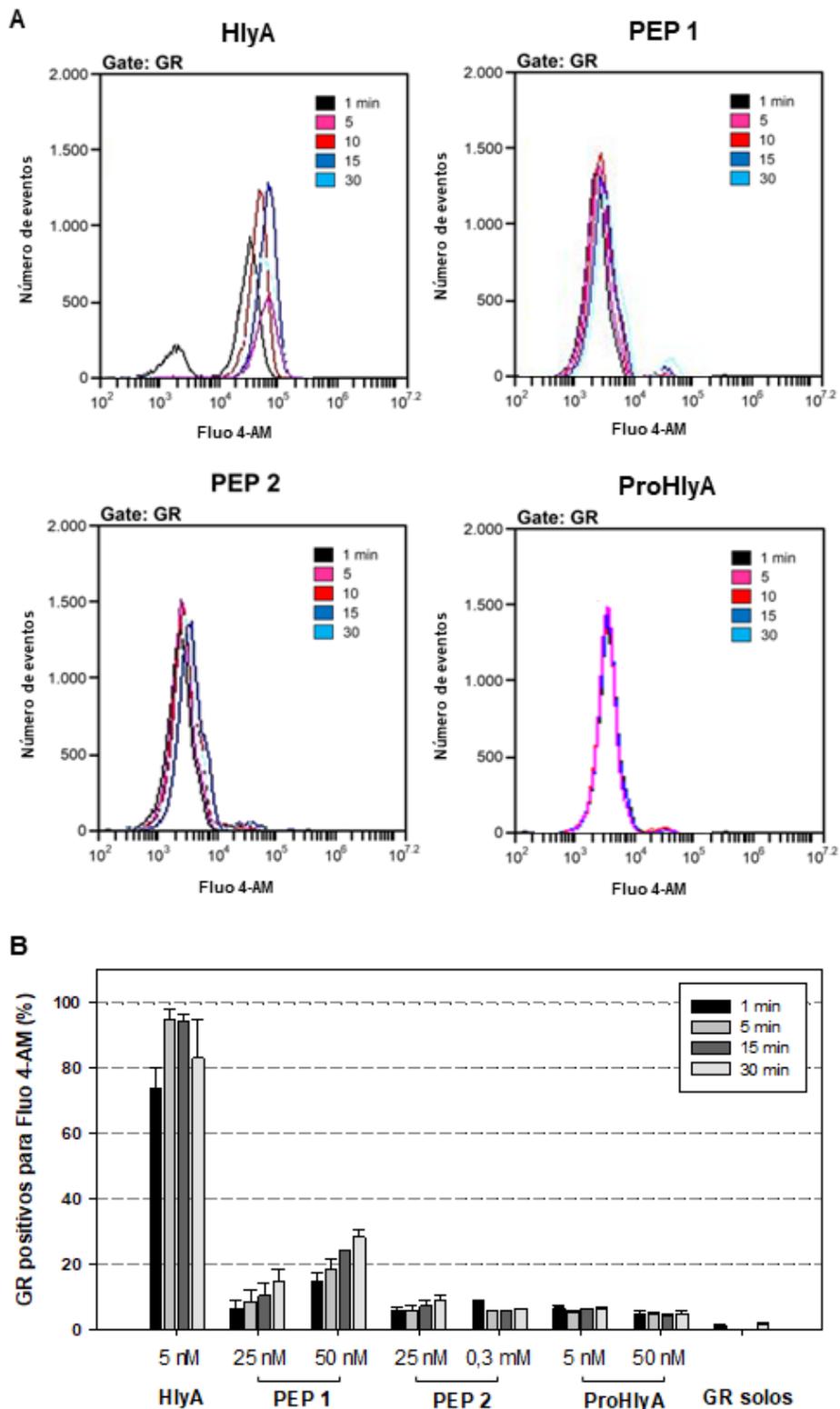


Figura 23. Medidas de  $Ca^{+2}$  intracelular en glóbulos rojos humanos.

A) Número de eventos en función de la intensidad de fluorescencia en escala exponencial para GR tratados con HlyA (5 nM), PEP 1 (25 nM), PEP 2 (25 nM) o ProHlyA (5 nM). B) Porcentaje de GR positivos para Fluo 4-AM, para los distintos tratamientos. Se tomó como positivos a todos los eventos con mayor fluorescencia que los GR marcados sin tratar.

## 4.4 Discusión

---

Teniendo en cuenta los resultados ya descritos respecto del rol del colesterol en el mecanismo de acción de HlyA (Herlax *et al.* 2009, Vazquez *et al.* 2014) es que nos propusimos estudiar la interacción de membranas de distinto porcentaje de colesterol con péptidos CRAC o CARC derivados del dominio de inserción y de la región entre los ácidos grasos de HlyA. Considerando que otras toxinas RTX, también tienen regiones CRAC y CARC en sus dominios de inserción en membrana y entre los sitios acilados, es que se realizó un alineamiento de las regiones mencionadas de HlyA con otras toxinas representativas de la familia RTX.

Teniendo en cuenta el grado de conservación de los sitios CRAC y CARC mencionados entre las distintas toxinas es que se decidió sintetizar dos péptidos, mediante la técnica de SPPS. PEP 1, un sitio CRAC perteneciente a la región entre los ácidos grasos de HlyA, y PEP 2 un sitio CARC perteneciente al dominio de inserción en membrana de HlyA.

Cabe mencionar que el mismo sitio CRAC correspondiente a PEP 1 está presente en CyaA de *Bordetella Pertussi*, (Masin *et al.* 2017). Además, el sitio CARC correspondiente a PEP 2 está presente en LtxA de *A. actynomicetemcomitans* y en RtxA de *Kingella kingae*, incluso se encontró que el residuo central Y de este dominio CARC en RtxA es crucial para la actividad de la toxina (Brown *et al.* 2013, Osickova *et al.* 2018).

### 4.4.1. Interacción de PEP 1 con membranas - rol del colesterol

Los resultados encontrados por las técnicas de monocapas, SPR y simulaciones de DM indican que PEP 1 se inserta e interacciona más con membranas que contienen colesterol, especialmente en las de POPC:Cho 2:1. Además, las simulaciones indican que todos los aminoácidos de PEP 1 se

encuentran a igual distancia del colesterol, y esta distancia se mantiene estable en el tiempo.

Hace algún tiempo, demostramos que HlyA presenta una conformación de glóbulo fundido en solución y que su contraparte inactiva, ProHlyA, presenta una estructura más compacta. La presencia de los ácidos grasos unidos covalentemente a la toxina podría favorecer esta conformación de glóbulo fundido, exponiendo regiones intrínsecamente desordenadas importantes en el mecanismo de acción de la toxina (Herlax *et al.* 2007). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Ludwig *et al.* (Ludwig *et al.* 1996) y Pellet *et al.* (Pellet *et al.* 1996) comentados anteriormente, y los resultados obtenidos en este capítulo, podríamos proponer que este sitio CRAC situado estratégicamente es expuesto en presencia de los ácidos grasos unidos covalentemente a la toxina. La unión a colesterol a través de este sitio podría inducir la inserción de la toxina en la membrana en una conformación adecuada que promueva la oligomerización de la toxina, y posterior lisis. Además, los resultados indican que PEP 1 produce un ligero aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, lo cual confirma su interacción directa con la membrana y podría indicar la activación de una vía de señalización intracelular. ProHlyA, que podría tener esta región en el interior de su estructura compacta, no induce un aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, aunque si interacciona con membranas (Pellet *et al.* 1996). Además, el porcentaje de células con un incremento en la concentración de calcio aumenta incluso a los 30 minutos de exposición al péptido, lo que indica que no hay permeabilización de la membrana; esto coincide con los resultados que indican que PEP 1 no presenta actividad hemolítica *per se*.

Por otro lado, se encontró que PEP 1 inhibe la actividad de HlyA, podemos suponer que PEP 1 compite con HlyA por la interacción con el colesterol y por lo tanto disminuye su actividad. Estos resultados son muy alentadores y nos llevan a estudiar este péptido en el Capítulo 5, con el objetivo de eventualmente poder utilizarlo como terapia alternativa para disminuir la actividad de la toxina.

#### 4.4.2. Interacción de PEP 2 con membranas - rol del colesterol

Los resultados de los ensayos de monocapas de Langmuir indican que el grado de inserción e interacción de PEP 2 no estaría favorecido por la presencia de colesterol. Respecto de los resultados de SPR, aunque se observa una disminución en el valor de las  $K_D$  en membranas que contienen colesterol, el hecho de que este péptido no inhiba la actividad hemolítica de la toxina nos indicaría que este sitio CRAC no está interaccionando con el colesterol. Además, los resultados obtenidos por simulaciones de DM indican que PEP 2 no interacciona directamente con colesterol. Cabe resaltar que la existencia de una secuencia CRAC o CARC en una proteína o péptido no indica necesariamente una interacción específica con colesterol (Palmer 2004, Volynsky *et al.* 2021).

Por otro lado, se encontró que PEP 2 presenta actividad hemolítica. La permeabilidad causada por el péptido en GR podría deberse a un mecanismo de acción de tipo "alfombra" (Shai *et al.* 2001). Según este modelo, los péptidos permeabilizan la membrana de forma similar a los detergentes, se unen a la superficie hasta que se alcanza una concentración umbral y se forman agujeros transitorios en la membrana. No se requieren estructuras peptídicas específicas ni la formación de canales estructurados para permeabilizar la membrana mediante este mecanismo. Si se requiere la presencia de aminoácidos cargados positivamente repartidos a lo largo de la cadena peptídica, para permitir la interacción con la cabeza polar de los lípidos, durante el proceso de permeabilización de la membrana (Shai *et al.* 2001), (Bechinger *et al.* 2006). PEP 2 cumple con estos requisitos estructurales ya que es un péptido no estructurado, y posee tres aminoácidos cargados positivamente que podrían facilitar su interacción con la membrana cargada negativamente del GR.

El hecho de que el péptido permeabilice la membrana a través del mecanismo de la “alfombra” no implica que toda la toxina lo haga también de esta manera. Es importante destacar que otros dominios de la toxina ayudan en el proceso hemolítico; por lo que sólo son necesarias concentraciones de toxina de nM o incluso de pM para lisar GR. Además, los experimentos de citometría de flujo demuestran que el péptido no induce un aumento de los niveles intracelulares de calcio a concentraciones sublépticas, como lo hace la toxina. Esto indica que el mecanismo de transducción desencadenado por el aumento de la concentración de calcio intracelular no es la forma en que el péptido lisa los GR, como se demostró para HlyA (Velasquez *et al.* 2015, Denis *et al.* 2019, Strack *et al.* 2019).

Además, se estudió el rol de la Y central del sitio CARC, y se observó que cuando se sustituye por una A el péptido pierde su actividad hemolítica. Por lo tanto, podemos concluir que la presencia de la Y<sup>347</sup> central es indispensable para la actividad hemolítica de PEP 2.

Los resultados de actividad encontrados para PEP 2 nos incitaron a estudiar en el Capítulo 6 su posible uso como tratamiento antitumoral, mediante la construcción de una inmunotoxina.

---

**PARTE 2: Aplicaciones terapéuticas  
de péptidos derivados de HlyA**

---

## **Capítulo 5. Estudio del efecto inhibitorio de un péptido CRAC sobre la actividad hemolítica de HlyA**

---

## 5.1 Introducción

---

Las UPEC son el principal agente etiológico causante de ITU. Estas bacterias expresan una amplia gama de factores de virulencia y genes que pueden aumentar su patogenicidad y resistencia a los antimicrobianos (Bunduki *et al.* 2021), como se mencionó en el Capítulo 1.

Por lo general las ITU responden al tratamiento con antibióticos, pero la prescripción de antibióticos sin una identificación bacteriana previa generó un aumento en la resistencia de las UPEC (Terlizzi *et al.* 2017, Timothy 2017). Los antibióticos son indispensables para el tratamiento de las ITU, sin embargo, la disminución de su efectividad en casos de patógenos resistentes y su interferencia con la microbiota intestinal impulsaron la búsqueda de tratamientos complementarios. Una alternativa puede ser la de interferir con la capacidad de las UPEC de adherirse e invadir el tejido epitelial del tracto urinario, utilizando moléculas específicas para inhibir sus factores de virulencia (Terlizzi *et al.* 2017, Krueger *et al.* 2019). Un beneficio secundario de este enfoque es que mantiene las bacterias de la microbiota del paciente intactas, disminuyendo los efectos secundarios de los antibióticos (Krueger *et al.* 2019). Al inhibir los factores de virulencia también se disminuye la presión de selección sobre las UPEC.

Dentro de los estudios recientes para inactivar los factores de virulencia bacterianos se encuentra el de la inhibición de toxinas (Krueger *et al.* 2019), mediante la interrupción de la interacción de las mismas con la membrana de la célula blanco. Particularmente se puede inhibir su oligomerización, bloquear el canal formado en la membrana blanco, desestabilizar la estructura de la toxina, o inhibir la unión entre la toxina y su receptor (Krueger *et al.* 2019). Además, se pueden administrar liposomas o polímeros que absorban la toxina en solución (Hu *et al.* 2013, Chen *et al.* 2018). Como ejemplo se puede citar que mediante el uso de bibliotecas peptídicas se encontró un péptido de 6 aminoácidos que bloquea el ensamblaje de la toxina ántrax de *Bacillus anthracis* e inhibe su acción (Gujraty *et*

*al.* 2005). Utilizando la misma tecnología se encontraron péptidos que se unen a los sitios activos de las toxinas TcdA y TcdB de *Clostridium Difficile* y al sitio de unión al receptor de la toxina Shiga (Stx) de *E. coli* enterohemorrágica inhibiendo su actividad (Nishikawa *et al.* 2006, Abdeen *et al.* 2010, Watanabe-Takahashi *et al.* 2021). Además, se descubrieron péptidos intrínsecos de TcdB de *Clostridium Difficile* que desestabilizan su estructura e interrumpen su unión a la membrana de células CHO-K1 (Larabee *et al.* 2017), y péptidos correspondientes al sitio de unión a LFA-1 de Leucotoxina A (LtxA) de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que bloquean su unión al receptor (Krueger *et al.* 2019). También para el caso de LtxA, se encontró que un péptido correspondiente a un sitio CRAC de la toxina que bloquea su unión al colesterol de la membrana e inhibe efectivamente su actividad lítica (Brown *et al.* 2013, Brown *et al.* 2016, Koufos *et al.* 2016).

Recalcando que HlyA es uno de los principales factores de virulencia de las UPEC, y que su expresión se vio aumentada en cepas aisladas de pacientes con pielonefritis, indicando una asociación entre el nivel de producción de HlyA y la capacidad invasiva de estas cepas (Timothy 2017), consideramos que terapias específicas que actúen sobre HlyA ayudarían a inhibir la capacidad invasiva de las cepas UPEC.

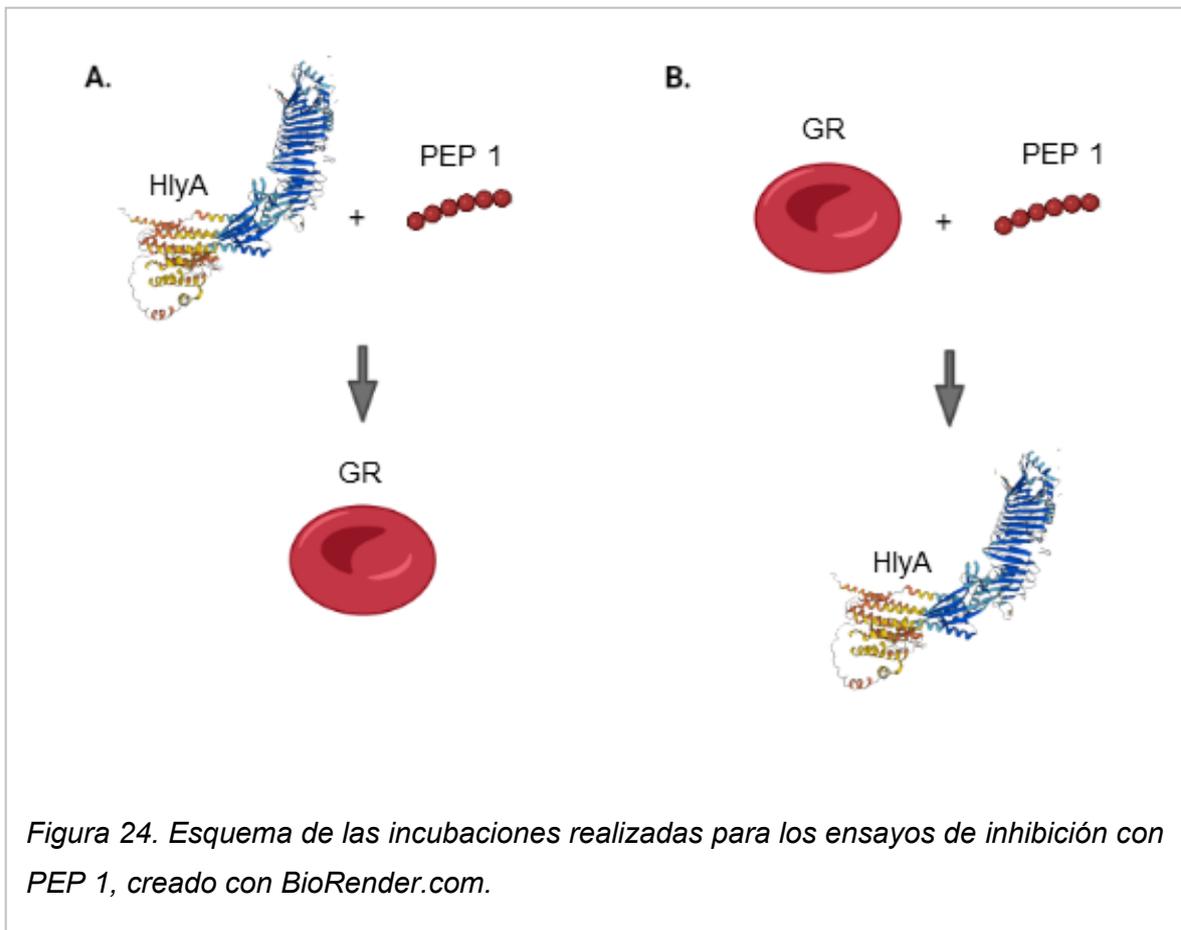
Los resultados obtenidos en el Capítulo 4 indican que un péptido CRAC correspondiente a los residuos 639-644 de HlyA interacciona preferencialmente con membranas con colesterol e inhibe la actividad hemolítica de la toxina. Teniendo en cuenta estos resultados y los antecedentes descritos es que nos propusimos estudiar el mecanismo de inhibición de la actividad hemolítica de HlyA por un péptido CRAC intrínseco. En particular estudiamos la cinética de inhibición de la actividad hemolítica de HlyA causada por el péptido, así como también los efectos inhibitorios del péptido en los distintos pasos del proceso hemolítico de la toxina como: la unión a membrana y la oligomerización de HlyA en GR humanos.

## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1. Cinética de inhibición de hemólisis

Con el objetivo de estudiar la inhibición de la actividad hemolítica de HlyA causada por PEP 1, se estudió la cinética de este proceso.

Los ensayos de inhibición de la actividad hemolítica se realizaron de manera similar a los ensayos de actividad hemolítica, pero con dos tipos de incubaciones previas (Figura 24): A- Se preincubó HlyA con diferentes concentraciones de PEP 1 durante 30 minutos a 37°C, a continuación se añadió la solución de GR; B- Los GR humanos se preincubaron con PEP 1 a diferentes concentraciones, durante 30 minutos a 37°C y luego se añadió HlyA.



Para ambos tipos de ensayos de inhibición, se utilizó la concentración de toxina que produjo un 100% de hemólisis (0,1  $\mu\text{M}$ ) y se mantuvieron las relaciones molares HlyA:Péptido en 1:0, 1:2 1:5 y 1:10. El hematocrito final utilizado fue del 2% v/v, y las medidas de DO a 595 nm se realizaron durante 30 minutos, cada 1 minuto.

### **5.2.2. Ensayos de unión a membranas de glóbulos rojos**

Para estudiar la inhibición de la unión de HlyA a membranas de GR causada por PEP 1 se realizó el siguiente ensayo utilizando la técnica de *Western Blot*. Las membranas de GR humanos se obtuvieron como se describió en la sección de materiales y métodos generales (sección 2.4), luego se incubaron 180 pmol de HlyA con 75  $\mu\text{l}$  de membranas durante 1 hora a 37°C. La inhibición de la unión se estudió siguiendo los dos tipos de preincubación con PEP 1 esquematizados en la Figura 24. La relación molar HlyA:PEP 1 estudiada fue de 1:5. Posteriormente, las membranas se precipitaron por centrifugación a 10.000g durante 10 min. El pellet se resuspendió en buffer muestra con un 5% de SDS y se realizó una electroforesis en un gel SDS-PAGE al 10%. Se realizó un *Western Blot* como se detalla en la sección de Materiales y métodos generales (sección 2.8). Se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti-HlyA (1:500) y un anticuerpo monoclonal de ratón anti  $\beta$ -actina (1:10.000) (A5316, Sigma); posteriormente se utilizaron los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa.

### **5.2.3. Ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)**

Esta técnica nos permite estudiar la cercanía entre moléculas, cuantificando la transferencia de energía entre un fluoróforo donador (D) y uno aceptor (A) cuando se excita al D. Esta transferencia ocurre cuando ambos fluoróforos están a distancias menores a 10 nm y en la orientación adecuada. La

eficiencia de esta transferencia de energía (Eficiencia de FRET, (E)) es directamente proporcional a la distancia entre D y A, y se puede detectar a partir de: i- el aumento de la intensidad de fluorescencia de A, ii- el descenso de la intensidad de fluorescencia de D o iii- el descenso de la vida media de la fluorescencia de D. Para que la transferencia de energía ocurra el espectro de excitación de A debe superponerse con el espectro de emisión de D.

Teniendo en cuenta que el proceso de oligomerización de HlyA se estudió previamente, midiendo la eficiencia de FRET entre dos poblaciones de toxina marcadas con un fluoróforo donador y uno aceptor (Herlax *et al.* 2009); en el presente capítulo se repitieron estos ensayos en presencia de PEP 1. Se utilizaron las sondas fluorescentes Alexa-488 (D), y Alexa-546 (A), ambas conjugadas a maleimida. La maleimida reacciona con grupos tioles; particularmente en proteínas, con residuos de cisteína. Considerando que HlyA es una proteína desprovista de cisteínas, se utilizó un mutante puntual de C para estos experimentos (HlyA K344C). Por lo tanto, el experimento se realizó en cuatro pasos: 1- purificación HlyA K344C; 2- marcado de HlyA K344C con las sondas fluorescentes (D y A); 3- interacción de las proteínas marcadas con membranas de GR, en presencia de PEP 1; 4- medición de la eficiencia de FRET.

**Purificación de HlyA K344C.** La proteína mutante HlyA K344C se purificó a partir de la cepa de *E. coli* WAM 2205 (Pellet *et al.* 1996); proporcionada amablemente por el Dr. R. A. Welch, de la Universidad de Wisconsin, Madison. La proteína mutante se purificó de la misma manera que HlyA, como se describió en la sección de Materiales y métodos generales 2.2.

**Marcado de HlyA K344C con sondas fluorescentes.** Se incubó HlyA K344C en una relación molar final 30:1 y 5:1 de sonda a proteína, con Alexa-488 (D) y Alexa-546 (A), respectivamente, en buffer TC desgasificado con 6 M de GnHCl y 10 mM de dTT, pH 7,4 durante la noche a 4°C. Para el marcado con alexa-546 se añadió 0,1% de colato de sodio. Se utilizaron columnas PD-10 (GE

Healthcare) para separar las proteínas marcadas de la sonda no unida. La eficiencia de marcado se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Concentración proteína (M)} = \frac{[A_{280} - (A_{sonda} \times CF_{280})]}{\epsilon_{HlyA}}$$

$$\text{Eficiencia de marcado} = \frac{A_{sonda}}{\epsilon_{sonda} \times \text{concentración proteína (M)}}$$

Se utilizaron los coeficientes de extinción molar:  $\epsilon_{492} = 67.100 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ,  $\epsilon_{554} = 90.300 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  y  $\epsilon_{280} = 73.960 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  para Alexa-488, Alexa-546 y HlyA respectivamente. La DO de la sonda ( $A_{sonda}$ ) se midió a 490 y 560 nm, para Alexa-488 y Alexa-546, respectivamente.  $CF_{280}$  es un factor de corrección para la contribución del fluoróforo a la DO a 280 nm, y equivale a 0,11 y 0,12 para Alexa-488 y Alexa-546, respectivamente. La actividad hemolítica de la proteína marcada no disminuyó significativamente en comparación con la no marcada.

***Interacción de HlyA K344C marcada con membranas de glóbulos rojos, en presencia de PEP1.*** Para cada experimento, se midieron tres tipos de muestras que combinaban HlyA K344C marcada y no marcada: (A) D/ proteína mutante sin marcar, (B) D/A, y (C) proteína mutante sin marcar/A, en relación molar 1:1. Se incubaron 120  $\mu\text{g}$  de proteína (muestras A, B o C) con 75  $\mu\text{l}$  de membranas, preparadas como se describió en la sección 2.3, a 37 °C durante 60 min en buffer TC con 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ . El volumen final de reacción fue de 1 ml. Luego, las membranas se precipitaron por centrifugación (10 min, 14.500 g), y se lavaron con TC para separar las proteínas no unidas. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  del mismo buffer.

Para el experimento en presencia del péptido se estudiaron los mismos dos tipos de preincubación que para los ensayos de hemólisis (Figura 24): 1- los 120  $\mu\text{g}$  de proteínas (A, B y C) se preincubaron con PEP 1 durante 30 min a 37°C, y luego se añadieron 75  $\mu\text{l}$  de membranas; 2- PEP 1 se preincubó con 75  $\mu\text{l}$  de

membranas durante 30 min a 37°C, y luego se añadieron los 120 µg de proteínas (muestras A, B o C). Luego el protocolo fue el mismo que para la toxina sola. La relación molar proteína:péptido estudiada fue de 1:5 y 1:10.

**Mediciones de FRET.** Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron a temperatura ambiente en un espectrofluorómetro Fluorolog-3 (Horiba-Jobin Yvon). Alexa-488 se excitó a 480 nm, y la emisión se registró entre 500 y 650 nm. La excitación directa de Alexa-546 se realizó a 530 nm, y la emisión se registró entre 540 y 650 nm.

La eficiencia de la transferencia de energía (E) se calculó como el aumento de la emisión de fluorescencia del aceptor, tal y como describen Gohlke *et al.* (Gohlke *et al.* 1994). Este método ajusta el espectro de emisión de fluorescencia de la muestra 2 excitada a 480 nm ( $F_{480}^{D/A}$ ) a la suma ponderada de dos espectros de emisión: espectro de muestra 1 excitada a 480 nm ( $F_{480}^D$ ) y espectro de muestra 2 excitada a 530 nm ( $F_{530}^{D/A}$ ) como se muestra en la siguiente ecuación:

$$F_{480}^{D/A} = a \cdot F_{480}^D + b \cdot F_{530}^{D/A}$$

Los coeficientes a y b son las contribuciones fraccionales ajustadas de los dos componentes espectrales; b es la señal de fluorescencia del aceptor debida al FRET del donador, normalizada por  $F_{530}^{D/A}$ . El ajuste de los espectros se realizó con Sigmaplot 12.0 (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Finalmente, E se obtuvo utilizando el valor b como se muestra en la siguiente ecuación:

$$b = E \cdot \frac{\varepsilon^D(480)}{\varepsilon^A(530)} + \frac{\varepsilon^A(480)}{\varepsilon^A(530)}$$

$\varepsilon^D$  y  $\varepsilon^A$  son los coeficientes de absorción molar de D y A en las longitudes de onda dadas. En todas las muestras se restó el espectro de emisión de las membranas.

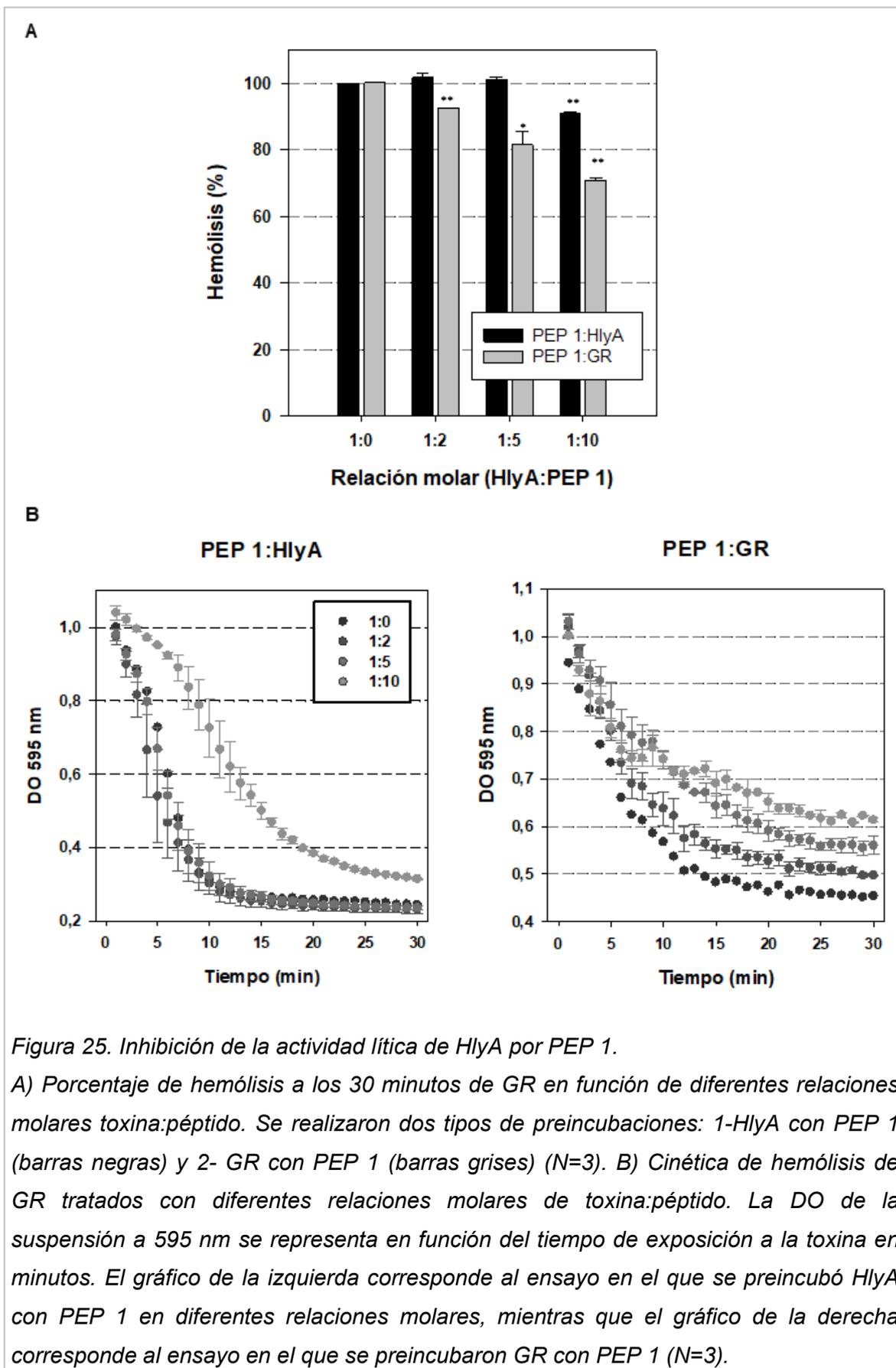
## 5.3 Resultados

---

### 5.3.1. Inhibición de la actividad hemolítica de HlyA por PEP 1

Teniendo en cuenta que los resultados del capítulo 4 muestran que PEP 1 inhibe la actividad de HlyA en un 30%, cuando se preincuba con GR, se decidió continuar con la caracterización del mecanismo de inhibición de PEP 1. En primer lugar, se estudió la inhibición de la actividad hemolítica de HlyA, siguiendo una segunda estrategia experimental, en el cual se preincubó primero HlyA con diferentes concentraciones de PEP 1 y luego se añadieron los GR. La Figura 25 A muestra el porcentaje de hemólisis a los 30 minutos para cada una de las estrategias de preincubación estudiadas, indicando que cuando se preincuba HlyA con PEP 1 en una relación molar de 1:10, el porcentaje de hemólisis a los 30 minutos disminuye sólo un 10%. Por el contrario, cuando los GR se preincuban con PEP 1, el porcentaje de hemólisis después de 30 minutos presenta una reducción estadísticamente significativa en todas las concentraciones de péptidos probadas, disminuyendo casi un 30% en la relación molar 1:10 de toxina:péptido.

Para profundizar en el proceso de inhibición por el péptido, se estudió la cinética de hemólisis de HlyA en presencia del péptido, para los dos tipos de preincubaciones (Figura 25 B). Cuando la toxina se preincubo con PEP 1 la curva de DO en función del tiempo presento la típica forma sigmoidea que presenta la toxina sola en solución , con un período de retardo (fase *lag*) muy corto (Figura 25 B, gráfico de la izquierda). Al agregar concentraciones crecientes del péptido, solo para la relación toxina:péptido 1:10, se observó una extensión de este periodo, y una inhibición del porcentaje de hemólisis a los 30 minutos, como se describió anteriormente.



Por otro lado, cuando los GR se preincubaron con PEP 1, la fase *lag* disminuyó (Figura 25 B, gráfico derecho) al aumentar la concentración de péptido. A los 30 min se observa una inhibición constante de la hemólisis a medida que aumenta la cantidad de péptido.

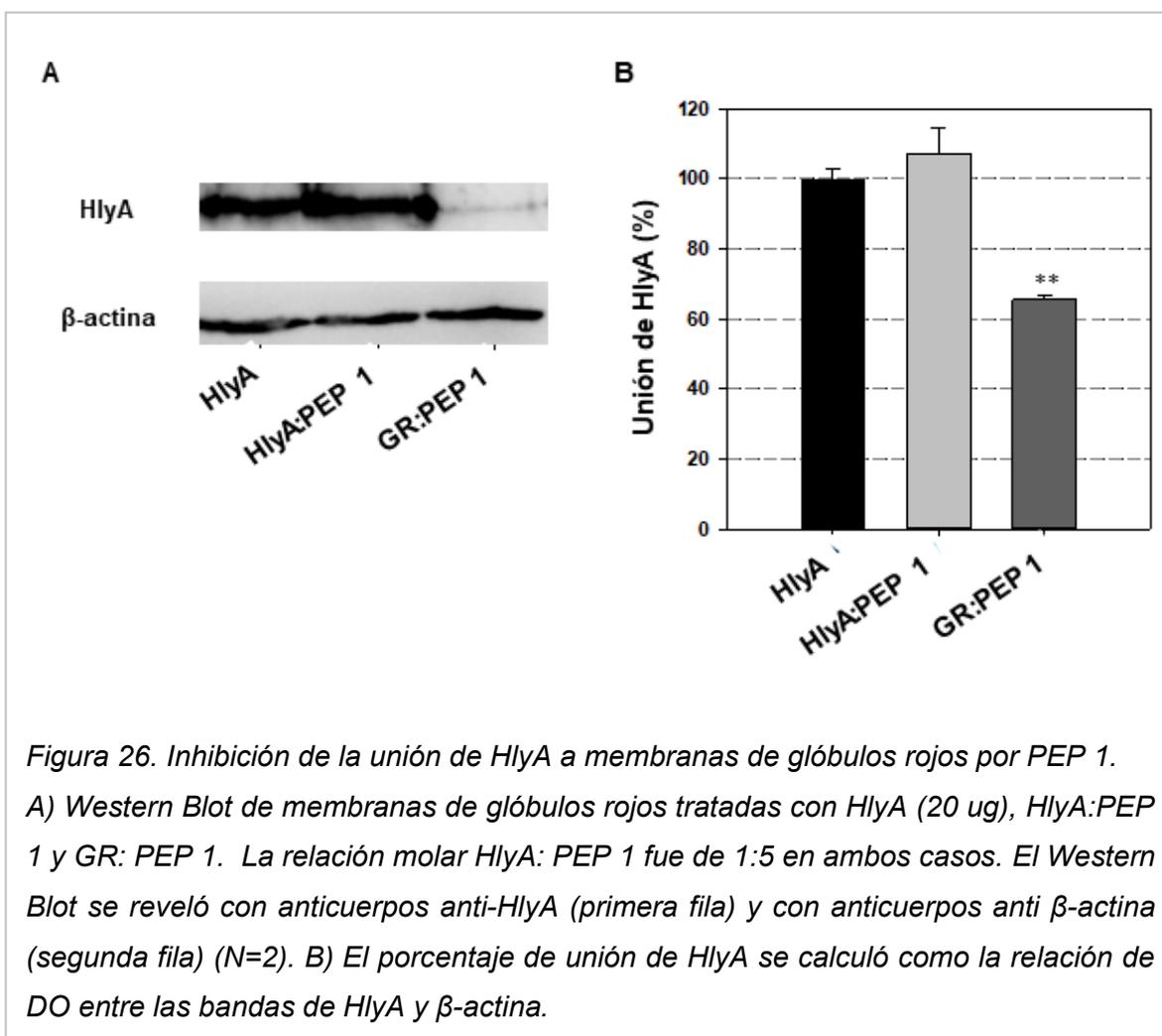
En conjunto, los resultados indican que PEP 1 inhibe la actividad hemolítica de HlyA, y que esta inhibición es mayor cuando los GR se preincuban con el péptido.

