



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Modelos de formación de poros de las actinoporinas, citolisinas producidas por anémonas marinas

Actinoporins pore forming models, cytolyisin from sea anemone

Haydee Mesa Galloso y Ayamey Pérez Oduardo

Centro de Estudio de Proteínas,
Facultad de Biología, Universidad
de La Habana.

* Autor para correspondencia:

mghaydee@gmail.com

RESUMEN

Las actinoporinas (APs) son proteínas citolíticas producidas por anémonas marinas y que pertenecen a la superfamilia de proteínas formadoras de poros (PFP). El mecanismo de formación de poros de las APs transcurre por diferentes etapas que incluyen: la unión de la proteína a la membrana, la oligomerización y el despliegue e inserción de la región aminoterminal en la bicapa, lo cual conduce a la formación del poro. Hasta el momento se han propuesto tres modelos de estructura del poro formado por las APs: el modelo del poro toroidal, el modelo del poro cónico y el modelo del poro híbrido. Los modelos difieren en cuanto a la estequiometría del poro y la relevancia de los lípidos en la arquitectura del canal. Existe debate acerca de las etapas requeridas para el ensamblaje del poro en la membrana por estas toxinas. Algunos estudios sugieren la existencia de estructuras preporo, mientras que otros la cuestionan. Sin embargo, existen múltiples evidencias acerca de la relevancia estructural y funcional de estructuras diméricas en la evolución de estas toxinas de su forma soluble monomérica hacia el canal transmembrana. En este trabajo se analizan los principales aspectos en debate acerca de la arquitectura del poro formado por las actinoporinas, así como la relevancia de posibles estructuras intermedias en el mecanismo de formación de poros de estas proteínas.

Palabras clave: actinoporinas, toxinas formadoras de poros, poro toroidal, poro híbrido, oligomerización en membranas.

ABSTRACT

Actinoporins (APs) are ~20kDa pore forming toxins (PFT) produced by sea anemones with a β -sandwich structure flanked by two α -helices and high affinity for sphingomyelin. The molecular mechanism of APs pore formation

Recibido: 2016-09-24

Aceptado: 2016-10-20

is composed of several well-defined steps: binding to the membrane, insertion of the N-terminal region, oligomerization and pore formation. Two hypothetical pathways have been postulated for describing the pore forming mechanism of these toxins: toroidal pore and hybrid pore. The toroidal pore proposes the direct participation of the lipids and the N-terminal region in the pore structure. In relation with this, it has proposed different stoichiometries by the pore formed by these toxins and the absence of pre-pore structures. The hybrid pore claims for an octameric structure stabilized by protein-protein and protein-lipid interactions. A difference between both models is the formation of a pre-pore state suggested for the hybrid pore. Besides, the difference between both models, they have consensus points. Here, we discuss the principal characteristics and differences between both pathways, and propose a consensus mechanism taking into account the model of assembly based on the addition of dimeric units for actinoporins family.

Keywords: membrane alanine aminopeptidase, APN structure, catalytic mechanism, APN natural inhibitors, APN functions

INTRODUCCIÓN

Actinoporins (APs) are ~20kDa pore forming toxins (PFT) produced by sea anemones. The molecular mechanism of APs pore formation is composed of several well-defined steps: binding to the membrane, insertion of the N-terminal region, oligomerization and pore formation. Three hypothetical models have been postulated for describing the architecture of the pore formed by these toxins: the toroidal pore, the conical pore and the hybrid pore. These models differ in the stoichiometry of the pore and in the implication of lipids in the channel walls. The different steps leading the pore assembly by APs on the membrane is still under debate. Some studies suggest the relevance of prepore structures while others assume that there is no need of such stable intermediates for the final pore assembly. However, many evidences support the structural and functional importance of dimeric structures in the transition of the monomer structure from solution to the pore state. Here, we discuss the principal aspects under debate about the architecture of the pore formed by APs and also the importance of possible intermediate structures in the pore-forming mechanism of these proteins.

DESARROLLO

I. Características generales de la actinoporinas

Las actinoporinas (APs) son proteínas formadoras de poros (PFP) que se encuentran en las secreciones de las anémonas de mar (Kem 1988, Turk 1991, Anderluh y Macek 2002). Este término es utilizado para designar a las citolisinas de 20 kDa. Las APs se caracterizan por ser proteínas globulares, monoméricas, solubles en agua, resistentes a la proteólisis, generalmente presentan puntos isoeléctricos superiores a

9,0 y en su mayoría no contienen residuos de Cys en su estructura primaria (Hinds, *et al.* 2002, Valle, *et al.* 2015). Estas proteínas se insertan espontáneamente en las membranas lipídicas para formar poros oligoméricos y su actividad formadora de poros es inhibida por preincubación con la esfingomieline (SM) (Anderluh y Macek 2002, Álvarez, *et al.* 2009, Kristan, *et al.* 2009, Valle, *et al.* 2015). Las APs se clasifican PFP- α , atendiendo al motivo estructural de hélice α que insertan en la membrana para la formación del poro (Gouaux 1997, Parker y Feil 2005, Alegre-Cebollada, *et al.* 2007b).

Las sticholysinas (StI y StII) de *Stichodactyla helianthus* (Anthozoa: Stichodactylidae) (Lanio, *et al.* 2001, Mancheno, *et al.* 2003, Castrillo, *et al.* 2009), la equinatoxina II (EqII) de *Actinia equina* (Anthozoa: Actiniidae) (Macek y Lebez 1988, Macek, *et al.* 1994, Athanasiadis, *et al.* 2001) y la fragaceatoxina C (FraC) de *Actinia fragacea* (Anthozoa: Actiniidae) (Bellomio, *et al.* 2009, Mechaly, *et al.* 2011, Mechaly, *et al.* 2012, Tanaka, *et al.* 2015) son las APs mejores estudiadas hasta el momento (Rojko, *et al.* 2015). Debido a la capacidad que presentan estas proteínas de desestabilizar las membranas diana y provocar la muerte celular, han sido reconocidas por sus potenciales aplicaciones en el diseño de inmunotoxinas, dirigidas selectivamente para causar la muerte de células no deseadas (Tejuca, *et al.* 2009) y en el diseño de sistemas de liberación de moléculas al citosol (Lanio, *et al.* 2010).

II. Características estructurales de las actinoporinas

Actualmente se conoce la estructura 3D de cuatro APs: EqII, determinada por resonancia magnética nuclear (RMN) y cristalografía de rayos X (Athanasiadis, *et al.* 2001, Hinds, *et al.* 2002), StII (Mancheno, *et al.* 2003) y FraC (Mechaly, *et al.* 2011), determinadas por

cristalografía de rayos X y StI, determinada por RMN (García-Linares, *et al.* 2013). Estas proteínas están formadas por un núcleo central organizado en forma de sándwich β (NCH- β) que contiene dos hojas β de cinco y cuatro hebras, respectivamente, y se encuentra flanqueado por dos hélices α , orientadas perpendicularmente una en relación a la otra (Fig. 1A). La superposición de los modelos cristalográficos de EqtII, StII y FraC reveló un alto grado de similitud con una diferencia de menos de 0,9 Å (Fig. 1C) (Mancheno, *et al.* 2003, Mechaly, *et al.* 2011). La primera hélice α (α 1) está próxima al extremo amino entre las hebras β 1 y β 2 en dichas APs, excepto en StI y posee características anfipáticas. La segunda hélice α (α 2) está ubicada entre las hebras β 7 y β 8 cercana al extremo carboxilo y se encuentra restringida en movimiento (Fig. 1B) (Athanasiadis, *et al.* 2001, Hinds, *et al.* 2002, Mancheno, *et al.* 2003, Mechaly, *et al.* 2011, García-Linares, *et al.* 2013). Estas hélices α interactúan con el sándwich β a través de interacciones hidrofóbicas, contactos de van der Waals y puentes salinos (Mancheno, *et al.* 2003).

