



FACULTAT
**DE CIÈNCIES
I TECNOLOGIA**

UVIC | UVIC·UCC

Trabajo de Fin de Grado

LA TOXINA ÉPSILON DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS INDUCE LA SECRECIÓN DE ECTOSOMAS

JUAN DAVID OCAMPO BEDOYA

Grado en Biotecnología

Tutor: Dr. Alexandre Olvera van der Stoep

Cotutores: Dr. Joan Blasi Cabús y Dr. Jonatan Dorca Arévalo

Vic, junio de 2020

Agradecimientos

Ante todo, me gustaría agradecer la ayuda, paciencia y dedicación de mis tutores durante la realización de este Trabajo de Fin de Grado, que pese a la situación del COVID-19, continuaron a mi lado en todo momento. En especial, darles las gracias a Jonatan y Joan, quienes me aceptaron en su grupo de investigación y me han enseñado tanto durante el tiempo que pude estar con vosotros.

Agradezco de corazón la gran ayuda y acogida que me dieron todos los miembros del laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular de la UB, con los que pude compartir una experiencia tan familiar y agradable.

A mi familia, quienes siempre me han apoyado en todos mis proyectos y han estado a mi lado tanto en los buenos como los malos momentos. Creo que nunca podré agradecer y compensar todo lo que habéis hecho por mí.

A mis amigos, que pese a la distancia que supone para algunos el estar en Barcelona y de los otros al volver a Mallorca, siempre habéis estado preocupándoos por mí. Sobre todo, agradecer a aquellos que me habéis aguantado durante el confinamiento con mis constantes videollamadas y mis quebraderos de cabeza con el TFG.

Resumen

Título: *La toxina Épsilon de Clostridium perfringens induce la secreción de ectosomas.*

Autor: Juan David Ocampo Bedoya

Tutores: Dr. Alexandre Olvera van der Stoep (UVic-UCC), Dr. Joan Blasi Cabús (UB) y Dr. Jonatan Dorca Arévalo (UB)

Fecha: junio de 2020

Palabras clave: *Toxina Épsilon, Clostridium perfringens, proteína de Mielina y Linfocitos, ectosomas, eritrocitos, linfocitos, Esclerosis Múltiple*

La toxina Épsilon (Etx) es una toxina formadora de poros producida por los toxinotipos B y D de la especie *Clostridium perfringens*, capaz de provocar enterotoxemia en animales rumiantes. La Etx posee la habilidad de atravesar la mucosa intestinal y la barrera hematoencefálica (BBB), afectando principalmente los riñones y el sistema nervioso central, en el cual, la toxina mata los oligodendrocitos provocando la posterior desmielinización de las estructuras cerebrales; llegándose a relacionar la toxina con el desarrollo de la Esclerosis Múltiple. Aunque el receptor de la Etx no se ha identificado con exactitud, se ha demostrado que la proteína de Mielina y Linfocitos (MAL) es fundamental en la unión y actividad tóxica.

Recientemente, se ha descubierto que la Etx también afecta a los eritrocitos y linfocitos T humanos, provocando la hemólisis de los eritrocitos y la muerte celular en ambos. En este trabajo, hemos estudiado el efecto de la Etx sobre las líneas celulares MDCK y MOLT-4, y en muestras de eritrocitos y linfocitos obtenidos de la sangre de dos individuos sanos. Los resultados obtenidos han demostrado que la Etx tiene la capacidad de inducir la formación y secreción de ectosomas. Además, se plantea la relación de los ectosomas como un efecto desencadenante para la Esclerosis Múltiple.

Summary

Title: Clostridium perfringens *Epsilon toxin induces secretion of ectosomes*

Author: Juan David Ocampo Bedoya

Supervisors: Dr. Alexandre Olvera van der Stoep (UVic-UCC), Dr. Joan Blasi Cabús (UB) y Dr. Jonatan Dorca Arévalo (UB)

Date: June 2020

Keywords: Epsilon toxin, Clostridium perfringens, Myelin and Lymphocyte protein, ectosomes, erythrocytes, lymphocytes, Multiple Sclerosis

Epsilon toxin (Etx) is a pore-forming toxin produced by Clostridium perfringens types B and D, and it can trigger enterotoxemia in ruminant animals. Etx can cross the intestinal mucosa and the blood-brain barrier (BBB), mainly affecting kidneys and the central nervous system, in which toxin kills oligodendrocytes and subsequently cause brain structure demyelination, recently associated with Multiple Sclerosis development. Although Etx receptor has not been accurately identified, the Myelin and Lymphocyte (MAL) protein is essential in his binding and toxic activity.

Also, Etx affects human erythrocytes and T lymphocytes, causing erythrocytes' haemolysis and cell death in both. In this work, we have studied Etx effect on MDCK and MOLT-4 cell lines, and the toxin effect on erythrocytes and lymphocytes samples from two healthy individuals' blood. The results obtained have proved that Etx can induce the formation and secretion of ectosomes. Furthermore, Etx's ectosomes are proposed as a triggering effect for Multiple Sclerosis.

Índice de Contenidos

1. Introducción.....	1
1.1 Las toxinas de <i>Clostridium perfringens</i>	1
1.2 La toxina Épsilon (Etx).....	2
1.2.1 El gen de la Etx	2
1.2.2 Expresión y activación de la Etx	2
1.2.3 Dominios proteicos de la Etx	3
1.2.4 Oligomerización y posible modo de acción de la Etx	4
1.2.5 Absorción intestinal y diseminación por el organismo de la Etx	4
1.3 Receptores de membrana involucrados en la citotoxicidad de la Etx	6
1.3.1 El papel de la CAV1 y la CAV2	6
1.3.2 El receptor HAVCR1	6
1.3.3 La fundamental importancia de la proteína MAL	7
1.4 La Etx en el contexto de la Esclerosis Múltiple	8
1.5 El posible mecanismo de defensa celular frente a la Etx.....	9
2. Objetivos	11
3. Materiales y métodos	12
3.1 Expresión y obtención de la proteína recombinante pEtx	12
3.2 Obtención de la Etx activa.....	13
3.3 Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE) de la pEtx y Etx.....	13
3.4 Cultivo y crecimiento de las líneas celulares MDCK y MOLT-4.....	13
3.5 Obtención de linfocitos y eritrocitos a partir de muestras de sangre humana	13
3.6 Obtención y purificación de ectosomas.....	14
3.7 Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot de las fracciones celulares y de ectosomas	15
4. Resultados	17
4.1 Secreción de ectosomas de la línea celular MDCK en presencia de la Etx.....	17
4.2 Secreción de ectosomas de la línea celular MOLT-4 en presencia de la Etx.....	18
4.3 Secreción de ectosomas en muestras de sangre total, eritrocitos y linfocitos	19
4.3.1 Detección de la Etx en las muestras de sangre.....	19
4.3.2 Detección de la Flotilina 1 en las muestras de ectosomas de la sangre.....	20
4.3.3 Detección de la proteína MAL en las muestras de sangre	20
4.3.4 Detección del TMEM16A/ANO1 en las muestras de sangre.....	22
4.3.5 Detección del TMEM16F/ANO6 en las muestras de sangre	23

5. Discusión	25
6. Conclusión.....	28
7. Perspectivas.....	29
8. Bibliografía	31

Lista de tablas

Taula 1: *Tabla con los toxinotipos hasta el momento establecidos de la Clostridium perfringens y sus respectivas toxinas producidas y enfermedades asociadas (Navarro, et al. 2018; Rood, et al. 2018; Kiu and Hall, 2018).*..... 2

Taula 2: *Tabla con los antígenos y sus anticuerpos primarios y secundarios correspondientes, además de mostrar las diluciones utilizadas y la marca comercial respectiva.* 16

Taula 3: *Tabla con el resumen de los resultados, indicando la presencia (✓) o la ausencia (✗) de las proteínas estudiadas en las muestras. La ausencia con asterisco (✗*) indica del resultado que precisa confirmación y los guiones (--) que no hay datos.* 25

Lista de abreviaturas

ATCC: American Type Culture Collection	DMEM-F12: Medio de cultivo “Dulbecco Modified Eagle Medium–F12”
BBB: Barrera hematoencefálica	MAL: Proteína “Myelin and Lymphocyte”
BSA: Albúmina de suero bovino	MDCK: Línea celular “Madin-Darby Canine Kidney”
CAV1: Caveolina-1	MOLT-4: Línea celular de linfoblastos T humanos
CAV2: Caveolina-2	pEtx: Protoxina Épsilon
CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades	RIPA: Tampón de Ensayos de Radio-Inmunoprecipitación
CPA: Toxina <i>Clostridium Perfringens</i> Alfa	RPMI: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
CPB: Toxina <i>Clostridium Perfringens</i> Beta	SDS: Dodecilsulfato sódico
CPE: <i>Clostridium Perfringens</i> Enterotoxina	SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida- Dodecilsulfato sódico
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	TBST: Solución salina tamponada con Tris y polisorbato 20
EM: Esclerosis Múltiple	TIM-1: Proteína de Inmunoglobulina y Mucina de las células T
Etx: Toxina Épsilon	TMEM16/ANO: Anoctaminas
FBS: Suero Fetal Bovino	TMEM16A/ANO1: Anoctamina 1
FLOT1: Flotilina 1	TMEM16F/ANO6: Anoctamina 6
HAVCR1: Receptor Celular del Virus Hepatitis A	Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano
I1: Individuo 1	UB: Universidad de Barcelona
I2: Individuo 2	β-PFP: Beta-Toxinas formadoras de poros
IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	
Itx: Toxina Iota	
LB: Medio de cultivo Caldo de Lisogenia	
LD₅₀: Dosis letal 50%	

Lista de figuras

- Figura 1:** Representación del dominio 1 (en rojo), el dominio 2 (en verde) y el dominio 3 (en azul) de la Etx, además de los residuos aromáticos relacionados con la interacción del receptor (en amarillo). 3
- Figura 2:** Estructura primaria del producto del gen Etx. Después de la secreción de la protoxina (pEtx) se activa mediante la eliminación de los residuos N y C terminales en las posiciones marcadas (Bokori-Brown, et al. 2011). 3
- Figura 3:** Cambios conformacionales durante la formación del poro. La parte coloreada representa un monómero de Etx y sus dominios (dominio 1 en verde, dominio 2 en azul y dominio 3 en amarillo), visto desde diferentes ángulos (a-c) (Savva, et al. 2019). 4
- Figura 4:** Representación esquemática de la distribución de la Etx en el organismo durante una enterotoxemia y sus efectos principales (Popoff, et al. 2011). 5
- Figura 5:** Modelo hipotético de la topología de la proteína MAL (B). El gen de la proteína MAL consiste en 4 exones representados en las cajas oscuras (Ex1, Ex2, Ex3, Ex4). Las tijeras con las líneas discontinuas indican el “splicing” (corte y empalme) que puede producirse en los exones 2 o 3 de la proteína MAL. Muchos de los aminoácidos de la proteína MAL se encuentran conservados entre especies (humano, perro, ratón y rata), aquellos aminoácidos diferentes entre las secuencias de estas especies homólogas se encuentran marcados con una estrella negra. (Frank, 2000). 7
- Figura 6:** Representación esquemática de las diferentes vesículas producidas por las células eucariotas (Colombo, et al. 2014). 9
- Figura 7:** Western blot revelado con anti-Etx, anti-ANO1, anti-Flotilina 1 y anti-Actina de la fracción ectosomal de las células MDCK preincubadas con pEtx y Etx durante 60 minutos a 37°C. 17
- Figura 8:** Western Blot de la fracción de ectosomas de la línea celular MOLT-4 incubada con pEtx y Etx, durante 30 minutos y 60 minutos. Los anticuerpos primarios utilizados fueron contra pEtx/Etx (A), TMEM16A/ANO1 (B) y MAL (C). 18
- Figura 9:** Western Blot de fracciones celulares incubadas con el anticuerpo primario contra pEtx/Etx, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx. 19
- Figura 10:** Western Blot de fracciones de ectosomas incubadas con el anticuerpo primario contra pEtx/Etx, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx. 20
- Figura 11:** Western Blot de fracciones de ectosomas incubadas con el anticuerpo primario contra Flotilina 1, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx. 20
- Figura 12:** Western Blot de fracciones celulares incubadas con el anticuerpo primario contra MAL, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx. 21
- Figura 13:** Western Blot de fracciones de ectosomas incubadas con el anticuerpo primario contra MAL, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx. 22

Figura 14: *Western Blot de fracciones celulares incubadas con el anticuerpo primario contra TMEM16A/ANO1, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx. 23*

Figura 15: *Western Blot de fracciones de ectosomas incubadas con el anticuerpo primario contra TMEM16A/ANO1, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx. 23*

Figura 16: *Western Blot de fracciones celulares y de ectosomas incubadas con el anticuerpo primario contra TMEM16F/ANO6, a partir de muestras de sangre total, eritrocitos y linfocitos de los individuos 1 y 2, preincubados con pEtx y Etx. 24*

Figura 17: *Representación de los posibles mecanismos inducidos por la Etx en el desarrollo de la Esclerosis Múltiple. La desmielinización de los axones se debe a la eliminación de los oligodendrocitos, ya sea, directamente al estar intoxicados (A), a través de la presentación de un autoantígeno (B) o a través de la fagocitosis de los ectosomas inducidos por la Etx (C). 29*

1. Introducción

1.1 Las toxinas de *Clostridium perfringens*

La especie *Clostridium perfringens* es un microorganismo perteneciente al reino monera, tratándose de una bacteria con forma de bacilo, grampositiva, anaerobia y capaz de formar esporas. Las primeras muestras fueron identificadas en 1891 por William H. Welch, al observar burbujas de gas en vasos sanguíneos infectados durante una autopsia (Welch, et al. 1892), microorganismo que después se relacionó con los síntomas de la gangrena gaseosa en soldados ingleses y franceses durante la Primera Guerra Mundial (Popoff, 2011).

La *C. perfringens* se ha encontrado en diversos medios como suelos, alimentos, aguas residuales e incluso formando parte de la microbiota gastrointestinal de muchos animales, incluyendo humanos. Esta supervivencia en diferentes medios se debe gracias a su rápida proliferación y a su gran habilidad de adaptación en condiciones de estrés, ya sea con pH bajo, radiación solar, presión atmosférica alta o incluso tolerando medios con oxígeno (Florence, et al. 2011).

Los factores de virulencia de la *C. perfringens* se han relacionado con sus más de 20 toxinas y enzimas hidrolíticas diferentes (Revitt-Mills, et al. 2015). Debido a esta gran capacidad de producción, se ha clasificado esta especie en 7 toxinotipos (Tipos A-G) dependiendo de la capacidad de producir una o varias de las 6 principales toxinas que libera: α (CPA), β (CPB), ϵ (Etx), ι (Itx), enterotoxina (CPE) y NetB (Rood, et al. 2018). Estas toxinas se han asociado con varias enfermedades sistémicas y entéricas (Tabla 1), entre las cuales destacan la mionecrosis, la intoxicación alimentaria, la enteritis, la enterocolitis y la enterotoxemia (Navarro, et al. 2018; Kiu and Hall, 2018), tanto en animales como en humanos.

Toxinotipos <i>C. perfringens</i>	Toxina/s asociada/s	Enfermedades asociadas
Tipo A	α (CPA)	Mionecrosis humana (gangrena gaseosa). Enteritis necrótica bovina y de aves de corral. Gastroenteritis canina. Enterocolitis necrótica equina, porcina y humana.
Tipo B	α (CPA), β (CPB), ϵ (Etx)	Enteritis hemorrágica bovina, porcina y ovina. Disentería ovina y caprina. Enterotoxemia ovina.
Tipo C	α (CPA), β (CPB), enterotoxina (CPE)	Enteritis necrótica aviar y humana. Enterocolitis porcina.
Tipo D	α (CPA), ϵ (Etx), enterotoxina (CPE)	Enterotoxemia bovina, ovina y caprina.
Tipo E	α (CPA), ι (Itx), enterotoxina (CPE)	Enterocolitis bovina y caprina. Enterotoxemia bovina y caprina.
Tipo F	α (CPA), enterotoxina (CPE)	Gastroenteritis canina. Enteritis canina, bovina y porcina.

		Enterocolitis necrótica equina. Diarrea aguda humana (por intoxicación alimentaria o asociada con antibióticos).
Tipo G	α (CPA), NetB	Enteritis necrótica aviar.

Taula 1: Tabla con los toxinotipos hasta el momento establecidos de la *Clostridium perfringens* y sus respectivas toxinas producidas y enfermedades asociadas (Navarro, et al. 2018; Rood, et al. 2018; Kiu and Hall, 2018).

1.2 La toxina Épsilon (Etx)

La toxina Épsilon (Etx) es sintetizada por los toxinotipos B y D de la *C. perfringens*. Actualmente, esta toxina clostridial se considera una de las más potentes, solamente por debajo de la toxina botulínica y la tetánica (Bokori-Brown, et al. 2011; Stiles, et al. 2013). Su dosis letal 50% (LD₅₀) en ratones ronda entre 50-75 ng/kg, por ello es considerada como un arma biológica en potencia, clasificada en la categoría B de agente biológico según la agencia de Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) del Gobierno de los Estados Unidos (Bokori-Brown, et al. 2011).

La *C. perfringens* tipo B y D suele encontrarse como un habitante usual del tracto intestinal de los animales rumiantes como cabras, ovejas y vacas (Popoff, 2011; Bokori-Brown, et al. 2011). Si se llega a producir su crecimiento excesivo, por ejemplo debido a un desequilibrio en la microbiota intestinal se puede desencadenar una enterotoxemia que puede acabar con la vida de estos animales rápidamente, traduciéndose en elevadas pérdidas económicas en el sector ganadero (Popoff, 2014).

Por otra parte, encontrar estos toxinotipos B y D en humanos es extremadamente raro, aunque se han encontrado casos por infección intestinal de la *C. perfringens* tipo D, extrayendo muestras de heces y suero con Etx y anticuerpos contra esta toxina (Popoff, 2011).

1.2.1 El gen de la Etx

El gen Etx se encuentra localizado en plásmidos de gran tamaño: al menos 5, de entre 48-110kbp, en la *C. perfringens* tipo D (Sayeed y McClane, 2007), y en uno de 65kbp en la *C. perfringens* tipo B (Sayeed y McClane, 2010).

