

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología

Informe Escrito Final

**Efecto de un residuo de prolina en la posición dos de la estructura
primaria de una actinoporina obtenida de la anémona marina**
Anthopleura nigrescens (Verril, 1928)

Tesis presentada como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Biotecnología

Jairo Luna Miranda

Campus Omar Dengo
Heredia, 2019

Este trabajo de graduación fue _____ por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.

Grado Académico, nombre

Presidente del Tribunal

Grado Académico, nombre

Director de la Escuela de Ciencias Biológicas

Ph.D. Javier Alvarado Mesén

Tutor

Ph.D. Frank Solano Campos

Asesor

Lic. Carolina Sancho Blanco

Asesora

Grado Académico, nombre

Invitado(a) especial

Resumen

Las actinoporinas son toxinas formadoras de poros producidas por las anémonas marinas, rondan los 20 kDa, son básicas, la mayoría carecen de cisteína en su estructura y pertenecen a una familia multigénica por lo que son producidas distintas isoformas por una misma anémona. Para la formación de poros es importante la hélice α cercana al amino terminal, al igual que los primeros 30 residuos cercanos a este sitio. En el año 2012 se reportó por primera vez la presencia de la especie *Anthopleura nigrescens* en Costa Rica. Empleando técnicas de biología molecular se identificaron alrededor de cuatro isoformas de actinoporina producidas por esta especie y se logró clonar, expresar, purificar y caracterizar a nivel molecular y funcional una de estas isoformas (nigrelisina, Ng). En las isoformas de esta toxina se encontraron alrededor de tres secuencias con un residuo de prolina en la posición dos, captando la atención de los investigadores ya que la prolina es un residuo que por lo general no forma parte de hélices- α debido a que su estructura cíclica es desestabilizadora de este tipo de estructura secundaria, la cual es fundamental para la formación del poro en estas toxinas. Además, en todas las actinoporinas reportadas a la fecha no se había encontrado ninguna con este residuo en su amino terminal. Partiendo de estos antecedentes, para realizar esta investigación de tesis, se procedió a la obtención de un mutante de Ng con un residuo de prolina en la posición dos. Esta toxina mutada se expresó y purificó para determinar el efecto de dicho residuo sobre su actividad biológica mediante ensayos de actividad hemolítica. Acorde a las pruebas realizadas se obtuvo que la mutación conllevó a una disminución de la actividad lítica de Ng, la cual fue evaluada mediante la determinación de su HC₅₀.

Palabras claves: actinoporina, prolina, mutación, hélice- α , actividad hemolítica.

Agradecimiento

Gracias a mi tutor el Ph.D. Javier Alvarado Mesén por la oportunidad, orientación, enseñanzas y disposición para el desarrollo de este trabajo de tesis, contribuyendo a mi desarrollo como profesional al compartir conmigo su conocimiento y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo. Gracias a mis asesores el Ph.D. Frank Solano Campos y la Lic. Carolina Sancho Blanco por su oportuno apoyo y por brindar la confianza de trabajar en sus respectivos laboratorios cuando fue necesario, además de sus sugerencias para enriquecer esta investigación y por su disponibilidad en todo momento.

Agradecer también al profesor M.P.M Abad Rodríguez Rodríguez y personal del Laboratorio de Biquímica y Biotecnología de Proteínas por la ayuda brindada.

Gracias al personal administrativo de la Universidad Nacional, tanto de Biología como de la universidad en general que de alguna u otra forma han influido en el viaje que ha sido transcurso de esta carrera. Incluyendo a todos los profesores que aportaron a mi formación académica con sus enseñanzas y valores como profesionales.

Gracias a ti lector de esta tesis por invertir tiempo en leer este apartado y demás contenido, y ojalá que te sea de utilidad la información de la misma.

Gracias a los amigos, familiares y todo al que he conocido, por los momentos compartidos en los que me han brindado su apoyo y orientación, a la gente que me apoya siempre. No importa dónde estén, les estoy agradecido, especialmente a SarahKhy por su apoyo a pesar de la distancia.

Finalmente, un profundo agradecimiento a mi madre y padre por su amor, enseñanzas y ayuda incondicional. Es gracias a ustedes que puedo ir hacia el mañana con fuerzas. Gracias por todo.

Dedicatoria

El presente trabajo está dedicado a mi madre y padre, por su amor, apoyo y guía en todos estos años para mi formación tanto profesional como de ser humano. Es un privilegio ser su hijo.

Índice

Miembros del Tribunal	I
Resumen	II
Agradecimiento	III
Dedicatoria	IV
Índice	V
Índice de cuadros	VII
Índice de figuras	VIII
Abreviaturas	IX
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación.....	6
1.3 Planteamiento del problema a investigar	9
1.4 Objetivos	10
1.4.1 Objetivo General	10
1.4.2 Objetivos Específicos.....	10
2. Marco Teórico	11
2.1 <i>Anémonas marinas</i>	11
2.2 <i>Anthopleura nigrescens</i>	12
2.3 <i>Toxinas formadoras de poros (PFTs)</i>	12
2.4 <i>Actinoporinas</i>	13
2.5 <i>Mecanismo de acción</i>	15
2.6 <i>Isoformas</i>	16
2.7 <i>Residuos de prolina en estructuras proteicas</i>	17
2.8 <i>Estudios Moleculares con Actinoporinas</i>	18
3. Marco Metodológico	20
3.1 <i>Material biológico</i>	20
3.2 <i>Transformación de células BL21 Star (DE3)</i>	20
3.3 <i>Expresión de la actinoporina recombinante NgPro2</i>	21
3.5 <i>Purificación de la actinoporina recombinante</i>	22
3.6 <i>Comparación de la actividad hemolítica de NgPro2 y Ng</i>	23
4. Resultados	25

5. Discusión	30
6. Conclusiones	33
7. Recomendaciones	34
8. Referencias	35

Índice de cuadros

Cuadro 1. Pruebas evaluadas para el análisis de varianzas de los datos.	28
--	----

Índice de figuras

Figura 1 Estructura tridimensional de una actinoporina (StII) en su estado soluble en agua.....	5
Figura 2 Esquema general de la clasificación taxonómica del <i>phylum</i> Cnidaria	11
Figura 3 Estructura tridimensional de una actinoporina (EqII).....	14
Figura 4 Modelo de la formación de poros transmembrana.....	16
Figura 5 Secuencias deducidas del segmento que codifica para la proteína madura Ng (A) y NgPro2 (B).....	25
Figura 6 Cromatografía de intercambio catiónico del extracto celular y evaluación de la homogeneidad del pico cromatográfico por SDS-PAGE (4-12%).....	26
Figura 7 Curva de calibración para estimar la concentración de Ng y NgPro2 mediante el método Bradford	27
Figura 8 Actividad hemolítica de Ng y NgPro2.....	28

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANDEVA	Análisis de Varianzas
AH	Actividad hemolítica
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BME	β -Mercaptoetanol
CDC	Citolisinas dependientes de colesterol
CJTOX	Toxina de la anemona <i>Cribrinopsis japonica</i>
DO	Densidad óptica
EqT	Equinotoxina de <i>Actinia equina</i>
EUA	Estados Unidos de América
FraC	Fragaceatoxina C de <i>Actinia fragacea</i>
HC ₅₀	Concentración de toxina necesaria para lograr la lisis del 50% de eritrocitos
Hmg	Magnificalisina de <i>Heteractis magnifica</i>
kDa	Kilodalton
LB	Caldo lisogénico; del inglés lysogeny broth
Ng	Nigrelisina de <i>Anthopleura nigrescens</i>
Or	Citolisina de <i>Oulactis orientalis</i>

pI	Punto isoeléctrico
PFT	Toxinas formadoras de poros; del inglés: pore-forming toxins
PM	Peso molecular
PstX	Toxina de <i>Phyllodiscus semoni</i>
RACE-PCR	Amplificación rápida de los extremos de ADN copia; del inglés Rapid amplification of cDNA ends
RPM	Revoluciones por minuto
RTXA	Toxina de <i>Radianthus macrodactylus</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio; del inglés: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SrcI	Citolisina de <i>Sagartia rosea</i>
St	Esticolisina de <i>Stichodactyla helianthus</i>
TBS	Tampón Tris-salino; del inglés: Tris-Buffered Saline
UA	Unidades arbitrarias

1. Introducción

Las actinoporinas son toxinas formadoras de poros en membranas biológicas y membranas modelo producidas por las anémonas de mar. Su purificación ha permitido el descubrimiento de varias isoformas de estas toxinas; si bien se sabe que estas isoformas presentan actividad lítica que difiere entre ellas, en la literatura existente no se ha reportado ninguna actinoporina que en su estructura primaria presente una prolina en la posición dos, por lo que el estudio de cómo se ve afectada la función de estas proteínas por la inserción de este residuo cerca del amino terminal se plantea como una oportunidad para ampliar el entendimiento de las actinoporinas.

1.1 Antecedentes

En años recientes el estudio de las anémonas marinas ha aumentado debido al potencial biotecnológico que presentan algunas de sus moléculas, principalmente para el área biomédica. En Costa Rica son pocas las investigaciones que se han realizado al respecto, en comparación al seguimiento que se les ha dado a estos organismos en otros países.

A nivel mundial, las investigaciones relacionadas con las anémonas marinas han permitido la identificación de las actinoporinas, las cuales pertenecen al grupo conocido como proteínas formadoras de poros y son, entre otras, las causantes de la actividad lítica del veneno de estos animales (Anderluh & Maček, 2002).

El empleo de técnicas moleculares y de bioquímica clásica han facilitado los estudios de estas proteínas permitiendo profundizar en la caracterización y entendimiento de la funcionalidad de las mismas. Algunas de las características que se han logrado establecer consisten en su peso molecular, que rondan los 20 kDa y sus puntos isoelectricos que por lo general son básicos, con valores superiores a 9 (Anderluh & Maček, 2002). Estructuralmente se ha encontrado que la mayoría de las actinoporinas no contienen cisteína y en cuanto a su funcionalidad, se ha esclarecido su mecanismo de acción, el cual consiste en la formación de poros en membranas celulares que contienen esfingomielina (Anderluh & Maček, 2002).

En adición a lo anterior, se ha determinado que en medio acuoso las actinoporinas se mantienen en estado monomérico y globular, y que al interactuar con membranas celulares estas toxinas se integran a las membranas como estructuras oligoméricas conllevando a la formación de poros, proceso en el que el amino terminal y la secuencia de los primeros treinta aminoácidos tienen un rol muy importante (Casallanovo *et al.*, 2006; Hinds, Zhang, Anderluh, Hansen, & Norton, 2002; Hong *et al.*, 2002; Mancheño, Martín-Benito, Martínez-Ripoll, Gavilanes, & Hermoso, 2003; Mechaly *et al.*, 2011; Rojko *et al.*, 2013).

Con base en lo anterior, se ha establecido que los parámetros de hidrofobicidad y distribución de cargas en el amino terminal son algunos de los factores que tienen efecto sobre la actividad lítica (Cilli *et al.*, 2007; Monastyrnaya *et al.*, 2010; Ros *et al.*, 2011). Esto es debido a que la región del amino terminal es el segmento más variable en la estructura primaria de las actinoporinas, por lo que ligeros cambios en esta región causan diferencias funcionales que se evidencian en el mecanismo para la formación del poro (Cilli *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2001; Monastyrnaya *et al.*, 2010; Pazos *et al.*, 2006).

La variación de los residuos de la estructura primaria se debe a que las actinoporinas son miembros de una familia multigénica, por lo que una misma anémona produce distintas isoformas, las cuales presentan un alto grado de homología estructural entre ellas (Anderluh *et al.*, 1999b; Monastyrnaya, Zykova, Apalikova, Shwets, & Kozlovskaya, 2002; Valle *et al.*, 2015; Wang, Yap, Chua, & Khoo, 2008).

Por la importancia de la composición de la estructura primaria sobre el mecanismo de acción, varias investigaciones se han enfocado en determinar la secuencia de aminoácidos de las actinoporinas que han sido purificadas de algunas especies, tales como *Actinia equina* (EqT II, IV y V) (Anderluh, Pungerčar, Štrukelj, Maček, & Gubenšek, 1996; Belmonte *et al.*, 1994; Maček & Lebez, 1988; Pungerčar, Anderluh, Maček, Franc, & Štrukelj, 1997) *Stichodactyla helianthus* (StI y StII) (Blumenthal & Kem, 1983; De Los Rios *et al.*, 2000; Lanio *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2001), *Heteractis magnifica* (HMgIII) (Samejima *et al.*, 2000; Wang, Chua, & Khoo, 2000), *Radianthus macrodactylus*, syn. *Heteractis crista* (RTXA y RTXII) (Il'ina *et al.*, 2006; Klyshko *et al.*, 2004), *Oulactis orientalis* (OrA y OrG) (Il'ina *et al.*, 2005), *Sagartia rosea* (SrcI) (Jiang *et al.*, 2002), *Phyllodiscus semoni* (PsTX)

(Nagai *et al.*, 2002), *Cribrinopsis japonica* (CJTOXI y CJTOXII) (Tsutsui & Sato, 2018) y *Anthopleura nigrescens* (Ng) (Alvarado-Mesén *et al.*, 2019), entre otras.

Se han planteado algunas hipótesis para justificar la razón por la cual un individuo de anémona produce distintas isoformas. Olivera *et al.*, (1990) y Valle *et al.*, (2015) plantean que la producción de diferentes actinoporinas es necesaria para aumentar el espectro de acción sobre la diversidad de presas presentes en el medio. Incluso se han comparado las actinoporinas con las inmunoglobulinas, en el sentido de emplear las isoformas como un sistema defensivo rudimentario (Wang *et al.*, 2008). Recientemente, Rivera-de-Torre *et al.*, (2016) demostraron la existencia de un efecto sinérgico entre las isoformas Stn I y Stn II, potenciando el veneno de la anémona.

La determinación de las secuencias aminoacídicas se ha logrado inicialmente por el aislamiento y purificación de las actinoporinas. La purificación se realiza mediante la aplicación de técnicas cromatográficas basadas en el punto isoeléctrico de dichas moléculas (Lanio *et al.*, 2001; Maček & Lebez, 1988; Valle *et al.*, 2016). Sin embargo, las isoformas no solo presentan diferencias en su punto isoeléctrico, sino que, también difieren en su peso molecular, haciendo necesario optimizar los protocolos de purificación establecidos, o bien, realizar una combinación de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular para lograr un alto grado de pureza, según sea el comportamiento de purificación de cada isoforma. (Bellomio *et al.*, 2009; Kem & Dunn, 1988; Lanio *et al.*, 2001; Norton *et al.*, 1990; Valle *et al.*, 2016).