### **5.3.2. Unión de HlyA a membranas de glóbulos rojos en presencia de PEP 1**

De manera simplificada se puede describir al proceso hemolítico de HlyA en tres etapas: adsorción reversible, inserción y oligomerización de la toxina en la membrana diana que finalmente inducen la lisis celular (Bakás *et al.* 1996, Sanchez-Magraner *et al.* 2006, Herlax *et al.* 2009). Los dos primeros pasos son responsables de la unión de la toxina a la membrana.

Para investigar en detalle qué paso de este proceso está siendo inhibido por PEP 1, se analizó el porcentaje de unión de HlyA en presencia y ausencia de PEP 1 mediante *western blot*. La inhibición de la unión se probó de las mismas dos maneras que el ensayo de actividad hemolítica: i- Preincubando HlyA con PEP 1, y ii- Preincubando las membranas de los GR con PEP 1; en una relación molar toxina:péptido de 1:5. El porcentaje de unión se calculó como la relación entre la DO de las bandas de HlyA y de  $\beta$ -actina, asumiendo que HlyA sola se unía al 100% (Figura 26). La Figura 26 B muestra que la unión de HlyA a las membranas sólo se inhibe cuando PEP 1 se preincuba con membranas de GR.

Este resultado explica la mayor inhibición hemolítica observada cuando se preincuban los GR con el péptido, en comparación con la inhibición observada cuando se preincuba HlyA con PEP 1 (Figura 25 A).



### 5.3.3. Inhibición de la oligomerización de HlyA en presencia de PEP 1

Anteriormente, hemos demostrado, por la medida de FRET, que HlyA oligomeriza en las membranas de los GR para formar el poro que finalmente conduce a la hemólisis (Herlax *et al.* 2009). Por lo tanto, utilizamos esta misma técnica para determinar si el péptido inhibe este proceso (Figura 27).

La Figura 27 A muestra los espectros obtenidos para membranas tratadas con HlyA. Claramente, en el espectro de la muestra que contiene D/A se ve la disminución de la fluorescencia del D y un aumento de la fluorescencia del A, indicando que hay una transferencia de energía entre ellos. Por lo tanto, midiendo espectros similares, pero en presencia de diferentes relaciones molares HlyA:PEP 1, se calculó la eficiencia FRET (E) (Figura 27 B). Los resultados indican que la presencia de PEP 1 disminuye la eficiencia FRET de forma dependiente de la concentración. A una relación molar toxina:péptido de 1:5 la disminución de la eficiencia de FRET causada por la presencia de PEP 1, es mayor cuando las membranas de GR se preincubaban con el péptido. A una mayor relación molar de toxina:péptido (1:10) la disminución de la eficiencia de FRET es estadísticamente significativa para ambos tipos de preincubación, lo que indica una disminución de la oligomerización de HlyA.

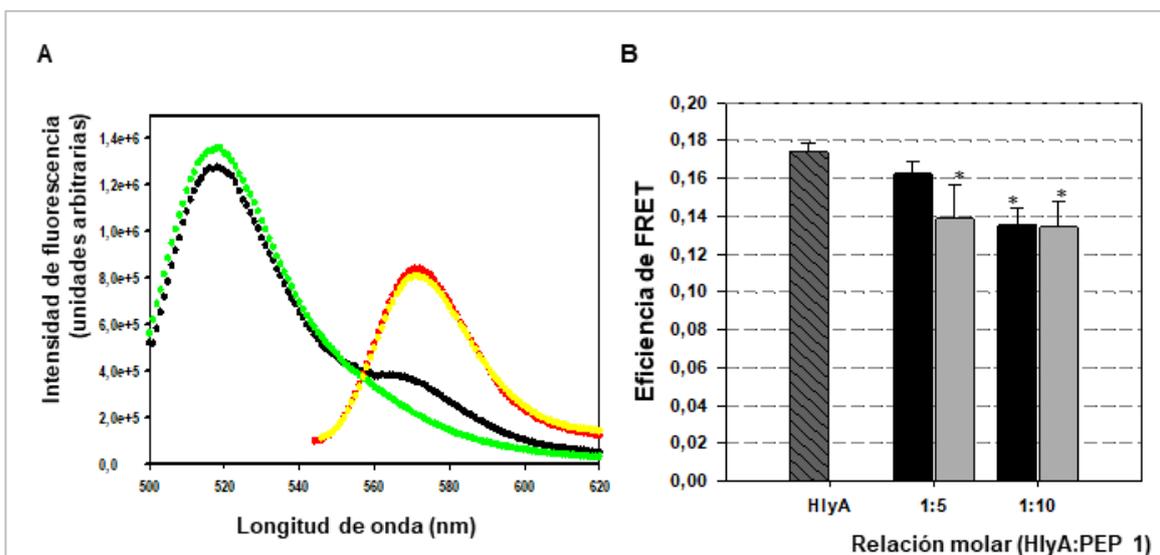


Figura 27. Inhibición de la oligomerización de la toxina por PEP 1.

A) Espectros de fluorescencia: en negro  $F_{480}^{D/A}$ , en verde  $F_{480}^D$ , en rojo  $F_{530}^{D/A}$  y en amarillo  $F_{530}^A$ . B) Eficiencia de FRET para membranas de GR tratadas con HlyA (gris discontinuo) y HlyA:PEP 1 en relaciones molares 1:5 y 1:10. PEP 1 se preincubó con GR (gris) o con HlyA (negro).

## 5.4 Discusión

---

En el presente capítulo se estudió en profundidad el efecto inhibitor de PEP 1 sobre el proceso hemolítico de HlyA que habíamos observado en el capítulo 4. Este efecto se comprobó de dos maneras diferentes; preincubando primero la toxina con el péptido a diferentes proporciones molares de toxina:péptido y la otra preincubando GR con diferentes concentraciones de péptido. A juzgar por los resultados obtenidos, el efecto inhibitor del PEP 1 es más eficaz en la última estrategia experimental, siendo esta inhibición de cerca del 30% para una relación molar toxina:péptido de 1:10. También se observa una ligera inhibición cuando se preincuba HlyA con el péptido para la misma relación molar toxina:péptido, aunque es sólo de un 10%.

Si analizamos en detalle la curva de hemólisis de HlyA, vemos que ésta presenta una forma sigmoidea, con un tiempo *lag* definido que asociamos a la difusión de la toxina hacia la membrana. Luego la toxina se une, se inserta y oligomeriza en la membrana, para finalmente lisar el GR. Eso se evidencia con la forma sigmoidea (cooperativismo) de la curva, y la pendiente de esa caída representa la velocidad de hemólisis. Finalmente, la curva se estabiliza cuando ya no se lisan más GR (Herlax *et al.* 2010). A medida que la concentración de toxina disminuye el tiempo *lag* incrementa levemente, la velocidad de hemólisis disminuye y la cantidad de GR lisados a tiempo final es menor. Un ejemplo de las curvas de hemólisis típicas a diferentes concentraciones de HlyA se puede observar en la Figura 8 A. Un efecto similar se observa cuando HlyA es preincubada con PEP 1, indicando que menos toxina llega a la membrana (solo a una relación molar HlyA:PEP 1 1:10). Por lo que podría existir una competencia entre la toxina y el péptido por unirse al GR, solo cuando la cantidad de péptido es alta. Por el contrario, cuando los GR son preincubados con péptido el tiempo *lag* no se modifica, pero sí la cantidad de GR que se lisan a los distintos tiempos. Es decir que existe una mayor inhibición de la hemólisis a medida que aumenta la

cantidad de péptido. En este caso, al preincubar los GR con el péptido, este podría unirse a la membrana e impedir la unión de la toxina.

En el capítulo anterior, demostramos que PEP 1 interacciona con membranas y con mayor afinidad con aquellas que contienen colesterol. Por lo tanto, podemos hipotetizar que PEP 1 interactúa y bloquea el acceso de HlyA a colesterol. Apoya esta hipótesis el hecho de que, aunque PEP 1 no sea hemolítico *per se*, induce un incremento de calcio intracelular en un 30% de las células tratadas, confirmando la interacción del péptido con membranas de GR. En cambio, ProHlyA, que podría tener esta región CRAC en el interior de su estructura compacta (Herlax *et al.* 2007), no induce un aumento de calcio. Además, se observa una disminución de un 35% en la unión de HlyA a GR cuando se preincuban los GR con el péptido, produciendo una disminución en la oligomerización de la toxina .

En conjunto, los resultados nos llevan a proponer un modelo para describir el mecanismo de inhibición de PEP 1 sobre la capacidad hemolítica de HlyA. El péptido CRAC estaría interactuando con el colesterol de la membrana de GR, bloqueando el acceso de la toxina e inhibiendo su capacidad de unión a la membrana, de oligomerización, y la posterior lisis de los GR.

Un mecanismo similar también se describió para un péptido CRAC derivado de LtxA de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, otro miembro de la familia de toxinas RTX (Brown *et al.* 2013, Brown *et al.* 2016, Koufos *et al.* 2016). En primer lugar, mediante ensayos de SPR con mutantes de LtxA, se demostró que un sitio CRAC de la región N terminal de esta toxina es responsable de la unión a colesterol (Brown *et al.* 2013). Luego, se encontró que un péptido correspondiente a ese sitio CRAC inhibe la actividad de LtxA, en células THP-1 y Jurkat, mediante el bloqueo de la unión de la toxina al colesterol de la membrana (Brown *et al.* 2013, Brown *et al.* 2016). Teniendo esto en cuenta, es que la

utilización de péptidos CRAC o CARC conservados en la familia de toxinas RTX, se presenta como una idea interesante para inhibir su actividad.

Estos resultados son alentadores ya que como se mencionó anteriormente, la implementación de terapias nuevas y alternativas contra UPEC es necesaria debido al incremento de cepas resistentes a los antibióticos. Las estrategias antitoxinas son especialmente útiles para aquellos pacientes en los que la terapia antibiótica está contraindicada, como en las mujeres embarazadas. Además, estos péptidos proporcionan una actividad específica y dirigida y no producirían efectos secundarios negativos asociados a los antibióticos tradicionales (Krueger *et al.* 2019). En este sentido, cabe resaltar que, aun siendo las UPEC responsables de un 80% de las UTI, y siendo HlyA el principal factor de virulencia de estas cepas, actualmente no existen terapias anti-HlyA aprobadas.

## **Capítulo 6. Construcción de una inmunotoxina compuesta por una región citotóxica de HlyA y anti-trop-2**

---

## 6.1 Introducción

---

De acuerdo con el Observatorio Global del Cáncer (Globocan) en el año 2020 se diagnosticaron alrededor de 19 millones de casos nuevos de cáncer en el mundo, y murieron casi 10 millones de personas a causa de esta enfermedad (Ferlay J 2020). Particularmente Argentina, se encuentra dentro de los países del mundo con incidencia de cáncer media-alta. En ese mismo año se diagnosticaron 130.878 casos nuevos de cáncer. Tanto en Argentina, como en el mundo, los tipos de cáncer con mayor incidencia son los de mama, pulmón y colorrectal.

Los tratamientos tradicionales para esta enfermedad son cirugía, radioterapia y quimioterapia. Muchos esfuerzos se han hecho para encontrar terapias más específicas contra el cáncer y así causar menos efectos secundarios en los pacientes; como por ejemplo la terapia hormonal, los antiangiogénicos, la ablación térmica, la hipertermia magnética, las terapias con células madre y la inmunoterapia, entre otras (Pucci *et al.* 2019, Debela *et al.* 2021). En este contexto, hace más de 100 años el químico alemán Paul Ehrlich concibió la teoría de la “bala mágica”, que consistía en dirigir una droga específicamente hacia el agente causante de enfermedad (Strebhardt *et al.* 2008). Esta teoría evolucionó con los años y dio lugar a lo que actualmente se conoce como conjugados droga-anticuerpo (ADC, del inglés *antibody-drug conjugates*), que se encuentran dentro de las terapias más avanzadas y específicas para el tratamiento del cáncer. Los ADC están compuestos por un agente citotóxico conjugado a un anticuerpo contra un biomarcador de células tumorales. Hasta el momento, 14 ADC se aprobaron por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos y otras agencias para su uso clínico (Fu *et al.* 2022).

Un tipo específico de ADC son las inmunotoxinas (IT), que como su nombre lo indica, están compuestas por una toxina conjugada a un anticuerpo. La primer IT se construyó en 1978, y durante los años se perfeccionó la construcción

de las mismas para mejorar su eficacia, generando así distintas generaciones de IT (Thorpe *et al.* 1978, Antignani *et al.* 2013):

- La primera generación de IT consiste en la conjugación química de una toxina completa a un anticuerpo de ratón anti-TRF (receptor de transferrina) (FitzGerald *et al.* 1986). Este tipo de IT presentan desventajas como la baja especificidad, alta inmunogenicidad, heterogeneidad química y eran poco estables.
- La segunda generación consiste en conjugados químicos entre toxinas con su dominio de unión celular deletado, y un anticuerpo. En este caso se mejoró su especificidad, pero siguen siendo químicamente heterogéneas y su gran tamaño les impide penetrar en los tumores sólidos.
- La tercera generación de IT se sintetiza por técnicas de biología molecular, y consiste, también, en una toxina sin su dominio de unión celular seguida por la región variable (Fv) de un anticuerpo. De esta manera también se logra disminuir el tamaño del anticuerpo utilizado. Esta generación avanzó enormemente ya que produce IT homogéneas y de menor tamaño, así como también se disminuyen sus costos de producción.
- Actualmente se desarrollan IT de cuarta generación, en la cual se utilizan anticuerpos humanizados fusionados con proteínas citotóxicas humanas, como proteínas proapoptóticas. Estas IT presentaron menos inmunogenicidad (Mathew *et al.* 2009, Jordaan *et al.* 2018).
- Actualmente se está conformando una quinta generación de IT en la cual se utilizan nanoanticuerpos. Estos anticuerpos simples y pequeños son producidos por camélidos y están compuestos sólo por la porción variable de una cadena pesada. Presentan un peso molecular de 12-15 kDa, su pequeño tamaño mejora la capacidad de penetración de la IT (Cao *et al.* 2020).

En la actualidad existen 3 IT aprobadas por la FDA para el tratamiento del cáncer, todas ellas dirigidas hacia cánceres hematológicos (Kim *et al.* 2020). Aunque muchos de los problemas que presentaban las IT ya se han superado todavía restan por mejorar su actividad inespecífica en células normales, su inmunogenicidad y la baja penetrabilidad en tumores sólidos (Kim *et al.* 2020).

### **6.1.1. Inmunotoxinas formadoras de poros para el tratamiento de tumores sólidos**

Existen distintos tipos de mecanismos mediante los cuales las IT inducen la muerte de la célula *target* como, por ejemplo, la inducción de vías apoptóticas, la regulación de procesos de génesis tumoral y la supresión de la progresión tumoral. Las tres IT aprobadas actualmente para su uso por la FDA están compuestas por fragmentos de la toxina diftérica (DT) de *Corynebacterium diphtheria* o de exotoxina A (PE38) de *Pseudomonas aeruginosa*; ambas toxinas actúan inhibiendo la síntesis proteica de la célula *target* (Khoshnood *et al.* 2022). Estas IT actúan intracelularmente, el anticuerpo se une al antígeno de la célula *target*, la IT es internalizada y ejerce su acción en el citoplasma (Kim *et al.* 2020). Uno de los principales problemas que presentan este tipo de IT es que una vez internalizadas la mayor parte se dirige a los lisosomas, donde es degradada.

Como se mencionó anteriormente, las IT actualmente aprobadas para su uso actúan contra cánceres hematológicos y no existen IT aprobadas para tumores sólidos, aunque algunas se encuentran en ensayos clínicos (Kim *et al.* 2020). Esto es debido a que el tejido de los tumores sólidos es más compacto y tiene poca vasculatura, lo que dificulta el acceso de las IT desde los vasos sanguíneos (Kim *et al.* 2020).

Teniendo estas problemáticas en cuenta es que la utilización de toxinas formadoras de poros para la construcción de IT aparece como una opción para el tratamiento de tumores sólidos. Este tipo de toxinas aumenta selectivamente la

permeabilidad de las células *target* y podría potenciar los efectos de otras drogas anti cáncer permitiendo su acceso al citoplasma; así como también exponer células internas de tumores sólidos donde no llegan otros tipos de drogas (Tejuca *et al.* 2004). La familia de las actinoporinas es la que más se ha estudiado para crear este tipo de IT (Avila *et al.* 1988, Tejuca *et al.* 1999, Tejuca *et al.* 2004, Tejuca *et al.* 2009). Uno de los problemas que presentaron este tipo de toxinas fue su capacidad para actuar sobre una amplia cantidad de tipos celulares, por lo que los últimos avances se dedicaron a inhibir la actividad inespecífica de este tipo de IT. Por ejemplo, Mutter *et al.* diseñaron una IT con la actinoporina Fragaceatoxin C (FraC), logrando inhibir su interacción con esfingomielina (Mutter *et al.* 2018). Para lograrlo, unieron la IT a una proteína soluble, mediante un sitio de reconocimiento para furina, una proteasa sobreexpresada en muchos tipos de cáncer. Por lo tanto, la IT puede ser activada al estar en contacto con furina, y producirse el clivado de la proteína soluble. Yee *et al.*, utilizó un mutante de la toxina *Hydra* actinoporin-like toxin 1 (HALT-1) secretada por *Hydra magnipapillata* para la construcción de una IT (Teo *et al.* 2021). A este mutante se le eliminó el sitio afín por la esfingomielina, y así perdió su efecto inespecífico sobre células normales. Estos ejemplos constituyen los últimos avances en la utilización de IT con toxinas formadoras de poro.

### **6.1.2. Biomarcadores de tumores sólidos**

Para la construcción de IT se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas de superficie que se encuentran sobreexpresadas en células tumorales. Por lo general estas proteínas están asociadas al crecimiento tumoral, la proliferación o metástasis. Para el tratamiento de tumores sólidos, atrajo una gran atención como antígeno *target* de las IT la proteína trop-2, también conocida como transductor de señales de calcio asociado a tumores 2 (TACSTD2) (Zaman *et al.* 2019). Esta proteína, se presenta como un candidato ideal para terapias dirigidas ya que es una glicoproteína de superficie reguladora de procesos de proliferación y transformación de células tumorales, que se encuentra

sobreexpresada en tumores malignos como cáncer de mama, de colon, de páncreas y gástrico (Goldenberg *et al.* 2018) y su nivel de expresión en los tumores se correlaciona con el mal pronóstico de los pacientes (Trerotola *et al.* 2013, Zeng *et al.* 2016).