Estos plásmidos contienen secuencias de inserción que les proporciona la habilidad de movilizar la secuencia de la toxina Etx entre diferentes plásmidos, al cromosoma principal o incluso entre diferentes *C. perfringens* (Sayeed y McClane, 2007 y 2010); lo que se supondría que otros toxinotipos podrían adquirir diferentes toxinas o perderlas.

1.2.2 Expresión y activación de la Etx

La Etx es sintetizada durante la fase exponencial de crecimiento de la *C. perfringens* como una proteína secretada, con forma elongada (100x20x20 Å) y poco activa, de aproximadamente 33kDa denominada protoxina (pEtx) (Hunter, et al. 1992; Cole, et al. 2004).

Esta protoxina es activada por las proteasas tripsina, α -quimotripsina, ambas producidas en el intestino, y la λ -proteasa, producida por la propia *C. perfringens* (Minami, et al. 1997). La activación de la protoxina viene dada por estas proteasas al romper los enlaces peptídicos y eliminar entre 11-13 residuos N-terminal y 23-29 residuos C-terminal (Figura 2), reduciendo su tamaño a 28,6kDa y provocando un cambio conformacional debido a la disminución del valor del punto isoelectrónico, siendo finalmente 1000 veces más tóxica que la protoxina (Popoff 2011; Bokori-Brown, et al. 2011).

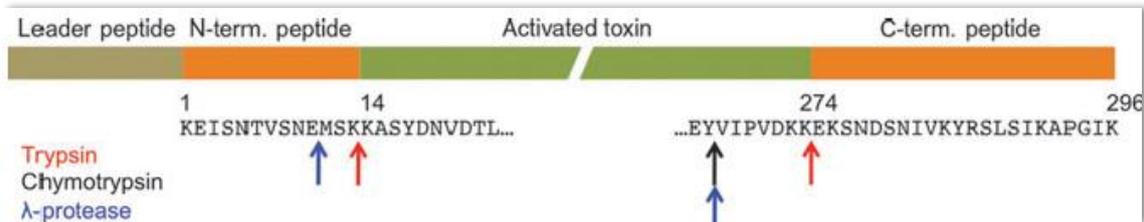


Figura 2: Estructura primaria del producto del gen *Etx*. Después de la secreción de la protoxina (*pEtx*) se activa mediante la eliminación de los residuos N y C terminales en las posiciones marcadas (Bokori-Brown, et al. 2011).

1.2.3 Dominios proteicos de la Etx

La Etx contiene 3 dominios (Figura 1), descritos a continuación (Cole, et al. 2004):

- El dominio 1 de la Etx consiste en una larga hélice α , seguido de un bucle y tres laminas β antiparalelas cortas. En este dominio se encuentra un conjunto de residuos aromáticos (Tyr49, Tyr43, Tyr42, Tyr209 y Phe212) posiblemente relacionados con la unión del receptor celular.
- El dominio 2 contiene 5 láminas β antiparalelas, en disposición β -sándwich, que contienen una secuencia de aminoácidos anfipáticos relacionados con la inserción en la membrana y la formación del canal del poro.
- El dominio 3 también se trata también de láminas en β -sándwich, 7 en total, el cual contiene el sitio de corte relacionado con la activación de la toxina, que una vez se ha realizado, pasa a funcionar como lugar de interacción monómero-monómero para realizar la oligomerización y por consiguiente el poro.

La mayor parte de la estructura se ha visto altamente relacionada con la toxina aerolisina, también formadora de poros y perteneciente a la misma familia de las toxinas β -formadoras de poro (β -PFP) heptaméricas, del género *Aeromonas*; aunque la principal diferencia reside en el dominio 1 de la aerolisina, cuya función es la interacción inicial con la célula diana y no se encuentra en la Etx (Iacovache, et al. 2015).

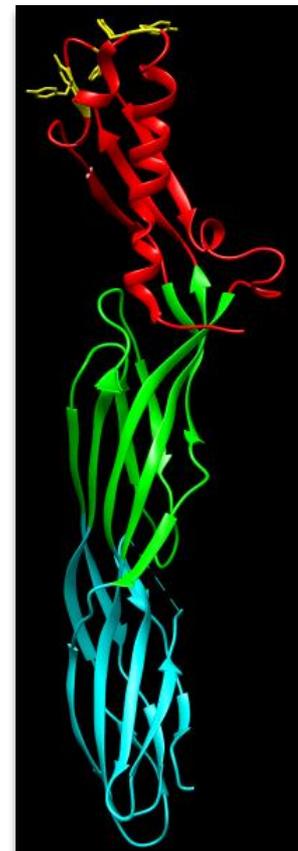


Figura 1: Representación del dominio 1 (en rojo), el dominio 2 (en verde) y el dominio 3 (en azul) de la Etx, además de los residuos aromáticos relacionados con la interacción del receptor (en amarillo).

1.2.4 Oligomerización y posible modo de acción de la Etx

La Etx, por lo general, se une con la zona apical de la membrana celular diana, en dominios resistentes a detergentes y ricos en colesterol, reconociendo un receptor específico (Stiles, et al. 2013). Este enlace promueve la formación gradual de complejos de la toxina en la membrana muy estables, formando un pre-poro que va añadiendo monómeros hasta producirse una oligomerización de 7 monómeros de la toxina épsilon (Figura 3), formando un heptámero de alrededor de 200kDa, el cual finalmente se inserta en la membrana, produciendo el poro y permeabilizándola (Robertson, et al. 2011).

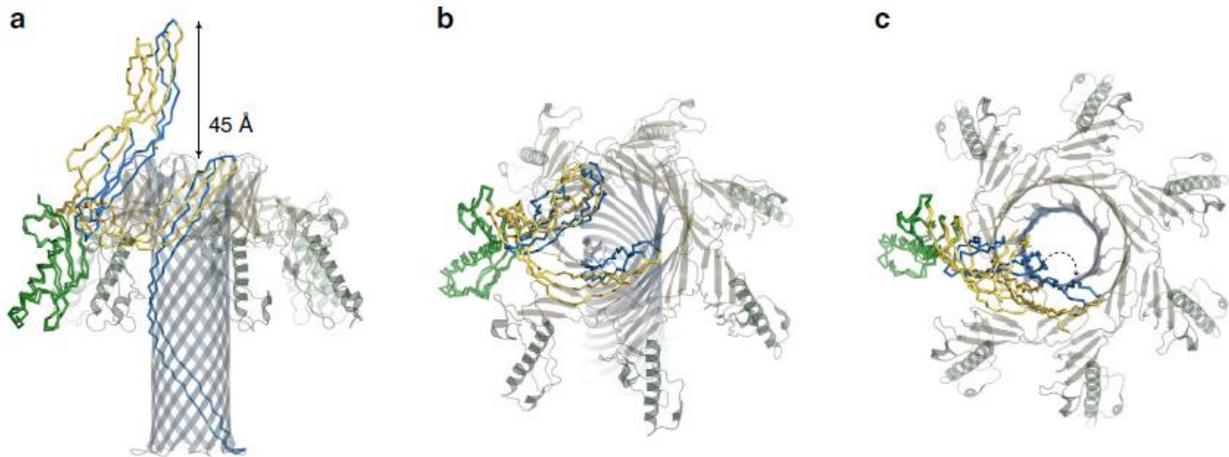


Figura 3: Cambios conformacionales durante la formación del poro. La parte coloreada representa un monómero de Etx y sus dominios (dominio 1 en verde, dominio 2 en azul y dominio 3 en amarillo), visto desde diferentes ángulos (a-c) (Savva, et al. 2019).

La Etx forma un poro de forma cónica con un diámetro aproximado de 2 nm que facilita el paso de moléculas de hasta 1kDa y provoca una rápida pérdida de K^+ intracelular y un aumento de Cl^- y Na^+ , con el posterior incremento de Ca^{2+} (Petit, et al. 2001).

La Etx es una toxina muy potente, que altera la permeabilidad de las monocapas celulares como el endotelio, causando edemas y una rápida muerte celular por necrosis caracterizado por una condensación del núcleo pero sin fragmentación del ADN, sin embargo, su modo de acción exacto aún se encuentra investigándose (Popoff 2011; Khalili, et al. 2017).

1.2.5 Absorción intestinal y diseminación por el organismo de la Etx

Cantidades elevadas de Etx inducen a un incremento en la permeabilización de la mucosa intestinal, aunque el mecanismo de acción exacto aún se desconoce, posiblemente la Etx cruce esta mediante una vía paracelular, abriendo las uniones estrechas entre los enterocitos (Popoff, 2011). Inmediatamente, las células endoteliales se ven también afectadas por la Etx, provocando necrosis y alterando la integridad de la barrera vascular, con el consecuente paso de la toxina a la sangre (Adamson, et al. 2005; Fernandez-Miyakawa y Uzal, 2003). Por otro lado, la Etx, de manera indirecta, disminuye la motilidad gastrointestinal, convirtiéndose en un factor de riesgo para el sobrecrecimiento bacteriano y provocando aún más acumulación de la toxina en el lumen del intestino (Losada-Eaton and Fernandez-Miyakawa, 2010).

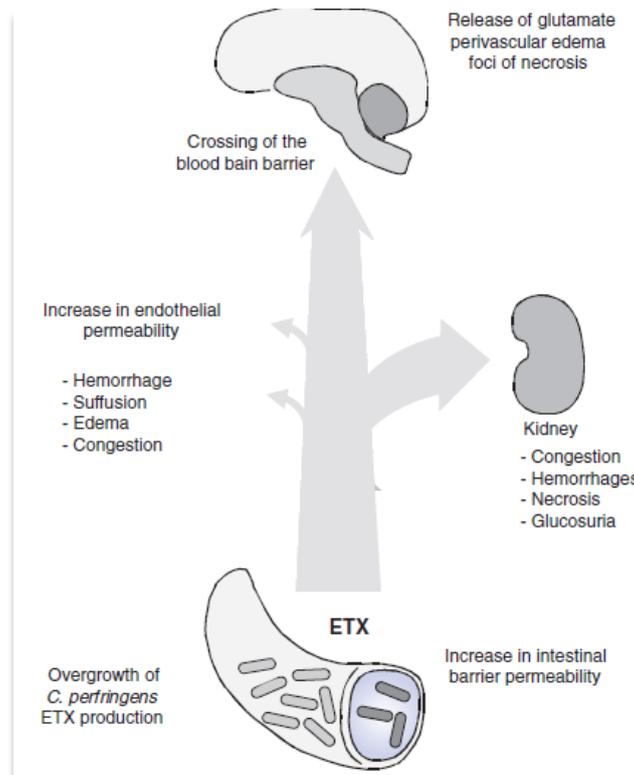


Figura 4: Representación esquemática de la distribución de la Etx en el organismo durante una enterotoxemia y sus efectos principales (Popoff, et al. 2011).

Una vez en el sistema circulatorio, diversos estudios han demostrado que la Etx tiene múltiples dianas (Figura 4), y por lo tanto se acumula y afecta a diversos órganos y tejidos:

Por un lado, se ha demostrado que la Etx afecta negativamente a los riñones en diversas especies. Un rasgo característico de la enterotoxemia ovina, caprina y bovina es la inflamación y hemorragia de estos (Songer, 1996). Por otra parte, se ha verificado que la Etx se une específicamente en las células epiteliales que forman los túbulos distales y colectores de los riñones de ratón (Dorca-Arévalo, et al. 2012) y en las líneas celulares renales MDCK (Riñón canino Madin-Darby), G-402 (Leiomioblastoma renal caucásico humano) y ACHN (Adenocarcinoma renal humano) (Chassin, et al. 2007; Ivie, et al. 2011), lo que podría significar que la Etx también afectaría a los riñones caninos y humanos.

Por otro lado, uno de los órganos donde más se acumula la Etx es el cerebro, lo que supone que la toxina es capaz de atravesar barrera hematoencefálica (BBB), provocando edemas vasogénicos, y, una vez en el interior, reconoce sitios o células específicas en ratón, oveja, vaca e incluso en el humano (Soler-Jover, et al. 2007; Dorca-Arévalo, et al. 2008). Las lesiones cerebrales se caracterizan por provocar edema perivascular, hemorragia, degeneración o distorsión de la materia blanca y necrosis cerebral (Wioland, et al. 2013). A través de marcajes con Etx fluorescente (Etx unida a GFP) se ha observado, que las acumulaciones se daban sobre todo en las células endoteliales vasculares del cerebelo, los pedúnculos cerebelosos, la sustancia blanca cerebral, el hipocampo, el tálamo, el estriado, el bulbo olfativo y los colículos (Soler-Jover, et al. 2007; Dorca-Arévalo, et al. 2008). En análisis más detallados, se descubrió que las células principalmente afectadas por la toxina se trataban de las neuronas

glutamatérgicas y los oligodendrocitos (Wioland, et al. 2013), que provocaba una liberación de glutamato (Lonchamp, et al. 2010) y procesos de desmielinización de diversas estructuras cerebrales (Wioland, et al. 2015; Linden et al. 2015), respectivamente.

Recientemente, se ha descubierto que la Etx también podría afectar a determinadas células sanguíneas humanas, en concreto, a los linfocitos T, provocando su muerte a través de la formación del poro en la membrana (Blanch, et al. 2018), y los eritrocitos, provocando su hemólisis (Gao, et al. 2018; Geng, et al. 2020).

1.3 Receptores de membrana involucrados en la citotoxicidad de la Etx

Se han sugerido tres proteínas como posibles receptores de la Etx: la caveolina-1 y caveolina-2 (CAV1 y CAV2) (Fennessey, et al. 2012), el Receptor Celular del Virus Hepatitis A (HAVCR1) (Ivie, et al. 2011), y la proteína de Mielina y Linfocitos (MAL) (Rumah, et al. 2015). De todas ellas, la proteína MAL se ha demostrado ser necesaria para la unión de la Etx a la membrana celular y su posterior citotoxicidad, mientras que el resto participan únicamente en su citotoxicidad. De todas maneras, se sigue investigando ya que el modelo de acción exacto es aún desconocido y se plantea que la Etx posiblemente necesite varios receptores para ello (Linden, et al. 2019).

1.3.1 El papel de la CAV1 y la CAV2

La CAV1 y CAV2 son proteínas estructurales asociadas entre ellas, con forma de matraz, que se encuentran en las invaginaciones ricas en colesterol de la membrana plasmática de las células de mamífero, denominadas caveolas. Sus funciones principales son la señalización celular, la endocitosis y transcitosis de macromoléculas, y la interacción proteica entre membranas, además de tener un impacto en la composición y fluidez de la zona de la membrana donde se encuentran (Parton y Simons, 2007).

Se ha demostrado a través de la delección del gen de estas proteínas que las caveolinas 1 y 2 potencian en gran medida la actividad citotóxica de la Etx en las células de mamífero, aunque no son esenciales en la unión con la membrana celular (Fennessey, et al. 2012).

La expresión de la proteína MAL y de la CAV 1 y 2 son necesarias para poder permeabilizar la barrera hematoencefálica y entrar al cerebro, aunque se ha demostrado que una vez en el sistema nervioso central solo es necesaria la proteína MAL para desarrollar su actividad tóxica (Linden, et al. 2019).

1.3.2 El receptor HAVCR1

El Receptor Celular del Virus Hepatitis A (HAVCR1), también conocido como proteína de Inmunoglobulina y Mucina de las células T (TIM-1), se trata de una proteína altamente O-glicosilada que se encuentra en la membrana celular, cuya función se ha visto relacionada con la actividad inmunológica frente a la respuesta de infecciones virales (McIntire, et al. 2001).

Se ha demostrado que la Etx es capaz de unirse al dominio extracelular del HAVCR1, pero no a otros dominios proteicos similares, sugiriendo que sea un posible receptor o correceptor, aunque al realizar una delección de su gen, todavía se produce cierta actividad tóxica de la Etx, siendo esta mucho más reducida (Ivie, et al. 2011). Por otra parte, también se plantea que la

toxina induzca al HAVCR1 a realizar señales de transducción intracelular, además de estabilizar las interacciones proteicas con la Etx (Ivie, et al. 2011).

Las investigaciones hasta el momento concluyen en que el HAVCR1 contribuye a la interacción de la Etx con la célula diana pero no es suficiente para realizar toda la actividad tóxica de esta, lo que supone que el HAVCR1, al igual que las CAV 1 y CAV2, participan en la citotoxicidad pero no son esenciales para la unión de la Etx.

1.3.3 La fundamental importancia de la proteína MAL

La proteína de Mielina y Linfocitos (MAL), es un proteolípido intermembranal muy hidrofóbico, de alrededor 17-20kDa, que contiene dos bucles extracelulares y los extremos C y N terminal intracelulares (Figura 5). Su función principal es la formación, estabilización y mantenimiento de las balsas lipídicas de la membrana celular, aunque posee otras funciones dependiendo del tipo celular donde se encuentre (Ramnarayanan y Tuma, 2011). La secuencia de aminoácidos de la proteína MAL entre humanos, ratones y perros comparten entre un 87 y 89 % de similitud en donde los dos bucles extracelulares son casi idénticos (Rumah, et al. 2015). Estos datos serían una de las principales razones de que la Etx actúe de forma tan similar en varias especies, tanto en órganos y tejidos como en tipos celulares semejantes.