Las APs poseen un grupo de residuos aromáticos en la superficie de la proteína, el cual se ha demostrado que está involucrado en el reconocimiento de los lípidos y en la unión a la membrana (Trp112, Tyr113, Trp116, Tyr133, Tyr137 y Tyr138, en StII). La determinación de la estructura 3D de un complejo StII-fosforilcolina (POC) permitió identificar un sitio de unión a POC (Fig. 1C) (Mancheno, *et al.* 2003). Este sitio, conservado en el resto de las APs (Mancheno, *et al.* 2003, Tanaka, *et al.* 2015), está constituido por los residuos Ser52, Val85, Ser103, Pro105, Tyr111, Tyr131, Tyr135 y Tyr136 en StII, se encuentra conservado en StII, StI, EqtII y FraC (Anderluh, *et al.* 2003, Castrillo, *et al.* 2009, Mechaly, *et al.* 2011). Se destaca una agrupación de aminoácidos aromáticos: Phe106, Trp110, Tyr111, Trp114, Tyr131, Tyr135 y Tyr136 que se encuentran cercanos al sitio de unión a POC (Anderluh y Macek 2002). Bakrač y colaboradores (2008) definieron al conjunto estructural compuesto por el sitio de unión a POC y la agrupación de aminoácidos aromáticos como el sitio de unión interfacial (SUI). Además, ha sido descrita una agrupación de aminoácidos básicos de StII compuesta por: Lys118, Lys149, Arg156, Arg175, Lys123, Arg124 y Arg125. A estos residuos se les atribuye la función de interactuar con las cargas negativas de los fosfolípidos que conforman las membranas lipídicas (Mancheno, *et al.* 2003).

Estudios recientes describen la presencia de cinco sitios de unión de los lípidos en la estructura monomérica de FraC (L1, L2, L3, L4 y L5) (Fig. 1D) (Tanaka, *et al.* 2015). De esta forma se propuso por primera vez la multivalencia lipídica en las APs. La descripción de múltiples sitios de unión a los lípidos en las APs es una nueva idea en la interacción de las PFP con las membranas biológicas (Ros y Garcia-Saez 2015, Tanaka, *et al.* 2015). Al parecer, la principal interacción se establece con la fosforilcolina (POC), la cual es la cabeza polar de la fosfatidilcolina (PC) y de la SM. Los sitios L2 y L3 se definieron como sitios de unión primaria y de mayor afinidad por los lípidos, mientras que los sitios L4 y L5 fueron considerados como sitios de menor afinidad por los lípidos (Fig. 1D). Cabe destacar que el sitio de unión al grupo POC, propuesto a partir de la estructura de StII, se encuentra en una orientación que se solapa con los sitios L2 y L3 de FraC (Rojko, *et al.* 2015, Tanaka, *et al.* 2015). Es notable que el sitio L1 forma parte de la arquitectura del poro de FraC y conectan monómeros adyacentes en el canal (Fig. 2C). De hecho la superficie de interacción proteína-lípido representa alrededor del 37% de la superficie total de contacto en el poro transmembrana. La región hidrofóbica de los sitios L1 se encuentran ocupando parte de los espacios desocupados en las paredes del poro conocidos como "ventanas". Tales ventanas no han sido observadas en otras PFPs y aunque se desconoce su función estructural se ha propuesto que pueden jugar un importante rol en la difusión de pequeñas moléculas hidrofóbicas a través de la membrana y en los movimientos transbica de los lípidos (Tanaka, *et al.* 2015).

III. Modelos de formación de poros propuestos para las APs

Durante décadas ha existido el consenso de que los poros originados por las APs son estructuras poco rígidas y poco estables, lo que durante décadas dificultó su visualización y su aislamiento en presencia de detergentes (Belmonte, *et al.* 1993, Kristan, *et al.* 2009). Debido a estas limitaciones, una aproximación inicial a la caracterización de los mismos fue posible a partir de estudios de los cambios de conductancia iónica en monocapas lipídicas planas (Belmonte, *et al.* 1993, Tejuca, *et al.* 1996). El radio del poro originado por las sticholysinas y EqtII en eritrocitos y liposomas se estimó en presencia de oligosacáridos y polietilenglicoles de diferentes radios hidrodinámicos y resultó

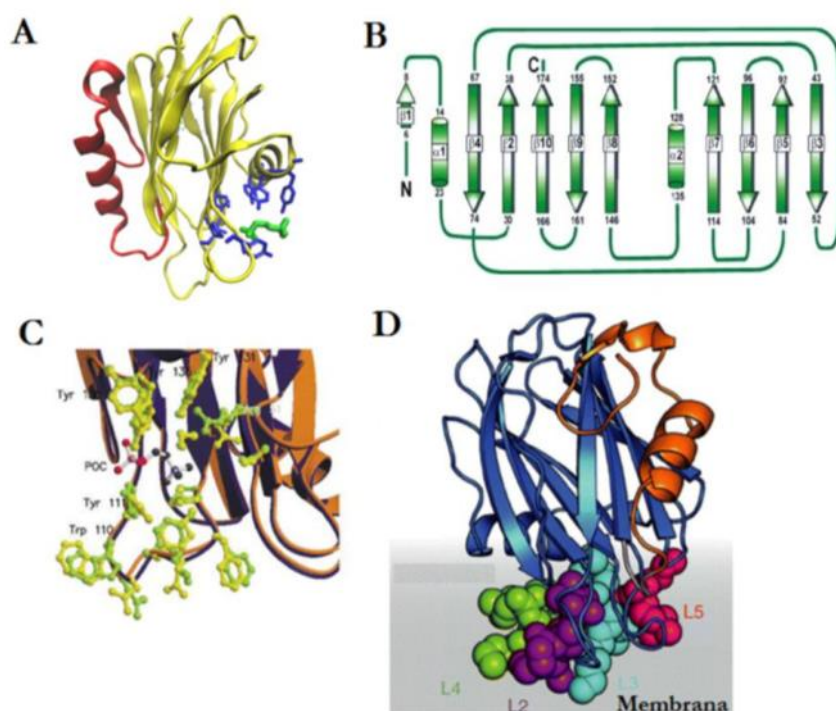


Figura 1: Representación esquemática de la estructura 3D y sitios de unión a la membrana de las actinoporinas. A) Diagrama de cintas del monómero de StII en complejo con la POC. En amarillo se representan las estructuras en hojas β , en rojo la hélice α aminoterminal y en azul el sitio de unión a POC (verde) (adaptada de Mancheno, *et al.* 2003). B) Diagrama topológico de la estructura secundaria de StII. Las hojas β se encuentran representadas con flechas y las hélices α con cilindros. Ambos tipos de representaciones están enumeradas en orden de aparición desde el extremo amino hasta el carboxilo (tomada de Mancheno, *et al.* 2003). C) Sitio de unión a POC propuesto por Mancheno, *et al.* (2003) para StII (adaptada de Mancheno, *et al.* 2003). D) Múltiples sitios de unión a la membrana sugeridos para FraC: L2 y L3 (violeta y azul) sitios de alta afinidad capaces de reconocer las cabezas polares expuestas al solvente como el grupo POC; L4 y L5 (verde y rosado) representan los sitios de baja afinidad a POC o sitios de alta afinidad a lípidos de diferente cabeza polar (adaptada de Tanaka, *et al.* 2015).

Figure 1: Eschematic view of the 3D structure and membrane binding sites of actinoporins. A) Stereo view ribbon diagram of StII-POC complex. The β -sheet structure, the N-terminal α helix and the POC binding site are represented in yellow, red and blue respectively. (modified from Mancheno, *et al.* 2003) B) Topology diagram of StII's secondary structure. α helices and β strands are represented by cylinders and arrows, respectively. Both representation are numerated since N-terminal region until the C-terminal (modified from Mancheno, *et al.* 2003). C) POC binding site suggested by Mancheno, *et al.* (2003) for StII (modified from Mancheno, *et al.* 2003). D) Multiple lipid binding sites proposed to FraC: L2 and L3 (purple and cyan) are proposed as high affinity sites and are suited to recognize the solvent-exposed region of the lipids, the POC head group. L4 and L5 (green and magenta) represent low-affinity sites or probably high-affinity binding sites for lipids with head groups other than POC (modified from Tanaka, *et al.* 2015).

ser de alrededor de 1 nm, independientemente del osmoprotector de referencia utilizado o de la concentración de toxina ensayada (Tejuca, *et al.* 2001). Resulta notable que con posterioridad estos valores fueron confirmados a partir de estudios cristalográficos con StII y FraC (ver detalles más adelante) (Mechaly, *et al.* 2011, Tanaka, *et al.* 2015).

