

El material de reacción cruzada 197 (CRM197) afecta al citoesqueleto de actina de las células endoteliales

Bilge Özerman Edis¹, Başak Varol¹, Ebru Haciosmanoğlu^{1,2}, Ayhan Ünlü^{1,3} y Muhammet Bektaş¹

¹ Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina de Estambul, Universidad de Estambul, 34390 Çapa, Estambul, Turquía

² Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Istanbul Bilim University, 34394 Esentepe, Estambul, Turquía

³ Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Trakya, 22030 Edirne, Turquía

Abstracto. CRM197, material de reacción cruzada 197, es un mutante de la toxina diftérica (DTx). CRM197 se utiliza en farmacología como proteína portadora. Recientemente se ha demostrado que CRM197 causa descomposición en los filamentos de actina. Con el fin de mostrar la localización intracelular de CRM197 y visualizar la estructura celular a través del citoesqueleto de actina, las células endoteliales fueron cultivadas y sometidas a CRM197 *in vitro*. Para abordar la interacción entre CRM197 y actina se realizaron estudios tanto experimentales como teóricos. La colocalización de CRM197 con filamentos de actina se determinó mediante microscopía de inmunofluorescencia. Después de la incubación de 24 horas, la pérdida del contacto célula-célula entre las células fue prominente. Se demostró que CRM197 se une a la G-actina mediante cromatografía de filtración en gel, y esta unión se confirmó mediante el análisis de Western blot de muestras eluidas obtenidas después de la cromatografía. Basado en la estructura cristalina, se generó el modelo acoplado del complejo CRM197-actina. La simulación de dinámica molecular reveló que Lys42, Cys218, Cys233 de CRM197 interactúa con Gly197, Arg62 y Ser60 de G-actina, respectivamente. La unión de CRM197 a la G-actina, la colocalización de CRM197 con filamento de actina y el reordenamiento del citoesqueleto de actina que resulta en la pérdida del contacto célula-célula muestran que la actina aparece a la vista como molécula objetivo para CRM197. **Palabras clave:** Filamentos de actina — Material de reacción cruzada 197 — Toxina diftérica — Células endoteliales

Abreviaturas: CRM197, material de reacción cruzada 197; DTx, toxina de difteria; FA, fragmento A;

HUVEC, células endoteliales de la vena umbilical humana.

Introducción

CRM197 es un mutante de la toxina diftérica (DTx), un miembro de la familia de toxinas binarias. CRM197 (58.4 kDa) contiene dos subunidades como DTx. CRM197 carece de la actividad enzimática debido a una sola sustitución de aminoácidos (Gly52 a Glu) en el fragmento A (FA), y esta sustitución produce un producto no tóxico (Giannini et al. 1984). En el citosol, el fragmento A, el dominio catalítico de la toxina nativa, transfiere la fracción ADP-ribosa de NAD a eEF2 y causa la detención de la síntesis de proteínas, mientras que la mutación en CRM197 impide la actividad enzimática, por lo que la síntesis de proteínas continúa (Kageyama et al. 2007). CRM197 se ha utilizado eficazmente en vacunas como proteína portadora o como adyuvante inmunológico (Shinefield 2010). CRM197 mantiene su capacidad de unión al receptor DTx, que es una proteína

transmembrana, el factor de crecimiento epidérmico similar al factor de crecimiento epidérmico (HB-EGF) del receptor EGF. CRM197 puede unirse a formas ancladas a membrana (proHB-EGF) o solubles (S-HB-EGF). proHB-EGF toma papel en la adhesión célula-célula, y el HB-EGF secretado tiene actividades mutagénicas (Vinante y Rigo 2013). La expresión génica de HB-EGF está regulada al aumento en las transformaciones oncogénicas, y las propiedades antitumorales de la unión de CRM197 a HB-EGF se han descrito en detalle (Bröker et al. 2011). El efecto citotóxico de la expresión de CRM197 también se ha demostrado en células de ovario de hámster chino y en la línea celular de fibroblastos de ratón LMTK (Qiao et al. 2008). CRM197 surge como un agente quimiosensibilizante para las células de carcinoma de ovario resistentes al paclitaxel (Tang et al. 2016). La capacidad de transferencia de carga de CRM197 a través de la barrera hemoencefálica ofrece nuevas oportunidades en el desarrollo de la administración de medicamentos para enfermedades del sistema nervioso central (Chen y Liu 2012). La trayectoria intracelular de la toxina nativa se ha estudiado en detalle, pero la AF de CRM197 no se ha