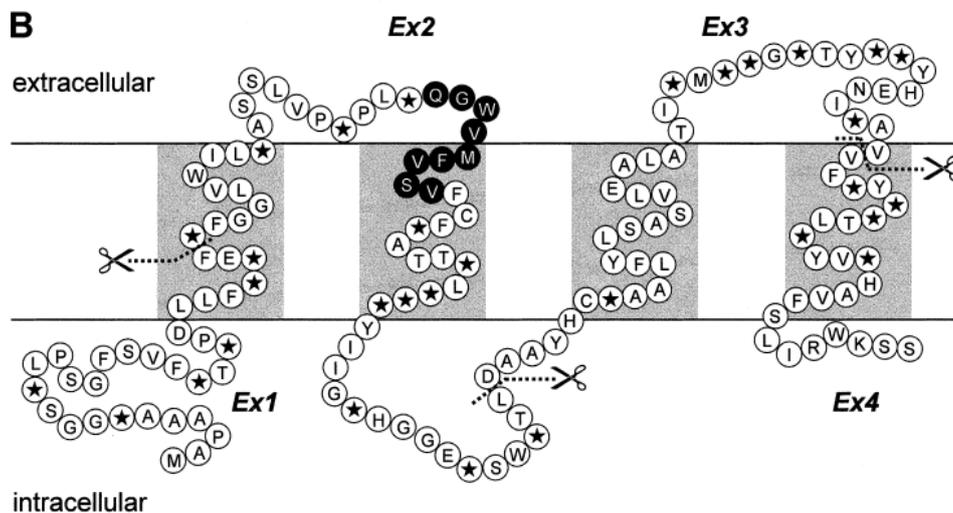


Figura 5: Modelo hipotético de la topología de la proteína MAL (B). El gen de la proteína MAL consiste en 4 exones representados en las cajas oscuras (Ex1, Ex2, Ex3, Ex4). Las tijeras con las líneas discontinuas indican el "splicing" (corte y empalme) que puede producirse en los exones 2 o 3 de la proteína MAL. Muchos de los aminoácidos de la proteína MAL se encuentran conservados entre especies (humano, perro, ratón y rata), aquellos aminoácidos diferentes entre las secuencias de estas especies homólogas se encuentran marcados con una estrella negra. (Frank, 2000).

Generalmente, se ha encontrado esta proteína en células polarizadas epiteliales, formando parte de la red trans de transporte del aparato de Golgi, clasificando apicalmente proteínas de membrana asociadas a la superficie (Puertollano y Alonso, 1999); en oligodendrocitos, en las membranas compactas y no compactas de mielina, con un papel en la función y biogénesis de mielina (Schaeren-Wiemers, et al. 2004); en linfocitos T humanos, implicado en la formación de sinapsis inmunológicas (Antón, et al. 2008); y recientemente en eritrocitos humanos, con la isoforma C de la proteína MAL (Rumah, et al. 2019).

La proteína MAL humana posee 4 isoformas (A, B, C y D) derivadas del “splicing” (corte y empalme) producido en el gen de la proteína (Figura 5), siendo la isoforma A la canónica. Comparadas con la isoforma A, la isoforma B carece de los residuos desde el 88 al 129, la isoforma C del 32 al 87, y a la isoforma D del 32 al 129 (I21145 (MAL_HUMAN), UniProtKB). El primer bucle extracelular correspondería a la secuencia desde el residuo 42 al 55, y el segundo desde el residuo 114 al 124 (Rumah, et al. 2015), lo que significaría que en la isoforma B solo poseería el primer bucle extracelular, en la isoforma C el segundo bucle extracelular y la isoforma D faltarían ambos bucles extracelulares.

Curiosamente, los eritrocitos humanos poseen la isoforma C de la proteína MAL (Rumah, et al. 2019), en la cual el fragmento faltante corresponde al primer bucle de los dos extracelulares. Según el estudio de Rumah en el año 2015, la Etx necesitaría solo del segundo bucle para actuar, explicando porque la Etx se acopla igualmente a los eritrocitos pese a faltar el primer bucle de la proteína MAL. Este hecho significaría que la unión de la toxina en un principio no se vería afectada y, por otra parte, supondría también que todas aquellas células humanas que poseyeran las isoformas B y D de la proteína MAL no se verían afectadas por las Etx, al no poseer el segundo bucle extracelular necesario para su acción tóxica.

La proteína MAL podría ser el receptor que interactúa directamente con la Etx vía interacciones proteína-proteína o ser un correceptor que forma parte de un complejo proteico necesario para la acción de la toxina (Rumah, et al. 2015). Que fuese un correceptor implicaría la selección, acompañamiento y / o reclutamiento de otra proteína intermediaria para el enlace directo con la Etx, o que la proteína MAL actuara como un organizador de la zona de la membrana lipídica necesaria para formar el complejo receptor; ambas posibilidades sin la interacción directa de la proteína MAL con la Etx (Rumah, et al. 2015; Khalili, et al. 2017).

1.4 La Etx en el contexto de la Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple (EM) es una compleja enfermedad inflamatoria crónica y autoinmune, caracterizada por el deterioro del sistema nervioso central debido a lesiones provocadas por el propio sistema inmunológico, entre las que destaca la desmielinización de estructuras cerebrales (Lassmann, 2018). Estudios genéticos y patológicos indican que se trata del sistema inmune adaptativo, específicamente las células T y B, siendo las responsables de detectar y actuar sobre antígenos propios (autoantígenos) del sistema nervioso central (Thompson, et al. 2018).

Las lesiones por desmielinización cortical son presentes en las primeras etapas de la enfermedad, pero no se ha visto que sean consecuencia de un proceso de inflamación, es decir, en ausencia de células T, células B e infiltración de plasma celular, lo que podría suceder debido a la activación prematura, directa o indirectamente, de la microglía (Lassmann, 2018; Thompson, et al. 2018). Además, en estas primeras etapas, se ha observado daños en los oligodendrocitos y una permeabilidad en la barrera hematoencefálica (Prineas y Parratt, 2012). Al no haber inflamación y tener estas características en las primeras fases de la enfermedad, Rumah y su equipo en 2013 planteó que este fenómeno podía ser debido a un virus o una toxina, y por ello investigaron la posible relación entre la Etx y su posible papel en el desarrollo de la Esclerosis Múltiple.

Esta hipótesis se basó en el aislamiento de la especie *C. perfringens* toxinotipo B y la presencia de sus toxinas (α , β , ϵ) en las heces de una paciente con los síntomas de las primeras etapas de la esclerosis múltiple, idea impulsada con el descubrimiento durante su investigación de que un 10% de los pacientes con esclerosis múltiple presentaban suero con anticuerpos contra la Etx, frente al 1% de los sueros control (Rumah, et al. 2013). Posteriormente, esta hipótesis se vio reforzada con la actividad tóxica de la Etx, permeabilizando la barrera hematoencefálica, dañando los oligodendrocitos y la consecuente desmielinización de las estructuras cerebrales (Wioland 2015; Linden et al. 2015). Sumado a ello, recientemente se volvió a detectar anticuerpos de Etx en líquido cefalorraquídeo y suero de más pacientes con la enfermedad, en un 24% de ellos frente al 10% de los sueros control (Wagley, et al. 2019).

1.5 El posible mecanismo de defensa celular frente a la Etx

Cuando las células se ven afectadas por una toxina que provoca poros y permeabilización de la membrana plasmática, la célula huésped realiza principalmente dos mecanismos de reparación: se libra de la región de la membrana afectada por la toxina en forma de ectosomas (microvesículas extracelulares), y/o a través de la endocitosis de los poros de la membrana para su posterior digestión (Babiyhuk y Draeger, 2015). La Etx al ser una toxina formadora de poros, en un principio podría provocar alguno, o ambos, mecanismos de acción.

Además, la secreción de ectosomas podría ser el mecanismo más plausible ya que en algunos tipos celulares afectados por la Etx (como los oligodendrocitos, linfocitos T o eritrocitos humanos) ya se ha identificado la formación y secreción de vesículas extracelulares (exosomas y ectosomas, Figura 6) con un papel importante en diversas funciones como la comunicación celular o la regulación inmunológica (Shifrin, et al. 2013; Colombo, et al. 2014).

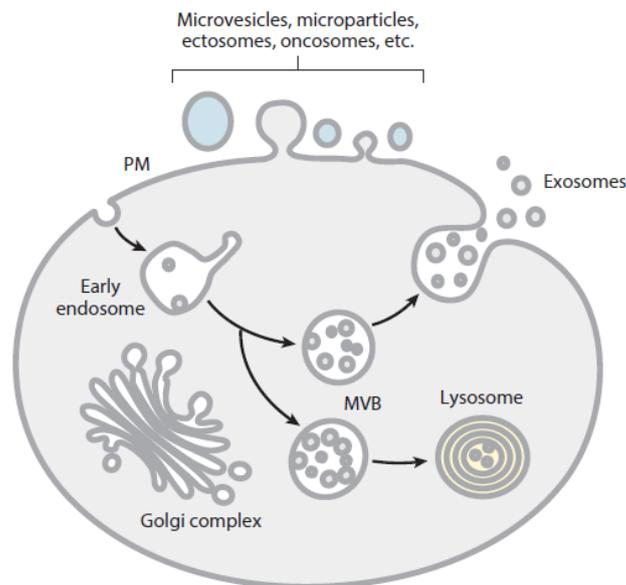


Figura 6: Representación esquemática de las diferentes vesículas producidas por las células eucariotas (Colombo, et al. 2014).

Los ectosomas son vesículas de entre 100-500nm de diámetro liberadas desde la membrana plasmática y por lo tanto poseen parte de la estructura y los componentes de la región de donde provienen, y no se han de confundir con los exosomas, siendo estas pequeñas vesículas, de entre

40-100nm de diámetro, liberadas vía exocitosis a través de la formación de cuerpos multivesiculares (Shifrin, et al. 2013).

La producción de ectosomas y exosomas se ha visto relacionada con las proteínas transmembranales de la familia de las anoctaminas (TMEM16/ANO); aunque originalmente estas proteínas se relacionaron con canales de transporte iónicos de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺ (como es el caso de la TMEM16A/ANO1 y la TMEM16B/ANO2), se descubrió que muchas de ellas eran escramblasas, proteínas con capacidad de translocación de fosfolípidos de la membrana celular (Whitlock y Hartzell, 2017). Recientemente, se comprobó que específicamente la TMEM16F/ANO6 (escramblasa dependiente de Ca²⁺) tiene un papel clave en la reparación de la membrana celular ante toxinas formadores de poros; escramblasa que debido al flujo de Ca²⁺ que suelen provocar estos agentes, se activa y provoca la secreción de vesículas extracelulares (Wu, et al. 2020).

2. Objetivos

Hasta el momento no se ha publicado nada respecto a que la Etx pudiera provocar la acción de alguno de los mecanismos de reparación descritos anteriormente. Por ello, en el laboratorio comenzamos a investigar acerca de la posibilidad de que la Etx indujera la secreción de ectosomas como posible defensa celular ante su actividad citotóxica. Por otra parte, siendo la producción de ectosomas en eritrocitos y linfocitos humanos algo común, decidimos probar esta hipótesis sobre la sangre humana, aislando y purificando estos dos componentes celulares.

A través de la producción de la toxina Épsilon recombinante y de la técnica de análisis de proteínas por Western Blot, se pretende conseguir los siguientes objetivos:

- **Comprobar si la Etx activa el mecanismo celular de secreción de ectosomas en eritrocitos y linfocitos humanos.**

La identificación y presencia de la Flotilina 1, una proteína utilizada como marcador para caracterizar ectosomas (Kowal, et al. 2016), nos confirmará si existe producción y secreción de ectosomas en eritrocitos y linfocitos humanos.

- **Identificar la presencia de la proteína MAL en las células y los ectosomas de los eritrocitos y linfocitos de la sangre humana.**

Los ectosomas, al contener parte de la región de la membrana celular de donde proceden, podrían contener la proteína intermembranal MAL, la cual se ha demostrado esencial en la interacción y citotoxicidad de la Etx.

- **Identificar la presencia de las proteínas TMEM16A/ANO1 y TMEM16F/ANO6 en las células y los ectosomas de los eritrocitos y linfocitos de la sangre humana.**

La TMEM16A/ANO1 y TMEM16F/ANO6 son proteínas transmembranales dependientes de Ca^{2+} para realizar sus funciones principales, respectivamente, el transporte de iones de Cl^- y la translocación de fosfolípidos membranales (Whitlock y Hartzell, 2017). Se conoce que la Etx produce un incremento interno tanto de Cl^- como de Ca^{2+} en las células diana (Petit, et al. 2001), por ello, hemos hipotetizado que la TMEM16A/ANO1 y TMEM16F/ANO6 podrían intervenir en la formación y secreción de los ectosomas durante la actividad tóxica, además de posiblemente estar presentes en ellos al encontrarse en la membrana plasmática.

3. Materiales y métodos

Los protocolos utilizados para este apartado se encuentran en el Anexo.

3.1 Expresión y obtención de la proteína recombinante pEtx

A partir de plásmidos construidos previamente (Soler-Jover, et al. 2007) que contenían cDNA de la pEtx, se clonó el cDNA en un vector de expresión pET22b transformado en *E. Coli* para poder producir la protoxina con una cola de 6 histidinas en el extremo C terminal. Las *E. Coli* recombinantes se inocularon en un cultivo bacteriano de 3ml de LB (10% triptona, 5% extracto de levadura y 10% NaCl a pH 7), suplementado con ampicilina 50ug/ml para la selección bacteriana recombinante. El cultivo se dejó toda la noche con agitación constante a 220rpm y 37°C.

Al día siguiente, todo el contenido se inocula en un matraz Erlenmeyer con 250ml de medio LB suplementado con 50ug/ml de ampicilina. El cultivo bacteriano inoculado se incubó con agitación constante a 220rpm y 37°C durante 3 horas. Pasado este tiempo, el cultivo debería encontrarse en fase exponencial de crecimiento con una densidad óptica a 600nm entre 0,6 y 0,9, punto óptimo para inducir la expresión de la proteína, que se realizó añadiendo 1mM de isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG). A continuación, se dejó el cultivo toda la noche en agitación constante a 220rpm y temperatura ambiente.

A la mañana siguiente, el cultivo se centrifugó a 5.000xg durante 15 minutos a 4°C con el objetivo de concentrar las bacterias en un pellet. Este pellet se resuspendió en 20ml de tampón fosfato (20mM PB, 250mM NaCl a pH 7,4) para su sonicación posterior. Se volvió a centrifugar a 12.000xg y 4°C durante 20 minutos, con la finalidad de separar los restos celulares (en el pellet) de la proteína deseada (en el sobrenadante), para poder ser separada por cromatografía de afinidad. Esta técnica se basa en la unión reversible entre la proteína deseada y un ligando específico.

Para realizar esta técnica, se utilizó como ligando una resina cargada con cobalto de la marca comercial TALON® (Metal Affinity Resin, Clontech), el cual posee una afinidad con la cola de 6 histidinas de nuestra proteína. Se prepararon diversas columnas a 4°C con 750ul de la resina cada una, y se equilibraron pasando por ellas tampón fosfato. A continuación, se fue pasando el sobrenadante por las columnas varias veces para retener la proteína deseada en ellas y luego se realizaron 3 lavados con 7,5ml del tampón fosfato (10 veces el volumen de la resina utilizada). El paso final fue la elución de la proteína, que se realizó con 3 ml de tampón fosfato suplementado con 250mM de imidazol, recogiendo la elución. Esta elución se dializó, con el objetivo de eliminar el imidazol, con un kit de la marca comercial Generon (Maxi GeBaFlex-tube Dialysis Kit 15pc) y PBS durante toda la noche con agitación suave a 4°C.

Finalmente, se cuantificó la proteína por el método Bradford (Bradford, 1976) mediante una recta patrón con BSA para luego conservarla a -80°C para su posterior uso.

3.2 Obtención de la Etx activa

La pEtx se activó mediante la incubación durante 1 hora a 37°C con agitación constante y 0,2U/ml de tripsina (Sigma-Aldrich), con el objetivo de realizar los cortes proteolíticos necesarios en los extremos N y C terminal de la toxina.

Por último, se cuantificó la Etx por el método Bradford (Bradford, 1976) mediante una recta patrón con BSA para su posterior almacenamiento a -80°C.

3.3 Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE) de la pEtx y Etx

Con el objetivo de comprobar el estado de la proteína y comprobar que la enzima tripsina había actuado correctamente, se analizaron 2ug de cada muestra, pEtx y Etx, previamente preparado con tampón de muestras (187,5mM de Tris a pH 6,8, 10% de SDS, 10% de glicerol y 0,006g de azul de bromofenol en agua desionizada) con un 10% de β -mercaptoethanol, y se hirvió durante 5 minutos a 100°C. El gel utilizado fue uno comercial de Bio-Rad al 12% de acrilamida (Mini-PROTEAN® TGX™ Gels), y se dejó correr con tampón de electrodos (0,19M de glicina, 0,25M de Tris a pH 8,3 y 0,1% de SDS m/v en agua desionizada) a 200V (PowerPac™ power supply, Bio-Rad) durante 1 hora. A continuación, el gel se fijó con tampón de fijación (25% de isopropanol v/v y 10% de ácido acético v/v en agua desionizada) durante 10 minutos, y se lavó el gel dos veces con agua desionizada durante 5 minutos cada lavado. Finalmente, se tiñó el gel con una solución de Coomassie Brilliant Blue G250 (10% de ácido ortofosfórico v/v, 10% de sulfato de amonio m/v, 0,12% de Coomassie Brilliant Blue G250 m/v y un 20% de metanol v/v en agua desionizada).

3.4 Cultivo y crecimiento de las líneas celulares MDCK y MOLT-4

La línea celular “Madin-Darby canine kidney” (MDCK) se obtuvo de la “American Type Culture Collection” (ATCC - CCL-34), y se usaron como control positivo ya que esta línea es el modelo in vitro más común y sensitivo a la Etx.

La línea celular MOLT-4, procedente de una leucemia linfoblástica T aguda humana (número de catálogo 85011413; ECACC), se utilizó para la obtención de ectosomas procedentes de linfocitos T ya que expresan la proteína MAL.

La línea celular MDCK se mantuvo en medio DMEM-F12 (“Dulbecco modified Eagle Medium–F12 medium containing 15 mM HEPES and 2.5 mM L-glutamine”; GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Biological Industries) y 1% de penicilina/ estreptomycin (P/S; Sigma-Aldrich) a 37°C y una atmosfera con 5% de CO₂.

La línea celular MOLT-4 se mantuvo en medio RPMI (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Biological Industries) a 37°C y una atmosfera con 5% de CO₂.

3.5 Obtención de linfocitos y eritrocitos a partir de muestras de sangre humana

Se extrajeron dos muestras de sangre de dos individuos sanos de ambos sexos (I1 y I2) en dos tubos con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para evitar su coagulación. Para la obtención posterior de ectosomas, las fracciones de linfocitos y eritrocitos se obtuvieron utilizando el

método de separación celular Histopaque® (Sigma-Aldrich), siguiendo el protocolo del fabricante.