Hasta el momento se han propuesto varios modelos para la arquitectura del poro formado en las membranas por las APs: el poro toroidal (Álvarez, *et al.* 2001), el poro cónico (Mechaly, *et al.* 2011) y el poro híbrido. El modelo de poro toroidal plantea que el poro está formado por 3-4 monómeros de proteínas y lípidos no formadores de bicapa. El modelo del poro cónico plantea que el poro está formado por 9 monómeros

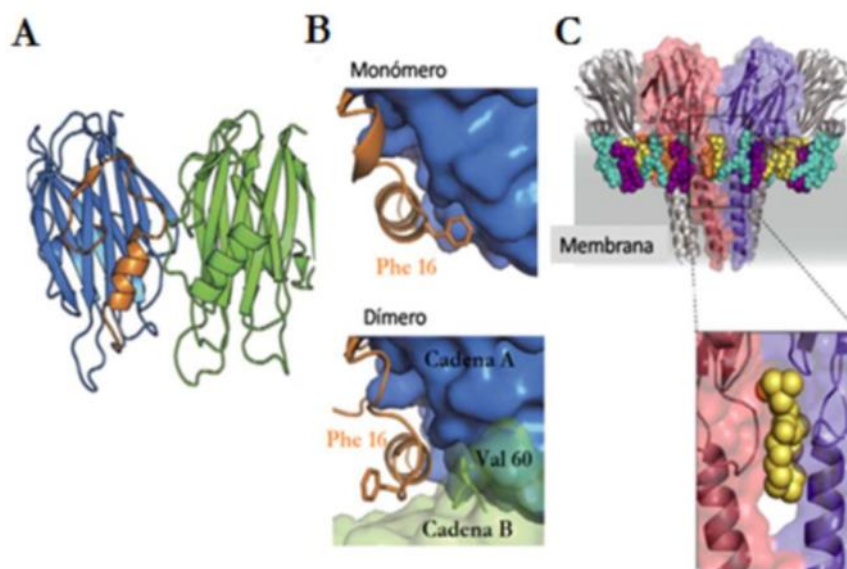


Figura 2: Estructura del posible intermediario dimérico y del poro octamérico de FraC. A) Estructura 3D del dímero de FraC. B) Cambios conformacionales de la Phe 16 y los residuos adyacentes en la estructura dimérica (vista inferior) con respecto a la estructura monomérica (vista superior). C) Estructura del poro octamérico de FraC. Vista superior: el poro está formado por 8 protómeros y 24 moléculas de lípidos, estas últimas se muestran en amarillo, violeta y azul. Vista inferior: lípidos no anulares ocupan las “ventanas” entre las hélices de cada monómero. (modificada de Tanaka y colaboradores (2015)).

Figure 2: Structures of the possible dimeric intermediate and the octameric pore of FraC. A) 3D structure of dimeric FraC B) Conformational changes at Phe 16 and adjacent residues in the dimeric structure (top view) respect to monomeric structure (bottom view). C) Octameric pore structure of FraC. Top view : the pore is form by 8 protomers and 24 lipid molecules shown in yellow, purple and blue. Close-up view: of non-annular lipids in the “windows” between the helix of each monomer (modified from Tanaka, et al. 2015).

de proteína y excluye la participación de lípidos, mientras que el modelo del poro híbrido asume que el poro está formado por 8 monómeros con participación de los lípidos (Tanaka, *et al.* 2015). A pesar de estas diferencias en la arquitectura del poro, todos los modelos coinciden en que el mecanismo de formación de poros por las APs consta de varias etapas que incluyen: la unión a la membrana, la oligomerización e inserción en la bicapa y finalmente la estructuración del poro transmembrana. Aún, la secuencia exacta de eventos que tiene lugar durante la completa inserción de las APs en la membrana se encuentra bajo debate. Es muy probable que durante el ensamblaje del poro estas proteínas atraviesen por diferentes estados unidos a las membranas que difieren en estructura y grado de oligomerización. A continuación, se resumen las principales características y evidencias experimentales obtenidas para los diferentes modelos del poro formado por las APs.

IV. Modelo del poro toroidal

En el modelo del poro toroidal se propone que el poro está estructurado en arreglo proteolípido. El modelo también asume la participación directa de la cabeza polar de los lípidos en la estructura del canal, lo que implica la formación de una estructura lipídica no lamelar (Álvarez, *et al.* 2001, Mancheno, *et al.* 2003). Así, los lípidos que componen el poro, adoptan una curvatura positiva en el plano perpendicular a la bicapa y curvatura negativa en el plano de la membrana y las hélices aminoterminales se encuentran intercaladas entre las cabezas polares de los lípidos (Fig. 3A). En este modelo se plantea que el poro funcional está formado por las hélices aminoterminales de 3-4 monómeros de proteínas que se insertan transmembrana, con los lípidos intercalados entre las unidades de proteína las que no interaccionan entre sí (Tabla 1).

El modelo del poro toroidal se sugirió por primera vez a partir de estudios funcionales con las sticholysinas. Los estudios de la actividad permeabilizante de Stl y

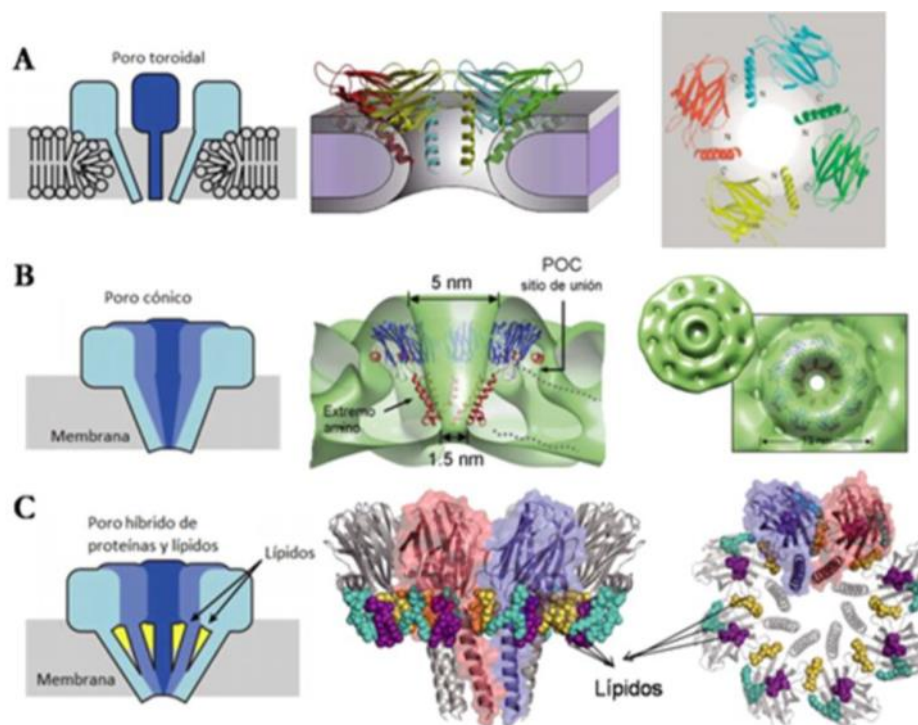


Figura 3: Modelos de los poros transmembranas formados por las actinoporinas. A) Modelo del poro toroidal, las hélices α de 3-4 monómeros de StII (cada uno representado en rojo, azul, amarillo o verde) conjuntamente con las cabezas polares de los fosfolípidos (región en gris) conforman las paredes del canal (modificada de Alvarez, *et al.* 2009; Tanaka, *et al.* 2015.). B) Modelo del poro cónico, el núcleo β de cada monómero se representa en azul y las hélices α en rojo, no se observan lípidos en la estructura del poro (modificada de Mechaly, *et al.* 2011; Tanaka, *et al.* 2015). C) Modelo del poro híbrido, 8 monómeros forman la estructura octamérica, cada monómero se une a tres moléculas lipídicas. Los lípidos se representan mediante esferas, en amarillos lo que forman parte del poro y en violeta y azul los que constituyen sitios de unión primaria a la membrana (modificada de Tanaka, *et al.* 2015).

Figure 3: Transmembrane pore models form by actinoporins A) Toroidal pore model, the α helix of 3 to 4 monomers of StII (represented in red, blue, yellow and green) with the polar head of the phospholipids (grey) form the walls of the channel (modified from Alvarez, *et al.* 2009; Tanaka, *et al.* 2015). B) Conic pore model, the β core of each monomer is represented in blue and the α -helix in red, not presence of lipid in the pore structure (modified from Mechally, *et al.* 2011; Tanaka, *et al.* 2015). C) Pore-hybrid model, 8 monomers form the octameric structure in wich each monomer binds to three lipid molecule. The lipids are represented by beads, in yellow the lipids that are forming part of the pore strcuture; and in purple and blue the lipids forming the membrane-binding region (modified from Tanaka, *et al.* 2015).