Actualmente solo dos ADC dirigidos contra trop-2 se han estudiado en ensayos clínicos. Uno es Sacituzumab govitecan, un ADC compuesto por un anticuerpo humanizado anti-Trop-2 conjugado a SN-38, un inhibidor de la topoisomerasa I. Este ADC fue el primero de su clase aprobado por la FDA para su uso en carcinomas mamarios metastásicos y uroteliales, que ya se han tratado previamente (Goldenberg *et al.* 2020). El otro es RN927C, en el cual el anticuerpo anti-Trop-2 está acoplado a un derivado de auristatina, un inhibidor de microtúbulos. Las terapias dirigidas contra trop-2 han demostrado la supresión de tumores tanto en modelos animales como en ensayos clínicos con humanos. Su combinación con otras terapias en ensayos preclínicos también ha presentado resultados prometedores (Zaman *et al.* 2019). Aunque existen algunos ensayos con IT dirigidas contra trop-2, no se han estudiado IT con toxinas formadoras de poro conjugadas a trop-2 para el tratamiento de tumores sólidos.

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos y los resultados obtenidos en el capítulo 4, proponemos como objetivo del presente capítulo la construcción de una IT, compuesta por un péptido correspondiente al dominio de inserción de la toxina formadora de poros HlyA y un anticuerpo anti-trop-2.

## 6.2 Materiales y Métodos

---

### 6.2.1. Cultivo de líneas celulares

Como modelo de células tumorales utilizamos la línea tumoral MCF-7. Esta línea se aisló de tejido mamario epitelial de una paciente con adenocarcinoma mamario metastásico. Es una línea dependiente de estrógeno, y es la línea celular mamaria tumoral más estudiada en el mundo. La línea celular Jurkat, de linfocitos T, se utilizó como control con baja expresión de trop-2 (Wang *et al.* 2023). Esta línea se obtuvo de la sangre periférica de un paciente con leucemia linfocítica aguda.

Las células se cultivaron en el medio DMEM-F12 (Hyclone), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Natocor), con L-glutamina 2 mM (EMEVE medios) y con antibiótico-antimicótico (Sigma). Se mantuvieron a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>. Para el subcultivo de las células MCF-7, se retiró el medio de cultivo, se lavó la monocapa celular con PBS, y se agregó 1 ml de Tripsina-EDTA (Sigma). Se inactivó la tripsina por la adición de 4 ml de medio de cultivo, luego se centrifugaron las células y se diluyeron en medio de cultivo nuevo. Finalmente, se colocó 1 ml de las células en 5 ml de medio de cultivo en un frasco nuevo. Las células se subcultivaron cada 4 días. Las células Jurkat crecen en suspensión, por lo tanto, su subcultivo consistió en el descarte y agregado de medio nuevo, manteniendo el número de células entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  por ml.

### 6.2.2. Medidas de viabilidad celular

El ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) es utilizado para medir la actividad metabólica celular (Mosmann 1983, Denizot *et al.* 1986). La enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa es capaz de reducir el MTT a formazán, un compuesto insoluble de color azul. La presencia de esta enzima refleja la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, y por ende el número de células viables. Por lo tanto, la cuantificación

colorimétrica de formazán se puede utilizar para medir la citotoxicidad de diversos compuestos. Para realizar el ensayo se sembraron  $2 \times 10^4$  células por pocillo, en placas de 96 pocillos. Se incubó la placa por 24 hs. para permitir que las células se adhieran a la superficie. Luego se descartó el medio y se trató a las células con distintas concentraciones de péptido, toxina o inmunotoxina; diluídas en medio de cultivo. Pasadas las 24 hs. de tratamiento, se lavaron las células con PBS y se incubaron con MTT (0,5 mg/ml) por 2 hs. Los cristales de formazán se disolvieron con DMSO por 15 min., y se midió la DO a 560 nm. La viabilidad celular se calculó como el porcentaje de  $DO_{560}$  respecto del control sin tratar. Como control positivo se utilizaron células tratadas con tritón-X100.

En el caso de las células Jurkat, todos los pasos que requerían retirar el medio de los pocillos fueron precedidos por una centrifugación de la placa (200 g 5 min) para precipitar las células.

### 6.2.3. Clonado del dominio de inserción de HlyA

El protocolo de clonado del dominio de inserción de HlyA se desarrolló como se grafica en la Figura 28. Se realizaron los siguientes pasos:

1. Obtención del plásmido donador (psF4000) y aceptor (pET28a).
2. Amplificación del inserto correspondiente al dominio de inserción de HlyA.
3. Digestión enzimática del inserto y del plásmido aceptor.
4. Ligación del inserto y el plásmido aceptor.
5. Transformación del plásmido recombinante en bacterias.

**Plásmidos utilizados.** Para la obtención del inserto correspondiente al extremo N-terminal de HlyA se utilizó el plásmido pSF4000, que corresponde a una construcción recombinante formada por el operón *hlyCABD* clonado en el plásmido vector pACYC184 mediante la enzima de restricción Sal I. El mismo posee resistencia contra cloranfenicol, y tiene un total de 12456 bp (Welch et al. 1983).

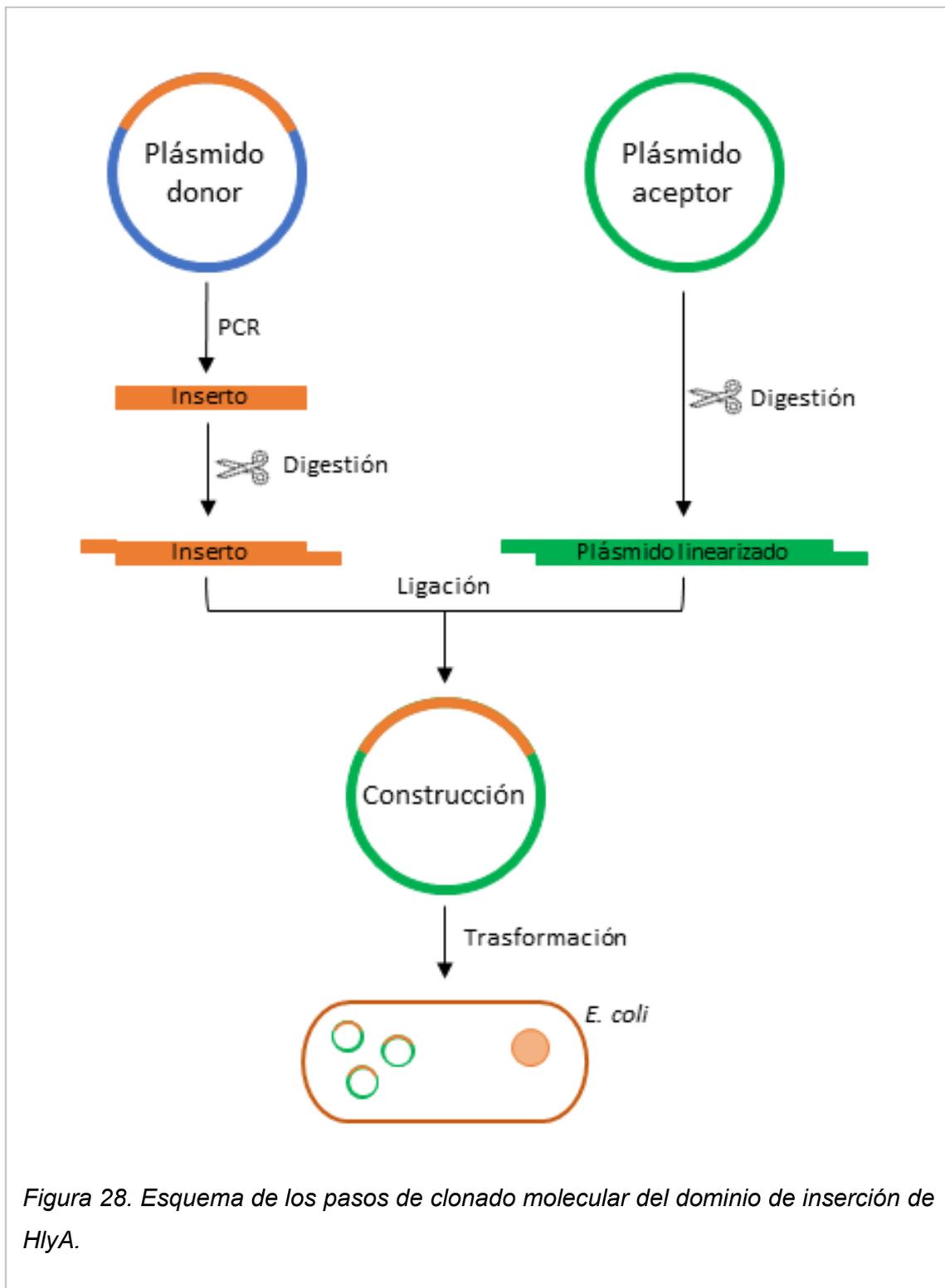


Figura 28. Esquema de los pasos de clonado molecular del dominio de inserción de HlyA.

Como vector aceptor se eligió el plásmido pET28a (Novagen), que posee una secuencia de 6 histidinas (His-tag) para su posterior purificación. La Figura 29 muestra un mapa de su sitio de clonado. El plásmido de 5369 pb presenta resistencia a kanamicina.

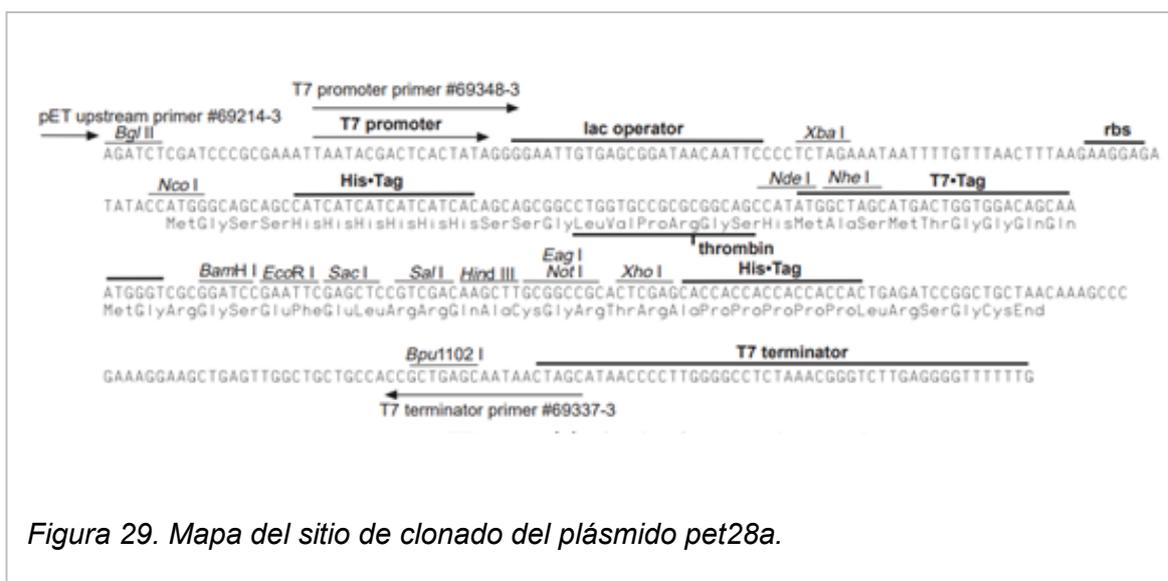


Figura 29. Mapa del sitio de clonado del plásmido pet28a.

**Obtención de plásmidos en escala analítica (minipreps).** Se obtuvieron los plásmidos (donor y aceptor) puros y en cantidad suficiente, utilizando el kit “High Purity Plasmid Miniprep Kit” (Dongsheng Biotech) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Se inocularon 5 ml de medio LB con antibiótico, con bacterias transformadas con los plásmidos correspondientes, se dejaron crecer durante la noche a 37°C en agitación. Se centrifugaron los cultivos (10 min a 4000 g), y se obtuvieron las bacterias precipitadas. Se resuspendieron completamente en 250 µl de la solución de resuspensión. Se agregaron 250 µl de solución de lisis y se mezcló por inversión 5 veces hasta que la solución se volvió viscosa y clara. Se agregaron 350 µl de la solución de neutralización y se mezcló inmediatamente 5 veces por inversión. Se centrifugó por 10 min a 14,000 g para precipitar restos celulares y el ADN cromosomal. Se transfirió el sobrenadante a la columna suministrada, se centrifugó por 1 min, y se descartó el eluato. Se agregaron 500 µl

de la solución de lavado I, se centrifugó por 1 min a 14,000 g y se descartó el eluato. Se repitió el procedimiento con la solución de lavado II, 2 veces. Se centrifugó durante 1 min para eliminar los restos de solución de lavado. Se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga limpio, se agregaron 50 µl de agua Milli Q estéril, se incubó por 2 min y se eluyó el plásmido centrifugando por 2 min a 14,000 g. Se cuantificó el ADN plasmídico por espectrofotometría usando el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Para cuantificar ADN doble cadena se midió la DO a 260 nm y utilizando el factor de conversión 1 DO = 50 µg/ml se calculó la concentración. Se evaluó la integridad y peso molecular de los plásmidos obtenidos por electroforesis en gel de agarosa.

**Electroforesis en gel de agarosa.** Se utilizó esta técnica para analizar la integridad y el peso molecular de distintos fragmentos de ADN. Se prepararon geles de 1% de agarosa en buffer TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH=8) y se agregó 1 µl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml) para evidenciar la presencia de ácidos nucleicos en un transiluminador UV. Las corridas se realizaron a 100V durante el tiempo necesario para la correcta separación del ADN. Las muestras se sembraron agregando la cantidad correspondiente de “6X Gel Loading dye” (Dongsheng Biotech) y en cada corrida se utilizó el marcador de peso molecular “500 bp Ladder” (Dongsheng Biotech).

**Amplificación del inserto.** Para obtener el inserto en grandes cantidades, se realizó una Reacción de polimerización en cadena (PCR) utilizando como templado el plásmido psF4000 que contiene el operón de HlyA. Se diseñaron los cebadores (*primers*) para amplificar del dominio de inserción de HlyA, comprendido entre los aminoácidos 177 y 416. A los *primers* se les agregaron en sus extremos, secuencias correspondientes a sitios de restricción para las enzimas *NDel* y *HindIII* (en el *primer* delantero y reverso respectivamente), y una señal de stop. Los *primers* fueron sintetizados por la empresa MacroGen y sus secuencias son las siguientes:

NdeI

Delantero: 5'-GGAATTCCCATATGTCTGAACTGGCAAAAGCGAGT-3'

STOP

Reverso: 5'-TTAAAGCTTACATTGCCTGTTTTGAAGCCTCA-3'

HindIII

La PCR se realizó utilizando las siguientes cantidades de reactivos: 100 ng del templado (miniprep pSF4000), 1  $\mu$ M de cada *primer*, 0,1  $\mu$ l de EasyTaq DNA Polymerase (TransGen Biotech), 1  $\mu$ l de 10X Buffer (c/20mM MgCl<sub>2</sub>), y 250  $\mu$ M de cada dNTP; en un volumen final de 10  $\mu$ l. El ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, 35 ciclos de: una desnaturalización de 30 seg a 94°C, una renaturalización (*annealing*) de 45 seg a 66°C y una extensión de 1 min a 72°C, por último, una extensión final de 5 min a 72°C. Luego se corroboró la correcta amplificación del inserto mediante un gel de agarosa.

**Digestión con enzimas de restricción.** Se realizó la digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* (Promega) del producto de PCR (inserto) y del plásmido pET28a (acceptor). Se prepararon las mezclas de reacción descritas en la primera sección de la Tabla 5. Primero se incubó con la enzima *NdeI* y el buffer D (Promega) durante la noche a 37°C, y al día siguiente se agregó en el mismo tubo de reacción el buffer E y la enzima *HindIII* (Promega). La mezcla se incubó durante 2 hs a 37°C. El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa, se cortó la banda correspondiente y se purificó utilizando un "Gel Extraction Kit" (Dongsheng Biotech), siguiendo el protocolo del fabricante.

Tabla 5. Digestión con enzimas de restricción del inserto y del plásmido aceptor.

Digestión del plásmido aceptor		Digestión del Inserto	
pET 28a	1ug	Producto PCR	1 µg
Buffer D 10X	2,5 µl	Buffer D 10X	1 µl
BSA (10 µg/µl)	0.25 µl	BSA (10 µg/µl)	0.1 µl
NDel	0,5 µl	NDel	0,5 µl
H2O	c.s.p. 25 µl	H2O	c.s.p. 10 µl
Buffer E 10X	2,5 µl	Buffer E 10X	1 µl
HindIII	0,5 µl	HindIII	0,5 µl

**Ligación del inserto y plásmido aceptor.** Se preparó la mezcla de ligación según se describe en la Tabla 6, incubándose durante 1 hora a 25°C. Se ensayaron las relaciones molares inserto:plásmido: 1:10, 1:25, 1:50.

La correcta ligación se analizó mediante PCR utilizando *primers* T7, los cuales hibridan en los extremos de la zona de clonado (Figura 29). El producto de la ligación se purificó utilizando la columna “Quick Gel Extraction Column” (Dongsheng Biotech).

Tabla 6. Ligación del plásmido e inserto.

Reactivos	Cantidades
Plásmido	23,5 µg
Inserto	Según relación inserto:plásmido
T4 DNA Ligase (TransGen Biotech)	2 µl
Buffer 5X	5 µl
H2O	c.s.p. 25 µl

**Transformación por electroporación.** La construcción recombinante se transformó en células *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes mediante un electroporador (Electroporador BioRad, modelo Micropulser™). Para obtener las bacterias competentes se agregaron 4 u 8  $\mu$ l de las construcciones obtenidas a 100  $\mu$ l de bacterias, y se les aplicó un pulso de 1,8 kV. Las bacterias se recuperaron durante 1 hora a 37°C en 600  $\mu$ l de medio SOC (2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> y 20 mM de glucosa). Luego se sembraron en placas de LB agar con kanamicina y se incubaron a la misma temperatura durante toda la noche.

**Análisis de la construcción.** Se realizaron *minipreps* de las colonias obtenidas y se evaluó la presencia de la construcción realizando una PCR con *primers* T7. Las construcciones obtenidas fueron secuenciadas por la empresa MacroGen.

**Conservación de la construcción recombinante.** Las *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas se guardaron en 16% v/v glicerol a -80°C. También se transformó la construcción en bacterias de expresión *E. coli* BL21, que se conservaron de igual forma.