Para comenzar, se añadió 3ml de Histopaque (Sigma-Aldrich) y 3ml de sangre en un tubo de centrifuga cónico de 15ml y se centrifugó a 400xg durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró con cuidado la capa superior con una pipeta Pasteur y se descartó, dejando intacta la capa blanquecina correspondiente a linfocitos y la capa más oscura que contiene los eritrocitos. La capa de linfocitos se añadió a un tubo limpio, el cual se lavó con 10ml de medio RPMI (GIBCO) y se centrifugó a 250xg durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5ml de medio RPMI (GIBCO), para centrifugarlo de nuevo a 250xg durante 10 minutos; proceso que se repitió de nuevo para finalmente resuspender el pellet final en 0,5ml de medio RPMI (GIBCO). De la misma manera, la capa de eritrocitos se lavó con RPMI el mismo número de veces y se resuspendió en 5ml de RPMI. Para realizar los experimentos, se resuspendieron los eritrocitos en 10ml de RPMI y los linfocitos en 5ml de RPMI.

3.6 Obtención y purificación de ectosomas

El siguiente procedimiento se llevó a cabo para la línea celular MDCK, la línea celular MOLT-4, las dos muestras de sangre, las dos muestras de eritrocitos y las dos muestras de linfocitos de los dos individuos sanos (I1 y I2). Se incubaron las muestras con 50nM de Etx durante 60 minutos a 37°C para la obtención de ectosomas. Como control negativo se incubaron las muestras con 50nM de pEtx en las mismas condiciones, ya que no produce actividad tóxica.

Las células MDCK son adherentes, y se cultivaron en placas de Petri para su posterior uso. Se usaron dos placas de células, una para cada condición (Etx o pEtx). Las células se incubaron con 50nM de Etx y como control negativo se incubaron con 50nM de pEtx en las mismas condiciones que se han explicado anteriormente. A continuación, se aspiró el sobrenadante de cada placa y se centrifugó cada muestra a 4.000xg durante 10 minutos a 4°C, descartando el pellet y conservando el sobrenadante final, donde se encontrarían los ectosomas sin purificar.

La línea celular MOLT-4 crece en suspensión en frascos de cultivo de 10 ml. De la misma manera que se ha explicado anteriormente, se utilizó un frasco para cada condición, incubándose la Etx o pEtx a 50 nM, por un tiempo de 30 y 60 minutos a 37°C. El medio resultante se centrifugó a 4.000xg durante 10 minutos a 4°C, descartando el pellet y conservando el sobrenadante, donde se encontrarían los ectosomas sin purificar.

De las muestras de sangre total, linfocitos y eritrocitos de los individuos sanos (I1 y I2), se extrajo 750ul a un eppendorf con pEtx a 50nM (se utilizaría de control al no ser activa esta toxina), y por otra parte, 750ul a otro eppendorf con Etx a 50nM para producir la actividad citotóxica. Ambos se incubaron 60 minutos a 37°C. Después, cada muestra con pEtx y Etx se centrifugó a 4.000xg durante 10 minutos a 4°C, esta vez, conservando tanto el pellet (fracción celular), como el sobrenadante (fracción de ectosomas aún sin purificar). El pellet de la fracción celular se resuspendió en buffer de lisis RIPA (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10% SDS, 1% sodium deoxycholate), con el fin de lisar las células que pudieran quedar y liberar su contenido al medio para luego analizarlo a través de Western Blot.

A continuación, las muestras de sobrenadantes tanto de las células MDCK, MOLT-4 como la de los individuos sanos (I1 y I2) con los ectosomas sin purificar se centrifugaron a 140.000xg durante 45 minutos a 4°C, para después descartar el sobrenadante y conservar el pellet. El pellet se resuspendió en PBS frío y se volvió a centrifugar a 140.000xg durante 40 minutos a 4°C, y se descartó el sobrenadante, conservando finalmente el pellet en donde se encontrarían los ectosomas, resuspendiéndolo en 100ul de PBS (fracciones de ectosomas con pEtX y EtX de cada muestra).

Finalmente, se realizó una cuantificación de las fracciones de ectosomas por el método Bradford (Bradford, 1976) mediante una recta patrón con BSA. La fracción celular de las muestras de sangre, eritrocitos y linfocitos se cuantificó usando un kit de ensayo proteico Pierce BCA (Thermo Scientific).

3.7 Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot de las fracciones celulares y de ectosomas

Con el objetivo de comprobar la presencia de las proteínas de la Taula 2 en los ectosomas producidos por las líneas celulares y las muestras de sangre, linfocitos y eritrocitos, y en la fracción celular de las tres últimas, se analizaron cantidades determinadas de proteína según el resultado de la cuantificación de cada muestra (entre 5 y 10 ug), para luego ser identificadas a través de Western Blot.

Previamente, se prepararon con tampón de muestras (187,5mM de Tris a pH 6,8, 10% de SDS, 10% de glicerol y 0,006g de azul de bromofenol en agua desionizada) con un 10% de β -mercaptoethanol, y se hirvieron durante 5 minutos a 100°C. Se utilizaron geles comerciales de Bio-Rad al 12% de acrilamida (Mini-PROTEAN® TGX™ Gels) para las fracciones celulares, y se hicieron geles con mayor grosor (1,5mm), con la fase concentradora al 4% y la fase separadora al 12% de acrilamida, para las fracciones de ectosomas. Todos los geles se dejaron correr con tampón de electrodos (0,19M de glicina, 0,25M de Tris a pH 8,3 y 0,1% de SDS m/v en agua desionizada) a 200V (PowerPac™ power supply, Bio-Rad) durante 1 hora.

A continuación, se realizaron las transferencias de proteínas a una membrana de nitrocelulosa con un kit comercial de transferencia (Trans-Blot Turbo Midi 0.2 μ m Nitrocellulose Transfer Packs; Bio-Rad) y se colocó en el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) hasta que se completó el programa, aproximadamente 10 minutos. Una vez obtenidas las membranas de nitrocelulosa con las proteínas, se realizó una tinción de Ponceau (Rojo Punzó) para comprobar que se había realizado correctamente la transferencia, luego se lavaron con agua corriente para eliminar el tinte sobrante.

El siguiente proceso fue realizar los diversos Western Blot para cada membrana con el fin de detectar las proteínas a analizar (Antígeno, Taula 2). Primero, las membranas se bloquearon (bloqueo de las uniones proteicas inespecíficas) con una solución de bloqueo (5% de leche en polvo en TBST (100mM tris, 1,4M NaCl, 1% Tween-20 a pH 7,4)) durante 1 hora con agitación suave constante a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados (con agitación, 5 minutos de duración cada uno) por membrana en TBST y se incubaron con la dilución del anticuerpo primario correspondiente contra la proteína a identificar (Taula 2) en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C y agitación suave constante. A la mañana siguiente, se

realizaron 5 lavados con TBST y se incubaron de nuevo con la dilución del anticuerpo secundario correspondiente (Taula 2) durante 1 hora en agitación suave y constante a temperatura ambiente. Para finalizar, se volvieron a realizar 5 lavados y se revelaron por quimioluminiscencia con el reactivo Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate (Millipore), detectando la señal emitida en el sistema Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

Anticuerpo primario	Dilución anticuerpo primario	Antígeno	Marca Comercial	Anticuerpo secundario (Marca comercial)	Dilución anticuerpo secundario
α -MAL	1/300	MAL	Santa Cruz Biotechnology	α -mouse (Dako)	1/2000
α -pETX	1/1000	pEtx y Etx	Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular (UB)	α -rabbit (Dako)	1/2000
α -ANO1	1/1000	TMEM16A / ANO1	Santa Cruz SC-377115	α -mouse (Dako)	1/2000
α -ANO6	1/1000	TMEM16F / ANO6	Life ANO6 antibody	α -mouse (Dako)	1/2000
α -FLOT1	1/1000	Flotilina 1	BD 610820	α -mouse (Dako)	1/2000
α -ACTIN	1/1000	Actina	Abcam ab8227	α -mouse (Dako)	1/2000

Taula 2: Tabla con los antígenos y sus anticuerpos primarios y secundarios correspondientes, además de mostrar las diluciones utilizadas y la marca comercial respectiva.

Quiero destacar, que al querer comprobar tantos anticuerpos primarios para identificar múltiples proteínas, se reutilizaron algunas de las membranas de nitrocelulosa (en donde ya se había realizado un Western Blot previo) a través de un proceso de deshibridación, el cual las desgastó bastante, y se ve reflejado en algunas de las figuras de los resultados. Este proceso se realizó incubando las membranas en tampón de deshibridación (62,4mM Tris-HCl a pH6,8, 2% SDS y 100mM beta-mercaptoethanol) durante 45 minutos a 60°C. A continuación, se lavaron 6 veces con TBST, para finalmente volver a proceder con el proceso de Western Blot explicado anteriormente.

4. Resultados

En todos los resultados, las muestras con pEtx (marcadas en las figuras con “[pEtx]”) se utilizan como control negativo de la acción de la Etx, ya que en su forma de protoxina no se encuentra activa y no causa efectos en las células, mientras que las muestras con Etx (marcadas en las figuras con “[Etx]”) son aquellas que han sufrido la actividad tóxica de esta.

4.1 Secreción de ectosomas de la línea celular MDCK en presencia de la Etx

La línea celular MDCK se utilizó como modelo del experimento al ser un tipo celular muy sensible a la Etx, y se utilizaron previamente a los experimentos con muestras de sangre con el fin de comprobar si era posible la hipótesis de los ectosomas. El resultado final del Western Blot se muestra en la Figura 7 en donde podemos apreciar la protoxina Épsilon de 33kDa (pEtx, flecha azul); la Etx activa en monómero de 29 kDa (flecha amarilla), y en heptámero cuando forma el poro (oligomerización de 7 monómeros) de aproximadamente 200kDa (flecha roja); la flotilina 1 de 47 kDa (flecha blanca), la cual se ha utilizado como marcador positivo de ectosomas (Kowal, et al. 2016); y la actina como control de carga. El TMEM16A/ANO1 es una proteína transmembranal que posiblemente esté relacionada con la Etx y la secreción de ectosomas, pudiéndose encontrar en ellos; aunque no se observa en los resultados seguramente debido a que el anticuerpo primario utilizado es afín de la especie humana y no de la canina.

Pese a ello, la presencia de la banda de flotilina 1 (flecha blanca) en las células MDCK con Etx, pero no con pEtx, nos indica que la toxina posiblemente provoca la formación y secreción de ectosomas. Por otra parte, el procedimiento de purificación de ectosomas se ha llevado a cabo correctamente, al no haber ninguna banda de actina o flotilina 1 en las MDCK con pEtx. Aunque se observa algo de protoxina (flecha azul), seguramente se trate de restos que se encontraban en el medio extracelular, además, la banda de pEtx es significativamente más débil que la de la Etx monomérica.

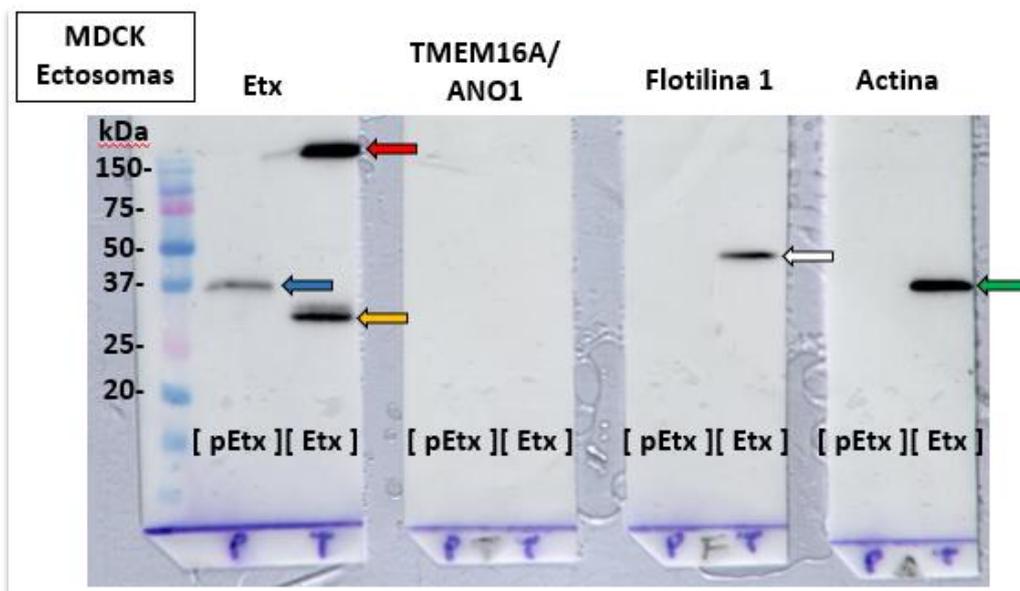


Figura 7: Western blot revelado con anti-Etx, anti-ANO1, anti-Flotilina 1 y anti-Actina de la fracción ectosomal de las células MDCK preincubadas con pEtx y Etx durante 60 minutos a 37°C.

4.2 Secreción de ectosomas de la línea celular MOLT-4 en presencia de la Etx

Una vez se comprobó que la Etx podía provocar la secreción de ectosomas, se realizó un procedimiento similar con línea celular MOLT-4, que al ser de una línea linfocitaria de procedencia humana, tendríamos más probabilidad de obtener resultados más acordes a nuestros objetivos, sobre todo con las proteínas TMEM16A/ANO1 y MAL, ambos anticuerpos primarios mucho más afines a muestras humanas según la marca comercial.

En la Figura 8 se puede observar la presencia de la pEtx de 33kDa (flecha azul) que correspondería con residuos que quedarían en el medio celular (a 30' pEtx), aunque por desgracia, no se observa la otra banda posiblemente debido a que no se cargó correctamente el pozo (60' pEtx). También se puede ver la Etx de 29kDa (flechas amarillas), además del heptámero de Etx que forma el poro de aproximadamente 200kDa (flechas rojas).

El TMEM16A/ANO1 es una proteína de 120kDa en monómero, y el doble en dímero como normalmente se encontraría en la membrana celular (Bill, et al. 2014). Se ha detectado una banda significativa de unos 80-90kDa (flecha blanca) en la membrana B, que en un principio no se correspondería con la información encontrada, pero la ficha técnica del anticuerpo comercial utilizado certifica que una banda de alrededor de 86kDa es positivo para la proteína TMEM16A/ANO1, por ello, consideramos la presencia de esta proteína en los ectosomas de la línea celular MOLT-4.

Por otra parte, se ha detectado exitosamente la proteína MAL y su correspondiente peso de aproximadamente 17kDa (flechas verdes), lo que podría indicar que la proteína MAL se encontraría en los ectosomas junto con la Etx.

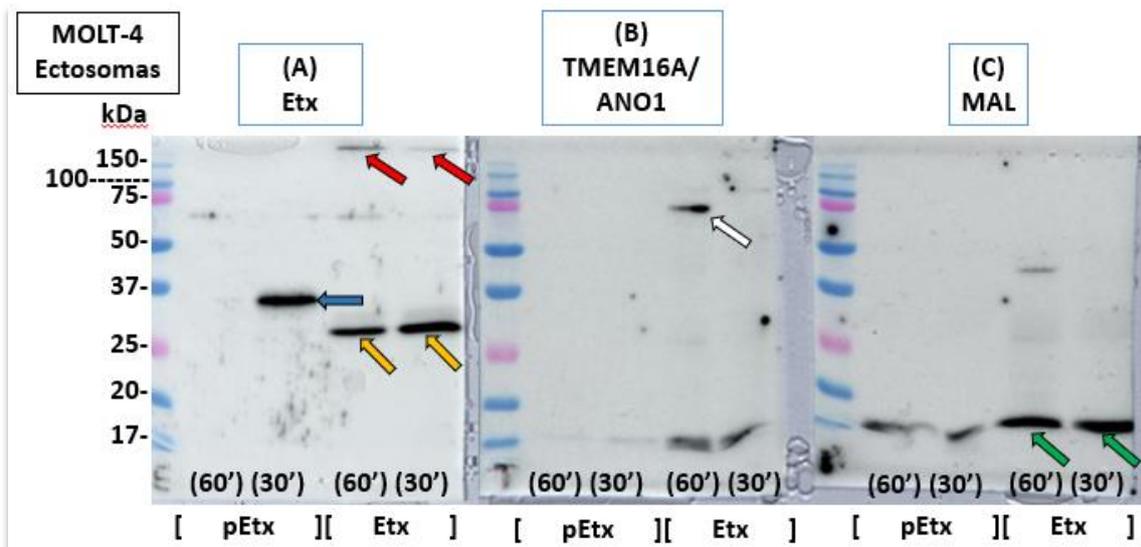


Figura 8: Western Blot de la fracción de ectosomas de la línea celular MOLT-4 incubada con pEtx y Etx, durante 30 minutos y 60 minutos. Los anticuerpos primarios utilizados fueron contra pEtx/Etx (A), TMEM16A/ANO1 (B) y MAL (C).

4.3 Secreción de ectosomas en muestras de sangre total, eritrocitos y linfocitos

4.3.1 Detección de la Etx en las muestras de sangre

Como podemos observar en la Figura 9, podemos verificar la presencia, tanto de la pEtx de 33kDa (flechas amarillas) como de la Etx de 29kDa (flechas rojas), en todas las muestras de la fracción celular de los individuos. Además, se puede ver que las bandas de la pEtx son más anchas que las de la Etx, lo que nos indica una mayor concentración que la toxina activada. Este resultado podría ser debido a que parte de la Etx se encuentra en los ectosomas, disminuyendo su concentración en las células.