StII en liposomas de PC y SM en los que se incluyó ácido fosfatídico en pequeñas proporciones demostraron que la presencia de este lípido aniónico favorece la formación de poros en las membranas (Álvarez, *et al.* 2001). Sin embargo, también se observó un incremento en la actividad permeabilizante de estas proteínas en liposomas en los que se incluyó fosfatidiletanolamina, un lípido zwitteriónico o estearilamina, un lípido cargado positivamente. Esto evidenció que el incremento en la actividad funcional de la toxina está relacionado con la presencia de lípidos formadores de estructuras no lamelares en las bicapas.

Otra implicación de este modelo es que cada poro constituye un punto de fusión entre las monocapas interna y externa lo que puede favorecer el movimiento transbicapa de los lípidos (Epand 1998). La capacidad de las sticholysinas de promover el movimiento transbicapa de los lípidos fue un hallazgo experimental que sustentó esta hipótesis (Álvarez, *et al.* 2001). Estas evidencias resultaron consistentes con los resultados obtenidos a partir de estudios de resonancia paramagnética electrónica que permitieron determinar que las sticholysinas no causan la inmovilización de sondas de espín localizadas hacia el centro

Tabla 1: Comparación entre los modelos de formación de poros

Table 1: Comparison between the pore-forming models

Características	Modelos de poros		
	Toroidal	Cónico	Híbrido
Número de monómeros	3-4 monómeros	9 monómeros	8 monómeros
Participación de los lípidos	Sí	No	Sí
Interacción proteína-proteína	No relevantes, lípidos intercalados entre los monómeros de proteínas	Sí	Sí
Interacción proteína-lípido	Notables	No	Sí
Inducción de curvatura	curvatura positiva en el plano perpendicular a la bicapa y curvatura negativa en el plano de la membrana	No	ND
Movimiento flip-flop	Sí	No	ND
Diámetro del poro	~2 nm	1,5 nm (interno)	1,6 nm (interno)
Metodología	Microscopía electrónica Microscopía de fuerza atómica	Difracción de rayos X Crio microscopía electrónica	Difracción de rayos X

ND: no determinado experimentalmente

de la bicapa (Álvarez, *et al.* 2003). De este modo, se evidenció que estas toxinas, a pesar de su demostrada capacidad formadora de poros, no son capaces de atravesar completamente el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica. Esta menor penetración puede explicarse a partir del modelo de formación de poros de naturaleza lipídica-toroidal, cuya estructuración implica el reordenamiento de los lípidos en la membrana, de modo que el centro de la bicapa queda menos expuesto al contacto con la toxina (Álvarez, *et al.* 2003). El modelo lipídico toroidal fue posteriormente propuesto para EqtII basado en que su interacción con vesículas liposomales de PC y SM promueve el desorden de los lípidos como se demostró en estudios de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y resonancia magnética nuclear de ^{31}P (Anderluh, *et al.* 2003). En este mismo estudio, se demostró que la selectividad a cationes de los poros formados por EqtII aumenta en presencia de PA, lo cual sugiere la participación de los lípidos en el canal conductivo (Anderluh, *et al.* 2003). El modelo del poro toroidal ha sido propuesto para otras PFP tipo α como la colicina E1, la proteína proapoptótica Bax y péptidos antimicrobianos como la melitina y la magainina (Santo y Berkowitz 2012).

Estos datos experimentales obtenidos a partir de estudios funcionales están en concordancia con las estructuras tetraméricas de StII observadas en presencia de monocapas lipídicas por Mancheno y colaboradores (2003, 2006). El ajuste de la estructura cristalina de

StII al ensamblaje bidimensional de la proteína en monocapas obtenido por microscopía electrónica en cristales bidimensionales, permitió obtener un modelo (18 Å de resolución) de una estructura tetramérica de (~2 nm diámetro) en dichas membranas. En el sistema de monocapas es imposible la formación de un poco transmembrana, teniendo en cuenta que este sistema carece de unas de las capas que conforman la bicapa lipídica, por lo que esta estructura se consideró como un estado preporo (ver análisis más detallado en epígrafe VII). Sin embargo, en el contexto del modelo del poro toroidal fue posible explicar cómo las dimensiones del tetrámero observado eran superiores a las esperadas teniendo en cuenta la participación exclusiva de tres a cuatro hélices α de la proteína, ya que la participación adicional de los lípidos en el canal permitiría rellenar las dimensiones de 2 nm de radio observadas mediante diferentes métodos.

Durante el refinamiento de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica, la región del extremo amino y el lazo que une a la hebra $\beta 7$ con la hélice 2α del carboxilo terminal quedaron fuera del mapa de densidad electrónica, lo cual indicó que estas son las únicas capaces de experimentar cambios conformacionales relevantes durante la etapa de oligomerización. El despliegue de la hélice α del cuerpo de la proteína permitió mejorar la calidad del ajuste de la estructura tetramérica, lo cual sugirió la necesidad de que dicha hélice experimente un movimiento pseudo-rígido a través del lazo que la une con el cuerpo de la

proteína. Este estado en el que la hélice α del extremo amino queda separada del cuerpo de la proteína debe ocurrir con anterioridad a la formación del poro transmembrana (Mancheno, *et al.* 2003, Mancheno, *et al.* 2006), aunque esta etapa constituye aún motivo de debate (ver acápite VII).

V. Modelo del poro cónico

El creciente desarrollo de las técnicas de difracción de rayos X y la criomicroscopía electrónica ha permitido obtener notables avances en la caracterización detallada de las posibles estructuras de las APs en presencia de lípidos o sistemas que los mimetizan. Un segundo modelo, conocido como poro cónico, se propuso a partir de determinaciones estructurales de los cristales de una estructura nonamérica de FraC en presencia del detergente N-óxido-N,N-dimetildecilamina y de las imágenes de los poros formados por esta AP en vesículas liposomales compuestas por DOPC y SM (Mechaly, *et al.* 2011) (Fig. 3B). A partir de estos hallazgos, se propuso que el poro que originan las APs está constituido por las hélices α del extremo amino de nueve monómeros, sin la participación de los lípidos de la membrana, lo que representó un punto de ruptura con el modelo del poro toroidal (Tabla 1).

Las imágenes de microscopía electrónica no permitieron resolver las subunidades individuales de FraC en el poro dada la resolución moderada del mapa de densidad obtenido. Sin embargo, el ajuste de la estructura cristalina de alta resolución (1,8 Å) del nonúmero de FraC obtenido en presencia del detergente, permitió el refinamiento de la estructura de baja resolución (hasta 30 Å) del poro formado en liposomas. En este modelo se propone que el canal tiene forma de embudo y se caracteriza por un diámetro superior de 5 nm y un diámetro inferior de 1,5 nm, aproximadamente igual al calculado previamente para EqTII y las sticholysinas (Belmonte, *et al.* 1993, Tejuca, *et al.* 2001). Este modelo, con mayor analogía a los poros tipo barril formados por ejemplo por las β -PFT (Heuck, *et al.* 2001) representó un nuevo desafío en el campo de estudio de las APs y de las PFP- α . Hasta el momento se pensaba las PFP- α solo eran capaces de formar poros cuando las hélices que formaban parte del dominio transmembrana estaban asociadas a los lípidos, como en el caso del modelo del poro toroidal. Por ello y otras razones (ver próximo párrafo), esta propuesta fue motivo de amplio debate en el

campo de las APs y fue sometida a validación experimental en los años posteriores.

Inicialmente, la estructura nonamérica de FraC en presencia de detergente se consideró como un estado prelítico pues no contaba con las hélices del extremo amino desplegadas (Morante 2012). Comúnmente se consideran estados prelíticos a estructuras unidas a membranas (oligoméricas o no) que no son capaces de formar poros funcionales, pero que pueden evolucionar hacia un poro. En este caso, se consideró la estructura del nonúmero oligomérico obtenido con alta resolución en presencia de detergente como un estado prelítico tipo preporo, aunque no se pudieron mostrar evidencias acerca de la capacidad de dicha estructura de progresar hacia un poro funcional (Rojko, *et al.* 2015, Tanaka, *et al.* 2015). De hecho, fue necesario forzar el despliegue del extremo amino para construir el modelo del poro en vesículas liposomales (Mechaly, *et al.* 2011). Resulta notable que, sus propios autores en colaboración con el grupo de Tsutomoto (Tanaka, *et al.* 2015), sugirieron con posterioridad que FraC forma poros octámicos en las membranas teniendo en cuenta que las interacciones proteína-proteína que se establecen en dicha estructura pudieran ser más favorables, en términos de área de interacción, que en la estructura nonamérica (ver más adelante consideraciones estructurales acerca de la mayor factibilidad funcional de la estructura octamérica con relación al nonúmero).