#### **6.2.4. Purificación del dominio de inserción de HlyA**

Se inocularon las bacterias *E. coli* BL21 transformadas con la construcción en 10 ml de medio LB con kanamicina (50  $\mu$ g/ml), y se incubaron durante la noche a 37°C y con una agitación de 250 rpm. El cultivo saturado se diluyó en un 1L de medio LB con kanamicina (50  $\mu$ g/ml), y se incubó en las mismas condiciones hasta que la DO a 600 nm fue de 0,7. Luego se agregó IPTG (Roche) a una concentración final de 1mM y se incubó por 2 hs. más. Posteriormente, se precipitaron las bacterias a 6500g por 15 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 50 ml de Tris-HCl 20 mM pH 7.5 frío con inhibidor de proteasas (Sigma). Luego, se lisaron las células por sonicación durante 5 min en hielo (Branson sonifier 450)

y se centrifugaron a 14000 g por 10 min para separar la fracción soluble de la insoluble. Se resuspendió el pellet en 5 ml de buffer de desnaturalización (Tris 20 mM, NaCl 300 mM NaCl, pH 7,4, 8M Urea), y se solubilizó por inversión por 1 h. a 4°C. Se centrifugó a 14000 g por 10 min a 4°C y se guardó el sobrenadante para ser purificado.

Se equilibró una columna de 2 ml de Ni-NTA Superflow (Quiagen) con el buffer de desnaturalización, se pasó la muestra, se lavó con 8 ml de buffer de lavado (Tris 20 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, pH 7,4, 8M Urea) y se eluyó la proteína con 5ml de buffer de elución (Tris 20 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 0.5 M, pH 7,4, 8M Urea). La purificación se realizó a un flujo de 0,7 ml/min y se tomaron muestras de 500 µl. La eficacia de todos los pasos de expresión y purificación del péptido se evaluó con un SDS-PAGE 12%. Las fracciones con la proteína purificada se concentraron en buffer sin imidazol (Tris 20 mM, NaCl 300 mM, pH 7,4, 8M Urea) mediante un concentrador de proteínas con una membrana de celulosa con un punto de corte de 15.000 kDa (Amicon, Millipore) y se guardaron a -20°C. Previo a cada ensayo el péptido se renaturalizó mediante diálisis en buffer TC o PBS, sin urea.

#### **6.2.5. Construcción de la inmunotoxina**

Para realizar la conjugación del péptido correspondiente al dominio de inserción de HlyA y el anticuerpo anti-trop-2, se utilizó el *crosslinker* succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, Sigma). Este *crosslinker* posee una longitud media de 8,3 Å. Es un *crosslinker* heterobifuncional, ya que posee grupos éster NHS y maleimida reactivos a grupos aminos y sulfhidrilos, respectivamente. Se utilizó el anticuerpo anti-trop-2 (B-9) (sc-376746, Santa Cruz Biotechnology), correspondiente a un anticuerpo IgG1 monoclonal de ratón contra los aminoácidos 141-225 pertenecientes a una región extracelular de trop-2 de origen humano.

Primero, se incubó el péptido con SMCC a una relación molar 1:5, en PBS durante 1:30 hs. a temperatura ambiente. El exceso de *crosslinker* no unido se removió utilizando una columna rellena con Sephadex® G-25 (PD-10 desalting columns, Cytiva). Las fracciones se cuantificaron mediante la técnica de Bradford. Luego se incubó la fracción que contenía péptido-SMCC con el anticuerpo anti-trop-2 en una relación molar 6:1 durante 2 hs. a temperatura ambiente. La IT se concentró utilizando un concentrador de proteínas con una membrana de celulosa con un punto de corte de 15 kDa (Amicon, Millipore).

## 6.3 Resultados

---

Considerando los resultados del Capítulo 4, que nos indican que el péptido CARC (PEP 2), perteneciente al dominio de inserción en membrana de HlyA, es hemolítico decidimos continuar estudiando su actividad con el objetivo de utilizarlo para la construcción de una IT para el tratamiento del cáncer de mama.

### 6.3.1. Actividad citotóxica de PEP 2 en la línea celular MCF-7

Se estudió la citotoxicidad de PEP 2 en la línea celular tumoral de mama MCF-7, mediante el ensayo de reducción de MTT. La Figura 30 muestra que tanto HlyA como PEP 2 inducen la muerte celular de MCF-7 luego de 24 hs. de tratamiento. Los valores de  $IC_{50}$  son de 2,3 nM y 1,7 mM para HlyA y PEP 2, respectivamente. Siendo el  $IC_{50}$  de PEP 2 6 órdenes de magnitud mayor que el de HlyA. Efecto similar a lo que se observó en la hemólisis de GR (Figura 22).

Teniendo en cuenta que la concentración citotóxica de PEP 2 es demasiado alta como para construir una IT eficaz, decidimos estudiar el dominio de inserción completo de HlyA con este fin. No se utilizó HlyA ya que IT de menor tamaño pueden penetrar mejor en tumores sólidos.

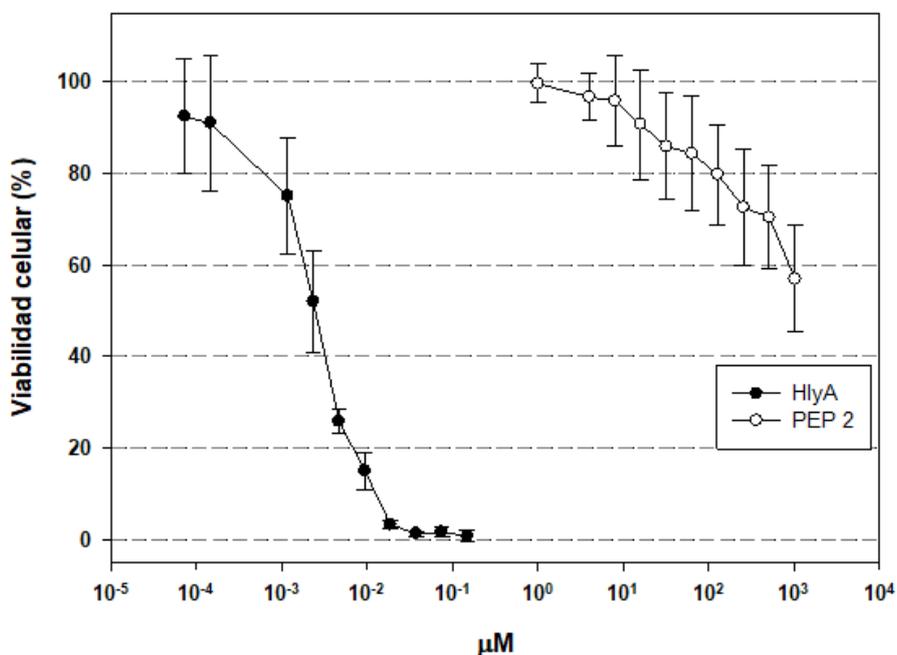


Figura 30. Citotoxicidad de PEP 2 en la línea celular MCF-7.

Curva de porcentaje de viabilidad celular de MCF-7 en función de la concentración de HlyA (negro) y PEP 2 (blanco) luego de 24 hs. de tratamiento.

### 6.3.2. Clonado del dominio de inserción de HlyA

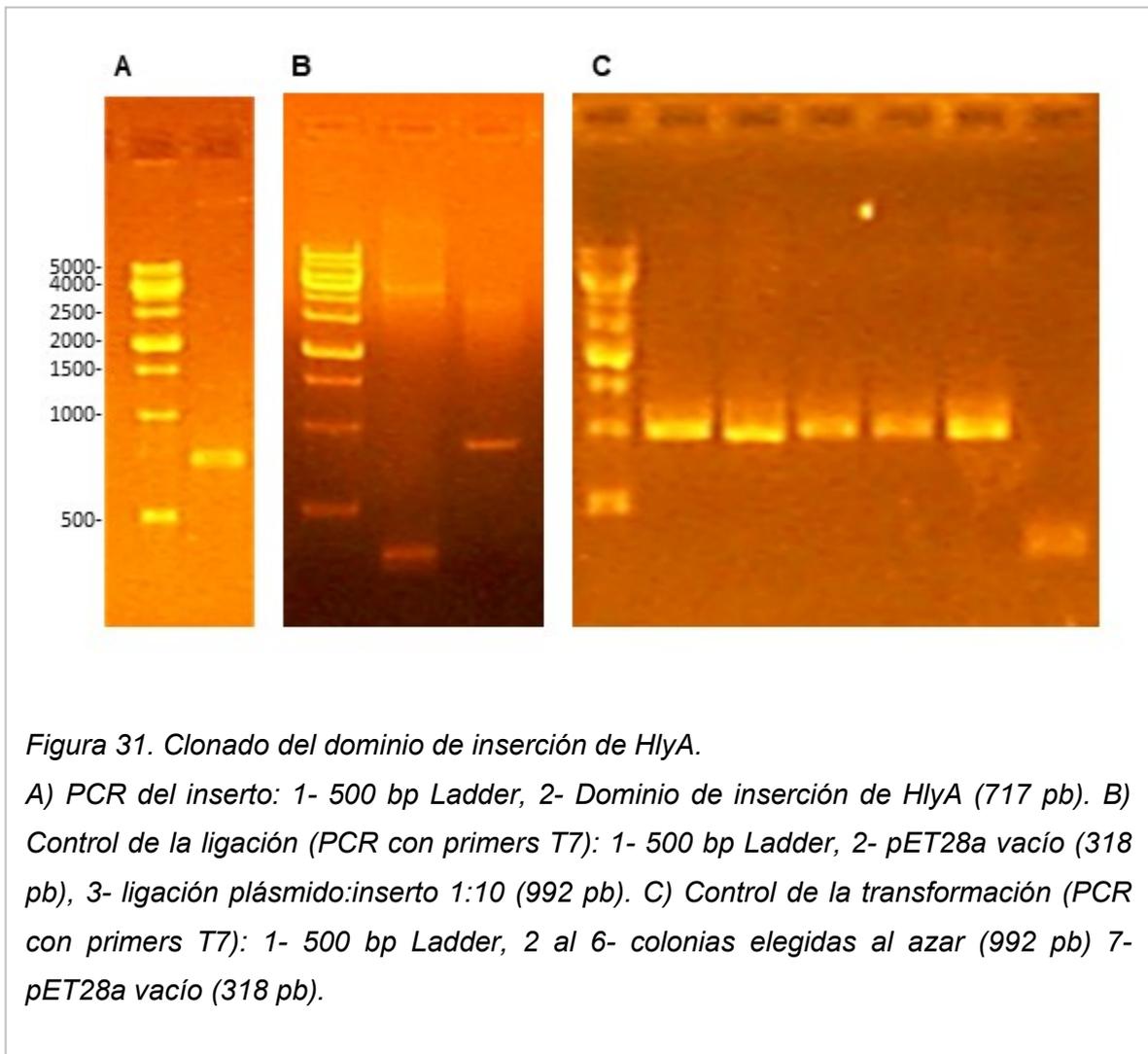
En primer lugar, se realizó el clonado del péptido correspondiente al dominio de inserción de HlyA, utilizando técnicas de biología molecular, como se detalla en la sección 6.2.3. y en la Figura 28.

En la Figura 31 A se observa la correcta amplificación por PCR del dominio de inserción de HlyA, ya que se obtuvo el amplicón esperado de 717 pb. Luego se realizó la ligación del producto de PCR (inserto) y del plásmido pET28a (aceptor), utilizando *primers* T7. Estos primers hibridan en los extremos de la zona de clonado del plásmido pET28a, por lo tanto, si el plásmido se encuentra vacío el amplicón generado debería ser de 318 pb. Por otro lado, si el inserto ligó

correctamente, el amplicón tendría un peso de 992 pb correspondiente a la distancia entre los sitios de hibridación de los *primers* T7 más la secuencia del inserto. En la Figura 31 B se observa que la ligación fue exitosa ya que se obtuvieron los amplicones esperados.

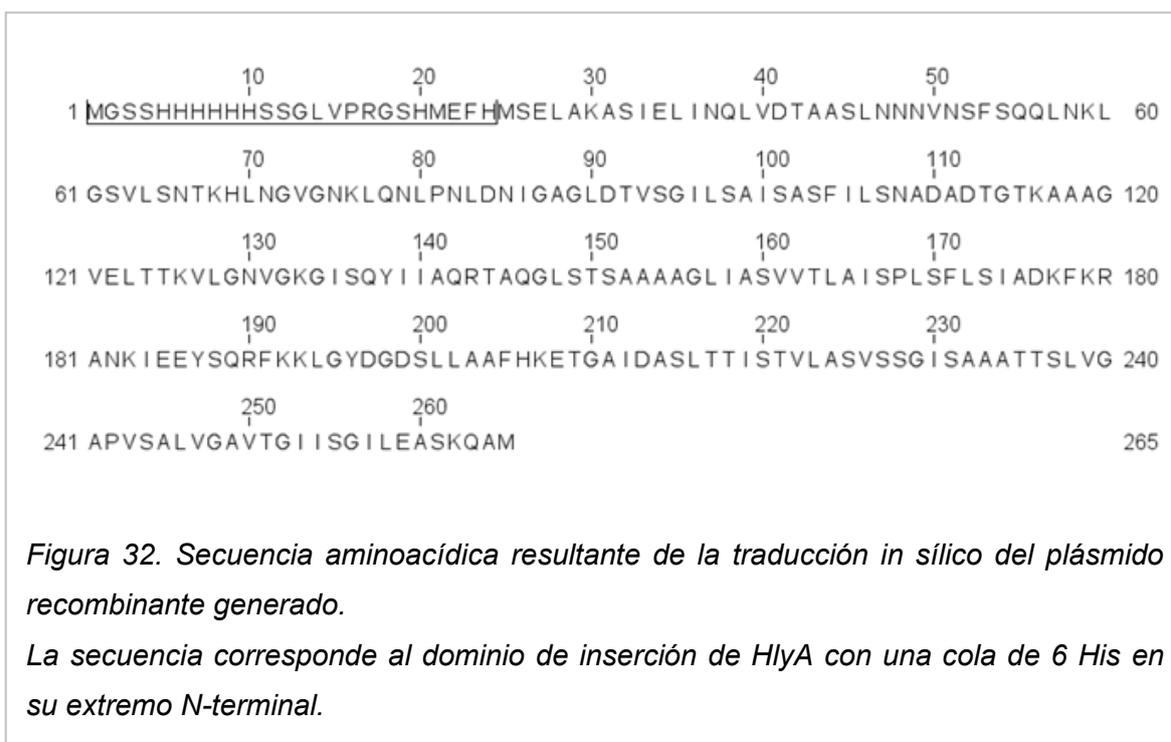
Finalmente, procedimos a transformar por electroporación bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  con esta construcción. De las colonias obtenidas se seleccionaron 5 al azar, se realizaron *minipreps* y se evaluó la presencia de la construcción realizando una PCR con *primers* T7. Se observa en la Figura 31 C que las 5 colonias presentan el inserto de 992 pb en el sitio de clonado del vector, y como control se observa que el plásmido vacío da el amplicón esperado de 318 pb.

Para corroborar que el inserto fuera el esperado se secuenciaron las 5 construcciones obtenidas. En el Anexo II se muestran los resultados de secuenciación de una de las colonias. Dado que los resultados de la secuenciación fueron los esperados, se procedió a conservar las construcciones en bacterias de clonado y expresión (*E. coli* DH5  $\alpha$  y BL21).



### 6.3.3. Expresión y purificación del dominio de inserción de HlyA

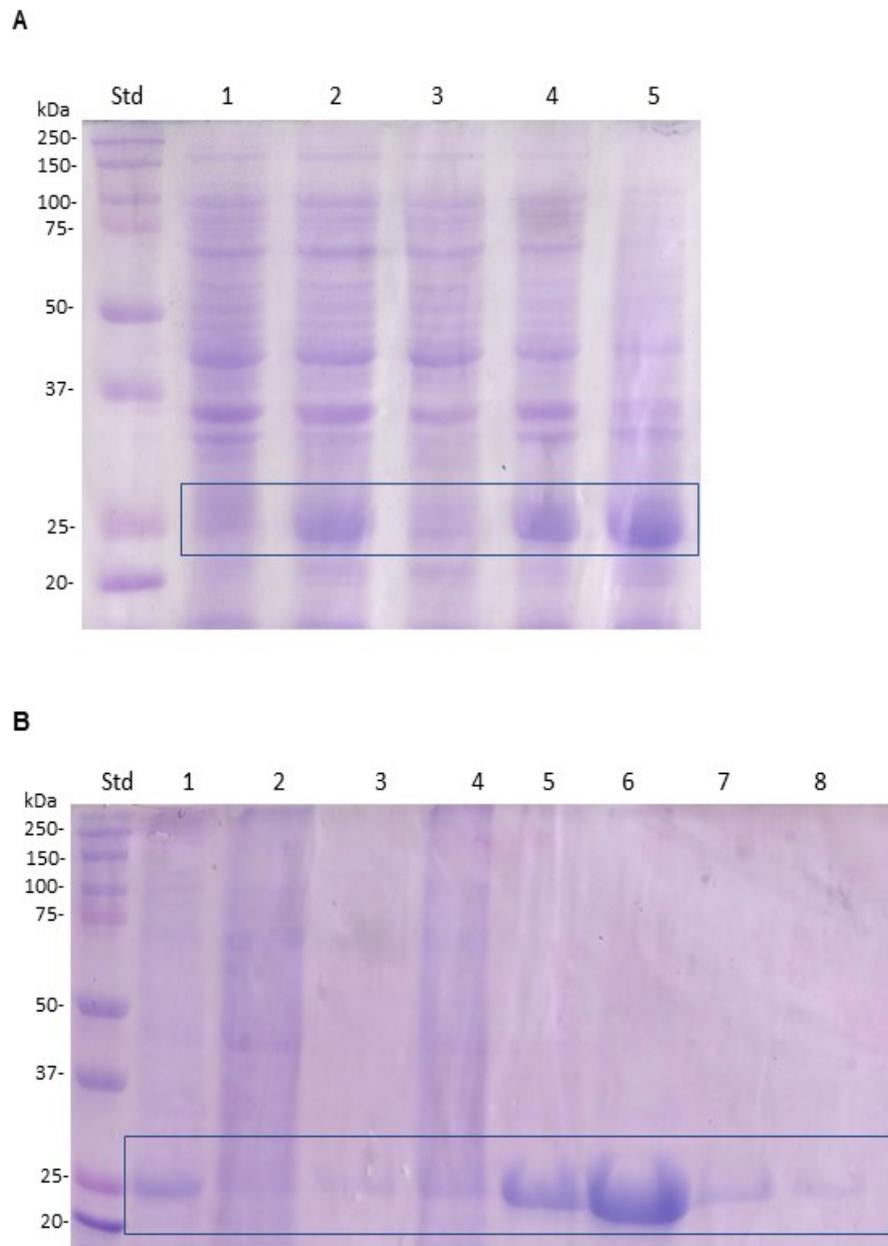
Posteriormente se procedió a poner a punto la expresión del péptido. En la Figura 32 se muestra su secuencia aminoacídica, traducida *in silico* a partir de los resultados de secuenciación de DNA, el péptido tiene 265 aminoácidos, un peso de 27,1 kDa, y posee un sitio His-tag, presente a continuación del extremo N-terminal de la secuencia del péptido.