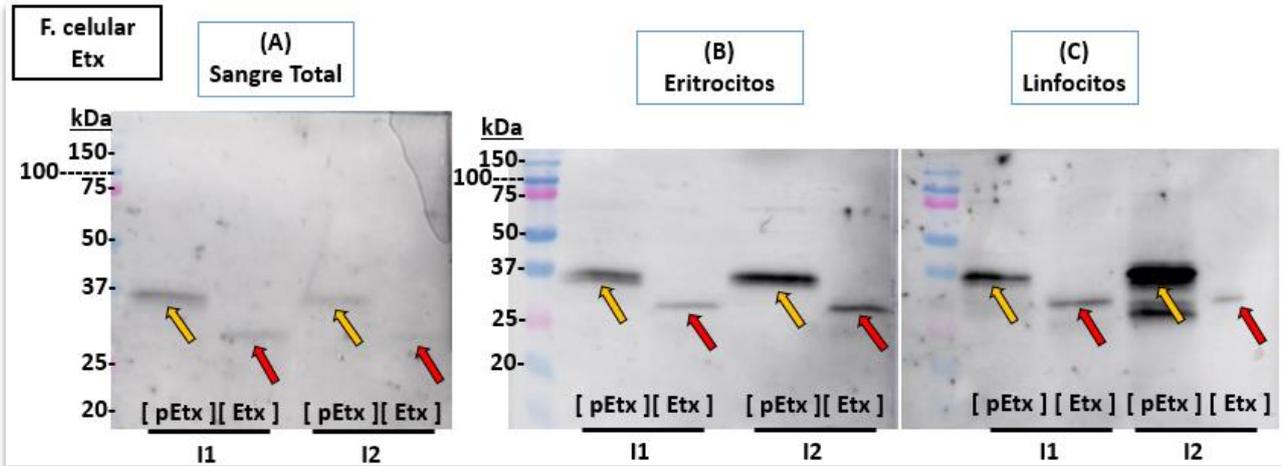


Figura 9: Western Blot de fracciones celulares incubadas con el anticuerpo primario contra pEtx/Etx, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx.

En la Figura 10 podemos observar la Etx de 29kDa (flechas rojas) claramente en las muestras de sangre total (A) y en los eritrocitos (B), al igual que en los linfocitos, pero con unas bandas mucho más claras. La pEtx de 33kDa (flechas amarillas) se puede observar pero con unas bandas muy difuminadas, indicando que hay presencia pero en mucha menor concentración que la Etx, sobre todo en los eritrocitos. Por otra parte, se puede apreciar ligeramente la oligomerización del poro (flechas verdes) en la sangre total (A) y los eritrocitos (B) pesando alrededor de 200kDa, lo que correspondería con el heptámero que forma, aunque en los linfocitos (C) no se aprecie posiblemente debido a que la imagen se encuentra recortada por la parte superior.

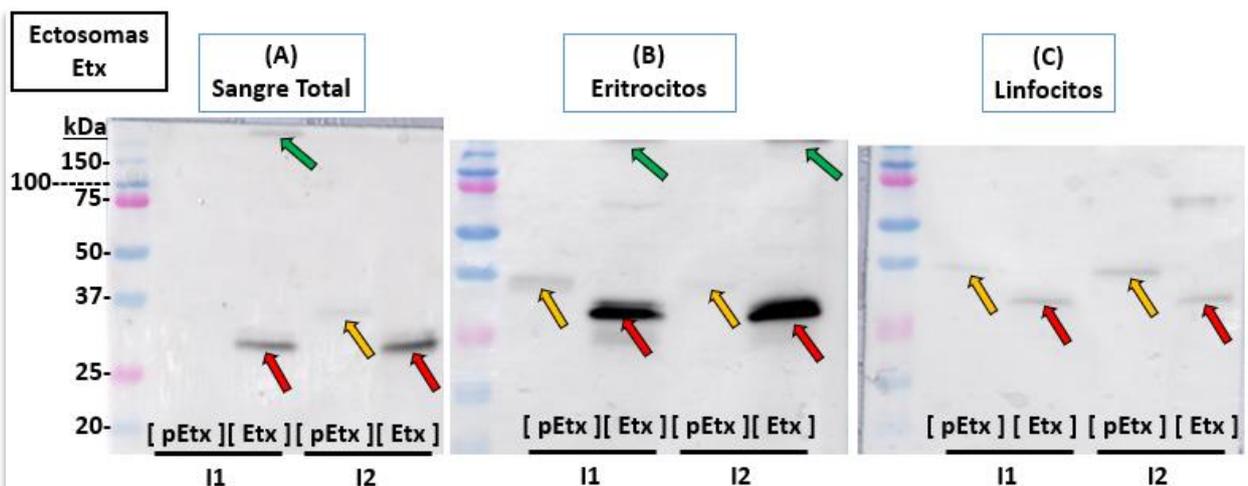


Figura 10: Western Blot de fracciones de ectosomas incubadas con el anticuerpo primario contra pEtx/Etx, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx.

4.3.2 Detección de la Flotilina 1 en las muestras de ectosomas de la sangre

Para verificar que se trataban de ectosomas, se realizó una deshíbrida de las membranas de los ectosomas del Western Blot previo con anti-pEtx, para ser reutilizado con los anticuerpos primarios contra la Flotilina 1, la proteína marcadora de ectosomas (Kowal, et al. 2016).

Como se puede observar en la Figura 11, hemos identificado con éxito la Flotilina 1 en todas las muestras (flechas rojas), aunque la membrana de los linfocitos (C), no se completó con éxito la deshíbrida. Debido a ello, vuelven a aparecer las bandas para la pEtx de 33kDa (flechas verdes) y Etx de 29kDa (flechas blancas) después del revelado, e incluso se pueden haber detectado oligomerizaciones de esta de 200kDa (flechas azules) que antes no se pudieron apreciar. Por desgracia, no hemos identificado la banda de 60-70kDa (flecha morada). Por otra parte, se observa la presencia de la flotilina 1 en los linfocitos con pEtx (flechas amarillas) pero no en los eritrocitos o en la sangre con pEtx. Esto se debe seguramente a que los linfocitos secretan ectosomas y exosomas para realizar diversas funciones como la regulación inmunológica (Colombo, et al. 2014), y por ello se identifica flotilina 1 en linfocitos sin la actividad tóxica de la Etx.

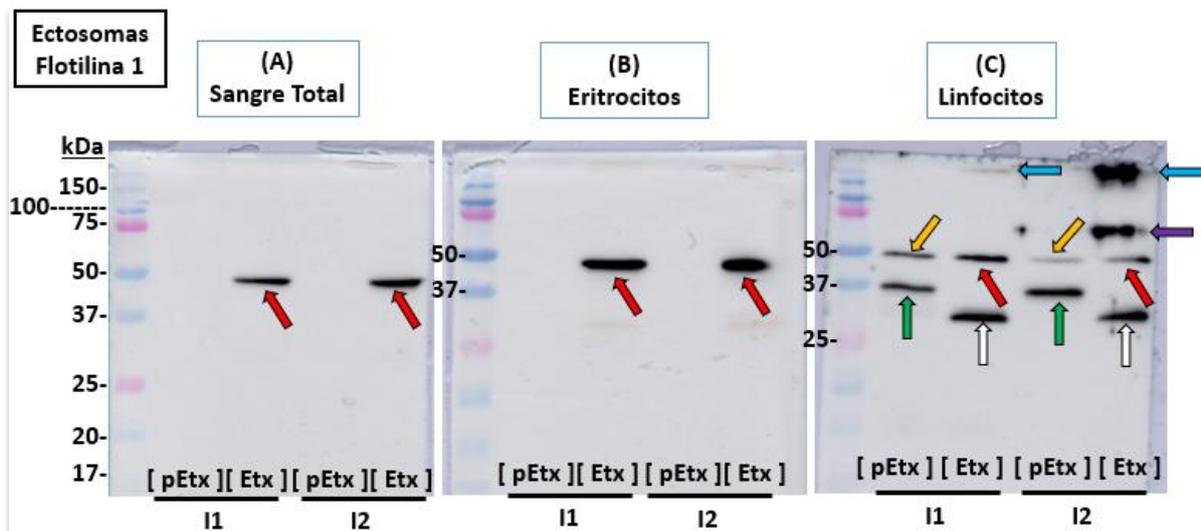


Figura 11: Western Blot de fracciones de ectosomas incubadas con el anticuerpo primario contra Flotilina 1, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx.

4.3.3 Detección de la proteína MAL en las muestras de sangre

La Figura 12 muestra la presencia de la proteína MAL (flechas rojas y amarillas) en solamente los eritrocitos (B) pero no en los linfocitos (C) ni en la sangre total (A), la cual debería contenerlo al incluir ambos tipos celulares, entre ellos los eritrocitos. Que no se vea en la sangre puede ser debido a un fallo durante el procedimiento, por ejemplo, que no se cargaran bien los pozos, no se incubara correctamente el anticuerpo primario o secundario, o porque la cantidad de proteína MAL esté por debajo del límite de detección.

Por otra parte, estos resultados nos llevan a pensar en que la concentración de MAL en la membrana celular de los linfocitos es mucho menor que en los eritrocitos o que simplemente su concentración en la sangre, y por tanto en la muestra de linfocitos, es bastante baja como para no ser detectada; aunque las investigaciones hasta el momento verifican que los linfocitos T en un principio si contendrían MAL (Blanch, et al. 2018), corroborado además en nuestro resultado anterior de la Figura 8 (flechas verdes), lo cual podría ser también un fallo en el procedimiento (como se ha comentado antes). Finalmente, vemos diferencias en el ancho de las bandas, siendo en los eritrocitos con pEtx (flechas rojas) más anchas que aquellos con Etx (flechas amarillas), indicando una mayor concentración en los eritrocitos con pEtx que con Etx. Esto podría deberse a que gran parte de la proteína MAL se ha ido a los ectosomas junto con la Etx.

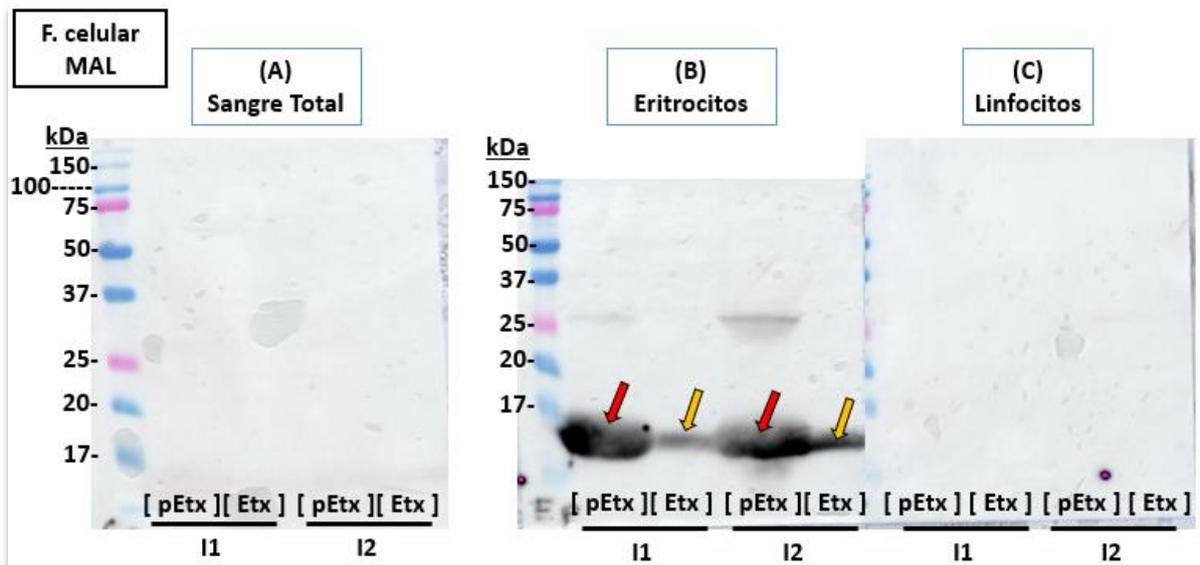


Figura 12: Western Blot de fracciones celulares incubadas con el anticuerpo primario contra MAL, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx.

En la Figura 13 podemos observar que se ha detectado proteína MAL en fracciones de ectosomas en un peso de aproximadamente 200kDa (flechas verdes), aunque también se puede ver unas bandas muy difuminadas que concordarían con los 17kDa (flechas blancas) de este. En los linfocitos no se aprecia ninguna banda. Este resultado nos lleva a la idea de que posiblemente la proteína MAL se encuentre en los 200kDa debido a que se encuentre unido al oligómero de la Etx, el cual pesa esta cifra.

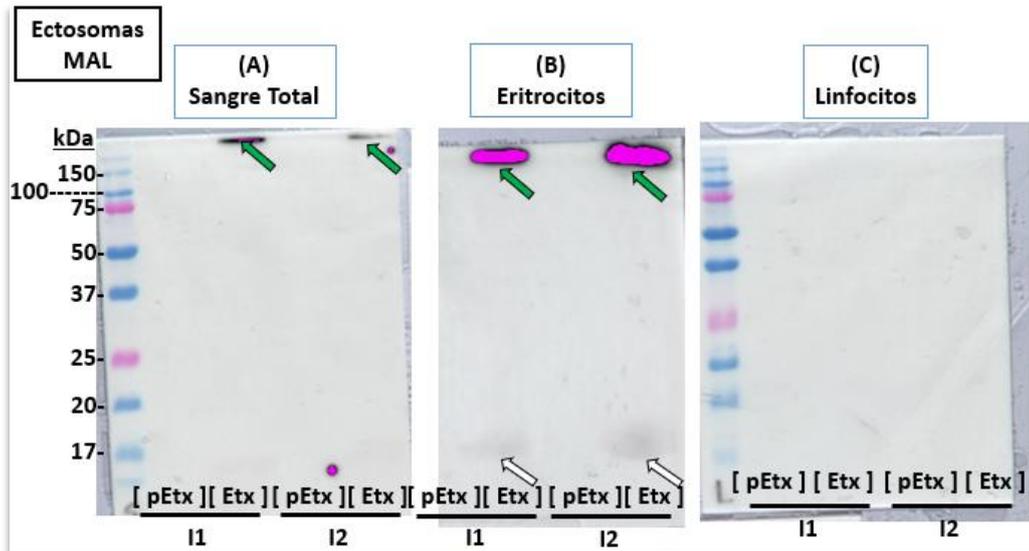


Figura 13: Western Blot de fracciones de ectosomas incubadas con el anticuerpo primario contra MAL, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx.

4.3.4 Detección del TMEM16A/ANO1 en las muestras de sangre

La Figura 14 muestra los resultados del Western Blot realizado con las fracciones celulares de las muestras. Por desgracia, a estas membranas se les realizó una deshibridación (antes se había realizado el Western Blot para la proteína MAL) y por ello se ven bastante desgastadas además de detectar de nuevo la proteína MAL de 17kDa (flechas blancas), lo que nos indica que el proceso de deshibridación no se completó correctamente. Aun así, podemos observar bandas entre 80-90kDa y otra entre 30-40kDa (flechas verdes) en los linfocitos (C), tanto con pEtx como con Etx. Este resultado es similar al obtenido con la línea celular MOLT-4 en cuanto a las bandas de 80-90kDa (B, Figura 8), confirmando la presencia de la TMEM16A/ANO1 (según la marca comercial del anticuerpo) en linfocitos pero no en los eritrocitos (B) ni en la sangre total (A). El hecho de que no se observe en la sangre total posiblemente sea debido a la poca concentración de linfocitos en ella y por lo tanto se encuentre por debajo del límite de detección del Western Blot.

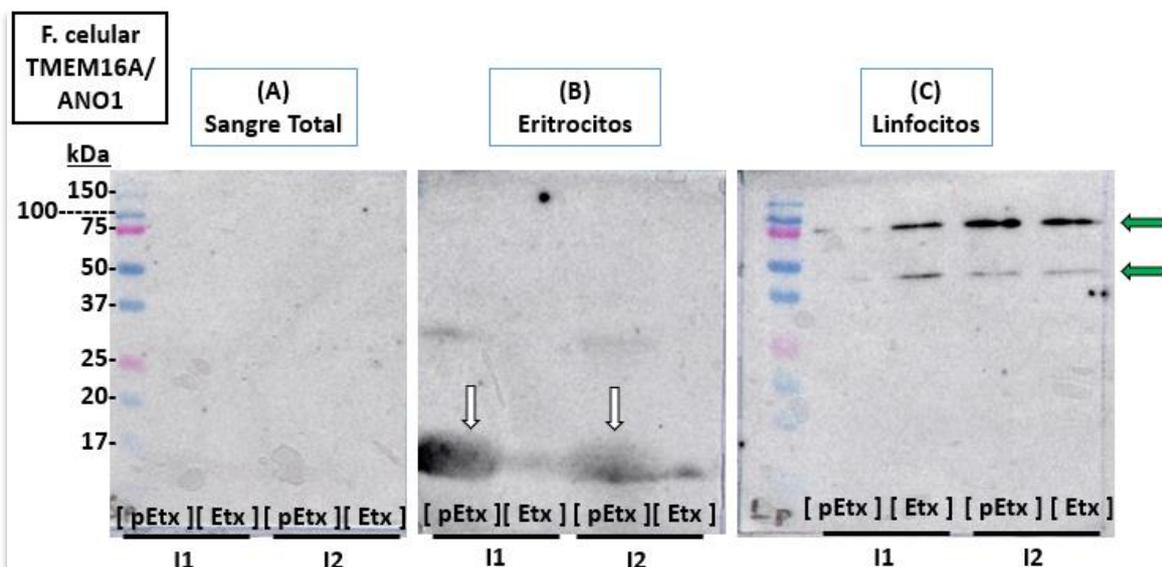


Figura 14: Western Blot de fracciones celulares incubadas con el anticuerpo primario contra TMEM16A/ANO1, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx.

En la Figura 15 (fracción de ectosomas), volvemos a ver de nuevo las marcas de la proteína MAL (flechas blancas) como en el Western Blot de las fracciones celulares. Además, se pueden observar dos bandas muy poco marcadas (flechas verdes) que nos indican muy poca presencia del TMEM16A/ANO1 en los linfocitos (C) del individuo 1 (I1), pero no del 2 (I2) ni en la sangre total, lo que podría suponer que muy poca cantidad se secreta junto los ectosomas. Este resultado nos indica que seguramente se encuentre casi por debajo del límite de detección del Western Blot y por ello no se observen bandas en el segundo individuo (I2), ni en la sangre total (A) en donde la concentración de linfocitos es aún menor.