VI. Modelo del poro híbrido

Recientemente, se obtuvo una importante contribución en la comprensión del mecanismo de formación de poros de esta familia de proteínas mediante la determinación de la estructura cristalográfica de diferentes estados conformacionales de FraC que incluyeron: el monómero en estado soluble, el monómero unido a lípidos, un posible intermediario dimérico y el poro oligomérico transmembrana (Tanaka, *et al.* 2015). El modelo del poro híbrido se propuso a partir de la determinación de la estructura cristalográfica del poro transmembrana de FraC (Tanaka, *et al.* 2015).

En este modelo, FraC forma un poro proteolipídico octámico en la membrana donde cada monómero está asociado a tres moléculas de lípidos (Fig. 3C). Este modelo tanto las interacciones proteína-proteína como las proteína-lípidos son relevantes para la estabilización del canal por lo que resultó una propuesta

con características comunes con el modelo del poro toroidal y el modelo del poro cónico (Tabla 1).

El análisis de los cristales de FraC obtenidos en presencia del lípido DHPC (1,6-2,3 Å de resolución), permitió determinar que cada cadena de proteína podía estar unida hasta 4 moléculas de lípidos. Los sitios de unión a dichas moléculas lipídicas se definieron como L2, L3, L4 y L5 y se caracterizaron por tener diferente afinidad (como se explicó anteriormente en el epígrafe II). Resulta notable que no se observaron evidencias del sitio L1 en el estado monomérico de FraC lo que refuerza su rol como lípido conector de dos protómeros adyacentes en el estado oligomérico. Al comparar la estructura del estado monomérico de FraC unido a la membrana con la estructura en solución (rmsd 0.37 ± 0.10 Å), se comprobó que la interacción inicial a lípidos no promueve cambios estructurales relevantes. Sin embargo, se observaron dos cambios conformacionales ligeros al interactuar con la membrana: el movimiento de ~ 8 Å del lazo móvil en solución que comprende los residuos del 77 al 85 y el despliegue parcial de los residuos del 2 al 6 del extremo amino (Tanaka, *et al.* 2015). La flexibilidad de este lazo podría contribuir a la interacción de FraC con regiones heterogéneas en la membrana (Tanaka, *et al.* 2015). En este sentido, se propuso que el cambio conformacional de los residuos del 2 al 6 constituye un punto de variabilidad estructural que contribuye a la separación de la región aminoterminal del NCH- β .

La estructura cristalina de un posible intermediario dimérico se obtuvo en presencia de POC y del detergente dodecilmaltoside (1,6 Å de resolución). En contraste con el monómero unido a membrana, la estructura del posible intermediario dimérico muestra un cambio conformacional notable respecto al monómero en solución en los residuos del 14 al 17 de la región aminoterminal (Tanaka, *et al.* 2015). En la forma monomérica de FraC, la cadena lateral de la Phe16 está insertada en una cavidad hidrofóbica de la región correspondiente al NCH- β (Fig. 2A y B). El cambio conformacional de los residuos del 14 al 17 permite un desplazamiento de 4,7 Å del carbono α de la cadena lateral de la Phe16 en contacto con el solvente, así como un ajuste estructural de la Gly15 y el Asp17 (Tanaka, *et al.* 2015). Dicho proceso conduce a la exposición del residuo de Val60 y la formación del posible intermediario dimérico en la membrana. Este tipo de interacción se observó también en la estructura

nonamérica descrita por Mechaly y colaboradores (2011).

Resultó notable que la interfaz de dimerización del posible intermediario dimérico posee una elevada similitud con la interfaz del poro octamérico (ver detalles más adelante) obtenido en el mismo estudio (rmsd 0.4 ± 0.04). Dicha similitud reforzó la validez funcional de dicha estructura dimérica como posible estructura intermedia en el ensamblaje del poro. Basados en tal similitud, los autores construyeron un modelo de un posible estado preporo octamérico de FraC. Tal estructura preporo modelo está compuesta 8 monómeros de FraC y posee dimensiones similares al estado del poro, pero posee las hélices del extremo amino unidas al cuerpo de la proteína (Tanaka, *et al.* 2015). En esta propuesta, la inserción del extremo amino en la membrana debe ocurrir una vez completada la estructura oligomérica octamérica y no se supone la existencia de otros estados oligoméricos intermediarios de menor tamaño (Morante, *et al.* 2015, Tanaka, *et al.* 2015). Sin embargo, hasta el momento, no se cuenta con evidencias experimentales que demuestren la relevancia funcional del modelo del preporo octamérico. Aunque la interfaz de oligomerización determinada en el octamero es conservada con al nonamero cónico (Mechaly, *et al.* 2011), el ángulo que adoptan los monómeros en ambas estructuras difiere. Es notable que en la estructura octamérica se observa un incremento del área de contacto y de los enlaces de hidrógeno, lo que determina el mayor grado de compactación de esta estructura y por lo tanto su mayor factibilidad para sufrir cambios conformacionales que le permitan evolucionar como estructura lítica (Tanaka, *et al.* 2015).

La estructura cristalina de alta resolución (3,1 Å) del poro transmembrana formado por FraC se obtuvo en mesofases lipídicas formadas a partir de partículas de poros. La inducción de los poros se logró a partir de la preincubación de FraC soluble con vesículas liposomales de PC y SM seguida de dos pasos de purificación en presencia de detergentes. El poro octamérico propuesto para FraC está formado por la región aminoterminal de las hélices de 8 monómeros de la toxina en presencia de 24 moléculas lipídicas (Tanaka, *et al.* 2015). En este modelo se propuso que la SM no solo actúa como receptor lipídico en la membrana, sino como un elemento estructural importante en el ensamblaje del poro (Tanaka, *et al.* 2015). En este sentido, se identificó que una de las tres moléculas

lipídicas (L1) se ubica entre dos protómeros adyacentes en regiones denominadas “ventanas” ubicadas entre las hélices que conforman el poro. En este modelo, el canal se caracteriza por un diámetro superior de 6 nm y un diámetro inferior de 1,6 nm, similar al descrito para el modelo del poro cónico (Mechaly, *et al.* 2011).

La principal limitación del modelo de poro híbrido es que no brinda ninguna información sobre el proceso de reorganización de la membrana lipídica (Cosentino, *et al.* 2015). Sin embargo, la presencia de ventanas o espacios parcialmente desocupados entre los protómeros de proteína pudiera permitir el movimiento transbicapa de los lípidos y la inducción de estructuras no lamelar (Tanaka, *et al.* 2015). Futuros es-

tudios deberán esclarecer la función de tales modificaciones en la estructura lamelar de los lípidos a la luz del modelo del poro híbrido. Tales evidencias podrían reconciliar aparentes puntos en discordia con el modelo del poro toroidal. En este sentido, resulta notable que la estructura octamérica obtenida por Tanaka y colaboradores (Tanaka, *et al.* 2015) ha sugerido el reanálisis de las estructuras tetraméricas observadas previamente para StII (Mancheno, *et al.* 2003). Una segunda inspección de los tetrámeros de StII sugiere que dichas estructuras ocultan una estructura octamérica similar a la de FraC. De hecho, en tal estudio se observó una densidad máxima de 8 alrededor del perímetro del poro formado por StII, que fueron tratadas como cuatro lóbulos de densidad independientes (Gilbert 2015). Los estudios recientes con FraC