ilustrado hasta ahora. La endocitosis mediada por receptores de DTx es seguida por la translocación de FA a través de la membrana endosomal que es apoyada por proteínas celulares que incluyen filamentos de actina y factor de elongación eucariota 2 (eEF2) (Varol et al. 2013). Se determinó que la FA interactuaba tanto con la actina filamentosa (F-actina) como con la actina globular (G-actina) de manera estequiométrica (Bektaş et al. 2009; Varol et al. 2012). La mayor interacción posible ha sido anticipada por simulaciones de dinámica molecular entre Tyr204 de toxina nativa y Gly48 de G-actina (Ünlü et al. 2013). Se ha propuesto que la unión de la FA a la F-actina se sitúe en el extremo positivo del filamento (Bektaş et al. 2009). En consecuencia, la unión a FA-actina inhibe la polimerización que induce el colapso del filamento en el tiempo. También se ha informado del efecto perjudicial de CRM197 sobre la F-actina. Los lisados celulares de células tratadas con CRM197 de 18 horas han sido sometidos a la fragmentación de actina y se ha determinado una disminución del 65% en la cantidad de F-actina en gránulos post-microsomales. Además, los niveles de F-actina y G-actina se han estimado a partir de la actina filamentosa soluble en tritón y se ha reportado un aumento del 50% en la fragmentación de la actina (Varol et al. 2012). En este estudio, nuestro objetivo fue mostrar la distribución intracelular de CRM197 y los cambios del citoesqueleto en células endoteliales de vena umbilical humana cultivadas (HUVEC). También estamos mostrando la interacción proteína-proteína entre CRM197 y actina mediante análisis de filtración en gel y técnicas computacionales de predicción.

Materiales y métodos

Materiales

Todos los reactivos fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO, USA). El anticuerpo monoclonal murino 7F2 que reacciona con el fragmento DTx A subunidad (anti-FA) fue comprado a Abcam (Cambridge, Reino Unido) y el anticuerpo monoclonal específico de actina (ratón) de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, EE. UU.). El boro [^3H]hidruro de sodio, actividad específica 15 Ci/ mM, se obtuvo de Perkin Elmer (Waltham, MA, USA). La G-actina se preparó como se describió anteriormente (Bektaş 2009).

Microscopía de inmunofluorescencia e imágenes

HUVEC (ATCC-CRL-1730) se cultivaron a semiconfluencia en cubiertas recubiertas de poli-L-lisina en placas de 6 pozos. Después de una incubación de 24 horas, se agregó CRM197 (0.8 nM) a los pozos. El medio se descartó después de 15 minutos de tratamiento con toxina mutante, y las células se lavaron con solución salina con fosfato (PBS). Las células se permeabilizaron en Tritón X-100 al 0,01% en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se fijaron en paraformaldehído al 2% en PBS durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron con PBS nuevamente y se incubaron con tampón de bloqueo (1% BSA en PBS) durante 1 hora. Para detectar CRM197, las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal murino 7F2 específico para la FA. Después de lavarse

con células PBS se incubaron con fluoresceína isotiocianato de cabra (FITC) marcado con anticuerpo Ig anti-ratón. A continuación, se detectó F-actina mediante el uso de faloidina-TRITC. La tinción con F-actina se llevó a cabo también para la incubación de 24 horas de CRM197 (0,8 nM). HUVEC se montaron en vidrio con reactivo antidesvanecimiento con DAPI, y se analizaron en el microscopio de investigación Olympus BX51 con lente de inmersión en aceite de 100×. Las imágenes se obtuvieron con una cámara DP72 controlada por el software Olympus DP2-TWAIN.

Análisis de áreas de contacto célula-célula

Para analizar las áreas de contacto célula-célula, el área entre las células endoteliales ($n = 10$) se midió mediante el software Olympus DP2-TWAIN. Los datos de diversas ubicaciones ($n = 27$) se presentaron como medias \pm deS. La prueba t no apareada se utilizó para comparar las diferencias entre el control y las células tratadas con CRM197. Se aceptó significación estadística para $p < 0,05$.

Triación reductiva de CRM197

CRM197 (100 mg) se incubó en presencia de boro [^3H]hidruro de sodio 3 mM durante 1 hora a 20°C en 50 mM TrisHCl, pH 7.4. Después de la incubación, la muestra se dializó y se aplicaron 10 ml de alícuota al filtro GF/A (Whatman). Filtros de fibra de vidrio que se lavaron sucesivamente en frío al 5% de TCA, éter-etanol (v/v: 1/1) y éter. Después del secado, los filtros se transfirieron a viales que contenían 5 ml de 0,4% de 2,5-difeniloxazol en tolueno y se determinó la radiactividad precipitada por TCA en un contador de centelleo líquido (Packard Tri-Carb1000 TR). La actividad específica de [^3H]CRM197 se especificó como 8860 dpm/ μg . [^3H]CRM197 (30 μg) se incubó con G-actina (20 μg) durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón de homogeneización (5 mM de fosfato de potasio, pH 7,5, 0,5 mM de ATP, 0,1 mM de CaCl_2 , 0,5 mM de ditiotereitol y 1 mM de Na_3N) y luego se sometió a filtración en gel.

Análisis de filtración de gel

Las distribuciones de tamaño se analizaron en una columna sefacril S-100 (Hi-prep 16/60) (GE Healthcare) equilibrada en un sistema AKTA Prime Plus con tampón de homogeneización y calibrada con ribonucleasa (Sr. 13,7 kDa), anhidrasa carbónica (Sr. 29 kDa), ovoalbúmina (Sr. 43 kDa), conalbúmina (Sr. 75 kDa), fosforilasa b (Sr. 97 kDa) y β -galactosidasa (Sr. 116 kDa). La cromatografía fue monitoreada utilizando el software PrimeView (GE Healthcare BioSciences). La columna equilibrada había corrido a 0,8 ml/min con tampón de homogeneización y el volumen de fracción era de 1 ml. El CRM197 tritado se sometió primero a filtración en gel y luego seguido de [^3H]CRM197-unión a la actina. La radiactividad en alícuotas de las fracciones se determinó en 1 ml de solución de Bray en un contador de centelleo líquido. La fracción de columna número 43 correspondiente a 101 kDa se concentró utilizando IVSS vivaspin 2 (Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, Francia),

concentrador centrífugo, luego analizado por electroforesis y Western blotting.