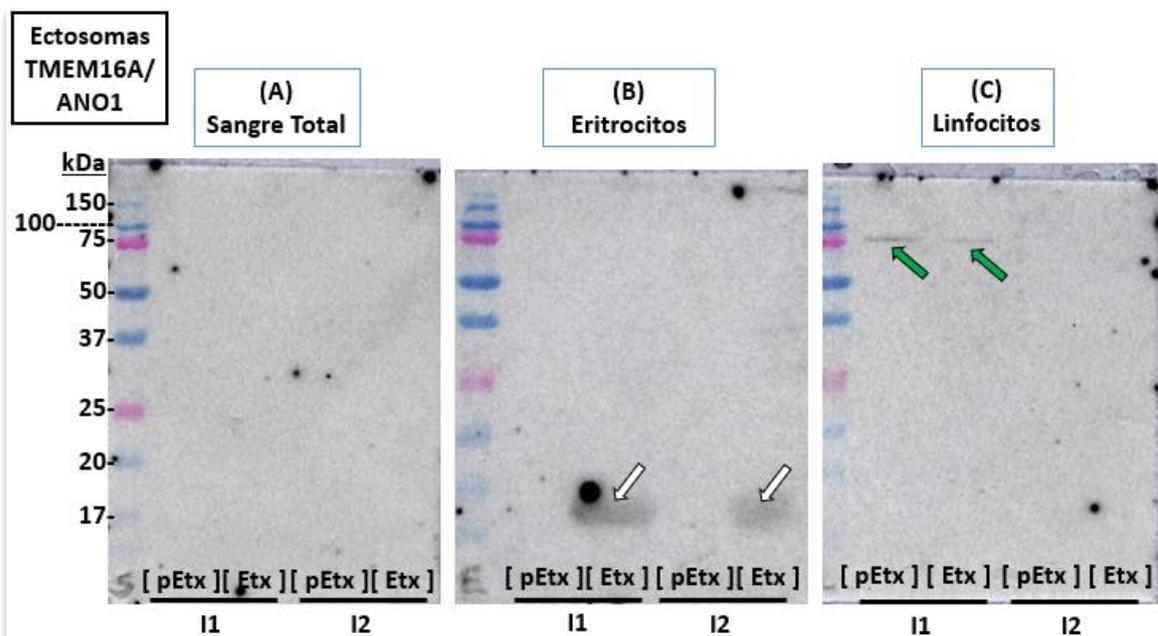


Figura 15: Western Blot de fracciones de ectosomas incubadas con el anticuerpo primario contra TMEM16A/ANO1, a partir de muestras de sangre total (A), eritrocitos (B) y linfocitos (C) de los individuos (I1 y I2), preincubados con pEtx y Etx.

4.3.5 Detección del TMEM16F/ANO6 en las muestras de sangre

El TMEM16F/ANO6 es una escramblasa de unos 106kDa dependiente de Ca^{2+} relacionada con la secreción de ectosomas (Whitlock y Hartzell, 2017), y conociendo que la Etx produce en la célula un incremento de este mismo ion (Petit, et al. 2001), podría verse activada por este proceso e intervenir en la secreción de ectosomas, además de poder encontrarse en ellos.

Exitosamente, conseguimos identificarla (Figura 16) en las muestras de ectosomas de los eritrocitos y de la sangre total con Etx (flechas rojas) de ambos individuos, pero no en los ectosomas de linfocitos con Etx. También se puede observar en la sangre y eritrocitos con pEtx de la fracción celular del individuo 2 (flechas amarillas), pero no en el individuo 1. Por otro lado, se observó una banda en los eritrocitos con Etx de la fracción celular del individuo 1 (flecha azul) que podría corresponder a algún resto de la TMEM16F/ANO6 encontrada en los ectosomas. Las bandas observadas se encuentran bastante dispersas en general, lo que podría indicar que algunas TMEM16F/ANO6 se podrían encontrar fragmentadas y detectarse en otros pesos

moleculares, posiblemente la banda en los linfocitos con pEtx de la fracción celular del individuo 1 (flecha blanca) corresponda a esta idea.

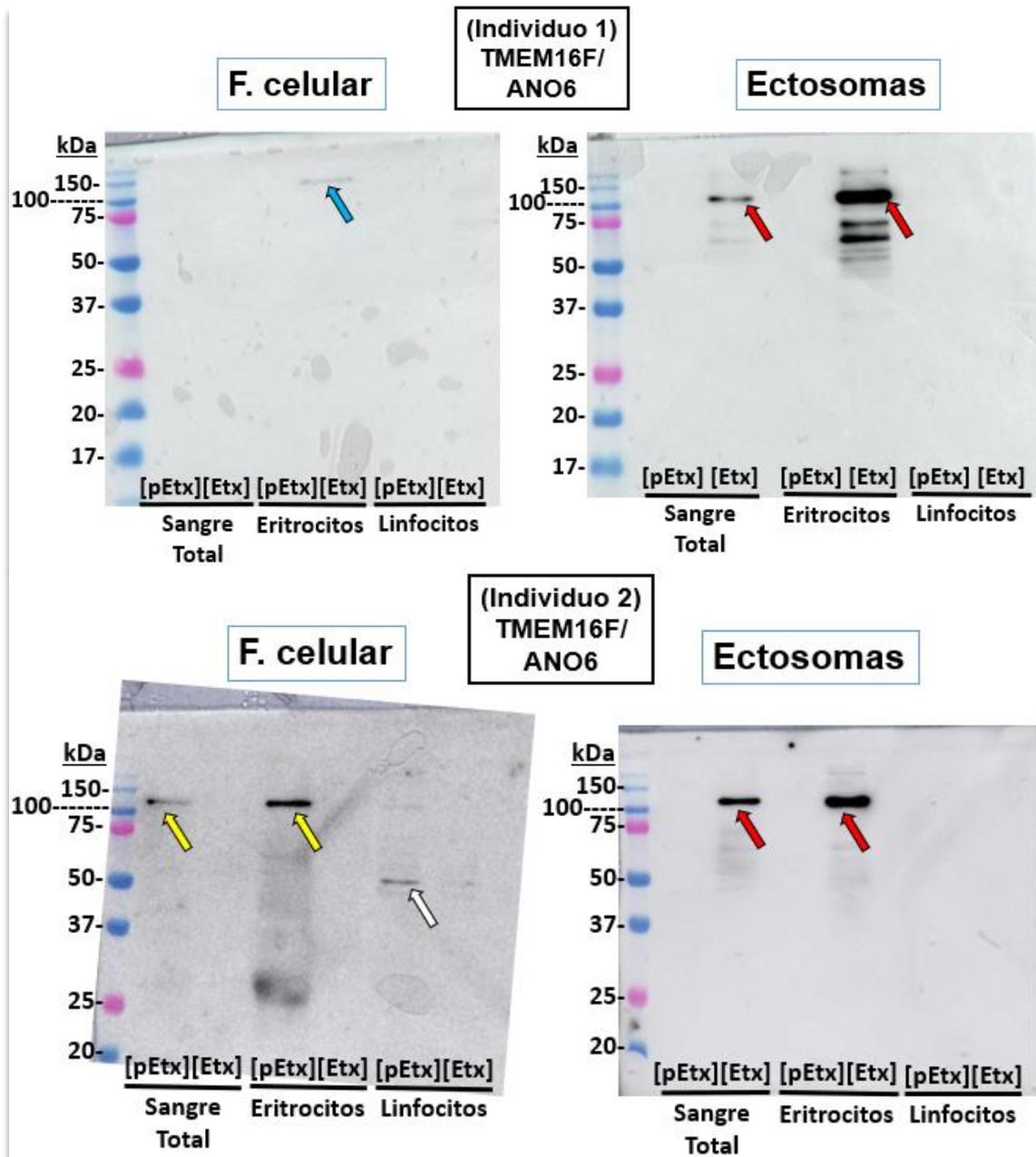


Figura 16: Western Blot de fracciones celulares y de ectosomas incubadas con el anticuerpo primario contra TMEM16F/ANO6, a partir de muestras de sangre total, eritrocitos y linfocitos de los individuos 1 y 2, preincubados con pEtx y Etx.

5. Discusión

Hasta el momento se conoce que determinadas células sanguíneas humanas pueden estar afectadas por la citotoxicidad de la Etx. Por una parte, se trata de los eritrocitos, a los cuales les induce un proceso denominado hemólisis (Gao, et al. 2018; Geng, et al. 2020). Por otra, la Etx afecta también a la población linfocitaria de la sangre, específicamente a los linfocitos T, provocando un efecto citotóxico y muerte celular (Blanch, et al. 2018). Estos descubrimientos tan recientes nos concedieron la oportunidad de utilizar muestras de sangre de dos individuos sanos para comprobar los efectos de la Etx sobre estas dos poblaciones de elementos sanguíneos, los cuales se separaron y aislaron previamente para realizar los correspondientes experimentos, obteniendo los resultados que se resumen en la Taula 3 (incluyendo los resultados de las líneas celulares MDCK y MOLT-4).

	Presencia de Ectosomas (Flotilina 1)		Identificación de la proteína MAL		Identificación del TMEM16A/ ANO1		Identificación del TMEM16F/ ANO6	
	CTL	Etx	Células	Ectosomas	Células	Ectosomas	Células	Ectosomas
Sangre	✗	✓	✗*	✓	✗*	✗*	✓	✓
Eritrocitos	✗	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓
Linfocitos	✓	✓	✗*	✗*	✓	✓	✗	✗
MDCK	✗	✓	--	--	--	✗	--	--
MOLT-4	--	--	--	✓	--	✓	--	--

Taula 3: Tabla con el resumen de los resultados, indicando la presencia (✓) o la ausencia (✗) de las proteínas estudiadas en las muestras. La ausencia con asterisco (✗*) indica del resultado que precisa confirmación y los guiones (--) que no hay datos.

Generalmente, cuando una toxina que forma poros en la membrana plasmática afecta a las células eucariotas, estas comienzan principalmente dos mecanismos de reparación para defenderse ante su efecto tóxico, siendo uno de ellos, el desprendimiento en forma de ectosomas de la región de la membrana que contiene la toxina (Babiychuk y Draeger, 2015). Siguiendo esta idea nos planteamos investigar si la Etx, al ser una toxina formadora de poros, tendría la capacidad de activar este mecanismo en los eritrocitos y linfocitos humanos. A través de la técnica Western Blot y de la identificación de la Flotilina 1, un marcador específico de ectosomas (Kowal, et al. 2016), exitosamente conseguimos comprobar la formación y secreción de ectosomas en presencia de la Etx (comprobado previamente en la línea MDCK), además de contener la toxina en ellos, aunque también detectamos ectosomas en los linfocitos incubados con pEtx sin actividad de la toxina (Taula 3), lo que atribuimos a que se debía a que este tipo de células utiliza también este mecanismo para otras funciones como la comunicación celular o la respuesta inmunológica (Shifrin, et al. 2013; Colombo, et al. 2014).

El hecho de que la Etx afectara tan específicamente a los eritrocitos y linfocitos (específicamente a los linfocitos T), entre la población tan diversa de la sangre humana, dio a entender que la toxina interactuaba concretamente con algún receptor de membrana que no contendrían las

demás células, y este es el caso de la proteína MAL, anteriormente planteada como esencial para la unión y posterior citotoxicidad de la Etx (Rumah, et al. 2015; Blanch, et al. 2018).

En los resultados obtenidos (Taula 3), vemos que los eritrocitos contienen la proteína MAL, lo que concuerda con los resultados recientes de Rumah y su equipo, en donde encuentran la isoforma C de la proteína MAL en estos (Rumah, et al. 2019), resultando además que los ectosomas, emitidos por este tipo celular, la contienen también. Curiosamente, detectamos también la proteína MAL en un peso aproximadamente 200kDA, siendo este peso molecular similar al del heptámero de la Etx (Robertson, et al. 2011), lo que nos hizo plantear que la proteína MAL podría quedarse unida al poro Etx, reforzando la hipótesis de que la proteína MAL podría ser el receptor de la Etx (Rumah, et al. 2015).

Blanch y su equipo en 2018 comprobaron que efectivamente se trataba de la proteína MAL la que participaba en la actividad tóxica de la Etx en los linfocitos T, al ver que solo afectaba a estos y no a los linfocitos B, que no la contenían (Blanch, et al. 2018). Por desgracia, en los resultados de nuestro experimento (Taula 3) no conseguimos identificar la proteína MAL en la población de linfocitos, lo que podría deberse a un error durante la incubación del anticuerpo en la membrana, durante la carga de la proteína en el gel de acrilamida, o que estuviera por debajo del límite de detección por Western Blot en una muestra heterogénea de linfocitos. Además, para reforzar esta teoría de fallo en la metodología, en el resultado del Western Blot de las MOLT-4 (línea celular de linfocitos T humanos; Taula 3), conseguimos identificar claramente la proteína MAL en los ectosomas de estos.

La TMEM16A/ANO1 y TMEM16F/ANO6, son proteínas transmembranales dependientes de Ca^{2+} para realizar sus funciones principales: el transporte de iones de Cl^- y la translocación de fosfolípidos membranales, respectivamente (Kunzelmann, et al. 2011). Conociendo que la Etx produce un incremento interno tanto de Cl^- como de Ca^{2+} en las células diana (Petit, et al. 2001), pensamos que habría una relación y posiblemente identificaríamos su presencia en las células y los ectosomas inducidos por la acción de la Etx. Por un lado, la presencia de la TMEM16A/ANO1 solo se ha confirmado en las muestras de linfocitos, tanto en las células como en los ectosomas, al igual que en la línea celular MOLT-4 (Taula 3); aunque actualmente no existe bibliografía en la que se confirme la presencia de esta proteína en linfocitos, por lo que sería interesante proseguir este estudio. Por otro lado, el TMEM16F/ANO6 solo se ha conseguido identificar en los eritrocitos, tanto en las fracciones celulares como en los ectosomas de estos, pero no en la población de linfocitos (Taula 3). Estos resultados están avalados por la identificación de la TMEM16F/ANO6 en eritrocitos con un papel en procesos de coagulación, aunque esta escramblasa también se detectó en una línea celular de linfocitos T humanos (Jurkat) durante su apoptosis (Pedemonte y Galletta, 2014), lo que implicaría que posiblemente poseyeran la proteína pero por algún motivo (seguramente debido a una baja concentración de linfocitos en las muestras) no se detectará. Además, la TMEM16F/ANO6 tiene un papel clave en la reparación de la membrana celular ante toxinas formadores de poros (Wu, et al. 2020), lo que supondría su presencia tanto en eritrocitos como linfocitos, y confirmaría la identificación de esta escramblasa en nuestros resultados de las muestras de eritrocitos.

A rasgos generales, no se obtuvo demasiados resultados positivos con la población de linfocitos (Taula 3) seguramente debido a la baja concentración de estos en la sangre (2×10^9 linfocitos B

por litro de sangre y 1×10^9 linfocitos T por litro de sangre), siendo menos del 1%, ante el 45% de los eritrocitos (5×10^{12} células/litro de sangre) y el 54% de plasma sanguíneo (Alberts, et al. 2002). Esto concordaría con la poca o nula detección de las proteínas estudiadas en la fracción linfocitaria, tanto en las células como en los ectosomas, teniendo en cuenta los estudios con líneas celulares de linfocitos T humanos en donde se han detectado e identificado algunas de ellas, como por ejemplo la proteína MAL (Blanch, et al. 2018).

Por otra parte, estudios recientes han demostrado los efectos tóxicos de la Etx sobre los eritrocitos humanos, llegando a provocar su hemólisis (Gao, et al. 2018; Geng, et al. 2020). Estos efectos incluso se han relacionado con ciertas anomalías en la sangre que ocurren durante la enfermedad de la Esclerosis Múltiple, hipotetizando que la Etx podría estar involucrada en la fragilidad observada en eritrocitos (Rumah, et al. 2019). Nuestros resultados con las muestras de eritrocitos humanos verifican esta actividad tóxica de la Etx (Tabla 3), además de plantear una relación entre la Etx y el desarrollo de enfermedades vinculadas con la secreción de ectosomas, como es el caso de la Esclerosis Múltiple (Carandini, et al. 2015; Šibíková, et al. 2018).

6. Conclusión

- La actividad tóxica de la Toxina Épsilon induce la producción y secreción de ectosomas en linfocitos y eritrocitos humanos, como posible estrategia de supervivencia.
- La proteína MAL se encuentra presente en los eritrocitos humanos y en los ectosomas inducidos por la citotoxicidad de la Etx.
- La proteína TMEM16A/ANO1 se encuentra presente en los linfocitos humanos y en los ectosomas inducidos por la Etx.
- La escramblasa TMEM16F/ANO6 se encuentra presente en los eritrocitos humanos y en los ectosomas inducidos por la Etx.

7. Perspectivas

Actualmente, la Toxina Épsilon plantea aún muchas incógnitas acerca de su mecanismo de acción y sus efectos citotóxicos sobre las células diana. En este apartado, se plantean algunos modelos e hipótesis relacionados con la Etx desde un punto de vista personal, con el objetivo de plantear ideas y crear un debate que pudiesen aportar una nueva perspectiva a los conceptos actuales o incluso desarrollar en futuras líneas de investigación.

La esclerosis múltiple (EM) se caracteriza por una desmielinización de las estructuras cerebrales, en donde se ha observado que los macrófagos contribuyen a la fagocitosis y eliminación de la mielina y los oligodendrocitos, contribuyendo además en la proliferación de la enfermedad a través de la presentación de antígenos, expresando MHC de clase II y moléculas estimuladoras de la respuesta inmunológica (CD83/CD40) (Raivich y Banati, 2004).