Debido a que las variaciones de la secuencia de residuos aminoacídicos afectan la funcionalidad de las actinoporinas, se ha implementado el uso de péptidos sintéticos y de mutaciones sitio dirigidas para estudiar la relación de los residuos sobre la función biológica de estas toxinas (Casallanovo *et al.*, 2006; Cilli *et al.*, 2007; Ros *et al.*, 2011). Con ayuda de estas técnicas, se han determinado algunos residuos de aminoácidos y su posición como factores importantes para el proceso de la formación del poro. Tal es el caso de la valina en la posición 60 (Val60), la cual es altamente conservada en la estructura de estas toxinas. Se ha demostrado que Val60 es un residuo involucrado en el ensamblaje de monómeros y puede utilizarse para estudios en la oligomerización (Morante, Caaveiro, Viguera, Tsumoto, & González-Mañas 2015b).

En las actinoporinas, la oligomerización es clave durante la formación del poro (Anderluh, Barlič, Potrich, Maček, & Menestrina, 2000). En la actinoporina FraC, por ejemplo, el extremo amino se une con la cadena lateral de la fenilalanina en la posición 16 (Phe16) insertada en una cavidad hidrófoba del núcleo β , esto en su forma de monómero; en el caso de la dimerización, la Val60 de una unidad desplaza la Phe16 de otra unidad generando el despliegue parcial y el desprendimiento adicional del extremo del amino terminal hacia la membrana (Subburaj, Ros, Hermann, Tong, & García-Sáez, 2015). En este caso la mutación dirigida se utilizó de manera que se cambió el residuo en la posición 16 a partir del amino terminal, obteniéndose como resultado que la actinoporina, debido a la mutación, en membranas con alto contenido de colesterol no logra la formación del poro (Morante, Caaveiro, Tanaka, González-Mañas, & Tsumoto, 2015a).

También se ha estudiado el lazo β 4- β 5 (Figura 1), que comprende los residuos 76-84 de StI. Dicho segmento es flexible (García-Linares *et al.*, 2013, López-Castilla, Pazos, Schreier, & Pires, 2014) y los residuos que lo conforman son importantes en el proceso de unión de la actinoporina a la membrana y en la consecuente formación del poro (Pardo-Cea *et al.*, 2011; García-Linares *et al.*, 2013). Un ejemplo de lo anterior es la prolina en la posición 80. En esta posición la prolina es un residuo conservado en la familia de las actinoporinas y su exposición dentro del lazo β 4- β 5 es mayor a otros residuos que constituyen este segmento (Anderluh *et al.*, 1999a; Pulagam & Steinhoff, 2013). Para estudiar la importancia de la prolina en esta posición se diseñó y purificó el mutante StI P80C. La mutación consistió en sustituir un residuo de prolina en la posición 80 por un residuo de cisteína para su posterior evaluación mediante espectroscopía de fluorescencia y de resonancia paramagnética electrónica en el estado de unión a la membrana, además de evaluar su actividad hemolítica (Hervis *et al.*, 2014). Otro estudio en esta línea de investigación respaldó la importancia del residuo de triptófano en la posición 111 en la unión de la StI con la membrana celular mediante mutación dirigida, ya que el Trp111 se encuentra en una región con residuos aromáticos que facilitan el anclaje a la membrana (Anderluh *et al.*, 1999a; Anderluh *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2002).

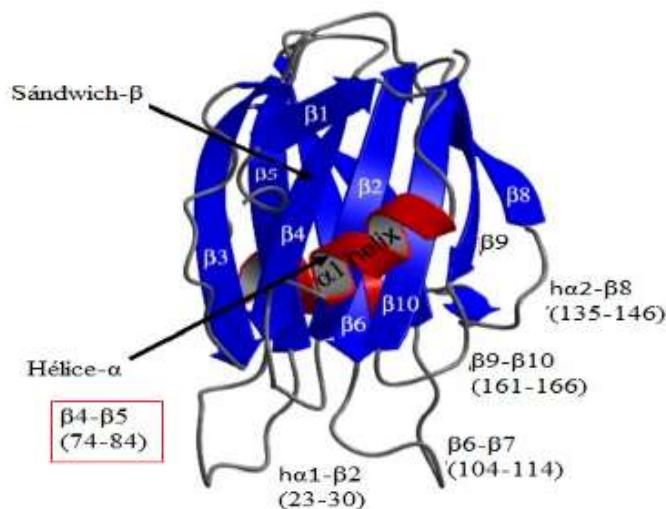


Figura 1. Estructura tridimensional de esticolisina I en su estado soluble en agua. Se muestran elementos de la estructura secundaria y el número de residuos en los bucles. El recuadro indica el lazo $\beta 4$ - $\beta 5$ (Tomado de Valle *et al.*, 2015).

A pesar de los diversos estudios realizados con estas toxinas, en ninguna de las secuencias deducidas se ha encontrado la presencia de un residuo de prolina en el amino terminal. Lo anterior podría deberse a que este es un aminoácido ciclado que generalmente no se encuentra en las hélices- α de proteínas solubles en agua, por lo que probablemente a nivel evolutivo, las isoformas con prolina en dicha posición están desfavorecidas (Barlow & Thornton, 1988; Reiersen & Rees, 2001; Woolfson & Williams, 1990).

Las investigaciones sobre las actinoporinas han permitido ampliar el conocimiento acerca de la función biológica de estas proteínas, lo que ha facilitado entender parte del mecanismo molecular de una proteína para interactuar con las membranas celulares y provocar perturbación en esta última, mediante la formación de un poro acuoso. Comprender el mecanismo de acción se ha convertido en una herramienta para la construcción de moléculas quiméricas, antiparasitarias e inmunotoxinas contra células tumorales (Avila, Mateo-Acosta, & Lage, 1989; Tejuca, Anderluh, & Dalla-Serra, 2009;; Tejuca *et al.*, 1999; Tejuca *et al.*, 2004). Evidenciando la importancia de desarrollar estudios enfocados en conocer a fondo la funcionalidad de estas proteínas con gran potencial biotecnológico.

En el caso de Costa Rica, se reportó la presencia de la anémona marina *Anthopleura nigrescens*, siendo además el primer reporte de esta especie en América Central (Acuña,

Alvarado-Mesén, Garese, & Cortés, 2012). Estudios posteriores con esta especie han permitido determinar la presencia de actinoporinas en su veneno, lográndose su aislamiento y purificación parcial (Alvarado-Mesén *et al.*, 2014), y recientemente su clonación, purificación y caracterización tanto funcional como estructural (Alvarado-Mesén *et al.*, 2019), con el fin de ampliar el conocimiento de las actinoporinas purificadas e introducir al país al estudio de estas toxinas con características prometedoras para aplicaciones biotecnológicas.

1.2 Justificación

El desarrollo de investigaciones para la obtención de nuevos productos a partir de fuentes naturales tiene como primer paso la detección, identificación y caracterización de compuestos bioactivos. En este sentido, la alta biodiversidad de los ecosistemas marinos atrae el interés de la comunidad científica, cuyos estudios han revelado que las especies de estas zonas representan una fuente de moléculas que tienen un gran potencial para aplicaciones biotecnológicas en distintos ámbitos.

Entre las especies de interés se encuentran las anémonas marinas. Estos organismos mayoritariamente sésiles producen venenos de alta complejidad molecular. Dentro de este cóctel de moléculas se han encontrado neurotoxinas, inhibidores de proteasas, fosfolipasas y toxinas formadoras de poros conocidas como actinoporinas (Anderluh & Maček, 2002). Dichas moléculas tienen gran potencial para aplicaciones biotecnológicas como es el caso de los inhibidores de proteasas, los cuales son de gran interés para la industria farmacéutica ya que se pueden emplear para inhibir la degradación de proteínas de interés, en sus etapas de purificación de su fuente natural o cuando las mismas son obtenidas de forma recombinante (Agbowuro, Huston, Gamble, & Tyndall, 2018). También, algunos parásitos como *Plasmodium*, en su ciclo de vida utilizan proteasas para lisar sus células hospederas, por lo tanto, encontrar un inhibidor para estas enzimas parasitarias, permitiría la elaboración de un fármaco efectivo contra este parásito (Koussis *et al.*, 2017). Por otro lado, las fosfolipasas, son de interés industrial para la elaboración de detergentes, nutracéuticos, biocombustibles, entre otros (Borrelli, & Trono, 2015). Por último, las actinoporinas han demostrado su

potencial para uso biomédico en el diseño de fármacos antitumorales o antiparasitarios (Tejuca *et al.*, 1999; Tejuca *et al.*, 2009).

En cuanto a investigaciones acerca de las actinoporinas, se ha encontrado que un mismo individuo de anémona produce diversas isoformas de dicha toxina. Estas isoformas por lo general presentan una actividad biológica potenciada o reducida acorde a los aminoácidos que conforman su estructura (Anderluh & Maček, 2002), haciendo necesario el estudio de las isoformas para un mejor entendimiento de cómo los cambios que presentan estas proteínas en su estructura afecta su funcionalidad.

Recientemente se reportó la presencia de la anémona marina *Anthopleura nigrescens* en Costa Rica (Acuña *et al.*, 2012) y tanto en su extracto crudo como en una fracción parcialmente pura, se detectó actividad hemolítica inhibible por esfingomielina (Alvarado-Mesén *et al.*, 2014). Un estudio más profundo utilizando una combinación de técnicas de proteómica y de biología molecular permitió la detección de al menos cinco isoformas de actinoporinas en esta anémona, de las cuales cuatro presentan un residuo de prolina en la posición dos de su estructura (Alvarado-Mesén *et al.*, 2019). Lo particular de estas isoformas es que la prolina es un aminoácido ciclado disruptor de hélices que no ha sido reportado en dicha posición en otras actinoporinas.

Con base en lo anterior, ha surgido la hipótesis de que una prolina en la posición dos de una actinoporina podría ser la causante de una actividad biológica reducida o nula debido a que la región amino terminal es clave en el mecanismo de formación de poro de estas toxinas y esta región se caracteriza porque su estructura secundaria está constituida por una hélice- α . Por lo cual el estudio de este residuo en dicha posición se plantea como una oportunidad para el entendimiento de su función, ya que la naturaleza cíclica de la prolina podría afectar la extensión de la hélice durante la formación del poro transmembranoso.

Para evaluar dicha hipótesis, se pretendía utilizar la isoforma que tuviese parámetros de similitud e identidad parecidos a Ng. Sin embargo, la actividad lítica de las isoformas con prolina podría no depender únicamente de este residuo sino también de los residuos aminoacídicos en los que estas isoformas difieren respecto a nigrelisina. Por lo que la mejor opción para evaluar el efecto de la prolina en la posición dos sobre la actividad lítica consiste en utilizar la misma secuencia de nigrelisina con la variante de introducir un residuo de

prolina en dicha posición, ya que se consideró que la prolina podría ser el principal elemento involucrado que podría afectar la capacidad lítica de las isoformas. Esto debido a que la prolina es un disruptor de hélices- α (Venselaar *et al.*, 2010), estructura secundaria de gran importancia en la función de estas proteínas.

El segmento del amino terminal de las actinoporinas es importante para la formación del poro. Sin embargo, es una región cuyos aminoácidos son poco conservados y estas variaciones afectan la capacidad permeabilizante de cada actinoporina (Cilli *et al.*, 2007; Ros *et al.*, 2011; Monastyrnaya *et al.*, 2010). En trabajos relacionados a este tema se han probado las propiedades funcionales de algunos residuos aminoacídicos en las actinoporinas, sin embargo, en ninguna de las investigaciones descritas se ha evaluado una prolina en la posición dos, por lo que el análisis a nivel molecular para evaluar su funcionalidad mediante la actividad lítica es un primer paso para su estudio.

En el país existen pocos antecedentes de exploración de la fauna marina local con el fin de encontrar moléculas biológicamente activas. Esto ha limitado el desarrollo de estudios de actividad *in vitro* de moléculas para su posterior estudio *in vivo* con el propósito de hacerlas viables para una determinada industria. Únicamente se registran unas pocas publicaciones de proyectos al respecto (Alvarado-Mesén *et al.*, 2014; Alvarado-Mesén *et al.*, 2019; Borbón-Alpízar, 2009; Borbón-Alpízar *et al.*, 2016). Por ende, para profundizar en el conocimiento de moléculas con potencial biotecnológico, en este caso las actinoporinas, se plantea este proyecto de tesis, cuyo objetivo principal es determinar el efecto de un residuo de prolina en la posición dos de la estructura primaria de una toxina recombinante de actinoporina obtenida de *A. nigrescens* sobre su actividad citolítica.

1.3 Planteamiento del problema a investigar

El estudio estructural y funcional de isoformas de actinoporinas es importante para el entendimiento de su actividad lítica y de la relación estructura-función de las proteínas en general, por lo que se plantea la siguiente interrogante: ¿Cuál es el efecto de un residuo de prolina en la posición dos de la secuencia de una actinoporina sobre su actividad citolítica?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Determinar el efecto de un residuo de prolina en la posición dos de la estructura primaria de una actinoporina recombinante obtenida de la anémona marina *A. nigrescens* sobre su actividad lítica mediante técnicas de clonación, expresión, purificación y caracterización funcional de proteínas, para una mejor comprensión de la relación estructura-función de estas moléculas con gran potencial biomédico.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Emplear técnicas de biología molecular para la expresión *in vitro* en *E. coli* BL21 de una isoforma de actinoporina de *A. nigrescens* con una prolina en la posición dos de su estructura primaria.
2. Desarrollar el protocolo para la purificación de la proteína recombinante mediante la combinación de técnicas cromatográficas y electroforéticas.
3. Comparar la actividad citolítica de la isoforma con prolina en la posición dos de su estructura primaria con otra isoforma activa que carece de este residuo aminoacídico.

2. Marco Teórico

2.1 Anémonas marinas

El filo Cnidaria se divide en dos subfilos: Anthozoa, que incluye anémonas y corales marinos y Medusozoa, compuesto por medusas (Figura 2) (Houliston, Momose, & Manuel 2010). En el caso de las anémonas marinas, son organismos que conforman el orden Actiniaria y son de las especies con mayor diversidad y distribución, ya que se encuentran en distintos tipos de hábitats marinos tanto en profundidades como latitudes diversas (Dunn, 1974). El éxito ecológico de estos organismos es logrado por la facilidad que tienen para establecer relaciones simbióticas con otras especies como cangrejos, algas, moluscos y peces, reflejando su importancia en la columna bento-pelágica (Hiebert & Bingham, 2012).