La expresión del péptido se realizó como se detalla en la sección de materiales y métodos 6.2.4. La Figura 33 A muestra un SDS-PAGE 12% con los perfiles proteicos de muestras obtenidas en los distintos pasos del proceso de expresión. En las calles 1 y 2 se observan muestras de las bacterias inducidas o no con IPTG. Como se esperaba, se observa una banda cerca de los 25 kDa correspondiente al péptido, en el caso de las bacterias inducidas. En las calles 3 y 4 se observan las proteínas solubles y las presentes en el *pellet*, luego de que las bacterias fueran sonicadas y centrifugadas. El péptido se observa mayormente en el *pellet*, indicando que se encuentra en cuerpos de inclusión. Por lo tanto, el próximo paso consistió en su solubilización con urea 8 M, que se observa en la calle 5.

Luego de que se puso a punto la expresión del péptido, se lo purificó por cromatografía de afinidad con una resina cargada con níquel, a la cual se unen proteínas con un extremo His-tag. En la Figura 33 B se observan muestras de los

eluatos de la columna de níquel. En la calle 1 se observa el péptido que se sembró en la columna, en la calle 2 la muestra que eluyó de la columna. En la calle 3 el eluato luego de los lavados y en las calles 4 a 8 el péptido eluído con imidazol 0.5 M. Se puede observar que el péptido se obtuvo en grandes cantidades y con una alta pureza en las fracciones 5 y 6 de elución.



*Figura 33. Expresión y purificación del dominio de inserción de HlyA.*

A) SDS-PAGE 12% Calle: Std- Estándar de peso molecular 1- Bacterias sin inducir 2- Bacterias luego de 2 hs. de inducción con IPTG 3- Porción soluble luego de sonicar las bacterias 4- Porción insoluble luego de sonicar las bacterias 5- Proteínas solubilizadas con urea 8M. B) SDS-PAGE 12% Calle: Std- Estándar de peso molecular 1- Muestra sembrada 2- Muestra eluída 3- Lavados 4-8- Elución con imidazol 0.5 M. Las bandas correspondientes al péptido se muestran con un recuadro azul.

#### **6.3.4. Actividad hemolítica y citotóxica del péptido**

Una vez expresado y purificado el péptido, procedimos a estudiar su actividad lítica. Los resultados indican que el péptido no es hemolítico en las concentraciones ensayadas (Figura 34 A), pero si disminuye la viabilidad de células MCF-7 (Figura 34 B) presentando un valor de  $IC_{50}$  3 órdenes menor que PEP 2 (Figura 30). Con lo cual logramos aumentar su efectividad además de aumentar la cantidad de péptido obtenido, con respecto a la síntesis química.

Estos resultados son alentadores para utilizar el péptido, correspondiente al dominio de inserción de HlyA, para la construcción de una IT, ya que no presenta actividad hemolítica, pero si actividad citotóxica.

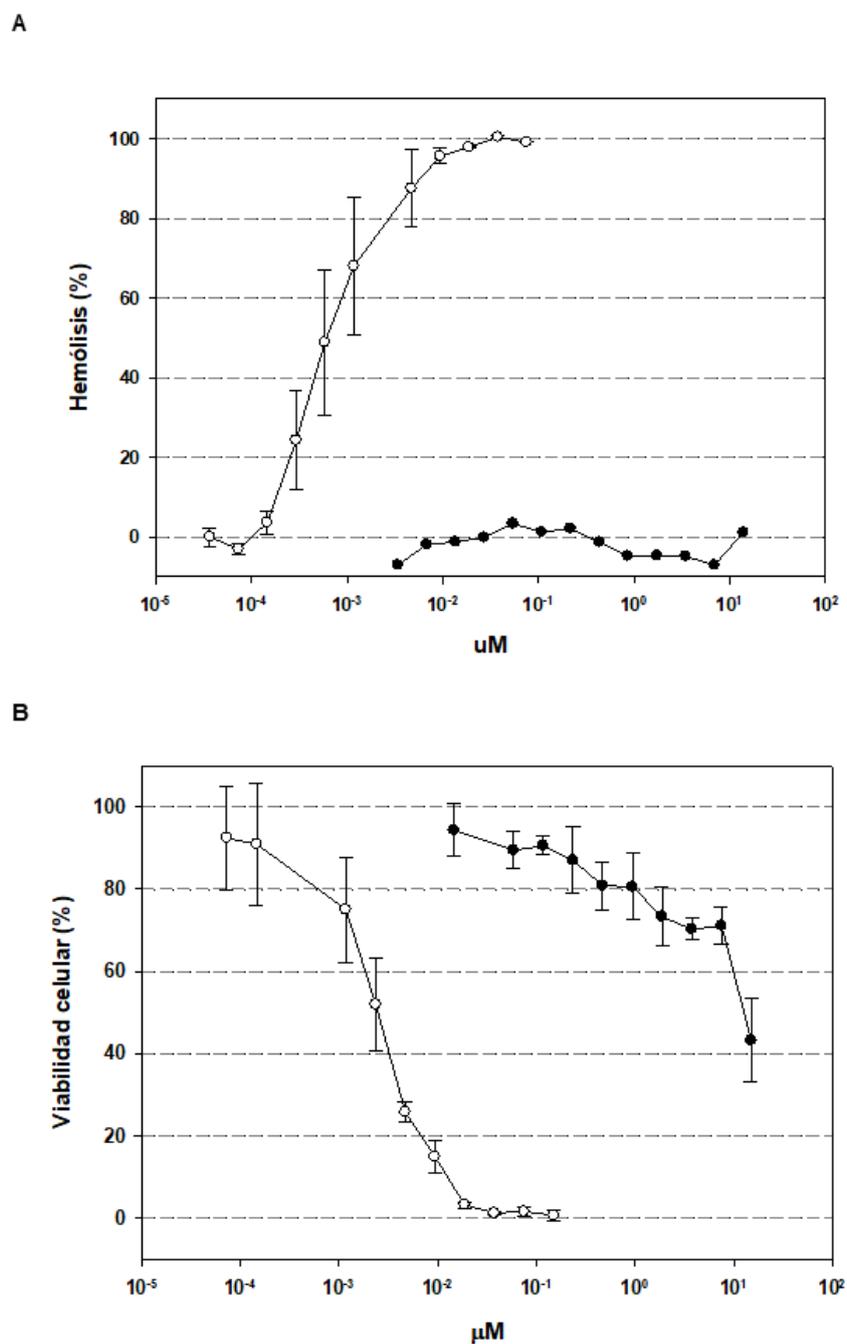


Figura 34. Actividad citolítica del péptido en glóbulos rojos humanos y en la línea celular MCF-7.

A) Porcentaje de hemólisis de GR humanos luego de 30 min de tratamiento con diferentes concentraciones de HlyA (blanco) y el péptido (negro). B) Porcentaje de viabilidad celular (respecto del control sin tratar) de células MCF-7 tratadas durante 24 hs. con HlyA (blanco) y el péptido (negro).

### 6.3.5. Construcción de la inmunotoxina

Para la construcción de la IT, el péptido correspondiente al dominio de inserción en la membrana de HlyA se conjugó al anticuerpo anti-trop-2, utilizando el *crosslinker* SMCC. Teniendo en cuenta que el péptido carece de cisteínas, al incubar en un primer paso el péptido con el SMCC se espera que este último se una a través del extremo éster NHS a los grupos aminos libres del péptido. Teniendo en cuenta el pKa de los grupos aminos de las proteínas, a pH entre 7-9 se espera que la reacción de conjugación ocurra principalmente con el grupo amino del N-terminal del péptido. Luego, se realizó la conjugación del extremo maleimida del SMCC a los sulfhidrilos presentes en el anticuerpo. En la Figura 35 A se observa un SDS-PAGE 12% en el que se corrió en la calle 1 el producto final de la conjugación, se observan dos bandas cercanas a los  $\approx 25$  kDa que corresponden a las cadenas livianas del anticuerpo (25 kDa) y al péptido libre (27,5 kDa). También se observan dos bandas cercanas a los  $\approx 50$  kDa que probablemente corresponden a las cadenas pesadas del anticuerpo (50 kDa) y al péptido conjugado a la cadena liviana del anticuerpo (52,5 kDa). En la calle 2 de la Figura 35 se observa la IT luego de ser concentrada.

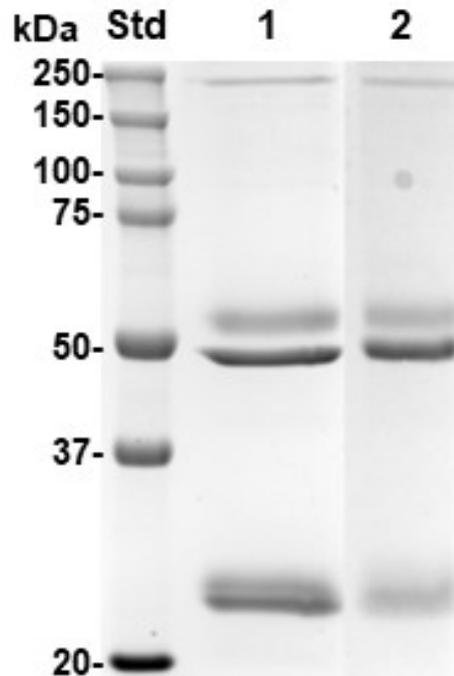


Figura 35. Construcción de la inmunotoxina.

SDS-PAGE 12% Std: estándar de peso molecular, Calle 1: IT, Calle 2: IT concentrada.

### 6.3.6. Actividad citotóxica de la inmunotoxina

Una vez construida la IT, procedimos a evaluar su actividad citotóxica en la línea celular MCF-7. El valor de  $IC_{50}$  obtenido para la IT es de  $1,2 \mu M$ , más de 15 veces menor al del péptido sin conjugar (Figura 36). Este resultado nos podría indicar que el anticuerpo direcciona al péptido hacia la célula *target*, aumentando su capacidad citotóxica.

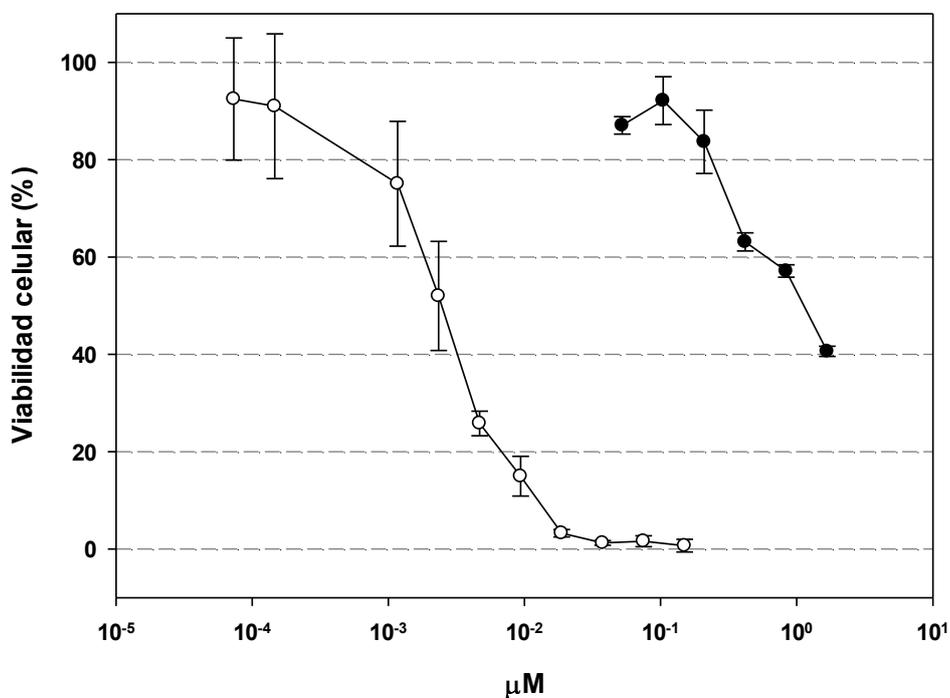


Figura 36. Actividad citotóxica de la inmunotoxina en células MCF-7.

Porcentaje de viabilidad celular de células MCF-7 luego de 24 hs. de tratamiento con HlyA (blanco) y con la IT (negro). El porcentaje de viabilidad se calculó respecto del control sin tratar.

Finalmente, con el objetivo de estudiar la especificidad de la IT se estudió su actividad citotóxica en la línea celular Jurkat, ya que la misma carece de trop-2. En la Figura 37 se observa la actividad citotóxica en las células Jurkat de HlyA, el péptido y la IT. HlyA fue citotóxica en todo el rango de concentración estudiado, por lo que estas células presentan una mayor susceptibilidad a la toxina que las MCF-7. Por otro lado, el péptido y la IT presentaron un valor de IC<sub>50</sub> de 0,28 y 0,42 μM respectivamente. Teniendo en cuenta los resultados, podemos concluir

que la conjugación del péptido al anticuerpo anti-trop-2 no le da la especificidad esperada.

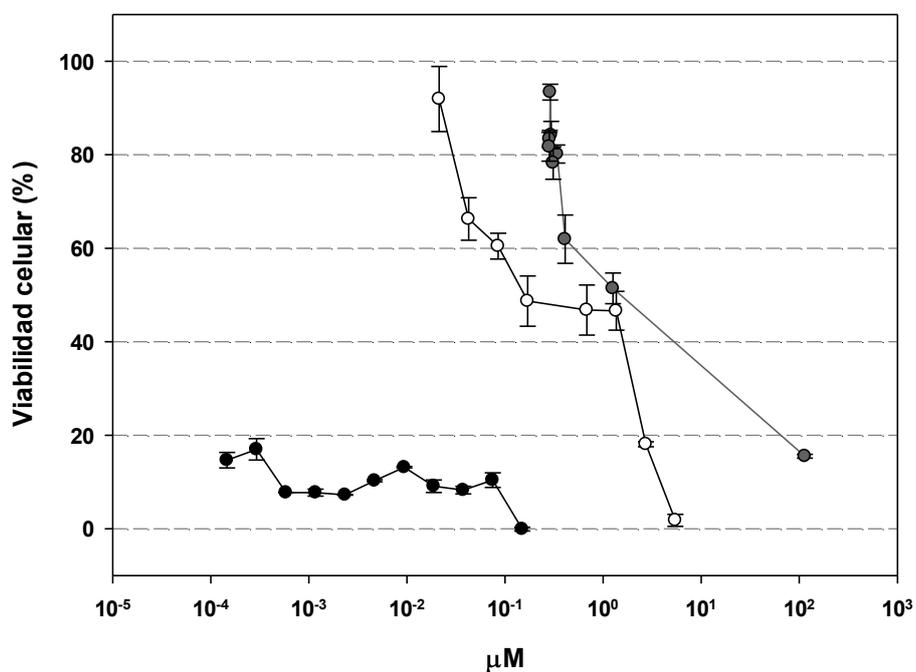


Figura 37. Actividad citotóxica de la inmunotoxina en células Jurkat.

Porcentaje de viabilidad celular de células Jurkat luego de 24 hs. de tratamiento con HlyA (negro), el péptido (blanco) y la IT (gris). El porcentaje de viabilidad se calculó respecto del control sin tratar.

## 6.4 Discusión

---

Las toxinas se han estudiado ampliamente, con el objetivo de inhibir sus efectos negativos sobre los seres humanos. Aun así, existe un campo de investigación en crecimiento que busca utilizar los conocimientos sobre el mecanismo de acción de las toxinas para generar impactos positivos en diferentes áreas, como la medicina, veterinaria o agroquímica. En particular, las toxinas pueden utilizarse para el tratamiento de distintas enfermedades humanas como diabetes, síndromes coronarios, hipertensión, enfermedades autoinmunes, dolor crónico, condiciones neurológicas congénitas, entre otras (Clark *et al.* 2019). Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo fue la construcción de una IT utilizando una región lítica de HlyA para el tratamiento del cáncer. Teniendo en cuenta que no existen IT para el tratamiento de tumores sólidos, la utilización de la toxina formadora de poros HlyA puede ser una opción para superar las dificultades que presentan este tipo de tumores.

En primer lugar, se midió la actividad citotóxica de PEP 2, un péptido CARC perteneciente al dominio de inserción de HlyA. Los resultados indican que luego de 24 hs de tratamiento de las células MCF-7 con PEP 2 el valor de IC<sub>50</sub> es 6 órdenes de magnitud mayor que la toxina. A partir de estos resultados es que se decidió evaluar la actividad citotóxica de un péptido correspondiente al dominio de inserción en membrana de HlyA. Como se mencionó en la sección 4.1.2. diversas regiones de este dominio parecen ser esenciales para la formación del poro y consecuentemente para la actividad lítica de la toxina. El péptido no presentó actividad hemolítica pero sí citotóxica. Estos resultados presentan una mejora respecto a PEP 2, ya que el dominio de inserción de HlyA es 2 órdenes de magnitud más citotóxico en las células MCF-7 (Tabla 7).

Posteriormente, se procedió a construir una IT de 2da generación utilizando el dominio de inserción de HlyA. Con el objetivo de tratar tumores sólidos el péptido se conjugó a un anticuerpo anti-trop-2, un antígeno

sobreexpresado en distintos tipos de células tumorales. La IT podría ser útil para tratar muchos tipos de cáncer, aun así, como una primera aproximación se decidió estudiar su actividad en la línea celular tumoral mamaria MCF-7. Los resultados indican que la IT es citotóxica en la línea celular MCF-7, con un valor de IC<sub>50</sub> 15 veces menor que el del péptido sin conjugar (Tabla 7). Es decir, que la conjugación del péptido al anticuerpo aumenta su eficacia.

Luego, para evaluar la especificidad de la IT, se estudió su citotoxicidad en la línea celular Jurkat, ya que esta línea celular no presenta moléculas de trop-2 en su superficie, a diferencia de la línea MCF-7 que presenta 110646 moléculas de trop-2 por célula (Cardillo *et al.* 2015). En la línea celular Jurkat HlyA fue 100% citotóxica en el rango de concentraciones ensayado y el péptido presentó un valor de IC<sub>50</sub> dos órdenes de magnitud menor que en las células MCF-7. Es decir que las células Jurkat son más sensibles a HlyA y al péptido. La IT presentó valores de IC<sub>50</sub> muy similares en ambas líneas celulares, por lo tanto, podemos concluir que la IT no es específica, ya que su citotoxicidad no depende de los niveles de expresión de trop-2 de las células.

Tabla 7. Valores de IC<sub>50</sub> en GR humanos y en las líneas MCF-7 y Jurkat de HlyA, PEP 2, el dominio de inserción y la inmunotoxina.