Análisis electroforético y Western blotting

Se realizó electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) como se describe en Laemmli (1970) y seguida de Western blotting para detectar actina y fragmento A de CRM197. PageRuler Prestained Protein Ladder de Thermo Scientific se utilizó como estándares de peso molecular. Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie y se teñieron en ácido acético al 10%, 50% metanol. Las proteínas separadas SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, MA, USA) que habían sido bloqueadas previamente con TBS (Solución salina tamponada tris) Tween (TBST) y BSA al 0,5% (albúmina sérica bovina) durante 1 hora. Las membranas se incubaron con anticuerpos específicos de actina o anticuerpos monoclonales específicos de FA 7F2 y luego con conjugados de fosfatasa alcalina de anticuerpos IgG anti-ratón. Después de tres lavados con bandas de proteína TBST en membranas de nitrocelulosa fueron detectados por NBT/BCIP (tetrazolio azul nitro/5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato).

Determinación computacional para la interacción CRM197-actina

Se encontraron estructuras cristalinas de alta resolución y secuencias primarias de CRM197 y actina en protein Data Bank (PDB). Código PDB: 4EA0 para CRM197 (Malito et al. 2012) y 3HBT para G-actina (Ünlü 2014) se utilizaron para el acoplamiento proteína-proteína. Pymol y VMD con NAMD (versión académica del software de análisis de proteínas) se utilizaron para mostrar posibles superficies de interacción del complejo CRM197-actina mediante el mapeo de residuos relacionados de proteínas. Para el acoplamiento molecular se utilizaron el módulo proteína-proteína PIPER (Kozakov et al. 2006) y ClusPro 2.0 (Comeau et al. 2004) como algoritmos de acoplamiento que están disponibles en el sistema de acoplamiento proteína-proteína en los Laboratorios de Bioinformática Estructural de la Universidad de Boston. PIPER utiliza el enfoque de correlación de la transformada rápida de Fourier (FFT) que proporciona potenciales precisos por pares, por lo que el número de posturas de falsos positivos se reduce críticamente. La función de puntuación aplicada en PIPER se asume como la totalidad de los términos que indican complementariedad de la forma, desolvación y contribuciones electrostáticas. Por otro lado, ClusPro 2.0 ordena las poses dadas a sus propiedades de agrupamiento. Las áreas de interacción se exploraron en primer lugar mediante el uso de un modelo energético simplificado y la teoría de la flexibilidad restringida. Luego, la puntuación detallada y el muestreo permitieron centrarse en áreas determinadas. El siguiente paso del algoritmo funciona para validar el algoritmo de acoplamiento mediante el uso de RMSD (desviación cuadrática media raíz) y se utilizó RMSD de doble lógica para medir la calidad de la agrupación de estructuras donde la agrupación significa aislamiento de cuencas energéticas de áreas de energía altamente cargadas. Los cálculos de acoplamiento se completaron en PIPER, DARS (Señuelos como Estado de Referencia) y SDU (Subestimación basada en

programación Semide definida) respectivamente. Con el fin de encontrar posibles conformaciones, DARS se utiliza para producir condiciones de referencia y la estabilidad de la energía libre fue analizada por SDU que proporciona optimización de energía y eliminación de grupos no locales. ClusPro filtra las confirmaciones acopladas con estructuras casi nativas y las clasifica en función de sus propiedades de agrupación en clústeres. El servidor genera los 10-30 mejores complejos acoplados con los rangos más altos. Mediante la evaluación de diez áreas de interacción de acuerdo con los cálculos de energía termodinámica, se determinan las áreas donde la posibilidad de unión es alta. Para analizar los resultados teóricos de ClusPRO, se utilizó el sistema de acoplamiento. Estos análisis entre estructuras complejas de CRM197/actina se realizaron utilizando Z-dock. El Z-dock es un protocolo de acoplamiento basado en cuerpo rígido, que utiliza un algoritmo FFT para realizar una búsqueda 3D de todos los modos de unión posibles en el espacio traslacional y rotacional entre las dos estructuras de proteínas (Pierce et al. 2011).

La energía de unión intermolecular libre entre CRM197 y actina se calculó utilizando NAMD. Para el cálculo se utilizaron un total de 1000 fotogramas que se generaron al final de la simulación dinámica molecular. La energía libre de unión entre los complejos $DG_{binding}$ se calculó en CHARMM:

$$Unión \Delta G = \text{complejo } \Delta G - (\text{receptor } G \Delta + \text{ligando } G \Delta)$$

Con el fin de estudiar las consecuencias estructurales, se analizaron las simulaciones de MD y los archivos de trayectoria resultantes para RMSD.