Figura 2. Esquema general de la clasificación taxonómica del filo Cnidaria (Tomado de Frazão, Vasconcelos, & Antunes, 2012).

Los cnidarios presentan organelas conocidas como nematocistos. Dichas estructuras contienen polipéptidos y proteínas que presentan actividad neurotóxica, citolítica y enzimática (Mariottini & Pane, 2010). Estas toxinas son transferidas mediante estimulación tanto química como mecánica y tienen funciones diversas como capturar y matar presas, digestión y mantener alejados a depredadores y competidores (Nevalainen *et al.*, 2004). Por esto, los compuestos biológicos que los cnidarios producen son importantes para las interacciones tanto inter como intraespecíficas, por lo cual, el estudio de estas moléculas facilitan el entendimiento de su relación con el medio que habitan (Rachamim & Sher, 2012).

Distintas especies de anémonas marinas han sido empleadas en investigación para la obtención de moléculas biológicamente activas, análisis de sus mecanismos de acción y de sus propiedades, con el objetivo de explorarlas como posibles componentes de nuevos fármacos biotecnológicos (Tejuca *et al.*, 1999; Tejuca *et al.*, 2009).

2.2 *Anthopleura nigrescens*

El género *Anthopleura* (Hexacorallia, Actiniaria) es uno de los géneros de anémonas marinas más conocidos ya que pueden encontrarse de manera abundante en zonas templadas e intermareales tropicales rocosas (Daly *et al.*, 2017). La abundancia de este género en lugares accesibles facilita su utilización en la elaboración de distintas investigaciones como la evaluación del estrés térmico y la transferencia de nutrientes (Bingham, Freytes, Emery, Dimond, & Muller-Parker, 2011; Hiebert & Bingham, 2012; Quesada, Acuña, & Cortés, 2014).

Debido a la amplia distribución de este género, fue posible reportar la especie *A. nigrescens* en Costa Rica (Acuña *et al.*, 2012). Esta especie forma agregados de individuos que en periodos de marea baja retraen sus tentáculos para evitar desecación, pudiendo ser esta una de las características más importantes que le permite a esta especie colonizar exitosamente zonas intermareales tropicales y calientes (Bingham *et al.*, 2011). Su presencia en el país ha propiciado el estudio de sus toxinas y posibles características que pueden implementarse en el campo biomédico (Alvarado-Mesén *et al.*, 2014; Alvarado-Mesén *et al.*, 2019; Borbón-Alpízar *et al.*, 2016).

2.3 *Toxinas formadoras de poros (PFTs)*

Las PFTs son moléculas desarrolladas por especies de todos los reinos biológicos, desde virus y bacterias hasta eucariotas como parte de su arsenal químico (Dang & Van Damme, 2015; Los, Randis, Aroian, & Ratner, 2013; Scott & Griffin, 2015). Su nombre deriva de las perforaciones que producen en las membranas celulares (Bischofberger, Iacovache & van der Goot, 2012). Se caracterizan por ser producidas como moléculas solubles, que posteriormente se unen a la membrana blanco mediante receptores específicos (Anderluh & Lakey, 2008). La mayoría de patógenos clínicos producen estas toxinas, ya que la formación del poro facilita otras reacciones en la célula sobre la que actúan, lo que contribuye a la patogénesis de la infección (Saier, 2000).

La clasificación de las toxinas formadoras de poro se basa en el tipo de estructura secundaria que se inserta en la membrana, ya sea un segmento α (hélice- α) o uno β (barril- β) (Geny & Popoff, 2006; Parker & Feil, 2005). Las α -PFTs comprenden la toxina de *Corynebacterium diphtheriae* y la toxina ClyA de *Escherichia coli*, entre otras; por su parte, las β -PFTs son un grupo formado por citolisinas dependientes de colesterol (CDC), perforinas, α -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, etc. (Iacovache, Bischofberger, & van der Goot, 2010).

Las interacciones necesarias para el mecanismo formador de poros de estas proteínas generalmente ocurren con los lípidos que componen la membrana celular, aunque hay excepciones como ocurre con las colisinas en las cuales la interacción se da con proteínas específicas (Cascales *et al.*, 2007). Por lo cual, los componentes de la membrana representan un factor relevante ya que funcionan como catalizadores para los cambios conformacionales requeridos por las toxinas debido a las características no polares de los lípidos de membrana que inducen la exposición de los segmentos anfipáticos e hidrofóbicos de las toxinas (Iacovache *et al.*, 2010; Ros & García-Saéz, 2015).

2.4 Actinoporinas

Los cnidarios producen diversos compuestos bioactivos como neurotoxinas, fosfolipasas y citolisinas, estas últimas en anémonas marinas son conocidas como actinoporinas (Anderluh & Maček, 2002).

Entre las características de las actinoporinas se puede mencionar que sus monómeros presentan un punto isoeléctrico básico y un peso molecular alrededor de los 20 kDa (Anderluh & Maček, 2002), tienen afinidad a membranas celulares con esfingomielina (Bakrač *et al.*, 2008) sin embargo, la presencia de colesterol y otros lípidos en la membrana podrían facilitar el mecanismo de acción de las actinoporinas (Alm, García-Linares, Gavilanes, Martínez-Del-Pozo, & Slotte, 2015; Gilbert, 2016). Contrario a otras moléculas de características tóxicas que presentan enlaces disulfuro para una mayor estabilidad y resistencia a proteasas (Fry *et al.*, 2009), las actinoporinas no presentan cisteínas en su estructura a excepción de las magnificalisinas de la especie *Heteractis magnifica* (Wang *et al.*, 2008) y la bandaporina de *Anthopleura asiatica* (Kohno, Satoh, Iguchi, & Nagai, 2009).

Las actinoporinas poseen alrededor de 175 aminoácidos en su estructura primaria (Alegre-Cebollada, Oñaderra, Gavilanes, & del Pozo, 2007; Anderluh & Maček, 2002; Maček, 1992). En cuanto a su estructura terciaria, las actinoporinas están formadas por un núcleo de entre 10 y 12 hojas- β flanqueadas por dos hélices- α , una correspondiente al N-terminal y la otra al C-terminal, siendo los 30 aminoácidos iniciales el único segmento que presenta cambios sin afectar el plegamiento del sándwich- β (Figura 3) (Anderluh & Maček, 2002; Athanasiadis, Anderluh, Maček, & Turk, 2001).

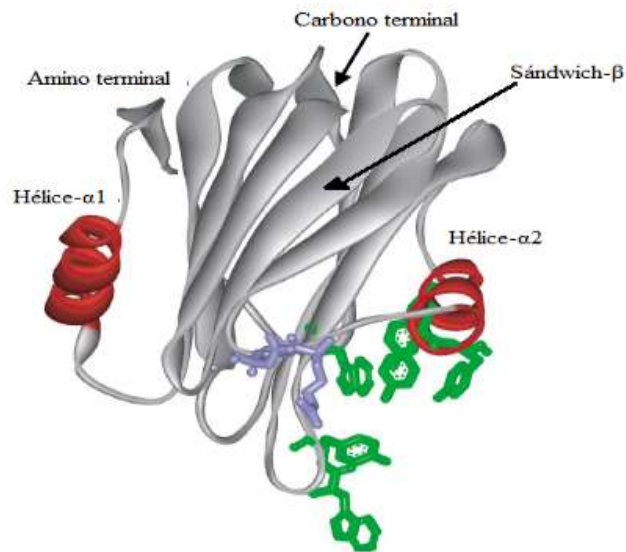


Figura 3. Estructura tridimensional de una actinoporina (EqII). Se señalan las hélices- α (rojo) que flanquean el sándwich- β (gris), así como las posiciones del carbono y el amino terminal. Aparecen resaltadas en verde las cadenas laterales de los residuos aromáticos que están involucradas en el reconocimiento de la membrana (Tomado de Anderluh & Maček, 2002).

Las actinoporinas mejor caracterizadas son las equinotoxinas, de la anémona marina *Actinia equina* (Anderluh *et al.*, 1999b; Kristan, Viero, Dalla-Serra, Maček, & Anderluh, 2009), esticolisinas I y II (StI y StII) de *Stichodactyla helianthus* (Lanio *et al.*, 2001) y fragaceatoxina C (FraC) de *Actinia fragacea* (Tanaka, Caaveiro, Morante, González-Manãs, & Tsumoto, 2015).

Algunas investigaciones han permitido conocer proteínas similares a las actinoporinas. Uno de estos casos es el descubrimiento de la toxina citolítica de la glándula salival de un

gasterópodo marino que tiene una alta similitud con la secuencia génica de las actinoporinas (Kawashima, Nagai, Ishida, Nagashima, & Shiomi, 2003). En adición, se han encontrado otras moléculas similares a las actinoporinas como la lectina fúngica de la especie *Xeroconomus chrysenteron* (Birck *et al.*, 2004) y la de *Agaricus bisporus* (Carrizo *et al.*, 2005).

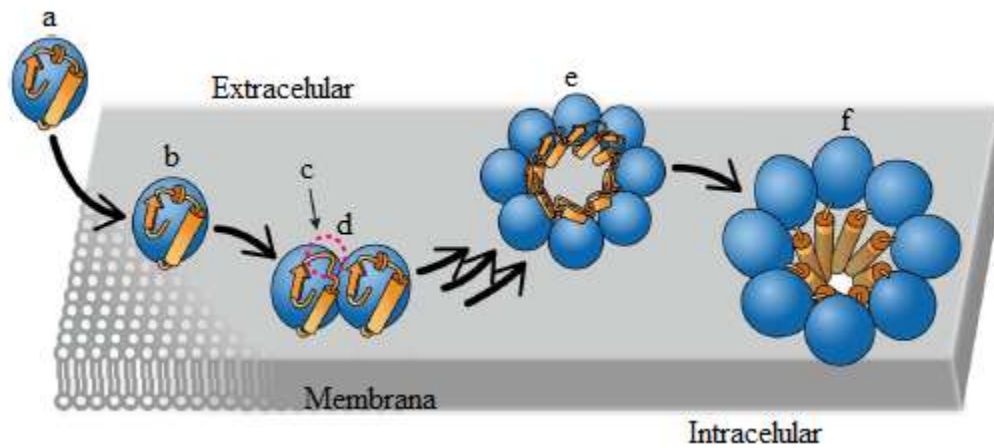
2.5 Mecanismo de acción

El mecanismo para la formación de poros de las actinoporinas aún no ha sido comprendido completamente a nivel molecular y el mismo conlleva una serie de pasos que finalizan con la producción del poro en la membrana celular (Álvarez *et al.*, 2009; Valle *et al.*, 2015).

Como un avance hacia el esclarecimiento del proceso de formación de poro, Tanaka *et al.*, (2015) empleando técnicas de cristalografía de proteínas con difracción de rayos X determinaron las estructuras del estado soluble, del monómero unido a la membrana, del estado preporo del oligómero y del poro ya formado (Figura 4A). Durante el proceso un monómero soluble en agua se une a múltiples lípidos. Las interacciones monómero-membrana facilitan la dimerización y el despliegue parcial del amino terminal, en presencia de balsas lipídicas la unión de los monómeros permite un despliegue adicional del amino terminal causando la inserción de esta región dentro de la membrana y así lograr la formación del poro activo (Tanaka *et al.*, 2015).

Para la formación del poro interactúan 8 monómeros con las estructuras lipídicas de la membrana (Mesa-Galoso, & Pérez-Oduardo, 2016; Tanaka *et al.*, 2015) (Figura 4B). El tamaño del poro ronda los 2 nm (independiente de la concentración de toxina) y su presencia en la membrana genera un choque osmótico coloidal que produce la muerte de la célula, lo que explica la actividad citolítica que producen las actinoporinas sobre eritrocitos en los ensayos (Belmonte, Pederzoli, Maček, & Menestrina, 1993; Tejuca, Dalla-Serra, Potrich, Álvarez, & Menestrina, 2001).

A



B

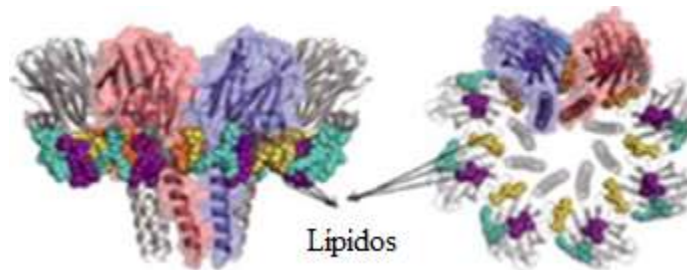


Figura 4. Modelo de la formación de poros transmembrana. (A) Pasos del mecanismo de acción: (a) monómero soluble en agua, (b) monómero unido a la membrana, (c) cambio conformacional, (d) dímero, (e) preporo (hipotético) y (f) poro transmembrana activo. Estructuras naranjas corresponden al segmento del amino terminal y las esferas azules al sándwich- β (Tomado de Tanaka *et al.*, 2015). (B) Modelo del poro en el que un octámero participa en conjunto con lípidos (Tomado de Mesa-Galoso & Pérez-Oduardo, 2016).

2.6 Isoformas

Se considera que las actinoporinas pertenecen a una familia multigénica debido a que se encuentran distintas isoformas en un mismo individuo de anémona (Anderluh *et al.*, 1999b; Valle *et al.*, 2015). Las isoformas presentan diferencias en su actividad lítica (Álvarez *et al.*, 2009) y solubilidad (Wang *et al.*, 2008) a causa de cambios en los residuos aminoacídicos que conforman su estructura primaria cercanos al amino terminal ya que es el segmento más variable en su composición (Cilli *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2001; Pazos *et al.*, 2006; Valle

et al., 2015). Se ha planteado que la producción de isoformas aumenta el espectro de presas que son accesibles para la alimentación (Olivera *et al.*, 1990) o que se emplean como un sistema defensivo rudimentario (Wang *et al.*, 2008), así como el aumento de la actividad lítica debido a un efecto sinérgico entre dos isoformas (Rivera-de-Torre *et al.*, 2016).