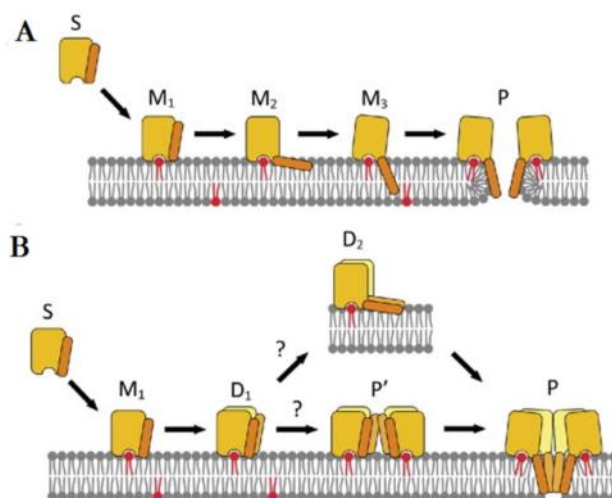


Figura 4: Mecanismos de formación de poros propuestos para las actinoporinas A) Mecanismo basado en el modelo del poro toroidal: Los monómeros de la toxina en solución (S) se unen a SM (rojo) en la membrana (M_1), posteriormente la hélice α (rectángulo naranja) se transfiere a la interfase agua-lípido (M_2), los monómeros oligomerizan para formar el poro (P) donde las hélices α se insertan en la membrana. Resultados recientes sugieren que la inserción de las hélices α en la membrana ocurre previo a la formación del oligómero conformando otro estado intermedio en la membrana (M_3). B) Mecanismo basado en el modelo del poro híbrido. Este modelo incluye la formación de un intermediario dimérico (D_1 , D_2) como paso esencial en el mecanismo de formación de poros. También propone la presencia de un estado prepore (P') en el cual las hélices de la región aminoterminal se encuentran unidas al núcleo β de la toxina. (Modificada de Rojko, *et al.* 2015).

*Figure 4: Proposed models of pore formation by actinoporins. A) Mechanism base on the toroidal pore-forming model. Soluble monomeric toxin (S) binds SM (lipids in red) in the membrane (M_1), subsequently α -helix (rectangle orange) is transferred to the lipid-water interface (M_2), then, the monomers oligomerize to form a pore (P), where α -helices transverse the membrane. Recent data suggests α -helix inserts into the bilayer core prior to oligomerization thus representing another monomer state on the membrane (M_3). B) Mechanism base on the hibrid-pore model. This models involves dimerization (D_1 , D_2) as an important intermediate step in the pore-forming mechanism. Also, this model proposes a possisble prepore assembly (P') where α -helices are still attached to the protein core (modified from Rojko, *et al.* 2015).*

permiten defender la propuesta de que las estructuras obtenidas con StII adoptan una orientación similar a las subunidades del poro de FraC si son analizadas desde una vista inferior y rotadas 90° (Gilbert 2015). Podría ser que cada las unidades de proteínas identificadas en para modelo del poro toroidal (Mancheno, *et al.* 2003, Mancheno, *et al.* 2006) se corresponde con estructuras diméricas en vez de monoméricas. Es importante destacar la evidencia experimental que demuestra que durante la formación de poros de StI, ocurren incrementos de conductancia en 3-4 pasos hasta que se adopta la estructura final del canal (Antonini, *et al.* 2014). Este hallazgo ha sido explicado bajo el modelo del poro toroidal asumiendo que durante el proceso de formación del poro ocurre la adición de secuencial de 3-4 monómeros proteicos y de moléculas de lípidos (Antonini, *et al.* 2014). Dicha evidencia pudiera permitir asumir un punto consenso entre el modelo toroidal y el híbrido (Rojko, *et al.* 2015) si se redefine cada evento de conductancia como consecuencia de la adición de unidades diméricas y no monoméricas (Subburaj, *et al.* 2015b).

VII. Discrepancias acerca de la existencia de estados preporo en el mecanismo lítico de las APs

Comúnmente el mecanismo de ensamblaje de las proteínas formadoras de poros se puede clasificar en dos categorías: concertado o no concertado, atendiendo a la presencia de estados preporos (Bayley 2009, Cosentino, *et al.* 2015). En el primer caso, la inserción de estas proteínas en la membrana tiene lugar luego del ensamblaje de estructuras oligoméricas. Así, se concibe la formación de estructuras oligoméricas estables que no son capaces de penetrar las membranas, pero que evolucionan hacia una estructura lítica. Tal mecanismo se ha propuesto para proteínas formadoras de poros tipo β como la hemolisina α de *E. coli* y las citolisinas dependientes de colesterol (Song, *et al.* 1996, Leung, *et al.* 2014). Por el contrario, el mecanismo no concertado, la oligomerización de los monómeros de proteínas tiene lugar de manera simultánea a la inserción en la membrana y por lo general no se observan estructuras preporo. Este mecanismo ha sido propuesto para la toxina ClyA de *E. coli* (Mueller, *et al.* 2009). En el caso de las APs este aspecto del mecanismo lítico continúa en debate.

Estudios iniciales con la StII, permitieron proponer la existencia de estados preporos basados en el modelo del poro toroidal (Martín-Benito, *et al.* 2000, Man-

cheno, *et al.* 2003, Mancheno, *et al.* 2006). Esta hipótesis fue razonada a partir de la observación de estructuras oligoméricas en los cristales de obtenidos en monocapas lipídicas de DOPC. El extremo amino de StII se encontró desplegado del cuerpo de la proteína, mediando contactos con el extremo carboxilo de otro monómero de proteína, y yacía en la superficie de la membrana lipídica. Sin embargo, no se demostró la factibilidad de esta estructura de evolucionar hacia un poro funcional. De hecho se cuestionó la posibilidad de que la hélice del extremo amino evolucionara hacia una orientación transmembrana una vez estuviera atrapada en interacciones proteína-proteína con el cuerpo de la proteína (Alegre-Cebollada, *et al.* 2007a).

Diversos estudios han propuesto que el despliegue parcial de la región aminoterminal del núcleo de la proteína, resulta de la interacción de la toxina con la membrana (Álvarez, *et al.* 2003, Alegre-Cebollada, *et al.* 2007b, Álvarez, *et al.* 2009). En el contexto del modelo del poro toroidal, estudios recientes plantean la inserción del extremo amino tiene lugar posterior a dicho despliegue de manera concomitante con la formación de oligómeros en la bicapa, en un mecanismo de tipo no concertado (Rojko, *et al.* 2013, Antonini, *et al.* 2014). Esta hipótesis es basada en estudios con un triple mutante de Cys de EqtII diseñado para monitorear la inserción del extremo amino en la membrana mediante estudios de fluorescencia. En dicho mutante, el extremo amino se encuentra unido al cuerpo de la proteína mediante enlace disulfuro entre la posiciones 8 y 69. El estudio demostró que se requiere de la previa inserción en la membrana del extremo amino para que ocurra la oligomerización eficiente de EqtII, lo cual implica que no se requiere de la formación de estructuras preporo estables en el mecanismo lítico de esta toxina. Por otra parte, los estudios de Antonini y colaboradores (2014) demostraron que la estructuración del poro formado por StI en las membranas tiene lugar en 3-4 eventos de conductancia. En conjunto, estas propuestas plantean que el poro formado por las APs se construye a partir de la adición sucesiva de moléculas de lípidos y proteínas y se excluye la posibilidad de un estado preporo (Rojko, *et al.* 2013, Rojko, *et al.* 2015). En contraste con estas propuestas, tanto el modelo del poro cónico (Mechaly, *et al.* 2011) como el modelo del poro híbrido (Tanaka, *et al.* 2015) conciben la formación de estructuras preporos tal como se discutió con ante-

rrioridad. El análisis de las dimensiones del canal formado por las APs (2 nm de diámetro), permite cuestionar la factibilidad de estas estructuras oligoméricas de insertar el extremo amino en la bicapa. Tales dimensiones del canal, comprobadas mediante diversas metodologías resultan muy pequeñas para insertar 4 hélices (menos 8 o 9) de manera concertada a través del mismo (Rojko, *et al.* 2013, Rojko, *et al.* 2015).