Resultados

Descomposición del citoesqueleto de actina bajo tratamiento CRM197

La distribución de CRM197 en células endoteliales se detectó mediante FA (Fig. 1A, C). La inmunotinción de la FA reveló que CRM197 estaba dispersa por todo el HUVEC y la tinción de F-actina mostró la colocalización de CRM197 con el citoesqueleto de actina en 15 minutos de incubación (Fig. 1B, C). Tras la incubación de 24 horas con CRM197 (0,8 nM), la tinción de F-actina reveló la pérdida del contacto célula-célula (Fig. 1E). Se analizaron las áreas de contacto célula-célula y el área entre las células endoteliales ($n = 10$) se midió mediante el software Olympus DP2TWIN. Los datos de diversas ubicaciones ($n = 27$) se presentaron como media \pm deS. Se utilizó la prueba *t no apareada* para comparar las diferencias entre el control y el tratamiento con CRM197

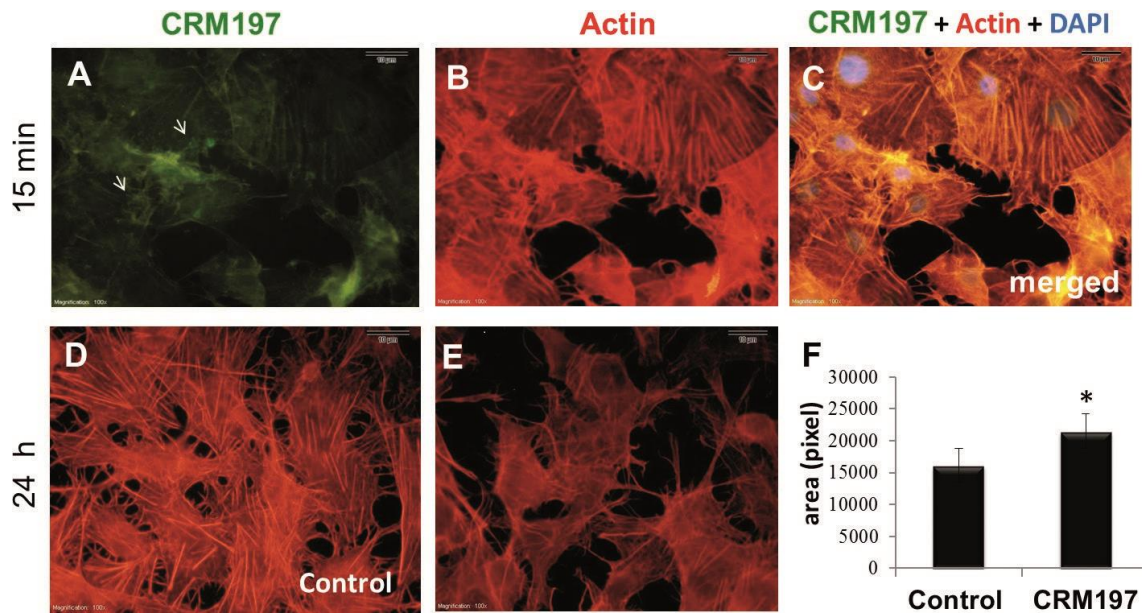


Figura 1. Tratamiento CRM197 en HUVECs. CRM197 (verde; **A, C**), F-actina (rojo; **B, C, D, E**) y núcleo (azul; **C**). Las flechas indican una distribución generalizada de CRM197 (**A**) después de 15 minutos de incubación. **D** y **E** muestran tinción de F-actina en HUVECs incubados 24 horas en ausencia (control; **D**) y en presencia de CRM197 (0,8 nM; **E**). **F.** Pérdida del contacto célula-célula a través de áreas entre células medida por el software Olympus DP2-TWAIN.* $p < 0.05$ vs. control, prueba *t*.

células. Se aceptó significación estadística para $p < 0,05$. Tinción de F-actina para HUVEC en ausencia (control; Fig. 1D) y en presencia de CRM197 (Fig. 1E) durante 24 horas de incubación expuso cambios considerables en las áreas de contacto célula-célula (Fig. 1F). Los cambios en la forma celular debido a la organización citoesquelética de la actina se establecieron significativos.

Interacción de CRM197 con actina in vitro

Se demostró que CRM197 se une a la G-actina por filtración en gel en Sephacryl S-100. Tras la incubación de CRM197 tritiado y G-actina, el complejo [³H] CRM197-actina se hizo evidente como un nuevo pico (Fig. 2A; línea discontinua) que se eluía en una región cor-

respondiendo a unos 101 kDa con una disminución concomitante en los tamaños de los picos correspondientes a [³H]CRM197 (Fig. 2A; línea sólida). Se determinó un cambio de casi el 70% de la radiactividad de 58 kDa a 101 kDa de la región de peso molecular. El análisis electroforético y el Western blotting indicaron la presencia de actina y CRM197 en la muestra eluida de filtración en gel (Fig. 2B). La fracción concentrada número 43 fue sometida a SDS-PAGE (10 µg por pozo) y Western blotting. Tras una reducción del enlace disulfuro interno durante la electroforesis, el perfil proteico del complejo CRM197-actina aparece como proteína completa (CRM197, 58 kDa) y como subunidades de CRM197; fragmento B (37 kDa), fragmento A (24 kDa) además de actina que tiene lugar en masa de 43 kDa (Fig. 2B; carril 2). Análisis de Western blot realizado con anti-actina (carril 3) y anti-FA (carril 4) que mostró tanto la proteína completa CRM197 como su subunidad, el fragmento A.