Las actinoporinas son de interés científico debido a su particular característica de existir en estado soluble al agua y poder asociarse a membranas, permitiendo el estudio de mecanismos estructurales y funcionales de membranas tanto naturales como artificiales (Parker & Feil, 2005; Valle *et al.*, 2015). En adición, basándose en las variaciones estructurales de las actinoporinas, se han desarrollado sistemas específicos para la entrega de fármacos, para lo cual se incorporan moléculas de actinoporinas en liposomas (membranas artificiales) (Anderluh *et al.*, 2000; Langer, 1990; Pentón *et al.*, 2011; Valle *et al.*, 2015).

2.7 Residuos de prolina en estructuras proteicas

Los residuos de prolina se producen con una frecuencia relativamente alta en proteínas integrales de membrana y son bastante raras en hélices de proteínas solubles en agua (Reiersen & Rees, 2001). Por esto, el residuo de prolina tiende a ser conservado e influyente en la función de las proteínas (Barlow & Thornton, 1988). Esto se debe principalmente a que cuando la prolina está en la cadena aminoacídica carece de un protón de amida, lo cual evita que se formen enlaces con aceptores de protones necesarios en una hélice- α para mantener la estabilidad y funcionalidad de la misma (Woolfson & Williams, 1990).

A nivel de residuo se ha observado que la región de la distorsión inducida por la prolina a la hélice se caracteriza por una columna de ángulos diédricos que se desvían de los valores helicoidales normales (Barlow & Thornton, 1988). A nivel global, para evaluar la geometría de la hélice se ha utilizado una amplia variedad de parámetros y algoritmos con el fin de describir las distorsiones inducidas por la prolina (Bansal, Kumar, & Velavan, 2000; Sankararamkrishnan, & Vishveshwara, 1992).

Recientemente, se detectaron al menos cinco isoformas de una actinoporina, de las cuales cuatro contienen un residuo de prolina en la posición dos de su estructura (Alvarado-Mesén *et al.*, 2019). En las actinoporinas no se ha reportado la presencia de un residuo de prolina en la región hidrofóbica del amino terminal, por lo que estos investigadores plantean la hipótesis

de que, una isoforma que lo contenga probablemente tiene una actividad biológica muy reducida o nula.

2.8 Estudios Moleculares con Actinoporinas

Gran parte del estudio de las actinoporinas se ha logrado mediante la producción de proteínas recombinantes, la cual consiste en la obtención de la región codificante, la clonación y expresión de la secuencia y la purificación de la proteína recombinante. La ventaja de la clonación consiste en la posibilidad de transferir las secuencias génicas de interés a distintos vectores de expresión que pueden emplearse en distintos organismos hospederos (Gräslund *et al.*, 2008).

Por otro lado, los sistemas de expresión permiten la transcripción de las secuencias codificantes de interés y su posterior traducción en el hospedero, siendo distintas cepas de *E. coli* los hospederos más utilizados para la expresión (Sahdev, Khattar, & Saini, 2008). Para la expresión en *E. coli* se necesita que el plásmido tenga elementos como el replicón, el marcador para resistencia a antibióticos, promotores para la regulación transcripcional, la secuencia Shine Dalgarno, el sitio de clonación múltiple y los terminadores de la transcripción (Valle *et al.*, 2016).

En el caso de las actinoporinas, generalmente se emplea la ampicilina como marcador de resistencia a antibióticos y se combinan con sistemas como el promotor T7-operador *lac* (Valle *et al.*, 2016). El promotor T7 es de los más usados para expresar proteínas que pueden ser tóxicas para las células hospederas (Studier, 2005; Valle *et al.*, 2016). Para el crecimiento de las células utilizadas en la expresión de actinoporinas recombinantes, se emplea el caldo lisogénico (LB) por su sencilla preparación y contenido de nutrientes adecuados para la fase temprana de crecimiento de las células (Valle *et al.*, 2016). Como medio de expresión destaca el de autoinducción, compuesto por glucosa, lactosa y glicerol (Studier, 2005) y que es utilizado principalmente con el sistema T7-*lac* (Valle *et al.*, 2016).

Posterior a la expresión se debe lograr la lisis celular para la obtención de la proteína recombinante, preservando la estructura y actividad de la misma, siendo la sonicación una de las técnicas más empleadas para lograrlo, facilitando proseguir con la purificación de la proteína recombinante (Feliu, Cubarsi, & Villaverde, 1998). En el caso particular de las actinoporinas, la purificación consiste primeramente en una precipitación de fracciones y/o

cromatografía por exclusión, seguida de una cromatografía por intercambio iónico cuyas condiciones se establecen basados en las variaciones de peso molecular y puntos isoeléctricos que presentan las isoformas de dichas toxinas (Valle *et al.*, 2015).

Por otro lado, varios estudios empleando mutación sitio dirigida han sido de gran aporte ya que permiten el análisis de la actividad biológica de las actinoporinas de una manera sencilla y exitosa. Con estas investigaciones se ha logrado esclarecer los residuos importantes en la funcionalidad de estas toxinas, así como las posiciones que se conservan o varían en la cadena de residuos (Hervis *et al.*, 2014; Morante *et al.*, 2015a; Morante *et al.*, 2015b; Subburaj *et al.*, 2015). La utilidad de esta técnica es la de generar diversidad genética mediante la alteración de secuencias de interés de un genoma al cambiar una o más bases en su estructura y así evaluar la funcionalidad de estas secuencias mutadas (Sauer *et al.*, 2016).

Según los antecedentes expuestos en párrafos anteriores, las anémonas marinas constituyen un recurso promisorio de moléculas bioactivas de interés biotecnológico y biomédico, tal es el caso de las actinoporinas que se han empleado para el diseño de inmunotoxinas contra células tumorales y contra parásitos, así como para diseñar novedosos sistemas de entrega de antígenos al citosol celular. La purificación y caracterización estructural y funcional de estas moléculas han permitido entender cómo pequeños cambios en su estructura primaria conducen a cambios en su actividad biológica, ya sea potenciándose o reduciéndose la misma, tal es el caso de las isoformas que están presentes en un mismo individuo y que presentan diferente actividad lítica entre ellas. La obtención de actinoporinas de forma recombinante es un recurso ampliamente utilizado ya que facilita su purificación mediante el empleo de técnicas cromatográficas de exclusión e intercambio iónico y a la vez, evita el tener que estar recurriendo a la fuente natural de la cual se obtienen dichas proteínas. Adicionalmente, tener las secuencias codificantes para las actinoporinas a disposición, facilitan que técnicas como la mutación sitio dirigida pueda ser utilizada para investigaciones sobre las características estructurales y funcionales de dichas toxinas, logrando definir los residuos aminoacídicos más relevantes y su influencia en la actividad biológica de las actinoporinas. Todo esto con el fin de aprovechar las características que estas proteínas poseen y lograr implementarlas como herramientas biotecnológicas.

3. Marco Metodológico

3.1 Material biológico

No se realizó colecta de individuos de *Anthopleura nigrescens* ya que se utilizó la información genética generada previamente por Alvarado-Mesén *et al.*, (2019), correspondiente a 5 isoformas de una nueva actinoporina. Como ya una de estas isoformas (nigrelisina, Ng) que no contenía prolina en la posición dos fue clonada, expresada, purificada y caracterizada a nivel funcional y estructural, se evaluó el efecto que podría tener una prolina en la posición dos de la estructura de Ng. Para esto, se utilizó la secuencia deducida de nigrelisina y empleando el software Geneious R9 (Biomatters Ltd., Nueva Zelanda) se le insertó un triplete codificante para un residuo de prolina en la posición 2 (NgPro2). Seguidamente, se solicitó el servicio de síntesis a la empresa GenScript (EUA), quienes sintetizaron la secuencia nucleotídica codificante mutada de nigrelisina y la incorporaron en el vector de expresión pET-21a (+) denominado posteriormente como NgPro2-pET-21a (+), el cual contiene un gen de resistencia a ampicilina.

3.2 Transformación de células BL21 Star (DE3) por choque térmico

El vector NgPro2-pET-21a (+) liofilizado previamente por GenScript fue centrifugado a 16000 x g durante 30 s. Posteriormente se le adicionaron 20 µL de agua destilada estéril y se le aplicó agitación en vortex. Para la transformación se utilizaron células para expresión *E. coli* BL21 Star (DE3) (Thermo Fisher Scientific, EUA). Las células de expresión almacenadas en microtubos se descongelaron en hielo escarchado y se les realizó un spin corto en frío (4°C). Al microtubo con células se le adicionaron 2 µL del plásmido y se mezcló suavemente por inversión, seguidamente se incubó el microtubo en hielo durante 30 min. Finalizado dicho periodo, se incubó en baño María a 42 °C durante 30 s e inmediatamente se pasaron a hielo durante 2 min y se le adicionó 250 µL de medio SOC (Thermo Fisher Scientific, EUA) al microtubo. Las células se incubaron en agitación (225 rpm) a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, en tres placas Petri con caldo lisogénico (LB) que contenía ampicilina (100 µg/mL) se inocularon 100 µL de las células transformadas y se esparcieron en la superficie con asa de Drigalski triangulares estériles. Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche.

3.3 Expresión de la actinoporina recombinante NgPro2

Para la expresión de la toxina se utilizó el método de autoinducción desarrollado por Studier, (2005). Para lo cual, primero se prepararon y esterilizaron durante 20 min a 121°C en autoclave las soluciones 50 XM (65 mM KH₂PO₄, 117 mM NH₄Cl, 12 mM NaSO₄, y 62 mM Na₂HPO₄), 5052 (25% v/v glicerol, 6 mM glucosa y 10 mM lactosa), glucosa 40%, MgSO₄ 1 M, FeCl₃ 0.1 M. Con las soluciones anteriores se prepararon los medios LB 2X (10 g/L peptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L cloruro de sodio (NaCl), precultivo MDG (9.625 mL de agua destilada estéril, 200 µL solución 50 XM, 20 µL de solución MgSO₄ (1 M), 10 µL de solución FeCl₃ (0.1 M), 125 µL de solución glucosa 40%, 10 µL de ampicilina 100 mg/mL) y autoinducción o medio ZYB (400 mL de medio LB 2X, 91.1 mL de agua destilada estéril, 4 mL de solución 50 XM, 4 mL de solución 5052, 0.4 mL de solución MgSO₄ (1M), 200 µL de solución FeCl₃ (0.1 M), 400 µL de ampicilina 100 mg/mL).

A partir de las placas inoculadas con las células transformadas se tomaron 3 colonias independientes y se procedió a inocular 3 tubos cónicos de 50 mL para centrífuga tipo Falcon con 10 mL de medio MDG cada uno. Los tubos se incubaron durante 19 horas a 37 °C en agitación constante (150 rpm). Cumplido el tiempo, se tomaron alícuotas de 2 mL del precultivo para inocular 400 mL del medio de expresión ZYB y se cultivaron a 37°C a 150 rpm durante 16 h.

Posteriormente se colectó 1 mL de cada cultivo para medir la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm en el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, EUA). Se centrifugó durante 10 min a 11180 x g (Thermo Scientific Sorvall ST16 R, Alemania) en microtubos de 1.5 mL, se descartó el sobrenadante y las células colectadas se resuspendieron a una concentración de células similares para ser utilizados posteriormente en gel de poliacrilamida. Para ello, se igualó la densidad óptica de los 3 cultivos a un valor de 7 mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$OD_{600nm} \times 1 \text{ mL} = V \times 7 \quad (1)$$

dónde OD_{600nm} es la densidad óptica del cultivo obtenida en el Nanodrop, 1 mL corresponde al volumen del medio que se centrifugó para tomar las células y V es el volumen de agua destilada necesario para la resuspensión.

Seguidamente, el extracto crudo de proteínas para el análisis de SDS-PAGE 4-12 % (Laemmli, 1970) se preparó mezclando 26 μL de muestra (células), 10 μL de buffer muestra Laemmli (4x) y 4 μL de agente reductor (BME 14M). Posteriormente se les dio un tratamiento de temperatura a 100 °C durante 10 min y se cargaron 35 μL de cada muestra en el pozo del gel. En un carril se aplicaron 10 μL de marcador de peso molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard (Thermo Fisher, EUA). Después de la separación a 200 V durante 35 minutos, se llevó a cabo la tinción del gel con Coomassie blue G-250 al 0,05% (p/v).

Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 x g durante 10 minutos a 4°C en centrífuga (Thermo Scientific Sorvall ST16 R, Alemania). Para colectar la biomasa producida por la autoinducción, primeramente, se pasaron los 800 mL de cultivo a tubos cónicos Falcon de 50 mL. La biomasa se resuspendió por vortex, y se le adicionó 1 mL de buffer A de purificación (tampón fosfato de sodio 50 mM) por cada 12mL de cultivo inicial. La biomasa resuspendida se sonicó en condiciones de amplitud 90, durante 10 min con pulsos de 10 segundos y pausas de 30 s a 30 °C en un sonicador (QSONICA SONICATORS Q700, EUA), manteniendo la muestra en hielo durante todo el proceso. Para la clarificación, los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 16700 x g durante 40 minutos a 4°C en centrífuga (Eppendorf 5418 R, Alemania). El sobrenadante se pasó a un tubo cónico para su posterior fraccionamiento.

3.5 Purificación de la actinoporina recombinante

La purificación de NgPro2 se realizó en un solo paso empleando una columna cromatográfica de intercambio catiónico CM-Sephadex C25 (Sigma-Aldrich, EUA) (0,8 x 6,0 cm) equilibrada con buffer fosfato de sodio 50 mM (pH 7.6). La elución se realizó con un gradiente lineal (0-1.0 mol*L⁻¹) de cloruro de sodio en el mismo buffer, a un flujo de 1 mL/min. La corrida cromatográfica fue realizada en un cromatógrafo ÄKTAprime Plus FPLC (Suecia) y monitoreada a $\lambda=280$ nm con el fin de detectar los picos proteicos que eluyeron. Las fracciones activas fueron mezcladas (aproximadamente 100 mL) y posteriormente desaladas por filtración utilizando tubos de centrifuga MILLIPORE (Merck-Amicon, EUA), con un poro de corte de 10 kDa. Las muestras fueron centrifugadas por 20 minutos a 4000 x g realizándose dos lavados con agua destilada para un volumen final de

recuperación de 10 mL. Una vez desalada la muestra, se evaluó la homogeneidad proteica mediante SDS-PAGE (como se describió en párrafos anteriores) y se cuantificó la proteína total mediante el método de Bradford (Coomasie Plus, Bradford, Assay Kit Thermo Scientific, 23236, EUA). Las fracciones del pico eluido en el gradiente fueron evaluadas por actividad hemolítica.