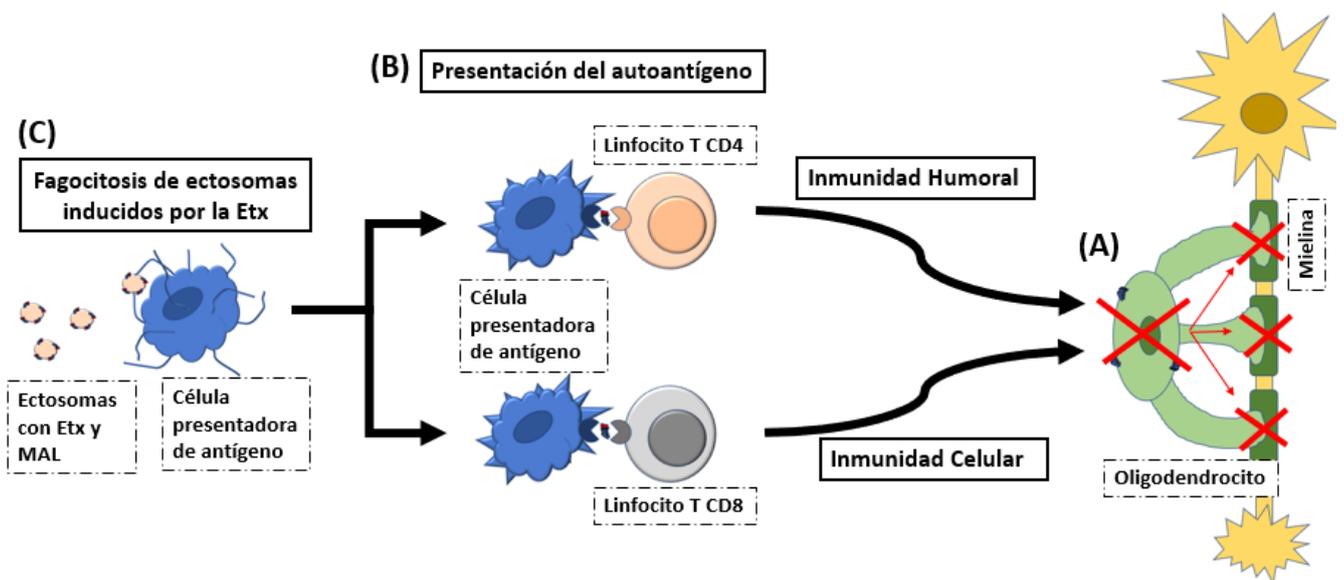


Figura 17: Representación de los posibles mecanismos inducidos por la Etx en el desarrollo de la Esclerosis Múltiple. La desmielinización de los axones se debe a la eliminación de los oligodendrocitos, ya sea, directamente al estar intoxicados (A), a través de la presentación de un autoantígeno (B) o a través de la fagocitosis de los ectosomas inducidos por la Etx (C).

Basándonos en la hipótesis de que la Etx podría ser un candidato posible como agente iniciador o agravador de la enfermedad de la Esclerosis Múltiple (Rumah, et al.2013), pensamos en mecanismos plausibles para ello. Por una parte, se ha demostrado que la Etx ya tiene de por sí como células diana los propios oligodendrocitos, siendo su función principal la mielinización de los axones (Wioland, et al. 2013), lo que podría ser la causa de la desmielinización en la enfermedad al ser eliminados (A, Figura 17). Por otra parte, posiblemente los macrófagos, al eliminar estas células intoxicadas o sus restos, pudieran realizar una presentación de antígeno propio (autoantígeno) y desencadenar en una respuesta autoinmune que la iniciara o la agravara (B, Figura 17).

De hecho, nuestra demostración de la producción de ectosomas en la sangre debido a la acción de la Etx sobre eritrocitos y linfocitos, también daría la oportunidad de que los macrófagos o las células dendríticas (ambas células presentadoras de antígeno), fagocitaran estos ectosomas con

la toxina, presentarán un antígeno que pudiera incluir un fragmento de la proteína MAL (reforzado por la posibilidad de que se encontrara unida al poro como planteamos en los resultados), y provocará una respuesta autoinmune sobre las células que poseyeran este receptor (C, Figura 17). Este sería el caso, por ejemplo, de las células epiteliales renales (Dorca-Arévalo, et al. 2012) o los oligodendrocitos (Wioland, et al. 2013), en este último, contribuyendo al desarrollo de la Esclerosis múltiple.

8. Bibliografía

- Adamson, R. H., Ly, J. C., Fernandez-Miyakawa, M., Ochi, S., Sakurai, J., Uzal, F., & Curry, F. E. (2005). Clostridium perfringens epsilon-toxin increases permeability of single perfused microvessels of rat mesentery. *Infection and Immunity*, 73(8), 4879–4887. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4879-4887.2005>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Table 22-1, Blood Cells. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science.
- Antón, O., Batista, A., Millán, J., Andrés-Delgado, L., en, R., Correas, I., & Alonso, M. A. (2008). An essential role for the MAL protein in targeting Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *The Journal of Cell Biology*, 183(6), i15–i15. <https://doi.org/10.1083/jcb1836oia15>
- Babiychuk, E. B., & Draeger, A. (2015). Defying death: Cellular survival strategies following plasmalemmal injury by bacterial toxins. *Seminars in cell & developmental biology*, 45, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.10.016>
- Bill, A., Hall, M. L., Borawski, J., Hodgson, C., Jenkins, J., Piechon, P., Popa, O., Rothwell, C., Tranter, P., Tria, S., Wagner, T., Whitehead, L., & Gaither, L. A. (2014). Small molecule-facilitated degradation of ANO1 protein: a new targeting approach for anticancer therapeutics. *The Journal of biological chemistry*, 289(16), 11029–11041. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.549188>
- Blanch, M., Dorca-Arévalo, J., Not, A., Cases, M., Gómez de Aranda, I., Martínez-Yélamos, A., Martínez-Yélamos, S., Solsona, C., & Blasi, J. (2018). The Cytotoxicity of Epsilon Toxin from Clostridium perfringens on Lymphocytes Is Mediated by MAL Protein Expression. *Molecular and Cellular Biology*, 38(19). <https://doi.org/10.1128/mcb.00086-18>
- Bokori-Brown, M., Savva, C. G., Fernandes Da Costa, S. P., Naylor, C. E., Basak, A. K., & Titball, R. W. (2011). Molecular basis of toxicity of Clostridium perfringens epsilon toxin. *FEBS Journal*, 278(23), 4589–4601. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08140.x>
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Carandini, T., Colombo, F., Finardi, A., Casella, G., Garzetti, L., Verderio, C., & Furlan, R. (2015). Microvesicles: What is the Role in Multiple Sclerosis?. *Frontiers in neurology*, 6, 111. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00111>
- Chassin, C., Bens, M., De Barry, J., Courjaret, R., Bossu, J. L., Cluzeaud, F., Ben Mkaddem, S., Gibert, M., Poulain, B., Popoff, M. R., & Vandewalle, A. (2007). Pore-forming epsilon toxin causes membrane permeabilization and rapid ATP depletion-mediated cell death in renal collecting duct cells. *American Journal of*

Physiology - Renal Physiology, 293(3).
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00199.2007>

- Cole, A. R., Gibert, M., Popoff, M., Moss, D. S., Titball, R. W., & Basak, A. K. (2004). Clostridium perfringens ϵ -toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(8), 797–798.
<https://doi.org/10.1038/nsmb804>
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Croese, T., & Furlan, R. (2018). Extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Molecular aspects of medicine*, 60, 52–61.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.006>
- Dorca-Arévalo, J., Martín-Satué, M., & Blasi, J. (2012). Characterization of the high affinity binding of epsilon toxin from Clostridium perfringens to the renal system. *Veterinary Microbiology*, 157(1–2), 179–189.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.020>
- Dorca-Arévalo, J., Soler-Jover, A., Gibert, M., Popoff, M. R., Martín-Satué, M., & Blasi, J. (2008). Binding of ϵ -toxin from Clostridium perfringens in the nervous system. *Veterinary Microbiology*, 131(1–2), 14–25.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.02.015>
- Fennessey, C. M., Sheng, J., Rubin, D. H., & McClain, M. S. (2012). Oligomerization of Clostridium perfringens Epsilon Toxin Is Dependent upon Caveolins 1 and 2. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046866>
- Fernandez Miyakawa, M. E., & Uzal, F. A. (2003). The early effects of Clostridium perfringens type D epsilon toxin in ligated intestinal loops of goats and sheep. *Veterinary research communications*, 27(3), 231–241.
<https://doi.org/10.1023/a:1023348708599>
- Florence, L. C. H., Hakim, S. L., Kamaluddin, M. A., & Thong, K. L. (2011). Determination of toxinotypes of environmental Clostridium perfringens by polymerase chain reaction. *Tropical Biomedicine*, 28(1), 171–174.
- Frank M. (2000). MAL, a proteolipid in glycosphingolipid enriched domains: functional implications in myelin and beyond. *Progress in neurobiology*, 60(6), 531–544.
[https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(99\)00039-8](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(99)00039-8)
- Gao, J., Xin, W., Huang, J., Ji, B., Gao, S., Chen, L., Kang, L., Yang, H., Shen, X., Zhao, B., & Wang, J. (2018). Research article Hemolysis in human erythrocytes by Clostridium perfringens epsilon toxin requires activation of P2 receptors. *Virulence*, 9(1), 1601–1614. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1528842>

- Geng, Z., Huang, J., Kang, L., Gao, S., Yuan, Y., Li, Y., Wang, J., Xin, W., & Wang, J. (2020). Clostridium perfringens epsilon toxin binds to erythrocyte MAL receptors and triggers phosphatidylserine exposure. *Journal of cellular and molecular medicine*, 10.1111/jcmm.15315. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15315>
- Hunter, S. E. C., Clarke, I. N., Kelly, D. C., & Titball, R. W. (1992). Cloning and nucleotide sequencing of the Clostridium perfringens epsilon- toxin gene and its expression in Escherichia coli. *Infection and Immunity*, 60(1), 102–110. <https://doi.org/10.1128/iai.60.1.102-110.1992>
- Iacovache, I., Dal Peraro, M., & Gisou van der Goot, F. (2015). Aerolysin and Related Aeromonas Toxins. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 773–793. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800188-2.00026-4>
- Ivie, S. E., Fennessey, C. M., Sheng, J., Rubin, D. H., & McClain, M. S. (2011). Gene-trap mutagenesis identifies mammalian genes contributing to intoxication by Clostridium perfringens ϵ -toxin. *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017787>
- Khalili, S., Jahangiri, A., Hashemi, Z. S., Khalesi, B., Mard-Soltani, M., & Amani, J. (2017). Structural pierce into molecular mechanism underlying Clostridium perfringens Epsilon toxin function. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 127, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.010>
- Kiu, R., & Hall, L. J. (2018). An update on the human and animal enteric pathogen Clostridium perfringens. *Emerging Microbes and Infections*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0144-8>
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., & Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(8), E968–E977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
- Kumar, A., Pillay, B., & Olaniran, A. O. (2015). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 31(8), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(89\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0168-1656(89)90046-1)
- Kunzelmann, K., Tian, Y., Martins, J. R., Faria, D., Kongsuphol, P., Ousingawat, J., Thevenod, F., Roussa, E., Rock, J., & Schreiber, R. (2011). Anoctamins. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 462(2), 195–208. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-0975-9>
- Lassmann H. (2018). Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(3), a028936. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028936>
- Linden, J. R., Flores, C., Schmidt, E. F., Uzal, F. A., Michel, A. O., Valenzuela, M., Dobrow, S., & Vartanian, T. (2019). Clostridium perfringens epsilon toxin induces

blood brain barrier permeability via caveolae-dependent transcytosis and requires expression of MAL. *PLoS pathogens*, 15(11), e1008014.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008014>

Linden, J. R., Ma, Y., Zhao, B., Harris, J. M., Rumah, K. R., Schaeren-Wiemers, N., & Vartanian, T. (2015). Clostridium perfringens epsilon toxin causes selective death of mature oligodendrocytes and central nervous system demyelination. *MBio*, 6(3).
<https://doi.org/10.1128/mBio.02513-14>

Lonchamp, E., Dupont, J. L., Wioland, L., Courjaret, R., Mbebi-Liegeois, C., Jover, E., Doussau, F., Popoff, M. R., Bossu, J. L., de Barry, J., & Poulain, B. (2010). Clostridium perfringens epsilon toxin targets granule cells in the mouse cerebellum and stimulates glutamate release. *PLoS ONE*, 5(9), 1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013046>

Losada-Eaton, D. M., & Fernandez-Miyakawa, M. E. (2010). Clostridium perfringens epsilon toxin inhibits the gastrointestinal transit in mice. *Research in Veterinary Science*, 89(3), 404–408. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.04.006>

McIntire, J. J., Umetsu, S. E., Akbari, O., Potter, M., Kuchroo, V. K., Barsh, G. S., Freeman, G. J., Umetsu, D. T., & DeKruyff, R. H. (2001). Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nature Immunology*, 2(12), 1109–1116. <https://doi.org/10.1038/ni739>

Minami, J., Katayama, S., Matsushita, O., Matsushita, C., & Okabe, A. (1997). Lambda-toxin of Clostridium perfringens activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiology and Immunology*, 41(7), 527–535. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01888.x>

Miyakawa, M. E. F., & Uzal, F. A. (2003). The early effects of Clostridium perfringens type D epsilon toxin in ligated intestinal loops of goats and sheep. *Veterinary Research Communications*, 27(3), 231–241.
<https://doi.org/10.1023/A:1023348708599>

Navarro, M. A., McClane, B. A., & Uzal, F. A. (2018). Mechanisms of action and cell death associated with Clostridium perfringens toxins. *Toxins*, 10(5).
<https://doi.org/10.3390/toxins10050212>

Parton, R. G., & Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(3), 185–194. <https://doi.org/10.1038/nrm2122>

Pedemonte, N., & Galletta, L. J. (2014). Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). *Physiological reviews*, 94(2), 419–459.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2011>

Petit, L., Gibert, M., Gillet, D., Laurent-Winter, C., Boquet, P., & Popoff, M. R. (1997). Clostridium perfringens epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. *Journal of Bacteriology*, 179(20), 6480–6487.
<https://doi.org/10.1128/jb.179.20.6480-6487.1997>

- Petit, L., Maier, E., Gibert, M., Popoff, M. R., & Benz, R. (2001). Clostridium perfringens Epsilon Toxin Induces a Rapid Change of Cell Membrane Permeability to Ions and Forms Channels in Artificial Lipid Bilayers. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 15736–15740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010412200>
- Popoff, M. R. (2011). Epsilon toxin: A fascinating pore-forming toxin. *FEBS Journal*, 278(23), 4602–4615. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08145.x>
- Popoff, M. R. (2014). Clostridial pore-forming toxins: Powerful virulence factors. *Anaerobe*, 30, 220–238. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.014>
- Prineas, J. W., & Parratt, J. D. (2012). Oligodendrocytes and the early multiple sclerosis lesion. *Annals of neurology*, 72(1), 18–31. <https://doi.org/10.1002/ana.23634>
- Puertollano, R., & Alonso, M. A. (1999). MAL, an integral element of the apical sorting machinery, is an itinerant protein that cycles between the trans-Golgi network and the plasma membrane. *Molecular biology of the cell*, 10(10), 3435–3447. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.10.3435>
- Raivich, G., & Banati, R. (2004). Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain research. Brain research reviews*, 46(3), 261–281. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.06.006>
- Ramnarayanan, S. P., & Tuma, P. L. (2011). MAL, but not MAL2, expression promotes the formation of cholesterol-dependent membrane domains that recruit apical proteins. *The Biochemical journal*, 439(3), 497–504. <https://doi.org/10.1042/BJ20110803>
- Revitt-Mills, S. A., Rood, J. I., & Adams, V. (2015). Clostridium perfringens extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. *Microbiology Australia*, 36(3), 114. <https://doi.org/10.1071/ma15039>
- Robertson, S. L., Li, J., Uzal, F. A., & McClane, B. A. (2011). Evidence for a prepore stage in the action of clostridium perfringens epsilon toxin. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022053>
- Rood, J. I., Adams, V., Lacey, J., Lyras, D., McClane, B. A., Melville, S. B., Moore, R. J., Popoff, M. R., Sarker, M. R., Songer, J. G., Uzal, F. A., & Van Immerseel, F. (2018). Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme. *Anaerobe*, 53, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>
- Rumah, K. R., & Fischetti, V. A. (2019). Human blood exposure to Clostridium perfringens epsilon toxin may shed light on erythrocyte fragility during active multiple sclerosis. *bioRxiv*, 789123.
- Rumah, K. R., Linden, J., Fischetti, V. A., & Vartanian, T. (2013). Isolation of Clostridium perfringens Type B in an Individual at First Clinical Presentation of

Multiple Sclerosis Provides Clues for Environmental Triggers of the Disease. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076359>

- Rumah, K. R., Ma, Y., Linden, J. R., Oo, M. L., Anrather, J., Schaeren-Wiemers, N., Alonso, M. A., Fischetti, V. A., McClain, M. S., & Vartanian, T. (2015). The Myelin and Lymphocyte Protein MAL Is Required for Binding and Activity of *Clostridium perfringens* ϵ -Toxin. *PLoS Pathogens*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004896>
- Savva, C. G., Clark, A. R., Naylor, C. E., Popoff, M. R., Moss, D. S., Basak, A. K., Titball, R. W., & Bokori-Brown, M. (2019). The pore structure of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *Nature communications*, 10(1), 2641. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10645-8>
- Sayeed, S., Li, J., & McClane, B. A. (2007). Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates. *Infection and Immunity*, 75(5), 2391–2398. <https://doi.org/10.1128/IAI.02014-06>
- Sayeed, S., Li, J., & McClane, B. A. (2010). Characterization of virulence plasmid diversity among *Clostridium perfringens* type B isolates. *Infection and Immunity*, 78(1), 495–504. <https://doi.org/10.1128/IAI.00838-09>
- Schaeren-Wiemers, N., Bonnet, A., Erb, M., Erne, B., Bartsch, U., Kern, F., Mantei, N., Sherman, D., & Suter, U. (2004). The raft-associated protein MAL is required for maintenance of proper axon-glia interactions in the central nervous system. *Journal of Cell Biology*, 166(5), 731–742. <https://doi.org/10.1083/jcb.200406092>
- Shifrin, D. A., Jr, Demory Beckler, M., Coffey, R. J., & Tyska, M. J. (2013). Extracellular vesicles: communication, coercion, and conditioning. *Molecular biology of the cell*, 24(9), 1253–1259. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-08-0572>
- Šibíková, M., Živný, J., & Janota, J. (2018). Cell Membrane-Derived Microvesicles in Systemic Inflammatory Response. *Folia biologica*, 64(4), 113–124.
- Soler-Jover, A., Dorca, J., Popoff, M. R., Gibert, M., Saura, J., Tusell, J. M., Serratos, J., Blasi, J., & Martín-Satué, M. (2007). Distribution of *Clostridium perfringens* epsilon toxin in the brains of acutely intoxicated mice and its effect upon glial cells. *Toxicon*, 50(4), 530–540. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.04.025>
- Songer, J. G. (1996). Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 216–234. <https://doi.org/10.1128/cmr.9.2.216-234.1996>
- Stiles, B. G., Barth, G., Barth, H., & Popoff, M. R. (2013). *Clostridium perfringens* epsilon toxin: A malevolent molecule for animals and man? *Toxins*, 5(11), 2138–2160. <https://doi.org/10.3390/toxins5112138>
- Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B., & Ciccarelli, O. (2018). Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*, 391(10130), 1622–1636. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1)