	IC <sub>50</sub> (μM)		
	GR	MCF-7	Jurkat
<b>HlyA</b>	0,00034	0,0023	< 0,00015
<b>PEP 2</b>	547,2	1700	-
<b>Dominio de inserción</b>	No hemolítico	20,6	0,28
<b>Inmunotoxina</b>	-	1,2	0,42

En conclusión, se logró construir y purificar una IT de 2da generación funcional, pero no específica. Como se mencionó anteriormente la inespecificidad es uno de los mayores problemas que presentan las IT compuestas por toxinas formadoras de poro, por lo que los últimos avances en el área se dedicaron a inhibir la actividad inespecífica de este tipo de IT. Teniendo en cuenta los resultados descritos es que proponemos a futuro construir una IT de 5ta generación sintetizada por técnicas de biología molecular. La cuál estaría compuesta por el dominio de inserción en la membrana de HlyA y un nanoanticuerpo anti-trop-2. Para bloquear su actividad inespecífica se propone unir el componente citotóxico de la IT a una proteína soluble mediante un sitio de reconocimiento para furina (Mutter *et al.* 2018). Furina es una proteasa sobreexpresada en muchos tipos de cáncer, por lo tanto, la IT puede ser activada al estar en contacto con furina, y producirse el clivado de la proteína soluble. De esta manera la IT propuesta presentaría menores costos de producción, mayor especificidad y menor tamaño.

## Capítulo 7. Conclusiones y perspectivas

---

En síntesis, la presente tesis aportó los siguientes conocimientos con respecto a la interacción de HlyA de *E. coli* con GR humanos:

- Las GP no participan en el mecanismo de acción de HlyA en GR humanos. En cambio, HlyA podría interactuar con las espectrinas  $\alpha$  y  $\beta$  de GR humanos.
- El péptido CRAC 639-644 perteneciente a la región entre los ácidos grasos de HlyA, interactúa con colesterol, no es hemolítico e inhibe la actividad de HlyA en GR.
- El péptido CARC 341-353 perteneciente al dominio de inserción en membrana de HlyA no interactúa fuertemente con colesterol. Aun así, es hemolítico y citotóxico, y pareciera que su mecanismo de acción es de tipo "alfombra".
- La Y central del péptido CARC 341-353 es indispensable para la actividad hemolítica de este péptido.

Teniendo en cuenta todos los resultados en conjunto, podríamos proponer que la presencia de los ácidos grasos unidos covalentemente a la toxina podría exponer el sitio CRAC 639-644, así el colesterol podría actuar como molécula aproximadora a la membrana mediante su interacción con este sitio. Además, HlyA podría interactuar con las espectrinas  $\alpha$  y  $\beta$  presentes en el lado interno de la membrana de GR humanos, y así anclarse en la membrana.

Teniendo en cuenta dichas conclusiones es que nos proponemos a futuro realizar los siguientes ensayos para profundizar aún más en el mecanismo de acción de HlyA:

- Profundizar en la interacción directa entre HlyA y espectrina en un contexto similar al biológico, por ejemplo, utilizando GR depletados de espectrinas.
- Estudiar el rol del sitio CRAC 639-644 en el mecanismo de acción de HlyA, utilizando mutantes de delección de este sitio.
- Estudiar el rol de la Y<sup>347</sup> de HlyA en el mecanismo de acción de HlyA, utilizando mutantes puntuales.

Por otro lado, los resultados obtenidos a partir del estudio de la relación estructura-función de HlyA mencionados anteriormente, nos motivaron a diseñar nuevas aplicaciones terapéuticas, utilizando distintos dominios de HlyA. Las conclusiones obtenidas al respecto fueron las siguientes:

- El péptido CRAC 639-644 perteneciente a la región entre los ácidos grasos de HlyA, se uniría al colesterol de la membrana inhibiendo la unión de HlyA a los GR humanos.
- Se construyó una IT de 2da generación compuesta por el dominio de inserción en membrana de HlyA conjugada a anti-trop-2. La cuál es citotóxica para la línea celular tumoral MCF-7, pero no específica.

Teniendo en cuenta dichas conclusiones es que nos proponemos a futuro:

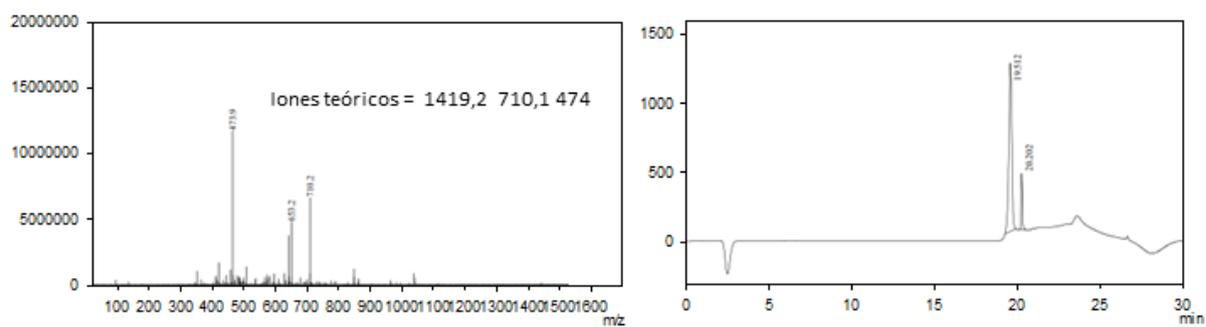
- Estudiar el efecto inhibitorio del péptido CRAC 639-644 en otros modelos experimentales como membranas corioamnióticas (modelo de infección urinaria en embarazadas) y plaquetas (modelo de bacteriemia).
- Construir por biología molecular una IT de 5ta generación y estudiar su actividad en distintos tipos celulares, esferoides y en modelos animales.

## Anexos

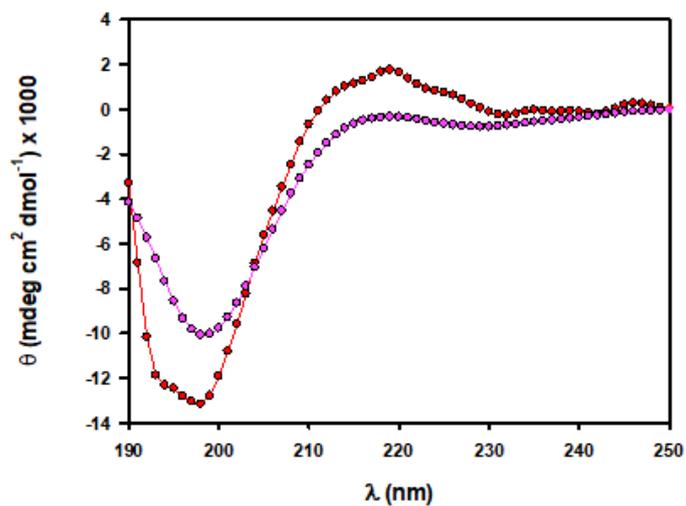
### Anexo I

A) Cromatograma de masas y HPLC de PEP 3. B) Espectro de dicroísmo circular de PEP 3 en PBS (rojo) y en 30% TFE (violeta).

A



B



**Anexo II**

Resultados de la secuenciación de la construcción recombinante compuesto por el dominio de inserción de HlyA clonado en el plásmido pET28a, realizada con *primers* T7.

>190429-013\_I09\_1\_T7promoter.ab1 1236

```
TTTAGGAACGGGGTACATTTCCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAA
GAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGTGGAGCATCATCACAGCAGCGG
CCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGAATTCCATATGTCTGAACTGGCAA
AAGCGAGTATTGAGCTAATCAACCAACTCGTGGACACAGCTGCCAGCCTT
AATAATAATGTTAACTCATTTTCTCAACAACCTCAATAAGCTGGGAAGTGT
ATTATCCAATACAAAGCACCTGAACGGTGTGGTAATAAGTTACAGAATT
TACCTAACCTTGATAATATCGGTGCAGGGTTAGATACTGTATCGGGTATT
TTATCTGCGATTTTCAGCAAGTTTCATTCTGAGCAATGCAGATGCAGATAC
CGGAACTAAAGCTGCAGCAGGTGTTGAATTAACAACGAAAGTACTGGGTA
ATGTTGGAAAAGGTATTTCTCAATATATTATCGCACAGCGTACAGCACAG
GGGTTATCTACATCTGCTGCTGCTGCCGGTTTAATTGCTTCTGTTGTGAC
ACTGGCAATTAGTCCCCTCTCATTCTGTCCATTGCCGATAAGTTTAAAC
GTGCCAATAAAATAGAGGAGTATTCACAACGATTCAAAAACTTGGATAC
GATGGTGACAGTTTACTTGCTGCTTTCCACAAAGAAACAGGAGCTATTGA
TGCATCGTTAAACAACGATAAGCACTGTTCTGGCTTCAGTATCTTCAGGTA
TTAGTGCTGCTGCAACGACATCTCTGGTTGGTGCACCGGTAAGCGCGCTG
GTAGGGGCTGTTACGGGGATAATTTTCAGGCATCCTTGAGGCTTCAAAACA
GGCAATGTAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA
GATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCAC
CGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGA
GGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACATATCCGGATTGGCGAATGGGACG
CGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGC
GTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTT
CCCTTCTTTTCCGCCACGGTTCGCCGGGTTTTCCCGTCAAGCTTTAAA
TCGGGGGGCCCCCTTTAGGGTTCCAATTTAAGGCT
```

## Bibliografía

- Abdeen, S. J., *et al.* (2010). "Peptide Inhibitors Targeting Clostridium difficile Toxins A and B." ACS Chemical Biology **5**(12): 1097-1103.
- Abraham, M. J., *et al.* (2015). "GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers." SoftwareX **1-2**: 19-25.
- Abraham, M. J., *et al.* (2018). "GROMACS User Manual version 2016, [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org)."
- Antignani, A. and D. FitzGerald (2013). "Immunotoxins: The Role of the Toxin." Toxins **5**: 1486-1502.
- Aoki, T. (2017). "A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins." Membranes **7**: 1-19.
- Avila, A. D., *et al.* (1988). "A new immunotoxin built by linking a hemolytic toxin to a monoclonal antibody specific for immature T lymphocytes." Int J Cancer **42**: 568–571.
- Baier, C. J., *et al.* (2011). "Disclosure of cholesterol recognition motifs in transmembrane domains of the human nicotinic acetylcholine receptor." Sci Rep **1**: 69.
- Bakas, L., *et al.* (2006). "Paradoxical lipid dependence of pores formed by the Escherichia coli alpha-hemolysin in planar phospholipid bilayer membranes." Biophys J **91**(10): 3748-3755.
- Bakás, L., *et al.* (2012). *E.coli* Alpha Hemolysin and properties. Biochemistry, Book I. P. D. Ekinci. Croacia.
- Bakás, L., *et al.* (1996). "Reversible adsorption and nonreversible insertion of Escherichia coli alpha-hemolysin into lipid bilayers." Biophys J. **71**(4): 1869-1876.

- Bakás, L., *et al.* (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.
- Bauer, M. E. and R. A. Welch (1996). "Association of RTX toxins with erythrocytes." Infec Immun **64**(11): 4665-4672.
- Bauman, S. J. and M. J. Kuehn (2006). "Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response." Microbes Infect **8**: 2400–2408. .
- Bechinger, B. and K. Lohner (2006). "Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides." Biochimica et Biophysica Acta **1758**: 1529–1539.
- Bennett, V. and A. J. Baines (2001). "Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues." Physiol Rev **81**(3): 1353-1392.
- Benz, R. (2020). "RTX-Toxins." Toxins (Basel) **12**(6).
- Berendsen, H., *et al.* (1981). Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. Intermolecular Forces. The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry. B. Pullman, Springer, Dordrecht. **14**: 331–342.
- Berendsen, H. J. C., *et al.* (1995). "GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation." Comput. Phys. Commun. **91**: 43–56.
- Berger, O., *et al.* (1997). "Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature." Biophys. J. **72**: 2002–2013.
- Bhakdi, S., *et al.* (1988). "The hemolysin of escherichia coli." European Journal of Epidemiology **4**(2): 135-143.

- Bhakdi, S., *et al.* (1990). "Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin I release." J. Clin. Invest **85**: 1746-1753.
- Boehm, D., *et al.* (1990). "Domains of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes." Infect Immunity **58**(6): 1959-1964.
- Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding." Anal. Biochem. **72**: 248-254.
- Brockman, H. (1999). "Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions?" Curr Opin Struct Biol **9**(4): 438-443.
- Brown, A. C., *et al.* (2013). "Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin utilizes a cholesterol recognition/amino acid consensus site for membrane association. ." J Biol Chem. **288**: 23607-23621.
- Brown, A. C., *et al.* (2016). "Inhibition of LtxA toxicity by blocking cholesterol binding with peptides." Mol Oral Microbiol **31**(1): 94-105.
- Bruce, L., *et al.* (1994). "Altered band 3 structure and function in glycophorin A and B deficient (MkMk) red cells." Blood **84**: 916-922.
- Bunduki, G. K., *et al.* (2021). "Virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis." BMC Infect Dis **21**(1): 753.
- Cao, L., *et al.* (2020). "HER2-specific immunotoxins constructed based on single-domain antibodies and the improved toxin PE24X7." Int J Pharm. **574**: 118939.
- Cardillo, T. M., *et al.* (2015). "Sacituzumab Govitecan (IMMU-132), an Anti-Trop-2/SN-38 Antibody-Drug Conjugate: Characterization and Efficacy in Pancreatic, Gastric, and Other Cancers." Bioconjug Chem **26**(5): 919-931.

- Cavaliere, S., *et al.* (1984). "*Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin characteristics and probable role in pathogenicity." Microbiol. Rev **48**: 326-343.
- Cavaliere, S. J. and I. S. Snyder (1982). "Effect of *Escherichia coli* alpha-hemolysin on human peripheral leukocyte viability in vitro." Infect Immun **36**(2): 455-461.
- Chen, Y., *et al.* (2018). "Broad-Spectrum Neutralization of Pore-Forming Toxins with Human Erythrocyte Membrane-Coated Nanosponges." Adv Healthc Mater **7**(13): e1701366.
- Christensen, M. G., *et al.* (2015). "[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Oscillations and IL-6 Release Induced by  $\alpha$ -Hemolysin from *Escherichia coli* Require P2 Receptor Activation in Renal Epithelia." J Biol Chem **290**(23): 14776-14784.
- Clark, G. C., *et al.* (2019). "Friends or Foes? Emerging Impacts of Biological Toxins." Trends in Biochemical Sciences **44**(4): 365-379.
- Cortajarena, A., *et al.* (2001). "Glycophorin as a receptor for *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin in erythrocytes." J. Biol. Chem **276**(16): 12513-12519.
- Cortajarena, A. L., *et al.* (2003). "A receptor- binding region in *Escherichia coli*  $\alpha$ -haemolysin." J.Biol.Chem. **278**(21): 19159-19163.
- Darden, T., *et al.* (1993). "Particle mesh Ewald: An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems." J. Chem. Phys. **98**: 10089–10092.
- Daza Millone, A., *et al.* (2018). "Phase-segregated Membrane Model assessed by a combined SPR-AFM Approach." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **172**.
- Debela, D. T., *et al.* (2021). "New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives." SAGE Open Med **9**: 20503121211034366.
- Denis, M. F. L., *et al.* (2019). "Regulation of extracellular ATP of human erythrocytes treated with alpha-hemolysin. Effects of cell volume, morphology, rheology and hemolysis." Biochim Biophys Acta Mol Cell Res **1866**(5): 896-915.

- Denizot, F. and R. Lang (1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability." J Immunol Methods **89**(2): 271-277.
- Dileepan, T., *et al.* (2007). "Human CD18 is the functional receptor for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin." Infect Immun **75**(10): 4851-4856.
- Dileepan, T., *et al.* (2005). "Mapping of the binding site for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin within bovine CD18." Infection and immunity **73**(8): 5233-5237.
- Eberspacher, B., *et al.* (1989). "Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of *Escherichia coli* hemolysin." Infection and immunity **57**(3): 983-988.
- Essmann, U., *et al.* (1995). "A smooth particle mesh Ewald method." J.Chem. Phys. **103**: 8577–8593.
- Fantini, J. and F. J. Barrantes (2013). "How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains." Front. Physiol. **4**(1-9).
- Felmlee, T., *et al.* (1985). "Escherichia coli hemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide." J Bacteriol **163**(1): 88-93.
- Ferlay J, E. M., Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). " Global Cancer Observatory: Cancer Today." Retrieved 28/10, 2022, from <https://gco.iarc.fr/today>.
- FitzGerald, D. J., *et al.* (1986). "Antitumor effects of an immunotoxin made with *Pseudomonas* exotoxin in a nude mouse model of human ovarian cancer." **83**(17): 6627-6630.
- Flores-Mireles, A. L., *et al.* (2015). "Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options." Nat Rev Microbiol **13**(5): 269-284.

- Foxman, B. (2010). "The epidemiology of urinary tract infection." Nature Reviews Urology **7**(12): 653-660.
- Fu, Z., *et al.* (2022). "Antibody drug conjugate: the "biological missile" for targeted cancer therapy." Signal Transduction and Targeted Therapy **7**(1): 93.
- Giner-Casares, J. J., *et al.* (2014). "Langmuir monolayers as unique physical models." Current Opinion in Colloid & Interface Science **19**(3): 176-182.
- Gohlke, C., *et al.* (1994). "Binding of DNA and RNA helices by bulged nucleotides observed by fluorescence resonance energy transfer." Proc. Natl. Acad. Sci. 11660-11664.
- Goldenberg, D. M. and R. M. Sharkey (2020). "Sacituzumab govitecan, a novel, third-generation, antibody-drug conjugate (ADC) for cancer therapy." Expert Opin Biol Ther **20**(8): 871-885.
- Goldenberg, D. M., *et al.* (2018). "The emergence of trophoblast cell-surface antigen 2 (TROP-2) as a novel cancer target." **9**(48).
- Goñi, F. M. and H. Ostolaza (1998). "E. coli alpha-hemolysin: a membrane-active protein toxin." Braz J Med Biol Res **31**(8): 1019-1034.
- Gray, L., *et al.* (1989). "A novel C-terminal signal sequence targets Escherichia coli haemolysin directly to the medium." J Cell Sci Suppl **11**: 45-57.
- Gujraty, K., *et al.* (2005). "Functional characterization of peptide-based anthrax toxin inhibitors." Mol Pharm **2**(5): 367-372.
- Habib, I., *et al.* (2013). "V(H)H (nanobody) directed against human glycoporphin A: a tool for autologous red cell agglutination assays." Anal Biochem **438**(1): 82-89.
- Hamaguchi, H. and H. Cleve (1972). "Solubilization and comparative analysis of mammalian erythrocyte membrane glycoproteins." Biochem Biophys Res Commun **47**(2): 459-464.