A su vez, estudios de detección de moléculas individuales (TIRF siglas en inglés) de EqtII localizada en membranas celulares, en condiciones más cercanas a las fisiológicas han demostrado que estas toxinas se encuentran en diferentes estados oligoméricos en la bicapa (Baker, *et al.* 2014, Subburaj, *et al.* 2015b). Hasta el momento se desconoce si estos estados oligoméricos son funcionales o no, lo que deja abierto el debate acerca de la existencia de estados preporos con diferente estequiometría para las APs. No obstante, estos resultados se pueden explicar basados tanto de las propuestas de mecanismo de ensamblaje de tipo no concertado como concertado. En el contexto del mecanismo no concertado basado en el modelo del poro toroidal, tales estructuras intermedias podrían poseer la capacidad de permitir el paso de moléculas y se estructurarían a partir de la adición de nuevas moléculas de lípidos y de proteína. En el modelo del poro híbrido, se propone la formación de un estado preporo oligomérico inactivo a partir de la adición secuencial de dímeros, donde las α -hélices se encuentran parcialmente desplegadas, pero no insertadas en la bicapa (Tanaka, *et al.* 2015). Sin embargo, la propuesta inicial de estos autores no concibe la formación de estados oligoméricos estables menores de 8 monómeros. Pudiera ser que las altas concentraciones usadas en los experimentos de cristalización condicionaran el desplazamiento hacia la formación de estructuras oligoméricas de mayor tamaño (Rojko, *et al.* 2015).

VIII. Formación de estructuras diméricas: ¿consenso entre ambos modelos?

La importancia de las estructuras diméricas en el autoensamblaje del poro funcional de las APs ha sido sugerida por varios autores. Estudios primarios de entrecruzamiento con EqtII permitieron sugerir la relevancia funcional de los intermediarios diméricos en el mecanismo lítico de EqtII (Belmonte, *et al.* 1993, Maccek, *et al.* 1994, Rojko, *et al.* 2013). En este sentido, Valle y colaboradores (2011) observaron que la pre-

sencia en el mutante StIE2C de una población dimérica (~ 50%), estabilizada por un enlace disulfuro en los extremos aminos, promueve una mayor actividad permeabilizante que su contraparte monomérica. Adicionalmente, en este estudio (Valle, *et al.* 2011) sugirió por primera vez mediante un entrecruzamiento sitio específico la importancia de los dímeros y la proximidad estructural de los extremos aminos en la estructura del poro. Tal como se ha descrito en los epígrafes anteriores datos recientes proponen la relevancia de los dímeros como intermediarios estructurales en el mecanismo de formación de poros de las APs (Tanaka, *et al.* 2015). Al parecer, la formación de estructuras diméricas en el mecanismo de las APs promueve el cambio conformacional necesario para la inserción del extremo amino en la membrana y la posterior oligomerización (Mechaly, *et al.* 2011, Cosentino, *et al.* 2015, Tanaka, *et al.* 2015).

En concordancia con estas evidencias experimentales, Subburaj y colaboradores (2015b) propusieron que la oligomerización de EqtII tiene lugar a través de la adición secuencial de dímeros en la membrana. Estos investigadores observaron la presencia predominante de monómeros, dímeros, tetrámeros y hexámeros en las membranas celulares, aunque no se excluyó la posibilidad de estados oligoméricos de mayor talla. Resulta notable, que el mutante del extremo amino de EqtII (L26C), en el cual se afectó la capacidad de insertarse en la bicapa (Malovrh, *et al.* 2003), mostró menor actividad lítica y una menor capacidad de ensamblaje en la membrana. De hecho, la oligomerización del mutante N-terminal L26C de EqtII, tuvo lugar a través de la adición secuencial de monómeros y no de dímeros, lo cual permitió sugerir la relevancia funcional de los intermediarios diméricos en el mecanismo lítico de EqtII (Subburaj, *et al.* 2015b). Los autores hipotizaron que la menor capacidad de oligomerizar de este mutante estaba dada por la inserción de una Cys en el extremo amino que afectaba su capacidad de desplegarse del cuerpo de la proteína y consecuentemente de insertarse en la membrana. Estos resultados resultaron coherentes con los publicados por (Rojko, *et al.* 2013) en el que se propone que la inserción del extremo amino debe ocurrir de manera no concertada, previa a la asociación de los monómeros de proteína para que aumente la eficiencia de oligomerización de EqtII (Rojko, *et al.* 2013).

En conjunto los resultados experimentales obtenidos hasta el momento sugieren que los oligómeros for-

mados por las APs son estructuras heterogéneas dada su variable estequiometría. Se puede decir que hay consenso en que los dímeros resultan estructuras intermediarias en el mecanismo de formación de poro de las APs, lo cual ha sido propuesto para otras PFP- α como las colicinas (Dunkel, *et al.* 2015) y la citolicina A (Benke, *et al.* 2015) de *E. coli* y la proteína pro-apoptótica Bax (Bleicken, *et al.* 2014, Subburaj, *et al.* 2015a). La estructuración de los oligómeros en la membrana a partir de la adición de dímeros es considerada un mecanismo de oligomerización más eficiente en comparación con la adición secuencial de monómeros (Cosentino, *et al.* 2015). El mecanismo de adición secuencial de dímeros ha sido propuesto para β -PFT como toxina ántrax (Christensen, *et al.* 2005) y la γ -hemolisina (Thompson, *et al.* 2011). La presencia en las APs de estados intermediarios constituidos por estructuras de menor orden oligomérico, pero con relevancia funcional difiere con la existencia de estados preporos, no líticos en el mecanismo concertado propuesto para las β -PFP. Este constituye un tema aún en debate si se tiene en cuenta que no se conoce aún si estos estados oligoméricos de menor talla pueden ser funcionales o no.

LITERATURA CITADA

- Alegre-Cebollada, J., A. Martínez del Pozo, J. G. Gavilanes y E. Goormaghtigh. 2007a. Infrared spectroscopy study on the conformational changes leading to pore formation of the toxin sticholysin II. *Biophys J* 93(9): 3191-3201
- Alegre-Cebollada, J., M. Onaderra, J. G. Gavilanes y A. M. del Pozo. 2007b. Sea anemone actinoporins: the transition from a folded soluble state to a functionally active membrane-bound oligomeric pore. *Curr Protein Pept Sci* 8(6): 558-572
- Álvarez, C., M. Dalla Serra, C. Potrich, I. Bernhart, M. Tejuca, *et al.* 2001. Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolytins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys J* 80(6): 2761-2774
- Álvarez, C., F. Casallanovo, C. S. Shida, L. V. Nogueira, D. Martínez, *et al.* 2003. Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces—modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction. *Chem Phys Lipids* 122 (1-2): 97-105
- Álvarez, C., J. M. Mancheno, D. Martínez, M. Tejuca, F. Pazos, *et al.* 2009. Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. *Toxicon* 54(8): 1135-1147
- Anderluh, G. y P. Macek. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* 40(2): 111-124
- Anderluh, G., M. Dalla Serra, G. Viero, G. Guella, P. Macek, *et al.* 2003. Pore formation by equinatoxin II, a eukaryotic protein toxin, occurs by induction of nonlamellar lipid structures. *J Biol Chem* 278(46): 45216-45223
- Antonini, V., V. Perez-Barzaga, S. Bampi, D. Penton, D. Martínez, *et al.* 2014. Functional characterization of sticholysin I and W111C mutant reveals the sequence of the actinoporin's pore assembly. *PLoS One* 9(10): e110824
- Athanasiadis, A., G. Anderluh, P. Macek y D. Turk. 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
- Baker, M. A., N. Rojko, B. Cronin, G. Anderluh y M. I. Wallace. 2014. Photobleaching reveals heterogeneous stoichiometry for equinatoxin II oligomers. *Chembiochem* 15(14): 2139-2145
- Bakrac, B., I. Gutierrez-Aguirre, Z. Podlesek, A. F. Sonnen, R. J. Gilbert, *et al.* 2008. Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin. *J Biol Chem* 283 (27): 18665-18677
- Bayley, H. 2009. Membrane-protein structure: Piercing insights. *Nature* 459(7247): 651-652
- Belmonte, G., C. Pederzoli, P. Macek y G. Menestrina. 1993. Pore formation by the sea anemone cytolytic equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. *J Membr Biol* 131(1): 11-22
- Bellomio, A., K. Morante, A. Barlic, I. Gutiérrez-Aguirre, A. R. Vi-guera, *et al.* 2009. Purification, cloning and characterization of fragaceotoxina C, a novel actinoporin from the sea anemone *Actinia fragacea*. *Toxicon* 54(869-880
- Benke, S., D. Roderer, B. Wunderlich, D. Nettels, R. Glockshuber, *et al.* 2015. The assembly dynamics of the cytolytic pore toxin ClyA. *Nat Commun* 6(6198
- Bleicken, S., G. Jeschke, C. Stegmüller, R. Salvador-Gallego, A. J. García-Saez, *et al.* 2014. Structural model of active Bax at the membrane. *Mol Cell* 56(4): 496-505
- Castrillo, I., J. Alegre-Cebollada, A. M. del Pozo, J. G. Gavilanes, J. Santoro, *et al.* 2009. ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR assignments of the actinoporin Sticholysin I. *Biomol NMR Assign* 3(1): 5-7
- Cosentino, K., U. Ros y A. J. García-Saez. 2015. Assembling the puzzle: Oligomerization of alpha-pore forming proteins in membranes. *Biochim Biophys Acta*