3.6 Comparación de la actividad hemolítica de NgPro2 y Ng

Primeramente, se preparó la suspensión de eritrocitos con sangre humana fresca de un donante voluntario aparentemente sano. Los eritrocitos se colectaron en presencia de anticoagulante en tubos BD Vacutainer (Becton, EUA), seguidamente se realizaron tres lavados con buffer TBS (0.145 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4) centrifugando a $700 \times g$ durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, las células se resuspendieron en TBS y se preparó el estándar de eritrocitos ajustando la concentración de la muestra mediante dilución con dicho buffer hasta obtener un valor de 0.2 unidades arbitrarias de densidad óptica a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas Multiskan FC (Labsystems, Finlandia).

La actividad hemolítica de la toxina purificada se determinó a una longitud de onda de 595 nm. Se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano, en las cuales se realizaron diluciones dobles seriadas de las toxinas Ng y NgPro2 en TBS en un volumen total de 100 μ L (0.5 μ L de toxina y 99.5 μ L de buffer). La reacción de hemólisis se inició al adicionar 100 μ L del estándar de eritrocitos para un volumen final de 200 μ L. La concentración de cada muestra se evaluó por triplicado a una temperatura de 24 ± 2 °C. Se utilizó Ng como referencia y se trabajó con una concentración proteica igual para ambas toxinas, la cual se calculó a partir de la ecuación obtenida con la recta de calibración generada con el método de cuantificación proteica Bradford, (1976).

Utilizando el software OriginPro 8 (EUA) se elaboraron las curvas de hemólisis, las cuales se normalizaron tomando como el máximo de absorbancia aparente el valor que correspondía a la suspensión en el tiempo cero (A_t/A_o). La fracción de hemólisis a partir de la extensión final de la lisis alcanzada después de transcurridos 30 min se calculó según la ecuación:

$$\%AH=100*(Ao-At)/(Ao-Amin) \quad (2)$$

donde A_o , A_t y A_{min} representan la absorbancia aparente en el tiempo cero, en el tiempo t , y en la presencia de un exceso de proteína, respectivamente. Las curvas hemolíticas se ajustaron a la función sigmoidea de Hill con lo que se obtuvo la concentración de proteína que causa el 50% de lisis de los eritrocitos (HC_{50}).

Adicionalmente, se realizó el análisis estadístico de los datos utilizando el software R 3.0.1 (EUA) para comparar las varianzas de los valores de absorbancia obtenidos asociados a la actividad hemolítica y su relación con los factores que podrían influir en el ensayo, es decir las muestras sin toxina, las muestras con Ng y las muestras tratadas con NgPro2. Para realizar la comparación de datos mediante ANDEVA, primeramente, se corroboró que los datos cumplieran con los supuestos de dicha prueba, siendo estos: (1) independencia de las observaciones, (2) variables obtenidas de manera aleatoria, (3) normalidad de los datos, para lo cual primero se realizó una transformación logarítmica de los datos y posteriormente a los residuos del modelo se les realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para determinar si eran valores paramétricos o no paramétricos y acorde a la naturaleza de los datos de este supuesto, (4) se evaluó la homogeneidad entre las varianzas (varianza constante entre diferentes grupos asociados a un mismo factor (Keselman *et al.*, 1998)), mediante la prueba de Bartlett. En el caso de la prueba *post hoc*, se aplicó la prueba Tukey. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas al presentar valores p menores a 0.05 ($p < 0.05$) (Keselman *et al.*, 1998).

Los resultados experimentales tanto para el análisis gráfico de la actividad lítica como para el análisis estadístico representan el valor promedio de al menos 3 determinaciones independientes de cada concentración evaluada para cada tratamiento.

4. Resultados

La secuencia nucleotídica utilizada corresponde únicamente a la secuencia que codifica para la proteína madura por lo que no incluye el péptido señal ni el propéptido (Figura 5A). A dicha secuencia se le realizó una mutación sitio dirigida con el fin de evaluar el efecto que pudiese tener la prolina en la posición dos de la estructura aminoacídica de una actinoporina (Figura 5B).

A

```
1 10 20 30 40 50 60
S L E V A G A V M E G A N L G M S V L Q T I L Q A I G D V S R K I A V G V D N E S G R S W T A Q N A Y F R S G T S D V I L P H T V P S
70 80 90 100 110 120 130
G K A L L Y D G Q K N R G P V A T G V V G V I T Y T M G D G N T L A V M F S V P Y D Y N W Y S N W W N V K I Y H G K V R A S Q K M Y E
140 150 160 170 179
D L Y Y Y R S P F K G D N G W H E R N L G Y G L K S K G F M N S S G A A L L Q I K V M K A
```

B

```
1 10 20 30 40 50 60
S P L E V A G A V M E G A N L G M S V L Q T I L Q A I G D V S R K I A V G V D N E S G R S W T A Q N A Y F R S G T S D V I L P H T V P
70 80 90 100 110 120 130
S G K A L L Y D G Q K N R G P V A T G V V G V I T Y T M G D G N T L A V M F S V P Y D Y N W Y S N W W N V K I Y H G K V R A S Q K M Y
140 150 160 170 180
E D L Y Y Y R S P F K G D N G W H E R N L G Y G L K S K G F M N S S G A A L L Q I K V M K A
```

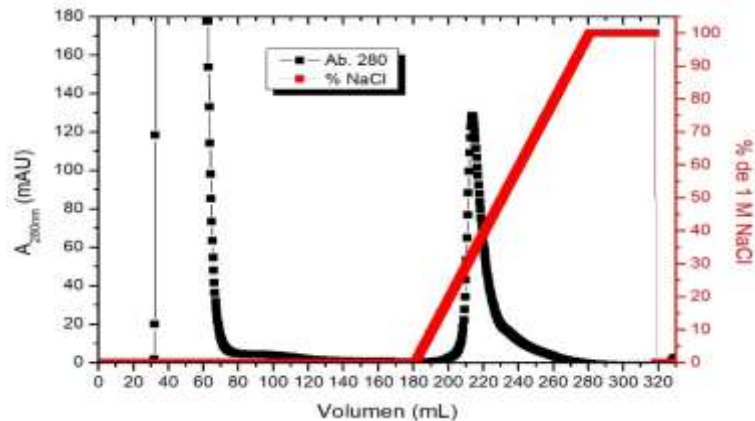
Figura 5. Secuencias deducidas del segmento que codifica para la proteína madura Ng (A) y NgPro2 (B). El recuadro rojo indica la mutación inducida con prolina.

De las células transformadas con el vector NgPro2-pET-21a (+) se obtuvieron tres placas Petri con colonias crecidas y 800 mL de suspensión celular con la proteína recombinante producida. Con la cromatografía de intercambio catiónico (Figura 6A) se obtuvo un único pico entre los volúmenes 205-226 mL (fracciones ~ 9-16) al alcanzarse la proporción del tampón B en la mezcla eluyente de ~33% (~0,33 mol*L⁻¹ NaCl), con un tiempo de retención de 213 min. El área del pico de elución representó un 2.96% del área total de los picos cromatográficos obtenidos, lo que significa que del total de proteínas presentes en el extracto de *E. coli*, un 2.96% correspondió a la actinoporina recombinante.

El ensayo SDS-PAGE (Figura 6B) evidencia la purificación de NgPro2, la cual tiene una movilidad electroforética a la altura de Ng. Además, un aspecto importante de destacar es la presencia de bandas entre los valores 6 y 14 kDa del marcador de peso molecular en los carriles de Ng y NgPro2, los cuales se considera consisten en péptidos de las mismas toxinas.

También, el SDS-PAGE permitió evidenciar que tanto en el extracto crudo (EC) como en las células autoinducidas (ZYB) se puede apreciar la banda de NgPro2, mientras que en el medio de precultivo MDG (último carril) dicha banda está ausente.

A



B

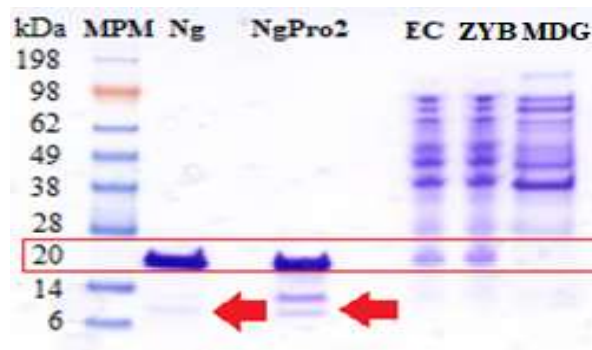


Figura 6. Cromatografía de intercambio catiónico del extracto celular y evaluación de la homogeneidad del pico cromatográfico por SDS-PAGE (4-12%). (A) Perfil cromatográfico obtenido por intercambio catiónico. (B) Gel de poliacrilamida. Los carriles corresponden al marcador de peso molecular (MPM) (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard; Thermo Fisher, EUA), nigrelisina (Ng), pico que eluyó en el gradiente (NgPro2), extracto celular (EC), el cultivo de células de expresión transformadas (ZYB) y cultivo en medio de precultivo (MDG). El recuadro en rojo indica bandas con movilidad similar a Ng. Las flechas rojas señalan posibles productos de la degradación de Ng o NgPro2 según corresponda el carril.

La concentración proteica de Ng y NgPro2 se determinó mediante el método Bradford (Figura 7), obteniéndose que el R^2 para la cuantificación fue de 0.97. Las concentraciones estimadas para Ng y para NgPro2 fueron de 0.37 y 0.47 mg/mL respectivamente.

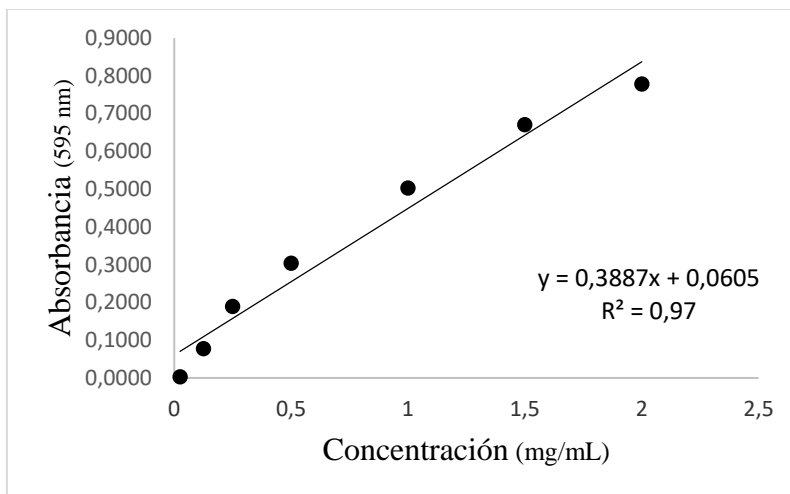


Figura 7. Curva de calibración para estimar la concentración de Ng y NgPro2 mediante el método Bradford (Coomasie Plus, Bradford, Assay Kit Thermo Scientific, 23236, EUA).

En los ensayos de actividad hemolítica ambas toxinas mostraron actividad lítica en eritrocitos (Figura 8A, B). Como se puede apreciar en dicha figura, Ng presenta una actividad lítica mayor que NgPro2, la cual inicia su actividad de manera más tardía, evento que ocurre en todas las concentraciones evaluadas siendo más apreciable a bajas concentraciones (1.25, 0.625 y 0.3125 nM). Con el fin de una visualización más detallada se graficó la actividad de las dos actinoporinas a una concentración de 1.25 nM (Figura 8C), mostrando una caída más abrupta de la turbidez para Ng lo cual se relaciona a una mayor velocidad de hemólisis de Ng respecto a NgPro2. Para comparar cuantitativamente la actividad hemolítica de ambas toxinas, se determinó el parámetro HC_{50} (Figura 8D) correspondiente a la concentración de proteína causante del 50% de lisis, calculado con el mejor ajuste sigmoideal de Hill ($R^2 = 0.990$; líneas continuas).

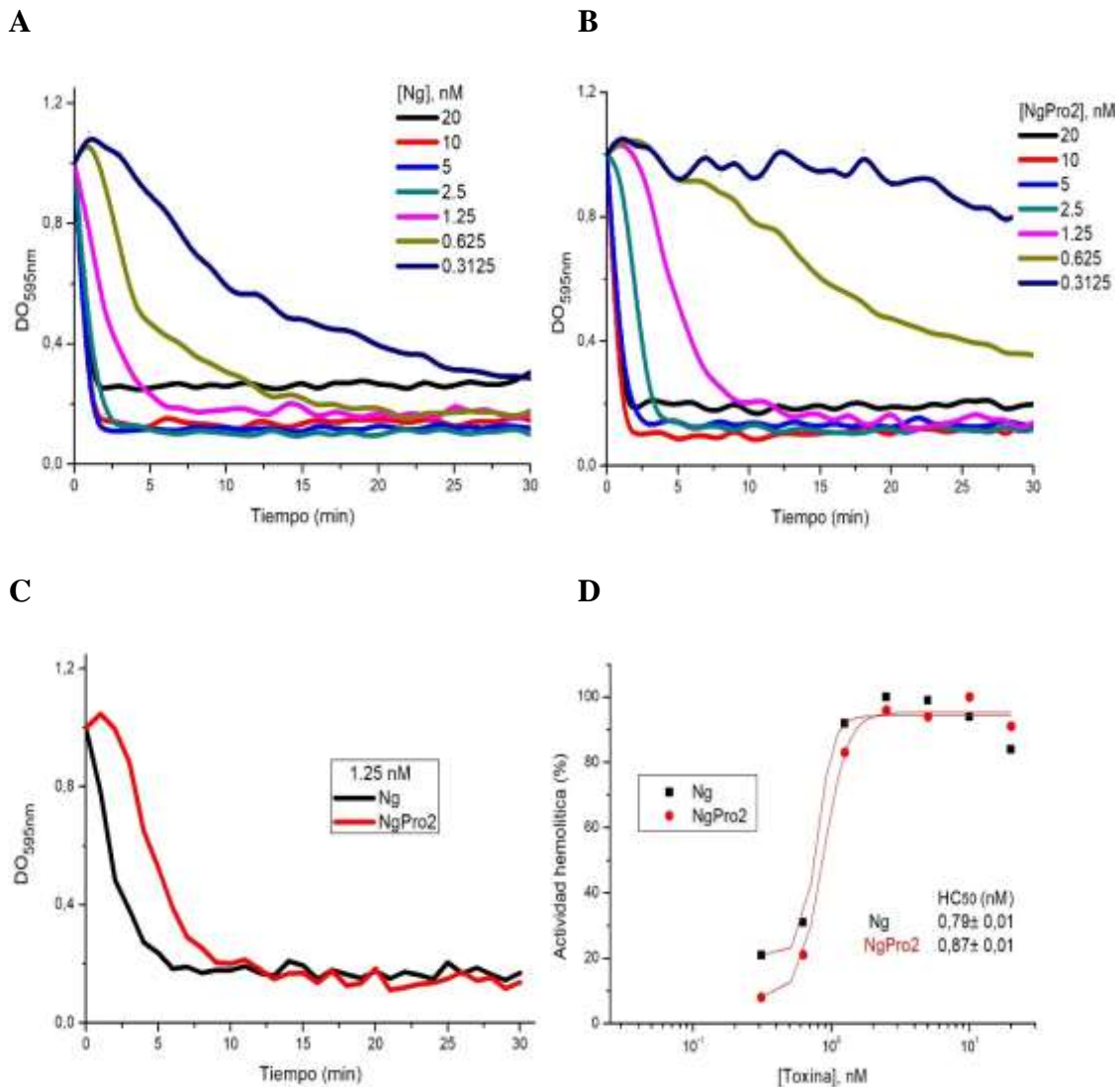


Figura 8. Actividad hemolítica de Ng y NgPro2. Lisis de eritrocitos humanos determinada por la disminución de la turbidez de la suspensión promovida por Ng (A) y NgPro2 (B) durante 30 minutos con distintas concentraciones de toxina a un $\lambda=595$ nm. (C) Comparación de Ng y NgPro2 a una concentración de 1.25 nM. (D) Porcentaje de actividad hemolítica después de 30 minutos de ensayo en función de la concentración proteica.