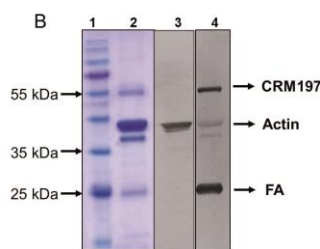
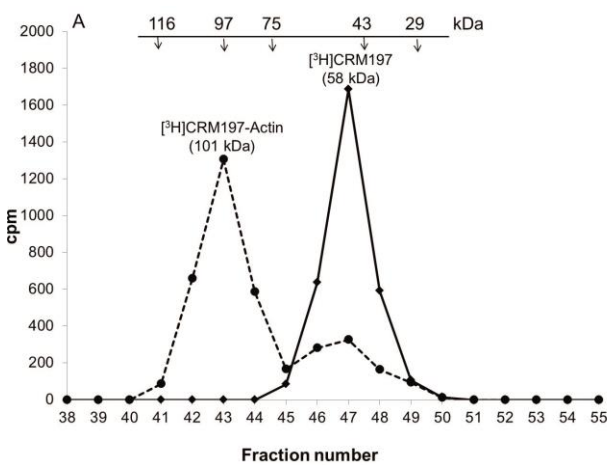


Figura 2. Vinculación de CRM197 a G-actina. **A.** Superposición de los cromatogramas de exclusión de tamaño de [³H]CRM197 (línea sólida) y [³H]CRM197-complejo de actina (línea discontinua). Las flechas indican los picos de marcadores de proteínas eluidas (en kDa) de masa molecular conocida. [³H]El complejo de actina CRM197 se hizo evidente en una región correspondiente a aproximadamente 101 kDa (1er pico) y libre [³H]CRM197 (hombro de 1er pico) permaneció en la misma región que [³H]CRM197 solo (pico de línea sólida). La radiactividad (recuento por minuto, cpm) se determinó en un

contador de centelleo líquido. **B.** SDS-PAGE mostró el perfil de proteínas del análisis de filtración en gel. Carril 1: estándares de masa molecular pretensados, carril 2: Tinción de colorante de Coomassie de proteínas eluidas a partir de la fracción concentrada número 43. La muestra en el carril 2 se sometió a un análisis de Western blot utilizando anti-actina (carril 3) y anti-FA (carril 4).

Estudios de referencia de acoplamiento y simulación de dinámica molecular para el complejo CRM197-actina

Se utilizó el cálculo de las energías de unión de CRM197 a la actina, ClusPro 2.0, un servidor automatizado de acoplamiento de proteínas con programa de modelado molecular. Las conformaciones acopladas se generaron utilizando DOT, el programa de acoplamiento basado en el enfoque de correlación FFT. Se utilizaron valores predeterminados de 1 Å gridstep y 4 Å capas superficiales. Los complejos acoplados fueron seleccionados y clasificados en base a un método de agrupamiento jerárquico (Comeau et al. 2004). La estructura del complejo GRM197-actina fue modelada en el servidor ClusPro. Para puntuar las orientaciones de acoplamiento del filtro electrostático, se incluyeron potenciales de pares de residuos y datos bioquímicos, además de la complementariedad de la superficie.

Los datos de nuestros estudios proporcionan información para la comprensión atómica de la interacción CRM197-actina. Hemos identificado tres puntos calientes y determinado aminoácidos Lys42, Cys218, Cys233 de CRM197 formando contactos con Gly197, Arg62, Ser60, respectivamente. La simulación de dinámica molecular (DM) del complejo CRM197-actina se realizó utilizando el campo de fuerza CHARMM (Brooks et al. 1983).

Ambos complejos de CRM197 y actina se sometieron a todas las simulaciones de MD del átomo para verificar la estabilidad del complejo durante una larga tirada de MD de 13 ns mediante el uso de 31.316 moléculas de agua y también para calcular el promedio del conjunto de energía libre de unión entre CRM197 y actina a partir de las trayectorias de MD. RMSD para todos los átomos de la columna vertebral, la energía electrostática, la energía de van der Waals del complejo CRM197-actina se estudiaron en forma de trayectorias MD. Los perfiles RMSD siempre permanecieron por menos de 0,5 nm durante toda la simulación. El valor RMSD para el complejo CRM197-actina aumentó de 0.042 a 0.27 nm a 3.2 ns, aumentó constantemente para alcanzar valores de 0.33 nm a 10 ns y finalmente alcanzó 0.5 nm alrededor de 13 ns que representan un perfil RMSD constante durante