- Herlax, V. and L. Bakas (2003). "Acyl chains are responsible for the irreversibility in the *Escherichia coli* alpha-hemolysin binding to membranes." Chem Phys Lipids. **122**: 185-190.
- Herlax, V. and L. Bakas (2007). "Fatty acids covalently bound to alpha-hemolysin of *Escherichia coli* are involved in the molten globule conformation: implication of disordered regions in binding promiscuity." Biochemistry **46**(17): 5177-5184.
- Herlax, V., *et al.* (2010). "The lytic mechanism of *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin associated to outer membrane vesicles." Health. **2**: 484-492.
- Herlax, V., *et al.* (2009). "Relevance of fatty acid covalently bound to *Escherichia coli* alpha-hemolysin and membrane microdomains in the oligomerization process." J Biol Chem **284**(37): 25199-25210.
- Hu, C. M., *et al.* (2013). "A biomimetic nanosponge that absorbs pore-forming toxins." Nat Nanotechnol **8**(5): 336-340.
- Hui, D., *et al.* (2000). "Combinatorial analysis of the structural requirements of the *Escherichia coli* hemolysin signal sequence." J.Biol.Chem. **275**: 2713-2720.
- Humphrey, W., *et al.* (1996). J. Mol. Graph. **14**: 33–38.
- Hyland, C., *et al.* (2001). "Membrane interaction of *Escherichia coli* Hemolysin: Flotation and Insertion-Dependent Labeling by Phospholipid Vesicles." J. Bacteriol **183**: 5364-5370.
- Issartel, J., *et al.* (1991). "Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation." Nature **351**: 759-761.
- Johnsen, N., *et al.* (2019). " $\alpha$ -Haemolysin production, as a single factor, causes fulminant sepsis in a model of *Escherichia coli*-induced bacteraemia." **21**(6): e13017.

- Jordaan, S., *et al.* (2018). "Updates in the development of ImmunoRNases for the selective killing of tumor cells." Biomedicines **6**(1): 28.
- Jumper, J., *et al.* (2021). "Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold." Nature **596**(7873): 583-589.
- Kausaite, A., *et al.* (2007). "Surface plasmon resonance label-free monitoring of antibody antigen interactions in real time." Biochemistry and Molecular Biology Education **35**(1): 57-63.
- Khoshnood, S., *et al.* (2022). "Bacteria-derived chimeric toxins as potential anticancer agents." Front Oncol **12**: 953678.
- Kim, J., *et al.* (2020). "Critical Issues in the Development of Immunotoxins for Anticancer Therapy." Journal of Pharmaceutical Sciences **109**: 104-115.
- Koronakis, E., *et al.* (1995). "Protein exporter function and *in vivo* ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB." Mol. Microbiol **16**: 87-96.
- Koronakis, V., *et al.* (1991). "Energetically distinct early and late stages of HlyB/HlyD-dependent secretion across both *Escherichia coli* membranes." EMBO J. **10**: 3263-3272.
- Koronakis, V., *et al.* (1997). "Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals." Mol Microbiol. **23**: 617-626.
- Koronakis, V., *et al.* (2000). "Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export." Nature **405**: 914-919.
- Koufos, E., *et al.* (2016). "Use of a Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus Peptide To Inhibit Binding of a Bacterial Toxin to Cholesterol." Biochemistry **55**(34): 4787-4797.

- Krueger, E. and A. C. Brown (2019). "Inhibition of bacterial toxin recognition of membrane components as an anti-virulence strategy." Journal of Biological Engineering **13**(1): 4.
- Kudryashov, D. S., *et al.* (2008). "Characterization of the enzymatic activity of the actin cross-linking domain from the *Vibrio cholerae* MARTX Vc toxin." J Biol Chem **283**(1): 445-452.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
- Lally, E. T., *et al.* (1999). "The interaction between RTX toxins and target cells." Trends Microbiol. **7**(9): 356-361.
- Lally, E. T., *et al.* (1997). "RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells." J Biol Chem **272**(48): 30463-30469.
- Larabee, J. L., *et al.* (2017). "Intrinsic Toxin-Derived Peptides Destabilize and Inactivate *Clostridium difficile* TcdB." mBio **8**(3).
- Lim, K. B., *et al.* (2000). "*Escherichia coli*  $\alpha$ -Hemolysin (HlyA) Is Heterogeneously Acylated in Vivo with 14-, 15-, and 17-Carbon Fatty Acids." J Biol Chem **275**: 36698-36702.
- Lin, W., *et al.* (1999). "Identification of a *Vibrio cholera* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage." Proc. Natl Acad Sci USA **96**: 1071-1076.
- Lindahl, E., *et al.* (2001). "GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis." Mol. Model. Annu. **7**: 306-317.
- Linhartova, I., *et al.* (2010). "RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism." FEMS Microbiol Rev **34**(6): 1076-1112.
- Linhartova, I., *et al.* (2015). RTX Toxins: A Review: 1-29.

- Ludwig, A., *et al.* (1996). "Analysis of the in vivo activation of hemolysin from *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **178**(18): 5422-5430.
- Ludwig, A., *et al.* (1988). "The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca<sup>2+</sup>-dependent binding to erythrocytes." Mol Gen Genet. **214**: 553-561.
- Ludwig, A., *et al.* (1991). "Mutations affecting pore formation by haemolysin from *Escherichia coli*." Mol Gen Genet. **226**: 198-208.
- Machnicka, B., *et al.* (2014). "Spectrins: a structural platform for stabilization and activation of membrane channels, receptors and transporters." Biochim Biophys Acta **1838**(2): 620-634.
- Marrs, C. F., *et al.* (2005). "*Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?" FEMS Microbiol Lett **252**: 183–190.
- Marsh, D. (2006). "Comment on Interpretation of Mechanochemical Properties of Lipid Bilayer Vesicles from the Equation of State or Pressure–Area Measurement of the Monolayer at the Air–Water or Oil–Water Interface." Langmuir **22**(6): 2916-2919.
- Masin, J., *et al.* (2017). "The conserved tyrosine residue 940 plays a key structural role in membrane interaction of Bordetella adenylate cyclase toxin." Sci Rep **7**(1): 9330.
- Mathew, M. and R. Verma (2009). "Humanized immunotoxins: A new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy." Cancer Sci **100**: 1359–1365.
- Moayeri, M. and R. A. Welch (1997). "Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin." Infect Immun **65**(6): 2233-2239.

- Morova, J., *et al.* (2008). "RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(14): 5355-5360.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of Immunological Methods **65**(1): 55-63.
- Murray, B. O., *et al.* (2021). "Recurrent Urinary Tract Infection: A Mystery in Search of Better Model Systems." **11**.
- Mutter, N. L., *et al.* (2018). "Modular Pore-Forming Immunotoxins with Caged Cytotoxicity Tailored by Directed Evolution." ACS Chemical Biology **13**(11): 3153-3160.
- Nelson, G. J. (1967). "Lipid composition of erythrocytes in various mammalian species." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism **144**(2): 221-232.
- Nieto, J., *et al.* (1996). "Suppression of transcription polarity in the E.coli hemolysin operon by a short upstream element shared by polysaccharide and DNA transfer determinants." Mol.Microbiol **19**: 705-714.
- Nishikawa, K., *et al.* (2006). "A multivalent peptide library approach identifies a novel Shiga toxin inhibitor that induces aberrant cellular transport of the toxin." The FASEB Journal **20**: 2597-2599.
- Oehlert, G. W. (1992). "A Note on the Delta Method." The American Statistician **46**(1): 27-29.
- Osickova, A., *et al.* (2018). "Cytotoxic activity of *Kingella kingae* RtxA toxin depends on post-translational acylation of lysine residues and cholesterol binding." Emerging microbes & infections **7**(1): 178-178.
- Ostolaza, H., *et al.* (1993). "Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin alpha-haemolysin." Biochim Biophys Acta **1147**(1): 81-88.

- Palmer, M. (2004). "Cholesterol and the activity of bacterial toxins." FEMS Microbiol Lett **238**(2): 281-289.
- Papo, N. and Y. Shai (2003). "Exploring Peptide Membrane Interaction Using Surface Plasmon Resonance: Differentiation between Pore Formation versus Membrane Disruption by Lytic Peptides." Biochemistry **42**(2): 458–466.
- Pellet, S. and R. Welch (1996). "*Escherichia coli* hemolysin mutants with altered target cell specificity." Infect Immun **64**: 3081-3087.
- Pellett, S., *et al.* (1990). "Characterization of monoclonal antibodies against the *Escherichia coli* hemolysin." Infection and immunity **58**(3): 822-827.
- Phillips, M. C. (1972). The Physical State of Phospholipids and Cholesterol in Monolayers, Bilayers, and Membranes. Progress in Surface and Membrane Science. J. F. Danielli, M. D. Rosenberg and D. A. Cadenhead, Elsevier. **5**: 139-221.
- Praetorius, H. (2021). "The bacteria and the host: a story of purinergic signaling in urinary tract infections." Am J Physiol Cell Physiol **321**(1): C134-c146.
- Pucci, C., *et al.* (2019). "Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges." Ecancermedicalscience **13**: 961.
- Rauenbuehler, P. B., *et al.* (1982). "Identification of the hemoglobin binding sites on the inner surface of the erythrocyte membrane." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **692**(3): 361-370.
- Ristow, L. C., *et al.* (2019). "The Extracellular Domain of the  $\beta$ (2) Integrin  $\beta$  Subunit (CD18) Is Sufficient for *Escherichia coli* Hemolysin and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin Cytotoxic Activity." mBio **10**(4).
- Ristow, L. C. and R. A. Welch (2016). "Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: A cloak or a dagger?" Biochim Biophys Acta **1858**(3): 538-545.

- Saffioti, N. A., *et al.* (2022). "Interactive Dynamics of Cell Volume and Cell Death in Human Erythrocytes Exposed to  $\alpha$ -Hemolysin from *Escherichia coli*." Int J Mol Sci **23**(2).
- Šakanovič, A., *et al.* (2019). "Surface Plasmon Resonance for Measuring Interactions of Proteins with Lipids and Lipid Membranes." Methods Mol Biol **2003**: 53-70.
- Sanchez-Magraner, L., *et al.* (2006). "Membrane insertion of *Escherichia coli* alpha-hemolysin is independent from membrane lysis." J. Biol. Chem **281**: 5461-5467.
- Sánchez-Magraner, L., *et al.* (2010). "Interdomain  $\text{Ca}(2+)$  effects in *Escherichia coli* alpha-haemolysin:  $\text{Ca}(2+)$  binding to the C-terminal domain stabilizes both C- and N-terminal domains." Biochim Biophys Acta **1798**(6): 1225-1233.
- Sanchez-Magraner, L., *et al.* (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.
- Sarin, V. K., *et al.* (1981). "Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction." Anal Biochem **117**(1): 147-157.
- Schindel, C., *et al.* (2001). "Interaction of *Escherichia coli* hemolysin with biological membranes: A study using cysteine scanning mutagenesis." Eur J Biochem **268**: 800-808.
- Shai, Y. and Z. Oren (2001). "From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides." Peptides **22**: 1629-1641.
- Skals, M., *et al.* (2010). "*Escherichia coli* alpha-hemolysin triggers shrinkage of erythrocytes via  $\text{K}(\text{Ca})3.1$  and  $\text{TMEM16A}$  channels with subsequent phosphatidylserine exposure." J Biol Chem. **285**(20): 15557-15565.

- Skals, M., *et al.* (2009). "Alpha-hemolysin from *Escherichia coli* uses endogenous amplification through P2X receptor activation to induce hemolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(10): 4030-4035.
- Skals, M. and H. A. Praetorius (2013). "Mechanisms of cytolysin-induced cell damage -- a role for auto- and paracrine signalling." Acta Physiol (Oxf) **209**(2): 95-113.
- Soloaga, A., *et al.* (1996). "Purification of *Escherichia coli* pro-haemolysin, and a comparison with the properties of mature  $\alpha$ -haemolysin." Eur. J. Biochem. **238**: 418-422.
- Stanley, P., *et al.* (1996). "Independent interaction of the acyltransferase HlyC with two maturation domains of the *Escherichia coli* toxin HlyA." Mol Microbiol **20**(4): 813-822.
- Stanley, P., *et al.* (1998). "Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: A unique protein lipidation mechanism underlying toxin function." Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**: 309-333.
- Stanley, P., *et al.* (1998). "Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: A unique protein lipidation mechanism underlying toxin function." Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**: 309-333.
- Stanley, P., *et al.* (1994). "Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin." Science **266**: 1992-1996.
- Strack, K., *et al.* (2019). "Induction of erythrocyte microvesicles by *Escherichia Coli* Alpha hemolysin." Biochemical Journal **476**: 3455–3473.
- Strandberg, E. and J. A. Killian (2003). "norkeling of lysine side chains in transmembrane helices: how easy can it get?" FEBS Lett. **544**: 69–73.
- Strebhardt, K. and A. Ullrich (2008). "Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. ." Nat. Rev.Canc. **8**: 473–480.

- Tate, C. G., *et al.* (1989). "Studies on human red-cell membrane glycoporphin A and glycoporphin B genes in glycoporphin-deficient individuals." Biochem J. **263**(3): 993-996.
- Tejuca, M., *et al.* (2009). "Sea anemone cytolsins as toxic components of immunotoxins." Toxicon **54**: 1206–1214.
- Tejuca, M., *et al.* (1999). "Antiparasite activity of sea anemone cytolsins on *Giardia duodenalis* and specific targeting with anti-*Giardia* antibodies." Int J Parasitol **29**: 489–498.
- Tejuca, M., *et al.* (2004). "Construction of an immunotoxin with the pore forming protein StI and ior C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line." Int Immunopharmacol **4**(6): 731-744.
- Teo, M. Y. M., *et al.* (2021). "Development of a single-chain fragment variable fused-mutant HALT-1 recombinant immunotoxin against G12V mutated KRAS colorectal cancer cells." PeerJ **9**: e11063.
- Terlizzi, M. E., *et al.* (2017). "UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies." **8**.
- Thompson, J. D., *et al.* (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-4680.
- Thorpe, P. E., *et al.* (1978). "Toxicity of diphtheria toxin for lymphoblastoid cells is increased by conjugation to antilymphocytic globulin. ." Nature. **271**(5647): 752-755.
- Timothy, K. (2017). The Pathogenesis of *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. *Escherichia coli*. S. Amidou. Rijeka, IntechOpen: Ch. 3.

- Trerotola, M., *et al.* (2013). "Trop-2 promotes prostate cancer metastasis by modulating  $\beta(1)$  integrin functions." Cancer Res **73**(10): 3155-3167.
- Uhlen, P., *et al.* (2000). "Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces  $Ca^{2+}$  oscillations in renal epithelial cells." Nature **405**: 694–697.
- Valeva, A., *et al.* (2008). "Putative identification of an amphipathic alpha-helical sequence in hemolysin of *Escherichia coli* (HlyA) involved in transmembrane pore formation." Biol Chem **389**(9): 1201-1207.
- Valeva, A., *et al.* (2005). "Binding of *Escherichia coli* Hemolysin and Activation of the Target Cells is Not Receptor-dependent." J Biol Chem **280**: 36657-36663.
- Van Der Spoel, D., *et al.* (2005). "GROMACS: fast, flexible, and free." J. Comput. Chem. **26**: 1701–1718.
- Varadi, M., *et al.* (2021). "AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models." Nucleic Acids Research **50**(D1): D439-D444.
- Vazquez, R., *et al.* (2014). "Novel evidence for the specific interaction between cholesterol and an RTX toxin." Biochemical Journal **458**: 481-489.
- Vazquez, R., *et al.* (2014). "Novel evidence for the specific interaction between cholesterol and  $\alpha$ -haemolysin of *Escherichia coli*." Biochemical Journal **458**: 481-489.
- Vazquez, R. F., *et al.* (2017). "Interaction of acylated and unacylated forms of *E. coli* alpha-hemolysin with lipid monolayers: a PM-IRRAS study." Colloids Surf B Biointerfaces **158**: 76-83.
- Velasquez, F. C., *et al.* (2015). "Induction of eryptosis by low concentrations of *E. coli* alpha-hemolysin." Biochim Biophys Acta **1848**(11 Pt A): 2779-2788.

- Volynsky, P. E., *et al.* (2021). "Interaction of Peptides Containing CRAC Motifs with Lipids in Membranes of Various Composition." Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology **15**(2): 120-129.
- Wang, C., *et al.* (2020). "Alpha-hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* induces GM-CSF-mediated acute kidney injury." Mucosal Immunology **13**(1): 22-33.
- Wang, D., *et al.* (2023). "Construction of a novel TROP2/CD3 bispecific antibody with potent antitumor activity and reduced induction of Th1 cytokines." Protein Expression and Purification **205**: 106242.
- Watanabe-Takahashi, M., *et al.* (2021). "Identification of a peptide motif that potently inhibits two functionally distinct subunits of Shiga toxin." Communications Biology **4**(1): 538.
- Waterhouse, A. M., *et al.* (2009). "Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench." Bioinformatics **25**(9): 1189-1191.
- Welch, M. M. a. R. (1994). "Effects of temperature, time, and toxin concentration on lesion formation by the *Escherichia coli* hemolysin." Infection and immunity **62**(10): 4124-4134.
- Welch, M. M. a. R. (1997). "Prelytic and lytic Conformation of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin." Infection and immunity **65**(6): 2233-2239.
- Welch, R. (2001). "RTX Toxin Structure and Function: A Story of Numerous Anomalies and Few Analogies in Toxin Biology." Current Top Microbiol Immunol **257**: 85-111.
- Welch, R. A. (1991). "Pore-forming cytolisins of Gram-negative bacteria." Mol. Microbiol **5**: 521-528.
- Welch, R. A., *et al.* (1983). "Molecular cloning and physical characterization of a chromosomal hemolysin from *Escherichia coli*." Infect Immun **42**(1): 178-186.

- Wiles, T. J., *et al.* (2008). "Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*." Exp Mol Pathol **85**(1): 11-19.
- Worsham, L. M., *et al.* (2005). "Thermodynamics of a protein acylation: activation of *Escherichia coli* hemolysin toxin." Biochemistry **44**: 1329-1337.
- Worsham, L. M., *et al.* (2001). "Insights into the catalytic mechanism of HlyC, the internal protein acyltransferase that activates *Escherichia coli* hemolysin toxin." Biochemistry **40**(45): 13607-13616.
- Zagaglia, C., *et al.* (2022). "Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli* Strains-New Strategies for an Old Pathogen." Microorganisms **10**(7).
- Zaman, S., *et al.* (2019). "Targeting Trop-2 in solid tumors: future prospects." Onco Targets Ther **12**: 1781-1790.
- Zeng, P., *et al.* (2016). "Impact of TROP2 expression on prognosis in solid tumors: A Systematic Review and Meta-analysis." Scientific Reports **6**(1): 33658.