Para el análisis estadístico (Cuadro 1) se determinó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($p>0.05$) posterior a una transformación logarítmica de los valores, por lo que la homogeneidad de varianzas se evaluó mediante la prueba de Bartlett, obteniéndose que las varianzas de los grupos de datos fueron homogéneas ($p>0.05$). Con lo anterior en adición a la independencia y aleatoriedad que el diseño experimental permitió

para la obtención de datos, se cumplieron los supuestos necesarios para realizar la ANDEVA, prueba en la cual se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados ($F=5457$, $p<0.05$). La prueba de Tukey permitió evaluar la significancia estadística entre las medias de los grupos obtenido en la ANDEVA, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados ($p<0.05$).

Cuadro 1. Pruebas evaluadas para el análisis de varianzas de los datos.

Supuestos de ANDEVA					
Prueba		p-value			
Normalidad (Shapiro-Wilk)		0.103			
Homocedasticidad (Bartlett)		0.082			
ANDEVA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F-value	p-value
Tratamiento	2	10.78	5.389	5457	2×10^{-6}
Residuales	3777	3.73	0.001		
Prueba <i>post hoc</i> (Tukey)					
Factores		p-value			
Ng-Control		0.009			
NgPro2-Control		0.004			
Ng-NgPro2		0.016			

5. Discusión

Con el fin de aportar al conocimiento de las actinoporinas, en la presente investigación se utilizó la información generada por Alvarado-Mesén *et al.*, (2019) quienes obtuvieron secuencias codificantes para actinoporina mediante RACE-PCR a partir del ARNm de *A. nigriscens*. Dichos investigadores clonaron, expresaron y purificaron esta toxina (nigrelisina, Ng) para posteriormente describir sus principales propiedades moleculares y funcionales.

Así, para este trabajo se empleó la mutagénesis sitio dirigida, con lo que se logró diseñar la secuencia codificante de nigrelisina mutada con una prolina en la posición 2 (Figura 5) para su posterior expresión, purificación y evaluación de su actividad lítica.

El método utilizado para la expresión recombinante fue el de autoinducción, el cual se basa en controlar la expresión de proteínas en *E. coli* según su fase metabólica. Para esto se ajustan en el medio los niveles de lactosa (produce la autoinducción) y glucosa (previene inducción por lactosa) (Studier, 2005). De esta forma se regula la expresión de la actinoporina cuando la densidad celular sea alta y se acabe la glucosa. El éxito de la autoinducción se evidencia en el reducido tiempo de incubación y en la poca formación de cuerpos de inclusión de la proteína producida (Studier, 2005), evidenciado por SDS-PAGE mediante bandas proteicas y por la conservación de la funcionalidad de la toxina recombinante.

Posterior a la expresión de la secuencia codificante mutada se realizó la purificación proteica (Figura 6A). Para este proceso se tuvo en cuenta que la mayoría de las actinoporinas son básicas (Anderluh & Maček, 2002) y que nigrelisina se purificó empleando la cromatografía de intercambio catiónico (Alvarado-Mesén *et al.*, 2019).

La homogeneidad de la fracción obtenida en la purificación se evaluó mediante SDS-PAGE, facilitado por el hecho de que las actinoporinas se secretan como formas monoméricas solubles de aproximadamente 20 kDa (Anderluh & Maček, 2002). Lo anterior se refleja en la corrida del gel de poliacrilamida realizado (Figura 6B), donde fue posible detectar en el extracto celular la actinoporina mutada con una movilidad electroforética a la altura de Ng. Un hallazgo interesante que se observó en la electroforesis fue que tanto para Ng como para NgPro2 se encontraron bandas levemente visibles, señaladas con flechas rojas

en la Figura 6B. Por el tamaño de estas bandas en relación con el marcador de peso molecular, y por la ausencia de las mismas en los extractos crudos, se especula que son péptidos residuales de la misma actinoporina purificada, posiblemente producidos por proteasas endógenas de las células de expresión o degradación de la proteína por sensibilidad a condiciones de almacenaje o purificación.

Por otro lado, previo al ensayo de actividad hemolítica se realizó la curva de calibración (Figura 7). Acorde al coeficiente de correlación de regresión (R^2) obtenido el ajuste es confiable. Esto porque la curva de calibración es un método frecuentemente utilizado que permite determinar e igualar las concentraciones proteicas con las que se realiza dicho ensayo (Kruger, 2009). Con la ecuación obtenida se igualaron las concentraciones de Ng y NgPro2 para evaluar la capacidad permeabilizante de estas toxinas.

De la actividad permeabilizante de las actinoporinas respecto a la región del amino terminal se conoce que la hélice anfipática en el extremo del amino está precedida por una cadena de residuos aminoacídicos cuya composición varía entre las distintas toxinas, que en el proceso de formación de poros tanto la hélice como la cadena se insertan en la bicapa y que junto con los lípidos de la membrana forman la pared del poro (Drechsler, *et al.*, 2006; Malovrh *et al.*, 2003; Ros *et al.*, 2015; Tanaka *et al.*, 2015). Por lo que la flexibilidad de la hélice es relevante durante las interacciones entre proteínas y con otras moléculas. Debido a esto se consideró importante evaluar la posible afectación de la hélice del amino terminal por una prolina cercana a dicha estructura. Esto porque la adición de residuos de prolina cercanas a hélices- α reduce la estabilidad la misma (Vanselaar *et al.*, 2010; Woolfson & Williams, 1990).

Para evaluar lo mencionado anteriormente, se analizó la actividad hemolítica de Ng y NgPro2, la cual en ambos casos aumentó con una clara dependencia de la concentración de toxina y del tiempo (Figura 8A, B, C). Esto último debido a que las células no son permeabilizadas hasta que una cantidad determinada de monómeros de la toxina se unen a la membrana de la célula (Anderluh & Maček, 2002; Tanaka *et al.*, 2015, Valle *et al.*, 2015). Para comparar la actividad hemolítica de las toxinas en cuestión, se determinó el HC_{50} ajustando los datos experimentales a un modelo sigmoideal de Hill (Figura 8D). A partir de estos resultados se evidencia que la inserción de una prolina en la posición 2 del amino

terminal tiene un efecto negativo en la actividad lítica de la toxina, ya que la misma se reduce en comparación con su isoforma carente de este residuo (Figura 8A, B, C), y como consecuencia se incrementa la concentración de NgPro2 para tener el mismo efecto que Ng según se deduce de la determinación de sus HC₅₀.

El efecto que genera la prolina puede deberse entre otras cosas, a su composición estructural, restringiendo el espacio disponible y afectando el proceso de plegamiento de la toxina. Esto posiblemente causado por el anillo de pirrolidina, el cual distorsiona las hélices al introducir una torcedura espacial en los segmentos adyacentes a ella (Barlow & Thornton, 1988; Ballesteros & Weinstein, 1992; Chang, Cheng, Trivedi, & Lin, 1999) y además la prolina es desestabilizadora por carecer de un protón de amida que evita la formación de enlaces de hidrógeno y también por influir en el ángulo del residuo que la precede en la secuencia (Lovell *et al.*, 2003; Senes, Engel, & DeGrado, 2004).

Por lo anterior, es viable considerar que se producen cambios leves en la disposición espacial de la región del amino terminal a causa del residuo de prolina, reflejándose en la reducción de la actividad lítica de NgPro2 con respecto a Ng. Este cambio puede afectar la unión inicial a la membrana, retrasando el inicio de la lisis, o bien, la formación del poro al afectar la estabilidad del mismo. Sin embargo, la actividad se mantiene debido a que dicho mecanismo depende de otros factores asociados a las características de Ng que pueden amortiguar el efecto disruptor de la prolina. Por ejemplo, su velocidad de hemólisis y de penetración en monocapas lipídicas, lo cual puede ser debido al arreglo de sus residuos aromáticos, esto al comparar Ng con StII (Alvarado-Mesén *et al.*, 2019).

En el caso del análisis de varianza, la diferencia estadísticamente significativa entre los grupos obtenida fue evaluada mediante la prueba *post hoc* Tukey, la que indicó diferencias significativas tanto entre las muestras con toxina y el control, así como al comparar las toxinas entre ellas. Siendo esto congruente con las diferencias en los resultados experimentales de la actividad biológica que presentaron las toxinas a causa de la mutación inducida en la secuencia codificante de nigrelisina.

6. Conclusiones

Los métodos empleados de transformación de células quimio competentes y de expresión por autoinducción fueron efectivos para el cumplimiento del objetivo de este trabajo dada la facilidad de desarrollarlos y por el bajo costo que requieren.

La cromatografía de intercambio catiónico permitió la purificación de la nigrelisina recombinante mutada. Confirmando ser un método que puede ser empleado en futuras investigaciones con esta actinoporina.

La toxina mutada con prolina fue capaz de unirse a la membrana de eritrocitos y formar oligómeros con una lisis más reducida que nigrelisina.

La inserción de un residuo de prolina en la posición 2 en la secuencia de Ng, demostró que conlleva a una afectación en su toxicidad, evidenciándose por el aumento en el HC₅₀ de dicha toxina.

Se evidenció la alta capacidad lítica de nigrelisina ya que, a pesar del efecto de la mutación, la actinoporina en cuestión mantiene valores similares a la nigrelisina sin la mutación inducida.

Este trabajo demuestra como un sistema de expresión bacteriana adecuado puede producir mutantes para estudios interesantes, por lo que investigaciones con Ng y otras actinoporinas serían beneficiosos para ampliar el conocimiento de estas y otras proteínas, además de hacer uso del potencial de los Laboratorios de Biotecnología de la Escuela de Ciencias Biológicas.

7. Recomendaciones

Ampliar con estudios moleculares y bioquímicos para determinar cómo varía el proceso de la formación del poro la nigrelisina con residuo de prolina en la posición dos.

Caracterizar funcionalmente las isoformas de nigrelisina ya que la actividad permeabilizante depende también de otros elementos que en dichas isoformas pueden interactuar con la prolina en la posición dos.

Evaluar la interacción entre nigrelisina y sus isoformas con el fin de comprobar si existe algún efecto sobre la actividad lítica relacionado a la interacción de las toxinas.

Explorar la aplicabilidad del conocimiento aportado en este trabajo ya sea dentro del grupo de las actinoporinas, o bien de manera análoga a otro conjunto de moléculas.

Desarrollar investigaciones para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, ya que algunas moléculas de la flora y fauna del país pueden poseer particularidades que no han sido encontradas en otras moléculas estudiadas, como es el caso de las isoformas de actinoporina con prolina cercana a la hélice del amino terminal.