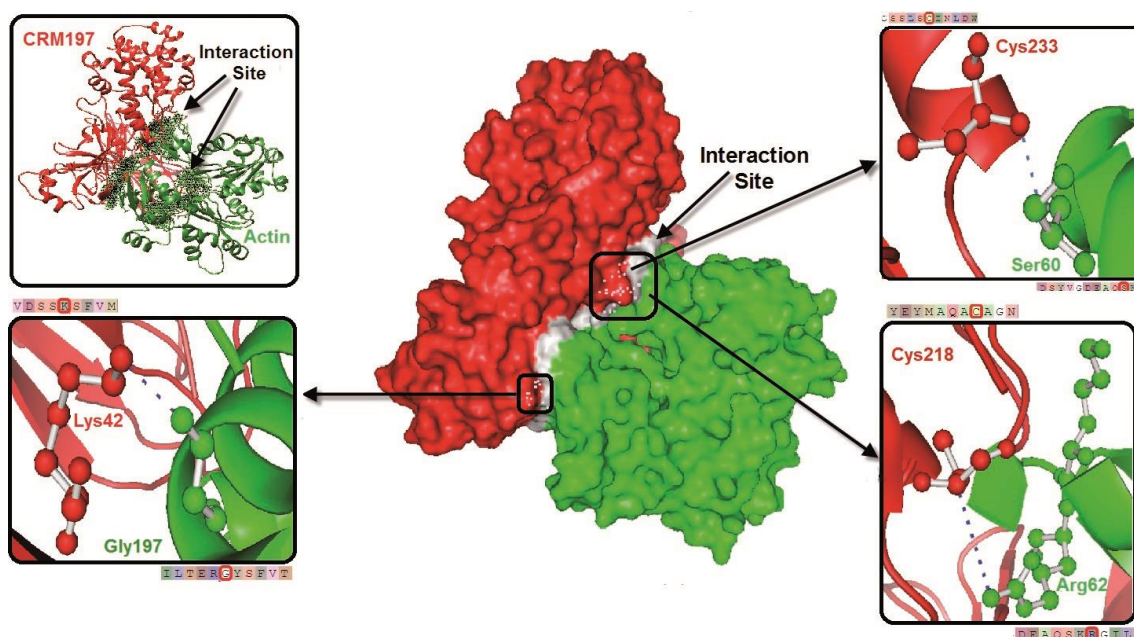


Figura 3. Interacción CRM197-G-actina a partir de estudios de acoplamiento molecular y simulación MD. El complejo acoplado CRM197-G-actin se ha mostrado en la estructura de dibujos animados. CRM197 y G-actina se han mostrado en color rojo y verde, respectivamente. El sitio de interacción del complejo CRM197-Gactin que se muestra en la representación de la cinta se ha reemplazado en la parte superior izquierda. La vista ampliada de tres puntos calientes se muestra en el recuadro. Los aminoácidos que interactúan se enfatizan en palos / esferas. Las líneas discontinuas azules indican el enlace entre los complejos CRM197-G-actina. También se indica la alineación de la secuencia de ambas estructuras que interactúan.

simulación. El modelo teórico de contactos de aminoácidos en el complejo CRM197-actina (dentro de 2.1 Å–3.4 Å) se muestra en la Figura 3. De acuerdo con los estudios de referencia de acoplamiento y la simulación MD para el complejo CRM197-actina se encontraron tres puntos calientes y se determinaron las energías libres entre estos puntos calientes como Ser60 y Cys233 (DG = -17.32 kJ / mol), Gly197 y Lys42 (DG = -11.26 kJ / mol), Arg62 y Cys218 (DG = -8.32 kJ / mol).

Discusión

En este estudio, hemos demostrado el reordenamiento del citoesqueleto de actina en células endoteliales tras el tratamiento con CRM197 *in vitro*. Para abordar la interacción entre CRM197 y actina, se realizaron estudios tanto experimentales como teóricos. Nuestros hallazgos indican una distribución generalizada de CRM197 en filamentos de actina en células endoteliales cultivadas. La colocalización de CRM197 con filamentos de actina apoya el hallazgo de la interacción molecular que se requiere para la endocitosis de DTx. Además, CRM197 difiere de DTx que se ha demostrado que está localizado en el área perinuclear de LOS HUVEC (Bektaş et al. 2011). Nuestros resultados de filtración en gel y análisis de Western blot muestran que CRM197 puede interactuar con la G-actina. Este resultado está respaldado por el efecto de unión *in vitro* e *in vivo* previamente informado de CRM197 a F-actina (Varol et al. 2012). Se ha informado que las interacciones entre el citoesqueleto de actina y los elementos de la maquinaria sintética de proteínas median la administración de DTx (Varol et al. 2013). El dominio catalítico (residuos 1-193) de la toxina nativa se transloca desde el compartimento endosomal a través del dominio T (residuos 200-387). Se ha demostrado que Tyr204 de toxina nativa interactúa con Gly48 de G-actina a través de estudios de simulaciones de dinámica molecular (Ünlü et al. 2013). Nuestros estudios de referencia de acoplamiento y simulaciones de dinámica molecular para el complejo CRM197-actina indican tres puntos calientes. Estos puntos calientes de aminoácidos son Lys42, Cys218, Cys233 de CRM197 formando contacto con Gly197, Arg62, Ser60 de actina, respectivamente. La posible interacción entre Lys42 de CRM197 con Gly197 de actina es compatible con experimentos de unión del complejo FA-actina que muestran que casi 1 sitio de unión está presente en G- y F-actina para FA de toxina nativa (Bektaş et al. 2009). Los residuos de aminoácidos 200-387 en CRM197, correspondientes al dominio T de DTx, incorporan dos residuos de cisteína para interactuar con la actina, lo que demuestra que el citoesqueleto de actina proporciona un marco estructural también para el tráfico endosomal de CRM197.