- Christensen, K. A., B. A. Krantz, R. A. Melnyk y R. J. Collier. 2005. Interaction of the 20 kDa and 63 kDa fragments of anthrax protective antigen: kinetics and thermodynamics. *Biochemistry* 44 (3): 1047-1053
- Dunkel, S., L. P. Pulagam, H. J. Steinhoff y J. P. Klare. 2015. In vivo EPR on spin labeled colicin A reveals an oligomeric assembly of the pore-forming domain in *E. coli* membranes. *Phys Chem Chem Phys* 17(7): 4875-4878
- Epand, R. M. 1998. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta* 1376(3): 353-368
- García-Linares, S., I. Castrillo, M. Bruix, M. Menendez, J. Alegre-Cebollada, et al. 2013. Three-dimensional structure of the actinoporin sticholysin I. Influence of long-distance effects on protein function. *Arch Biochem Biophys* 532(1): 39-45
- Gilbert, R. J. 2015. Protein-lipid interactions and non-lamellar lipidic structures in membrane pore formation and membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*
- Gouaux, E. 1997. Channel-forming toxins: tales of transformation. *Curr Opin Struct Biol* 7(4): 566-573
- Heuck, A. P., R. K. Tweten y A. E. Johnson. 2001. Beta-barrel pore-forming toxins: intriguing dimorphic proteins. *Biochemistry* 40(31): 9065-9073
- Hinds, M. G., W. Zhang, G. Anderluh, P. E. Hansen y R. S. Norton. 2002. Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytolytic toxin equinatoxin II: implications for pore formation. *J Mol Biol* 315(5): 1219-1229
- Kristan, K. C., G. Viero, M. Dalla Serra, P. Macek y G. Anderluh. 2009. Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon* 54(8): 1125-1134
- Lanio, M. E., V. Morera, C. Alvarez, M. Tejuca, T. Gomez, et al. 2001. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 39(2-3): 187-194
- Lanio, M. E., J. Lombardero, L. Fernández, R. Laborde, Y. Cruz, et al. 2010. Composiciones vacunales a base de Sticholysina encapsulada en liposomas. Patente CU-2010-144
- Leung, C., N. V. Dudkina, N. Lukyanova, A. W. Hodel, I. Farabella, et al. 2014. Stepwise visualization of membrane pore formation by suliyisin, a bacterial cholesterol-dependent cytolytic toxin. *Elife* 3(e04247)
- Macek, P. y D. Lebez. 1988. Isolation and characterization of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia equina* L. *Toxicon* 26(5): 441-451
- Macek, P., G. Belmonte, C. Pederzoli y G. Menestrina. 1994. Mechanism of action of equinatoxin II, a cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia equina* L. belonging to the family of actinoporins. *Toxicology* 87(1-3): 205-227
- Malovrh, P., G. Viero, M. D. Serra, Z. Podlesek, J. H. Lakey, et al. 2003. A novel mechanism of pore formation: membrane penetration by the N-terminal amphipathic region of equinatoxin. *J Biol Chem* 278(25): 22678-22685
- Mancheno, J. M., J. Martin-Benito, M. Martinez-Ripoll, J. G. Gavilanes y J. A. Hermoso. 2003. Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure* 11(11): 1319-1328
- Mancheno, J. M., J. Martin-Benito, J. G. Gavilanes y L. Vazquez. 2006. A complementary microscopy analysis of Sticholysin II crystals on lipid films: Atomic force and transmission electron characterizations. *Biophys Chem* 119(3): 219-223
- Martin-Benito, J., F. Gavilanes, V. de Los Rios, J. M. Mancheno, J. J. Fernandez, et al. 2000. Two-dimensional crystallization on lipid monolayers and three-dimensional structure of sticholysin II, a cytolytic toxin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys J* 78(6): 3186-3194
- Mechaly, A. E., A. Bellomio, D. Gil-Carton, K. Morante, M. Valle, et al. 2011. Structural insights into the oligomerization and architecture of eukaryotic membrane pore-forming toxins. *Structure* 19(2): 181-191
- Mechaly, A. E., A. Bellomio, K. Morante, J. Agirre, D. Gil-Carton, et al. 2012. Pores of the toxin FraC assemble into 2D hexagonal clusters in both crystal structures and model membranes. *J Struct Biol* 180(2): 312-317
- Morante, K. 2012. Purification and characterization of the structure and function of a novel actinoporin isolated from the sea anemone *Actinia fragacea*. Tesis de doctorado
- Morante, K., J. M. Caaveiro, K. Tanaka, J. M. Gonzalez-Manas y K. Tsumoto. 2015. A pore-forming toxin requires a specific residue for its activity in membranes with particular physicochemical properties. *J Biol Chem* 290(17): 10850-10861
- Mueller, M., U. Grauschopf, T. Maier, R. Glockshuber y N. Ban. 2009. The structure of a cytolytic alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature* 459(7247): 726-730
- Parker, M. W. y S. C. Feil. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* 88(1): 91-142
- Rojko, N., K. C. Kristan, G. Viero, E. Zerovnik, P. Macek, et al. 2013. Membrane damage by an alpha-helical pore-forming protein, Equinatoxin II, proceeds through a succession of ordered

- steps. *J Biol Chem* 288(33): 23704-23715
- Rojko, N., M. Dalla Serra, P. Macek y G. Anderluh. 2015. Pore formation by actinoporins, cytolytins from sea anemones. *Biochim Biophys Acta*
- Ros, U. y A. J. Garcia-Saez. 2015. More Than a Pore: The Interplay of Pore-Forming Proteins and Lipid Membranes. *J Membr Biol* 248(3): 545-561
- Santo, K. P. y M. L. Berkowitz. 2012. Difference between magainin-2 and melittin assemblies in phosphatidylcholine bilayers: results from coarse-grained simulations. *J Phys Chem B* 116(9): 3021-3030
- Song, L., M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, et al. 1996. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274(5294): 1859-1866
- Subburaj, Y., K. Cosentino, M. Axmann, E. Pedrueza-Villalmanzo, E. Hermann, et al. 2015a. Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species. *Nat Commun* 6(8042)
- Subburaj, Y., U. Ros, E. Hermann, R. Tong y A. J. Garcia-Saez. 2015b. Toxicity of an alpha-pore-forming toxin depends on the assembly mechanism on the target membrane as revealed by single molecule imaging. *J Biol Chem* 290(8): 4856-4865
- Tanaka, K., J. M. Caaveiro, K. Morante, J. M. Gonzalez-Manas y K. Tsumoto. 2015. Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid. *Nat Commun* 6(6337)
- Tejuca, M., M. D. Serra, M. Ferreras, M. E. Lanio y G. Menestrina. 1996. Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolytin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 35(47): 14947-14957
- Tejuca, M., M. Dalla Serra, C. Potrich, C. Alvarez y G. Menestrina. 2001. Sizing the radius of the pore formed in erythrocytes and lipid vesicles by the toxin sticholysin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *J Membr Biol* 183(2): 125-135
- Tejuca, M., G. Anderluh y M. D. Serra. 2009. Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon* 54(1206-1214)
- Thompson, J. R., B. Cronin, H. Bayley y M. I. Wallace. 2011. Rapid assembly of a multimeric membrane protein pore. *Biophys J* 101(11): 2679-2683
- Turk, T. 1991. Cytolytic toxins from sea anemones. *Toxin Reviews* 10(3): 223-262
- Valle, A., A. Lopez-Castilla, L. Pedrera, D. Martinez, M. Tejuca, et al. 2011. Cys mutants in functional regions of Sticholysin I clarify the participation of these residues in pore formation. *Toxicon* 58(1): 8-17
- Valle, A., J. Alvarado-Mesén, M. Lanio, C. Álvarez, J. Barbosa, et al. 2015. The multigene families of actinoporins (part I): Isoforms and genetic structure. *Toxicon* 103(176-187)

• • •

Editor para correspondencia: Dra. Maday Alonso