8. Referencias

- Acuña, F. H., Alvarado-Mesén, J., Garese, A., & Cortés, J. (2012). First record of the sea anemone *Anthopleura nigrescens* (Cnidaria: Actiniaria: Actiniidae) on the Pacific coast of Central America. *ANZIAM Journal*, 5(3), 5–7. <https://doi.org/10.1017/S175526721200022X>
- Agbowuro, A. A., Huston, W. M., Gamble, A. B., & Tyndall, J. D. (2018). Proteases and protease inhibitors in infectious diseases. *Medicinal research reviews*, 38(4), 1295–1331.
- Alegre-Cebollada, J., Oñaderra, M., Gavilanes, J. G., & del Pozo, A. M. (2007). Sea anemone actinoporins: the transition from a folded soluble state to a functionally active membrane-bound oligomeric pore. *Current Protein & Peptide Science*, 8(6), 558–572. <https://doi.org/18220843>
- Alm, I., García-Linares, S., Gavilanes, J. G., Martínez-Del-Pozo, Á., & Slotte, J. P. (2015). Cholesterol stimulates and ceramide inhibits Sticholysin II-induced pore formation in complex bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1848(4), 925–931. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.12.017>
- Alvarado-Mesén, J., Álvarez, Y., Pedrera, L., Ros, U., Lanio, M. E., Valle, A., & Álvarez, C. (2014). Isolation and partial purification of a hemolytic sphingomyelin-inhibitable fraction from the sea anemone *Anthopleura nigrescens*. *Biotecnología Aplicada*, 31(1), 53–56.
- Alvarado-Mesén, J., Solano-Campos, F., Canet, L., Pedrera, L., Hervis, Y. P., Soto, C., Borbón, H., Lani, M. E., Lomonte, B., Valle, A., & Álvarez, C. (2019). Cloning, purification and characterization of nigrelysin, a novel actinoporin from the sea anemone *Anthopleura nigrescens*. *Biochimie*, 156, 206–223. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.013>
- Álvarez, C., Mancheño, J. M., Martínez, D., Tejuca, M., Pazos, F., & Lanio, M. E. (2009). Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: Their interaction with membranes. *Toxicon*, 54(8), 1135–

1147. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.022>

- Anderluh, G., Barlič, A., Podlesek, Z., Maček, P., Pungerčar, J., Gubenšek, F., Zecchini, M. L., Dalla-Serra, M., & Menestrina, G. (1999a). Cysteine scanning mutagenesis of an eucaryotic pore-forming toxin from sea anemone: topology in lipid membranes. *Eur. J. Biochem.*, *263*, 128–136.
- Anderluh, G., Barlič, A., Potrich, C., Maček, P., & Menestrina, G. (2000). Lysine 77 is a key residue in aggregation of equinatoxin II, a pore-forming toxin from sea anemone *Actinia equina*. *Journal of Membrane Biology*, *173*(1), 47–55. <https://doi.org/10.1007/s002320001006>
- Anderluh, G., Križaj, I., Štrukelj, B., Gubenšek, F., Maček, P., & Pungerčar, J. (1999b). Equinatoxins, pore-forming proteins from the sea anemone *Actinia equina*, belong to a multigene family. *Toxicon*, *37*(10), 1391–1401. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00082-3)
- Anderluh, G., & Lakey, J. H. (2008). Disparate proteins use similar architectures to damage membranes. *Trends in Biochemical Sciences*, *33*(10), 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.07.004>
- Anderluh, G., & Maček, P. (2002). Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Aanthozoa: Actiniaria). *Toxicon*, *40*(2), 111–124. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00191-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00191-X)
- Anderluh, G., Pungerčar, J., Štrukelj, B., Maček, P., & Gubenšek, F. (1996). Cloning, sequencing, and expression of equinatoxin II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *220*(2), 437–442. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0391>
- Anderluh, G., Razpotnik, A., Podlesek, Z., Maček, P., Separovic, F., & Norton, R. S. (2005). Interaction of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II with model membranes: 19F NMR studies. *Journal of Molecular Biology*, *347*(1), 27–39.
- Athanasiadis, A., Anderluh, G., Maček, P., & Turk, D. (2001). Crystal structure of the soluble form of equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *Structure*, *9*(4), 341–346. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00592-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00592-5)

- Avila, A. D., Mateo Acosta, C. De, & Lage, A. (1989). A carcinoembryonic antigen directed immunotoxin built by linking a monoclonal antibody to a hemolytic toxin. *International Journal of Cancer*, *43*(5), 926–929. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910430533>
- Bakrač, B., Gutiérrez-Aguirre, I., Podlesek, Z., Sonnen, A. F. P., Gilbert, R. J. C., Maček, P., Lakey, J. H., & Anderluh, G. (2008). Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(27), 18665–18677. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708747200>
- Ballesteros, J. A., & Weinstein, H. (1992). The role of Pro/Hyp-kinks in determining the transmembrane helix length and gating mechanism of a Leu-zervamicin channel. *Biophys. J.*, *62*, 110 – 111.
- Bansal, M., Kumar, S., & Velavan, R. (2000). HELANAL: a program to characterize helix geometry in proteins. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, *17*, 811 – 819.
- Barlow, D. J., & Thornton, J. M. (1988). Helix geometry in proteins. *Journal of Molecular Biology*, *201*(3), 601–619. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90641-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90641-9)
- Bellomio, A., Morante, K., Barlič, A., Gutiérrez-Aguirre, I., Viguera, A. R., & González-Mañas, J. M. (2009). Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin from the sea anemone *Actinia fragacea*. *Toxicon*, *54*(6), 869–880. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.022>
- Belmonte, G., Menestrina, G., Pederzoli, C., Križaj, I., Gubenšek, F., Turk, T., & Maček, P. (1994). Primary and secondary structure of a pore-forming toxin from the sea anemone, *Actinia equina* L., and its association with lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.*, *1192*(2), 197–204. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90119-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90119-8)
- Belmonte, G., Pederzoli, C., Maček, P., & Menestrina, G. (1993). Pore formation by the sea anemone cytolysin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. *The Journal of Membrane Biology*, *131*(1), 11–22. <https://doi.org/10.1007/BF02258530>
- Bingham, B. L., Freytes, I., Emery, M., Dimond, J., & Muller-Parker, G. (2011). Aerial exposure and body temperature of the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Invertebrate Biology*, *130*(4), 291–301. <https://doi.org/10.1111/j.1744->

7410.2011.00241.x

- Birck, C., Damian, L., Marty-Detraves, C., Lougarre, A., Schulze-Briese, C., Koehl, P., Fournier, D., Paquereau, L., & Samama, J. P. (2004). A new lectin family with structure similarity to actinoporins revealed by the crystal structure of *Xerocomus chrysenteron* lectin XCL. *Journal of Molecular Biology*, 344(5), 1409–1420. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.007>
- Bischofberger, M., Iacovache, I., & Gisou van der Goot., F. (2012). Pathogenic pore-forming proteins: function and host response. *Cell Host Microbe*, 12, 266–275.
- Blumenthal, K. M., & Kem, W. R. (1983). Primary structure of *Stoichactis helianthus* cytolysin III. *Journal of Biological Chemistry*, 258(9), 5574–5581.
- Borbón-Alpízar, H. (2009). Caracterización química de metabolitos aislados en un extracto con actividad antimicrobiana y antifúngica de la ascidia *Rhopalaea* sp proveniente del área de Cuajiniquil, Guanacaste, Costa Rica. Tesis de Maestría en Química, Universidad de Puerto Rico, Campus de Mayagüez.
- Borbón-Alpízar, H., Váldez, S., Alvarado-Mesén, J., Soto, R., & Vega, I. (2016). Antimicrobial properties of sea anemone *Anthopleura nigrescens* from Pacific coast of Costa Rica. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(5), 418–421. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.01.014>
- Borrelli, G. M., & Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 20774-20840.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254.
- Carrizo, M. E., Capaldi, S., Perduca, M., Irazoqui, F. J., Nores, G. A., & Monaco, H. L. (2005). The antineoplastic lectin of the common edible mushroom (*Agaricus bisporus*) has two binding sites, each specific for a different configuration at a single epimeric hydroxyl. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10614–10623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411989200>

- Casallanovo, F., Oliveira, F. J. F., de Souza, F. C., Ros, U., Martínez, Y., Pentón, D., Tejuca, M., Martínez, D., Pazos, F., Pertinhez, T. A., Spisni, A., Cilli, E. M., Lanio, M. E., Álvarez, C., & Schreier, S. (2006). Model Peptides Mimic the Structure and Function of the N-terminus of the Pore- Forming Toxin Sticholysin II 3. *Biopolymers (Peptide Science)*, *84*, 169–180. <https://doi.org/10.1002/bip>
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., & Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and molecular biology reviews*, *71*(1), 158-229.
- Chang, D. K., Cheng, S. F., Trivedi, V. D., & Lin, K. L. (1999). Proline affects oligomerization of a coiledcoil by inducing a kink in a long helix. *J. Struct. Biol.*, *128*, 270 – 279.
- Cilli, E. M., Pigossi, F. T., Crusca, E., Ros, U., Martinez, D., Lanio, M. E., Álvarez, C., & Schreier, S. (2007). Correlations between differences in amino-terminal sequences and different hemolytic activity of sticholysins. *Toxicon*, *50*(8), 1201–1204. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.013>
- Daly, M., Crowley, L. M., Larson, P., Rodríguez, E., Heestand Saucier, E., & Fautin, D. G. (2017). Anthopleura and the phylogeny of Actinioidea (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria). *Organisms Diversity and Evolution*, *17*(3), 545–564. <https://doi.org/10.1007/s13127-017-0326-6>
- Dang, L., & Van Damme, E. J. M. (2015). Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*, *117*(1), 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.020>
- De Los Rios, V., Oñaderra, M., Martínez-Ruiz, A., Lacadena, J., Mancheño, J. M., Martínez Del Pozo, Á., & Gavilanes, J. G. (2000). Overproduction in *Escherichia coli* and purification of the hemolytic protein sticholysin II from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Protein Expression and Purification*, *18*(1), 71–76. <https://doi.org/10.1006/prev.1999.1174>
- Drechsler, A., Potrich, C., Sabo, J. K., Frisanco, M., Guella, G., Dalla-Serra, M., Anderluh, G., Separovic, F., & Norton, R. S. (2006). Structure and activity of the N-terminal region of the eukaryotic cytolysin equinatoxin II. *Biochemistry*, *45*(6), 1818–1828.

<https://doi.org/10.1021/bi052166o>

- Dunn, D. F. (1974). Redescription of *Anthopleura nigrescens* from Hawaii. *Pacific Science*, 28(4), 377–382.
- Feliu, J. X., Cubarsi, R., & Villaverde, A. (1998). Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of *E. coli* cells. *Biotechnology and bioengineering*, 58(5), 536–540.
- Fração, B., Vasconcelos, V., & Antunes, A. (2012). Sea anemone (cnidaria, anthozoa, actiniaria) toxins: An overview. *Marine Drugs*, 10(8), 1812–1851. <https://doi.org/10.3390/md10081812>
- Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D. A., King, G. F., Nevalainen, T. J., Norman, J. A., Lewis, R. J., Norton, R. S., Renjifo, C., & de la Vega, R. C. R. (2009). The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10(1), 483–511. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>
- García-Linares, S., Castrillo, I., Bruix, M., Menéndez, M., Alegre-Cebollada, J., Martínez-del-Pozo, Á., & Gavilanes, J. G. (2013). Three-dimensional structure of the actinoporin sticholysin I. Influence of long-distance effects on protein function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 532(1), 39–45.
- Geny, B., & Popoff, M. R. (2006). Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. *Biology of the Cell*, 98(11), 667–678. <https://doi.org/10.1042/BC20050082>
- Gilbert, R. J. C. (2016). Protein-lipid interactions and non-lamellar lipidic structures in membrane pore formation and membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(3), 487–499. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.026>
- Gräslund, S., Sagemark, J., Berglund, H., Dahlgren, L. G., Flores, A., Hammarström, M., Johansson, I., Kotenyova, T., Nilsson, M., Nordlund, P., & Weigelt, J. (2008). The use of systematic N- and C-terminal deletions to promote production and structural studies of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 58(2), 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.11.008>

- Hervis, Y. P., Valle, A., Canet, L., Álvarez, C., Lanio, M. E., & Pazos, F. (2014). Relevance of Pro80 for membrane interaction and pore formation by sticholysin I, a toxin from *Stichodactyla helianthus* (Anthozoa: Stichodactylidae). *Rev. Cubana. Cienc. Biol.*, *3*, 27-40.
- Hiebert, T. C., & Bingham, B. L. (2012). The effects of symbiotic state on heterotrophic feeding in the temperate sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Marine Biology*, *159*(5), 939–950. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1871-8>
- Hinds, M. G., Zhang, W., Anderluh, G., Hansen, P. E., & Norton, R. S. (2002). Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II: Implications for pore formation. *Journal of Molecular Biology*, *315*(5), 1219–1229. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5321>
- Hong, Q., Gutiérrez-Aguirre, I., Barli, A., Malovrh, P., Kristan, K., Podlesek, Z., Maček, P., Turk, D., González-Mañas, J. M., Lakey, J. H., & Anderluh, G. (2002). Two-step membrane binding by equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(44), 41916–41924. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204625200>
- Houliston, E., Momose, T., & Manuel, M. (2010). *Clytia hemisphaerica*: A jellyfish cousin joins the laboratory. *Trends in Genetics*, *26*(4), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.01.008>
- Iacovache, I., Bischofberger, M., & van der Goot, F. G. (2010). Structure and assembly of pore-forming proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, *20*(2), 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.01.013>
- Il'ina, A. P., Lipkin, A., Barsova, E., Issaeva, M., Leychenko, E., Guzev, K., Monastyrnaya, M., Lukyanov, S., & Kozlovskaya, E. (2006). Amino acid sequence of RTX-A's isoform actinoporin from the sea anemone, *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon*, *47*(5), 517–520. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.12.014>
- Il'ina, A. P., Monastyrnaya, M. M., Isaeva, M. P., Guzev, K. V., Rasskazov, V. A., & Kozlovskaya, E. P. (2005). Primary structures of actinoporins from sea anemone *Oulactis orientalis*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, *31*(4), 320–324.

<https://doi.org/10.1007/s11171-005-0044-2>

- Jiang, X. Y., Yang, W. L., Chen, H. P., Tu, H. Bin, Wu, W. Y., Wei, J. W., Wang, J., Liu, W. H., & Xu, A. L. (2002). Cloning and characterization of an acidic cytolysin cDNA from sea anemone *Sagartia rosea*. *Toxicon*, 40(11), 1563–1569. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00173-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00173-3)
- Kawashima, Y., Nagai, H., Ishida, M., Nagashima, Y., & Shiomi, K. (2003). Primary structure of echotoxin 2, an actinoporin-like hemolytic toxin from the salivary gland of the marine gastropod *Monoplex echo*. *Toxicon*, 42(5), 491–497. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00226-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00226-5)
- Kem, W. R., & Dunn, B. M. (1988). Separation and characterization of four different amino acid sequence variants of a sea anemone (*Stichodactyla helianthus*) protein cytolysin. *Toxicon*, 26(11), 997–1008. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90198-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90198-5)
- Keselman, H. J., Huberty, C. J., Lix, L. M., Olejnik, S., Cribbie, R. A., Donahue, B., Kowalchuk, R. K., Lowman, L. L., Petoskey, M. D., & Levin, J. R. (1998). Statistical practices of educational researchers: An analysis of their ANOVA, MANOVA, and ANCOVA analyses. *Review of educational research*, 68(3), 350-386.
- Klyshko, E. V., Issaeva, M. P., Monastyrnaya, M. M., Il'yna, A. P., Guzev, K. V., Vakorina, T. I., Dmitrenok, P. S., Zykova, T. A., & Kozlovskaya, E. P. (2004). Isolation, properties and partial amino acid sequence of a new actinoporin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon*, 44(3), 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.06.006>
- Kohno, Y., Satoh, H., Iguchi, A., & Nagai, H. (2009). Characterization of a new hemolytic protein toxin from the sea anemone *Anthopleura asiatica*. *Fisheries Science*, 75(4), 1049–1054. <https://doi.org/10.1007/s12562-009-0112-2>
- Koussis, K., Goulielmaki, E., Chalari, A., Withers-Martinez, C., Siden-Kiamos, I., Matuschewski, K., & Loukeris, T. G. (2017). Targeted deletion of a Plasmodium site-2 protease impairs life cycle progression in the mammalian host. *PLoS One*, 12(1), 170-260.
- Kristan, K., Viero, G., Dalla-Serra, M., Maček, P., & Anderluh, G. (2009). Molecular

- mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon*, 54(8), 1125–1134. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.026>
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. En: J. M. Walker (Ed.), *The protein protocols handbook* (pp. 17-24). Totowa, NJ: Humana Press.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Langer, R. (1990). New Methods of Drug Delivery. *Science*, 249(4976), 1527–1533. <https://doi.org/10.1126/science.2218494>
- Lanio, M. E., Morera, V., Álvarez, C., Tejuca, M., Gómez, T., Pazos, F., Besada, VI., Martínez, D., Huerta, V., Padrón, G., & Chávez, M. D. L. A. (2001). Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, 39, 187–194. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00106-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00106-9)
- López-Castilla, A., Pazos, F., Schreier, S., & Pires, J. (2014). Solution NMR analysis of the interaction between the actinoporin sticholysin I and DHPC micelles correlation with backbone dynamics. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 82(6), 1022-1034.
- Los, F. C. O., Randis, T. M., Aroian, R. V., & Ratner, A. J. (2013). Role of Pore-Forming Toxins in Bacterial Infectious Diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 173–207. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00052-12>
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M.G., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2003). Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and C beta deviation. *Proteins*, 50, 437-450.
- Maček, P. (1992). Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones (Actiniaria). *FEMS Microbiology Letters*, 105(1–3), 121–129. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90082-Y](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90082-Y)
- Maček, P., & Lebez, D. (1988). Isolation and characterization of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia equina* L. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 26(5), 441–451. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2903587>

- Malovrh, P., Viero, G., Serra, M. D., Podlesek, Z., Lakey, J. H., Maček, P., Menestrina, G., & Anderluh, A. (2003). A novel mechanism of pore formation: membrane penetration by the N-terminal amphipathic region of equinatoxin. *J. Biol. Chem.*, *278*, 22678–22685.
- Mancheño, J. M., Martín-Benito, J., Martínez-Ripoll, M., Gavilanes, J. G., & Hermoso, J. A. (2003). Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure*, *11*(11), 1319–1328. <https://doi.org/10.1016/j.str.2003.09.019>
- Mariottini, G. L., & Pane, L. (2010). Mediterranean jellyfish venoms: A review on scyphomedusae. *Marine Drugs*, *8*(4), 1122–1152. <https://doi.org/10.3390/md8041122>
- Martinez, D., Campos, A. M., Pazos, F., Álvarez, C., Lanio, M. E., Casallanovo, F., Schreier, S., Salinas, R. K., Vergara, C., & Lissi, E. (2001). Properties of St I and St II, two isotoxins isolated from *Stichodactyla helianthus*: A comparison. *Toxicon*, *39*(10), 1547–1560. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00127-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00127-1)
- Mechaly, A. E., Bellomio, A., Gil-Cartón, D., Morante, K., Valle, M., González-Mañas, J. M., & Guérin, D. M. A. (2011). Structural insights into the oligomerization and architecture of eukaryotic membrane pore-forming toxins. *Structure*, *19*(2), 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.11.013>
- Mesa-Galloso, H., & Pérez-Oduardo, A. (2016). Modelos de formación de poros de las actinoporinas, citolisinas producidas por anémonas marinas. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, *5*(2): 1-15.
- Monastyrnaya, M. M., Leychenko, E., Isaeva, M., Likhatskaya, G., Zelepuga, E., Kostina, E., Trifonov, E., Nurminski, E., & Kozlovskaya, E. (2010). Actinoporins from the sea anemones, tropical *Radianthus macrodactylus* and northern *Oulactis orientalis*: Comparative analysis of structure-function relationships. *Toxicon*, *56*(8), 1299–1314. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.07.011>
- Monastyrnaya, M. M., Zykova, T. A., Apalikova, O. V., Shwets, T. V., & Kozlovskaya, E.

- P. (2002). Biologically active polypeptides from the tropical sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon*, 40(8), 1197–1217. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00139-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00139-3)
- Morante, K., Caaveiro, J. M. M., Tanaka, K., González-Mañas, J. M., & Tsumoto, K. (2015a). A pore-forming toxin requires a specific residue for its activity in membranes with particular physicochemical properties. *Journal of Biological Chemistry*, 290(17), 10850–10861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.615211>
- Morante, K., Caaveiro, J. M. M., Viguera, A. R., Tsumoto, K., & González-Mañas, J. M. (2015b). Functional characterization of Val60, a key residue involved in the membrane-oligomerization of fragaceatoxin C, an actinoporin from *Actinia fragacea*. *FEBS letters*, 589(15), 1840-1846.
- Nagai, H., Oshiro, N., Takuwa-Kuroda, K., Iwanaga, S., Nozaki, M., & Nakajima, T. (2002). A new polypeptide toxin from the nematocyst venom of an Okinawan sea anemone *Phyllodiscus semoni* (Japanese name “unbachi-isoginchaku”). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(12), 2621–2625. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2621>
- Nevalainen, T. J., Peuravuori, H. J., Quinn, R. J., Llewellyn, L. E., Benzie, J. A. H., Fenner, P. J., & Winkel, K. D. (2004). Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139(4), 731–735. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.006>
- Norton, R. S., Bobek, G., Ivanov, J. O., Thomson, M., Fiala-Ber, E., Moritz, R. L., & Simpson, R. J. (1990). Purification and characterisation of proteins with cardiac stimulatory and haemolytic activity from the anemone *Actinia tenebrosa*. *Toxicon*, 28(1), 29–41. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90004-Q](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90004-Q)
- Olivera, B. M., Rivier, J., Clark, C., Ramilo, C. A., Corpuz, G. P., Abogadie, F. C., Mena, E. E., Woodward, S. R., & Hillyard, D. R. C. L. (1990). Diversity of conus neuropeptides. *Science*, 249(4966), 257–263.
- Pardo-Cea, M. A., Castrillo, I., Alegre-Cebollada, J., Martínez-del-Pozo, Á., Gavilanes, J. G., & Bruix, M. (2011). Intrinsic local disorder and a network of charge–charge

- interactions are key to actinoporin membrane disruption and cytotoxicity. *The FEBS Journal*, 278(12), 2080-89.
- Parker, M. W., & Feil, S. C. (2005). Pore-forming protein toxins: From structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 88(1), 91–142. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.009>
- Pazos, F., Valle, A., Martínez, D., Ramírez, A., Calderón, L., Pupo, A., Tejuca, M., Morera, V., Campos, J., Fando, R., Dyszy, F., Schreier, S., Horjales, E., Álvarez, C., Lanio, M. E., & Lissi, E. (2006). Structural and functional characterization of a recombinant sticholysin I (rSt I) from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, 48(8), 1083–1094. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.004>
- Pentón, D., Pérez-Barzaga, V., Díaz, I., Reytor, M. L., Campos, J., Fando, R., Calvo, L., Cilli, E. M., Morera, V., Castellanos-Serra, L. R., Pazos, F., Lanio, M. E., Álvarez, C., Pons, T., & Tejuca, M. (2011). Validation of a mutant of the pore-forming toxin sticholysin-I for the construction of proteinase-activated immunotoxins. *Protein Engineering, Design and Selection*, 24(6), 485–493. <https://doi.org/10.1093/protein/gzr002>
- Pulagam, L. P., & Steinhoff, J. H. (2013). Acidic pH-induced membrane insertion of colicin A into *Escherichia coli* natural lipids probed by site-directed spin labeling. *J. Mol. Biol.*, 425, 1782-94.
- Pungerčar, J., Anderluh, G., Maček, P., Franc, G., & Štrukelj, B. (1997). Sequence analysis of the cDNA encoding the precursor of equinatoxin V, a newly discovered hemolysin from the sea anemone *Actinia equina*. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1341(2), 105-107. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(97\)00083-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(97)00083-6)
- Quesada, A. J., Acuña, F. H., & Cortés, J. (2014). Diet of the sea anemone *Anthopleura nigrescens*: composition and variation between daytime and nighttime high tides. *Zoological Studies*, 53, 26-32. <https://doi.org/10.1186/s40555-014-0026-2>
- Rachamim, T., & Sher, D. (2012). What Hydra can teach us about chemical ecology - how a simple, soft organism survives in a hostile aqueous environment. *International Journal of Developmental Biology*, 56(8), 605–611. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113474tr>

- Reiersen, H., & Rees, A. R. (2001). The hunchback and its neighbours: Proline as an environmental modulator. *Trends Biochem. Sci.*, 26, 679–684. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01957-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01957-0)
- Rivera-de-Torre, E., García-Linares, S., Alegre-Cebollada, J., Lacadena, J., Gavilanes, J. G., & Martínez-del-Pozo, Á. (2016). Synergistic action of actinoporin isoforms from the same sea anemone species assembled into functionally active heteropores. *Journal of Biological Chemistry*, 291(27), 14109–14119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.710491>
- Rojko, N., Kristan, K., Viero, G., Žerovnik, E., Maček, P., Dalla-Serra, M., & Anderluh, G. (2013). Membrane damage by an α -helical pore-forming protein, equinatoxin II, proceeds through a succession of ordered steps. *Journal of Biological Chemistry*, 288(33), 23704–23715. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.481572>
- Ros, U., Pedrera, L., Díaz, D., Karam, J. C. D., Sudbrack, T. P., Valiente, P. A., Martínez, D., Cilli, E. M., Pazos, F., Itri, R., Lanio, M. E., Schreier, S., & Avarez C. (2011). The membranotropic activity of N-terminal peptides from the poreforming proteins sticholysin I and II is modulated by hydrophobic and electrostatic interactions as well as lipid composition. *J. Biosci.*, 36, 781–791.
- Sahdev, S., Khattar, S. K., & Saini, K. S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307(2), 249–264 <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9603-6>
- Saier, M. H. (2000). Families of proteins forming transmembrane channels. *Journal of Membrane Biology*, 175(3), 165–180. <https://doi.org/10.1007/s002320001065>
- Samejima, Y., Yanagisawa, M., Aoki-Tomomatsu, Y., Iwasaki, E., Ando, J., & Mebs, D. (2000). Amino acid sequence studies on cytolytic toxins from sea anemone *Heteractis magnifica*, *Entacmaea quadricolor* and *Stichodactyla mertensii* (Anthozoa). *Toxicon*, 38(2), 259–264. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00154-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00154-3)
- Sankararamkrishnan, R., & Vishveshwara, S. (1992). Geometry of proline-containing α -helices in proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 39, 356 – 363

- Sauer, N. J., Mozoruk, J., Miller, R. B., Warburg, Z. J., Walker, K. A., Beetham, P. R., Schöpke, C. R., & Gocal, G. F. (2016). Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, *14*(2), 496-502.
- Scott, C., & Griffin, S. (2015). Viroporins: Structure, function and potential as antiviral targets. *Journal of General Virology*, *96*(8), 2000–2027. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000201>
- Senes, A., Engel, D. E., & DeGrado, W. F. (2004). Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Current Opinion in Structural Biology*, *14*(4), 465-479.
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, *41*(1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- Subburaj, Y., Ros, U., Hermann, E., Tong, R., & García-Sáez, A. J. (2015). Toxicity of an α -pore-forming toxin depends on the assembly mechanism on the target membrane as revealed by single molecule imaging. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(8), 4856-4865.
- Tanaka, K., Caaveiro, J. M. M., Morante, K., González-Manãs, J. M., & Tsumoto, K. (2015). Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid. *Nature Communications*, *6*, 4–6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7337>
- Tejuca, M., Anderluh, G., & Dalla-Serra, M. (2009). Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon*, *54*(8), 1206–1214. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.025>
- Tejuca, M., Anderluh, G., Maček, P., Marcel, R., Torres, D., Sarracent, J., Álvarez, C., Lanio, M. E., Dalla-Serra, M., & Menestrina, G. (1999). Antiparasite activity of sea-anemone cytolytins on *Giardia duodenalis* and specific targeting with anti-Giardia antibodies. *International Journal of Parasitology*, *29*, 378–387.
- Tejuca, M., Dalla-Serra, M., Potrich, C., Álvarez, C., & Menestrina, G. (2001). Sizing the radius of the pore formed in erythrocytes and lipid vesicles by the toxin sticholysin I

- from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Journal of Membrane Biology*, 183(2), 125–135. <https://doi.org/10.1007/s00232-001-0060-y>
- Tejuca, M., Díaz, I., Figueredo, R., Roque, L., Pazos, F., Martínez, D., Iznaga-Escobar, N., Pérez, R., Álvarez, C., & Lanio, M. E. (2004). Construction of an immunotoxin with the pore forming protein StI and ior C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line. *International Immunopharmacology*, 4(6), 731–744. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.02.010>
- Tsutsui, K., & Sato, T. (2018). Identification of the two new, functional actinoporins, CJTOX I and CJTOX II, from the deep-sea anemone *Cribrinopsis japonica*. *Toxicon*, 148, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.008>
- Valle, A., Alvarado-Mesén, J., Lanio, M. E., Álvarez, C., Barbosa, J. A. R. G., & Pazos, I. F. (2015). The multigene families of actinoporins (part I): Isoforms and genetic structure. *Toxicon*, 103, 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.028>
- Valle, A., Hervis, Y. P., Socas, L. B. P., Canet, L., Faheem, M., Barbosa, J. A. R. G., Lanio, M. E., & Pazos, I. F. (2016). The multigene families of actinoporins (part II): Strategies for heterologous production in *Escherichia coli*. *Toxicon*, 118, 64–81. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.03.018>
- Venselaar, H., Joosten, R. P., Vroiling, B., Baakman, C. A., Hekkelman, M. L., Krieger, E., & Vriend, G. (2010). Homology modelling and spectroscopy, a never-ending love story. *European Biophysics Journal*, 39(4), 551-563.
- Wang, Y., Chua, K. L., & Khoo, H. E. (2000). A new cytolysin from the sea anemone, *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning and functional expression 1. *Pharmacia*, 1478(1), 9–18.
- Wang, Y., Yap, L. L., Chua, K. L., & Khoo, H. E. (2008). A multigene family of Heteractis magnificalyisins (HMgs). *Toxicon*, 51(8), 1374–1382.
- Woolfson, D. N., & Williams, D. H. (1990). The influence of proline residues on α -helical structure. *FEBS Letters*, 277(1–2), 185–188.