Se sabe desde hace mucho tiempo que CRM197 tiene actividad de nucleasa (Bruce et al. 1990) y la actina posee un bucle de unión A la DNase I (Carlier et al. 2015). Nuestros hallazgos muestran que CRM197 comparte el mismo dominio de unión en la actina con la DNase I. CRM197 puede ejercer su actividad de nucleasa mediante el transporte nuclear basado en actina. El transporte de p53, proteína supresora de tumores, es un ejemplo de transporte nuclear basado en actina. Recientemente se ha determinado que el monomérico es responsable del transporte de p53 al área perinuclear (Saha et al. 2016).

El citoesqueleto de actina también se ve afectado indirectamente por toxinas bacterianas a través de proteínas de la familia Rho (Aktories et al. 2012). Varias toxinas de proteínas bacterianas como las toxinas binarias clostridiales se dirigen al citoesqueleto de actina para modificaciones post-traslacionales. La glucosilación, la adenilación, la ADP-ribosilación y la desamidación son modificaciones bacterianas de las Rho GTPasas que inactivan la actividad enzimática y, en consecuencia, el citoesqueleto de actina está desorganizado. Se ha demostrado que las modificaciones bacterianas de las Rho GTPasas son detectadas por la pirina a través de modificaciones aguas abajo en la vía del citoesqueleto de actina (Xu et al. 2014). Además de las vías de señalización controladas por Rho GTPasas, se proponen oligómeros de actina reticulados para activar nuevas vías de toxicidad. Recientemente se ha demostrado que el efecto de la toxina poco abundante se amplifica por las proteínas reguladoras de la actina aguas arriba mediadas por oligómeros de actina reticulados que se forman debido al dominio de reticulación de actina de varias toxinas como el cólera, la tos ferina y las toxinas del ántrax (Heisler et al. 2015). DTx cataliza la transferencia del grupo ADPribosyl de NAD a eEF2 además tanto DTx como CRM197 despolimerizan filamentos de F-actina (Varol et al. 2012). En el caso de la inhibición de la síntesis de proteínas DTx se acompaña de un trastorno del citoesqueleto de actina.

Se ha demostrado que la forma mutante no tóxica de la toxina de la difteria, CRM197, daña la F-actina, pero se desconoce si ejerce algún efecto sobre la proteína de la familia Rho o las proteínas reguladoras de la actina.

En nuestro estudio, la unión de CRM197 a la G-actina, la colocalización de CRM197 con filamentos de actina y la pérdida del contacto célula-célula muestran que la actina aparece como molécula diana para CRM197. En conclusión, CRM197 daña el citoesqueleto de actina, por lo tanto, mejoraría la motilidad celular y, posteriormente, limitaría la comunicación de célula a célula. Sugerimos que los cambios en el citoesqueleto de actina de las células endoteliales bajo el tratamiento de CRM197 pueden ser la base del efecto previamente informado de CRM197 para la transferencia de carga a través de la barrera hematoencefálica al sistema nervioso central.

Reconocimientos. Este trabajo fue apoyado por la Unidad de Coordinación de Proyectos de Investigación Científica de la Universidad de Estambul. Número de proyectos: 21270 y 51249. Estamos agradecidos a Gamze Kılıç Berkmen por su ayuda de edición.

Referencias

- Aktories K., Schwan C., Papatheodorou P., Lang A. E. (2012): Ataque bidireccional al citoesqueleto de actina. Toxinas proteicas bacterianas que causan polimerización o despolimerización de la actina. *Toxicon* **60**, 572–581
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.338> Bektaş M., Varol B., Nurten R., Bermek E. (2009): Interacción de la toxina diftérica (fragmento A) con actina. *Bioquímica celular. Funct.* **27**, 430–439
<https://doi.org/10.1002/cbf.1590>
 Bektaş M., Haciosmanoğlu E., Özerman B., Varol B., Nurten R., Bermek E. (2011): On diphtheria toxin fragment A release into the cytosol–

- cytochalasin D effect and involvement of actin filaments and eukaryotic elongation factor 2. *Int. J. Bioquímica. Cell Biol.* **43**, 1365–1372
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.05.017>
- Bröker M., Costantino P., DeTora L., McIntosh E. D., Rappuoli R. (2011): Características bioquímicas y biológicas del material de reacción cruzada 197 CRM197, un mutante no tóxico de la toxina de la difteria: uso como proteína de conjugación en vacunas y otras aplicaciones clínicas potenciales. *Biológicos* **39**, 195–204
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.05.004>
- Brooks B. R., Brucoleri R. E., Olafson B. D., States D. J., Swaminathan S., Karplus M. (1983): Charm: a program for macromolecular energy minimization, and dynamics calculations. *J. Informática. Chem.* **4**, 187–217
<https://doi.org/10.1002/jcc.540040211>
- Bruce C., Baldwin R. L., Lessnick S. L., Wisniewski B. J. (1990): La toxina diftérica y su homólogo defectuoso ADP-ribosiltransferasa CRM197 poseen actividad desoxirribonucleasa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 2995–2998
<https://doi.org/10.1073/pnas.87.8.2995>
- Carlier M. F., Pernier J., Montaville P., Shekhar S., Kühn S., Cytoskeleton Dynamics and Motility group (2015): Control of polarized assembly of actin filaments in cell motility. *Célula Mol. Vida Sci.* **72**, 3051–3067
<https://doi.org/10.1007/s00018-015-1914-2>
- Chen Y., Liu L. (2012): Métodos modernos para la administración de medicamentos a través de la barrera hematoencefálica *Adv. Drug Deliver Rev.* **64**, 640–665
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.010>
- Comeau S. R., Gatchell D. W., Vajda S., Camacho C. J. (2004): ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Ácidos nucleicos Res.* **32**, W96–99
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh354>
- Giannini G., Rappuoli R., Ratti G. (1984): La secuencia de aminoácidos de dos mutantes no tóxicos de la toxina de la difteria: CRM45 y CRM197. *Ácidos nucleicos Res.* **12**, 4063–4069
<https://doi.org/10.1093/nar/12.10.4063>
- Heisle D.B., Kudryashova E., Grinevich D. O., Suarez C., Winkelman J. D., Birukov K. G., Kotha S. R., Parinandi N. L., Vavylonis D., Kovar D. R., Kudryashov D. S. (2015): ACTIN-TOXINA DIRIGIDA. Los oligómeros de actina producidos por la toxina ACD envenenan la polimerización de actina controlada por la mina. *Ciencia* **349**, 535–539
<https://doi.org/10.1126/science.aab4090>
- Kageyama T., Ohishi M., Miyamoto S., Mizushima H., Iwamoto R., Mekada E. (2007): El mutante de la toxina diftérica CRM197 posee una actividad EF2-ADP-ribosil débil que potencia su actividad antitumoral. *J. Bioquímica.* **142**, 95–104
<https://doi.org/10.1093/jb/mvm116>
- Kozakov D., Brenke R., Comeau S. R., Vajda S. (2006): PIPER: un programa de acoplamiento de proteínas basado en FFT con potenciales por pares. *Proteínas* **65**, 392–406
<https://doi.org/10.1002/prot.21117>
- Laemmli U. K. (1970): Escisión de proteínas estructurales durante el ensamblaje de la cabeza del bacteriófago T4. *Naturaleza* **227**, 680–685
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Malito E., Bursulaya B., Chen C., Lo Surdo P., Picchianti M., Balducci E., Biancucci M., Brock A., Berti F., Bottomley M. J., Nissim M., Costantino P., Rappuoli R., Spraggon G. (2012): Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **3**, 5229–5234
<https://doi.org/10.1073/pnas.1201964109>
- Pierce B. G., Hourai Y., Weng Z. (2011): Accelerating protein docking in ZDOCK using an advanced 3D convolution library. *PLoS One* **6**, e24657 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024657>
- Qiao J., Ghani K., Caruso M. (2008): El mutante de toxina difteria CRM197 es un inhibidor de la síntesis de proteínas que induce toxicidad celular. *Toxicón.* **51**, 473–477
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.09.010>
- Saha T., Guha D., Manna A., Panda A. K., Bhat J., Chatterjee S., Sa G. (2016): G-actin guides p53 nuclear transport: potential contribution of monomeric actin in altered localization of mutant p53. *Sci. Rep.* **6**, 32626
<https://doi.org/10.1038/srep32626>
- Shinefield H. R. (2010): Visión general del desarrollo y uso actual de las vacunas conjugadas CRM197 para uso pediátrico. *Vacuna* **28**, 4335–4339
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.04.072>
- Tang X., Deng S., Li M., Lu M. (2016): El material de reacción cruzada 197 revierte la resistencia al paclitaxel en el cáncer de ovario humano resistente al paclitaxel. *Tumor Biol.* **37**, 5521–5528
<https://doi.org/10.1007/s13277-015-4412-0>
- Ünlü A., Bektaş M., Şener S., Nurten R. (2013): La interacción entre la actina y el fragmento de FA de la toxina diftérica. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 3135–3145
<https://doi.org/10.1007/s11033-012-2387-0>
- Ünlü A. (2014): Predicción computacional de la interacción actina-actina. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 355–364
<https://doi.org/10.1007/s11033-013-2869-8>
- Varol B., Bektaş M., Nurten R., Bermek E. (2012): El efecto citotóxico de la toxina diftérica sobre el citoesqueleto de actina. *Célula Mol. Biol. Lett.* **17**, 49–61
<https://doi.org/10.2478/s11658-011-0036-6>
- Varol B., Özerman Edis B., Bektaş M. (2013): Estructura, entrega y acción de toxinas. En: *Corynebacterium Diphtheriae y Especies Toxigénicas Relacionadas*. (Ed. A. Burkovski), pp. 83–94, Springer, Países Bajos
- Vinante F., Rigo A. (2013): Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor/Diphtheria toxin receptor in normal and neoplastic hematopoiesis. *Toxinas* **5**, 1180–1201
<https://doi.org/10.3390/toxins5061180>
- Xu H., Yang J., Gao W., Li L., Li P., Zhang L., Gong Y. N., Peng X., Xi J. J., Chen S., Wang F., Shao F. (2014): Detección inmune innata de modificaciones bacterianas de Rho GTPasas por la pirina inflamatoria. *Naturaleza* **513**, 237–241
<https://doi.org/10.1038/nature13449>

Recibido: 23 de septiembre de 2016

Versión final aceptada: 3 de febrero de 2017

Publicado por primera vez en línea: 27 de junio de 2017