- Universal Protein Resource (UniProt). “Myelin and Lymphocyte Protein.” *UniProt Consortium: European Bioinformatics Institute and SIB Swiss Institute of Bioinformatics*. www.uniprot.org/uniprot/I21145.
- Wagley, S., Bokori-Brown, M., Morcrette, H., Malaspina, A., D’Arcy, C., Gnanapavan, S., Lewis, N., Popoff, M. R., Raciborska, D., Nicholas, R., Turner, B., & Titball, R. W. (2019). Evidence of *Clostridium perfringens* epsilon toxin associated with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, *25*(5), 653–660. <https://doi.org/10.1177/1352458518767327>
- Welch, W. H. (1892). A gas-producing bacillus capable of rapid development in the blood vessels after death. *Bull Johns Hopkins Hosp*, *3*, 81. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10010189232/>
- Whitlock, J. M., & Hartzell, H. C. (2017). Anoctamins/TMEM16 Proteins: Chloride Channels Flirting with Lipids and Extracellular Vesicles. *Annual review of physiology*, *79*, 119–143. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034031>
- Wioland, L., Dupont, J. L., Bossu, J. L., Popoff, M. R., & Poulain, B. (2013). Attack of the nervous system by *clostridium perfringens* epsilon toxin: From disease to mode of action on neural cells. *Toxicon*, *75*, 122–135. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.04.003>
- Wioland, L., Dupont, J. L., Doussau, F., Gaillard, S., Heid, F., Isope, P., Pauillac, S., Popoff, M. R., Bossu, J. L., & Poulain, B. (2015). Epsilon toxin from *Clostridium perfringens* acts on oligodendrocytes without forming pores, and causes demyelination. *Cellular Microbiology*, *17*(3), 369–388. <https://doi.org/10.1111/cmi.12373>
- Wu, N., Cernysiov, V., Davidson, D., Song, H., Tang, J., Luo, S., Lu, Y., Qian, J., Gyurova, I. E., Waggoner, S. N., Trinh, V. Q., Cayrol, R., Sugiura, A., McBride, H. M., Daudelin, J. F., Labrecque, N., & Veillette, A. (2020). Critical Role of Lipid Scramblase TMEM16F in Phosphatidylserine Exposure and Repair of Plasma Membrane after Pore Formation. *Cell reports*, *30*(4), 1129–1140.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.066>

Anexo

En este apartado se adjuntan los protocolos realizados:

1. DESCONGELACIÓN DE LINEAS CELULARES

- 1.1. Extraer el tubo con la línea celular deseada del tanque de nitrógeno.
- 1.2. Colocar en el baño a 37°C durante 30s.
- 1.3. Homogenizar con ayuda de una pipeta.
- 1.4. Colocar 10ml de medio de cultivo deseado, precalentado, en una placa Petri de 10cm.
- 1.5. Añadir todo el contenido celular a la placa.
- 1.6. Incubar a 37°C, a 5% de CO₂.

2. AMPLIFICACIÓN DE LINEAS CELULARES

- 2.1. Aspiración del medio de la placa de cultivo.
- 2.2. Añadir, agitar suavemente y aspirar con PBS 1X (repetir 2 veces).
- 2.3. Añadir 1 ml de tripsina.
- 2.4. Incubar la placa durante 4-6min a 37°C, 5% CO₂.
- 2.5. Golpear suavemente la base de la placa y observar al microscopio que las células se han separado completamente de la base.
- 2.6. Añadir 2 ml de medio y recoger en un tubo falcon de 10ml.
- 2.7. Centrifugar 3min a 900rpm.
- 2.8. Desechar el sobrenadante y resuspender en 5ml de medio el pellet de células.
- 2.9. En nuevas placas de Petri de 10cm, rotular y añadir 9,5ml de medio.
- 2.10. Añadir 0,5ml del tubo con células a cada placa (Dilución 1/10).
- 2.11. Incubar las nuevas placas a 37°C, 5% CO₂.

3. CRIOPRESERVACIÓN DE LINEAS CELULARES

- 3.1. Aspiración del medio de la placa, añadir 1 mL de tripsina e incubar durante 5 minutos.
- 3.2. Añadir 5 ml de medio, pasar a un tubo falcon 10mL y centrifugar 3min a 900rpm.
- 3.3. Descartar sobrenadante y resuspender en 4,5mL de medio.
- 3.4. Añadir 0,5mL de DMSO (solución final al 10% de DMSO).
- 3.5. Repartir en eppendorfs de 1mL.
- 3.6. Envolver los eppendorfs en unas 20 capas de papel (esto proporciona que se congele lentamente) y colocar en un bote de plástico.
- 3.7. Congelar a -80°C durante un día.
- 3.8. Pasar a nitrógeno líquido a -120°C.

4. SEPARACIÓN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS CON HISTOPAQUE-1077 (Protocolo comercial)

- 4.1. A un tubo de centrífuga cónico de 15 ml, agregar 3 ml de Histopaque-1077 y llevar a temperatura ambiente.
- 4.2. Cuidadosamente colocar 3 ml de sangre completa en el Histopaque-1077.

- 4.3. Centrifugar a 400xg durante exactamente 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4.4. Después de la centrifugación, aspirar cuidadosamente la capa superior con una pipeta Pasteur hasta 0,5 cm de la interfaz opaca que contiene células mononucleares. Desechar la capa superior.
- 4.5. Transferir cuidadosamente la interfaz opaca con una pipeta Pasteur a un tubo de centrifuga cónico limpio.
- 4.6. Lavar las células agregando 10 ml de solución salina tamponada con fosfato isotónico o medio de cultivo celular apropiado y mezclar suavemente, extrayendo y sacando con una pipeta Pasteur.
- 4.7. Centrifugar a 250xg durante 10 minutos.
- 4.8. Aspirar el sobrenadante y descartar.
- 4.9. Resuspender el sedimento celular con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato isotónico o medio de cultivo celular apropiado y mezclar, extrayendo y sacando suavemente con una pipeta Pasteur.
- 4.10. Centrifugar a 250xg durante 10 minutos.
- 4.11. Repetir los pasos 8, 9 y 10, desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato isotónico o medio de cultivo celular apropiado.
- 4.12. Resultados: los eritrocitos y los granulocitos deben sedimentarse en el fondo del tubo de centrifuga. Los linfocitos deben encontrarse en la interfaz entre Histopaque-1077 y el plasma.

5. PRODUCCIÓN DE LA TOXINA ÉPSILON

- 5.1. *E. Coli* recombinante se encuentran en glicerol 50% para preservación.
- 5.2. Con una punta de una pipeta se pica la superficie y se introduce en un tubo con 3mL de LB y el antibiótico (Ampicilina) a 50 µg/ml correspondiente a la resistencia de nuestro vector.
- 5.3. Incubación toda la noche a 37°C con agitación constante a 220rpm.
- 5.4. El contenido se vierte en un Erlen Meyer con 250ml de LB y el antibiótico correspondiente a 50 µg/ml.
- 5.5. Incubación con agitación durante 3h a 37°C con agitación constante a 220rpm.
- 5.6. Inducción a 1mM de IPTG e incubación toda la noche a temperatura ambiente.
- 5.7. Traspaso a un tubo de centrifuga de 250ml y centrifugar 5000 x g durante 15min a 4°C.
- 5.8. Desechar sobrenadante y resuspender en 25mL (1/10 parte del volumen inicial) de tampón fosfato (20mM PB con NaCl 250mM a pH 7,4).
- 5.9. Congelación a -20°C hasta su uso.

6. PURIFICACIÓN DE LA TOXINA ÉPSILON SIN ACTIVAR (PROTOXINA)

- 6.1. Descongelación y centrifugación a 12.000 x g durante 20min a 4°C.
- 6.2. Descartar pellet.
- 6.3. Preparación de columna con 750 µl de resina cargada (Metal Affinity Resin, Clontech; TALON), y pasar 4 veces con tampón fosfato (20mM PB con NaCl 250mM a pH 7,4).

- 6.4. Añadir el sobrenadante a la columna y pasar 4 veces.
- 6.5. Descartar la elución final.
- 6.6. Lavar con 7,5ml de tampón fosfato, 3 veces (10 veces el volumen de la resina cargada).
- 6.7. Añadir trombina 3 ml de tampón fosfato suplementado con 250mM de imidazol.
- 6.8. Recoger la elución final.
- 6.9. Dializar con el kit comercial (Maxi GeBaFlex-tube – Dialysis Kit; Generon) y PBS durante toda la noche con agitación suave a 4°C.
- 6.10. Congelar a -20°C para su posterior uso.

7. OBTENCIÓN DE LA TOXINA ÉPSILO ACTIVA

- 7.1. Añadir 0,2U/ml de tripsina.
- 7.2. Incubar durante 1 hora a 37°C con agitación constante.
- 7.3. Congelar a -20°C para su posterior uso.

8. EXPERIMENTO CON Etx EN LAS LINEAS CELULARES (SEPARACIÓN DE ECTOSOMAS)

- 8.1. 6 placas en total: 2 CTL sin toxina (20min y 60min), 2 con protoxina (PEtx) (20min y 60min), y 2 con toxina activada (Etx) (20min y 60min).
- 8.2. Aspirar medio de las placas y lavar con 10ml de PBS 1x.
- 8.3. Añadir 10ml de medio.
- 8.4. Incubar en tiempo creciente (20min y 60min).
- 8.5. Recoger sobrenadantes en 6 tubos 10ml para centrifuga.
- 8.6. Centrifugar a 4.000 x g durante 10min a 4°C.
- 8.7. Descartar pellet.
- 8.8. Centrifugar a 140.000 x g durante 45min a 4°C.
- 8.9. Descartar el sobrenadante.
- 8.10. Resuspender en 10ml de PBS 1x frío (Lavado).
- 8.11. Centrifugar de nuevo a 140.000 x g durante 40min a 4°C.
- 8.12. Descartar sobrenadante y quedarse con el pellet (donde se encuentran los ectosomas).
- 8.13. Congelación de pellet con ectosomas a -20°C para posterior uso.

9. CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR BRADFORD

- 9.1. Resuspensión en 1ml de PBS 1x frío del pellet de los ectosomas.
- 9.2. Realizar una dilución de BSA en agua destilada para una recta patrón:
- 9.3. En la placa de lectura, añadir 10uL en un pozo de las diluciones de BSA, por triplicado.
- 9.4. Añadir 10uL de cada muestra de ectosomas a un pozo, por triplicado (no se diluyó al observar poca concentración); más 10uL para un blanco de PBS 1x.
- 9.5. Añadir 200uL de reactivo Bradford a todos los pozos con contenido anterior.
- 9.6. Análisis de la absorbancia a 595nm en el espectrofotómetro.
- 9.7. Con el programa Excel, determinación de las concentraciones de proteína a partir de la creación de una recta patrón del BSA: 0 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 (ug de BSA)

10. CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR BCA

- 10.1. Añadir 1 mL de buffer RIPA pH 7,5 (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10% SDS, 1% sodium deoxycholate) y raspar los restos celulares de las placas de cultivo. Recoger en eppendorfs cada muestra.
- 10.2. Realizar una dilución de BSA en agua destilada para una recta patrón:
- 10.3. En la placa de lectura, añadir 10uL en un pozo de las diluciones de BSA, por triplicado.
- 10.4. Preparación de diluciones 1/40 de las muestras en buffer RIPA pH 7,5.
- 10.5. En la placa de lectura, añadir 10uL en un pozo de las diluciones de las muestras, más 10uL para un blanco del buffer RIPA pH 7,5, todo por triplicado.
- 10.6. Preparación del reactivo de BCA a partir de los dos subreactivos A y B a 1:50 (el volumen total depende del número de pozos llenados anteriormente, 200uL por cada pozo).
- 10.7. Añadir 200uL del reactivo BCA a cada pozo con contenido.
- 10.8. Incubar a 37°C durante 30min.
- 10.9. Análisis de la absorbancia a 562nm en el espectrofotómetro.
- 10.10. Con el programa Excel, determinación de las concentraciones de proteína a partir de la creación de una recta patrón del BSA: 0 - 0.25- 0.5 - 1 – 2 – 4 (µg de BSA)

11. PREPARACIÓN DE GELES DE ACRILAMIDA AL 12%

- 11.1. Preparación del montaje con los dos cristales (0,75mm o 1,5mm) en el soporte y el peine correspondiente.
- 11.2. Preparación de la solución separadora (“Resolving”) en tubo falcon 15mL:
 - Acrilamida = 3mL
 - Tampón “Resolving” = 2,5mL
 - H2O MiliQ = 4,35mL
 - TEMED = 10uL
 - APS 10% = 100uL
- 11.3. Añadir lentamente entre los cristales del montaje hasta llenar aproximadamente $\frac{3}{4}$ del volumen.
- 11.4. Añadir 1mL de agua o isopropanol muy lentamente.
- 11.5. Esperar a que el gel polimerice (10-15min) y se vuelva sólido (comprobar el resto de solución del tubo falcon para verificar).
- 11.6. Retirar el agua/isopropanol.
- 11.7. Preparación de la solución concentradora (“Stacking”):
 - Acrilamida = 1mL
 - Tampón “Stacking” = 2,5mL
 - H2O MiliQ = 6,3mL
 - TEMED = 10uL
 - APS 10% = 100uL
- 11.8. Añadir lentamente hasta llenar completamente el volumen entre los cristales.
- 11.9. Colocar el peine con cuidado de no hacer burbujas.
- 11.10. Esperar a que el gel polimerice (10-15min) y se vuelva sólido (comprobar el resto de solución del tubo falcon para verificar).

11.11. Desmontar el par de cristales con el gel y guardar el conjunto en la nevera a 4°C hasta su uso.

12. ELECTROFORESIS DE LAS MUESTRAS DE LA FRACCIÓN TOTAL Y DE ECTOSOMAS

- 12.1. Preparación de diluciones de las muestras según la concentración deseada.
- 12.2. Añadir 50uL de tampón de muestras con Beta Mercaptoethanol (BME) a cada dilución de muestra.
- 12.3. Hervir a 100°C durante 10min
- 12.4. (Opcional): si no se continua, se pueden congelar a -80°C para uso posterior.
- 12.5. Preparar el montaje de electroforesis y colocar el gel en su posición.
- 12.6. Llenar la cavidad interior con buffer para electroforesis hasta el límite superior.
- 12.7. En cada pozo del gel:
 - En el primer pozo añadir 5uL de marcador molecular (MWM).
 - Añadir 25uL o 50uL (dependiendo del volumen del pozo) de cada dilución de muestra con BME, teniendo en cuenta el orden.
 - Añadir 25uL de BME en el resto de los pozos vacíos.
- 12.8. Colocar la tapa con los electrodos según su polaridad (negro y rojo).
- 12.9. Comenzar a correr la electroforesis a 80V durante 10min y luego a 200V durante 1h.
- 12.10. Apagar el aparato y desmontar el gel del montaje de electroforesis, y luego de los cristales con cuidado.

13. WESTERN BLOT DE LAS MUESTRAS DE LA FRACCIÓN TOTAL Y DE ECTOSOMAS

- 13.1. Transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa (Máquina “Trans-Blot Turbo”, BIO-RAD):
 - A. Utilización del kit de Trans-Blot Turbo, compuesto por filtros de papel y la membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia: se coloca la parte denominada “Bottom”, encima el gel, y para finalizar la parte “Upper”.
 - B. Se coloca el conjunto en el Casete de la máquina y se introduce de nuevo en ella, asegurando de que está cerrado correctamente.
 - C. Se introduce los parámetros del gel utilizado y se inicia el proceso, el cual dependiendo del tipo de programa tarda aproximadamente entre 7 y 10 minutos.
 - D. Una vez concluido, se extrae el Casete y se desecha todo el contenido menos la membrana.
- 13.2. Para comprobar si existen bandas de proteínas, se puede teñir la membrana con tinte de Ponceau (Rojo Punzó) y a continuación se quita el exceso con agua, además de poder recortarse para obtener un menor tamaño de esta y manejarla más fácil.
- 13.3. Preparación del buffer TBS-T 1x, y del buffer de TBS-T 1x con leche en polvo (por cada 100mL, 5g de leche en polvo).
- 13.4. Añadir 10mL del buffer TBS-T con leche a la membrana para el bloqueo de proteínas inespecíficas y dejar en agitación suave durante 30min a temperatura ambiente.
- 13.5. Añadir el anticuerpo primario deseado según la dilución correspondiente en buffer TBS-T con leche. Ejemplo: Antisuero anti-Etx hecho en conejo, dilución 1/1000. Se añadió 4uL a 4mL para incubar la membrana.
- 13.6. Incubación con agitación suave a 4°C durante toda la noche.

- 13.7. Se recupera la dilución del anticuerpo (se puede conservar añadiendo azida de sodio a 1/100 y guardado en la nevera a 4°C).
- 13.8. Lavado con buffer TBS-T 1x durante 5min (5 veces).
- 13.9. Añadir a dilución 1/2000 el anticuerpo secundario, correspondiente al primario, en TBS-T con leche. Ejemplo: El anticuerpo anti-Etx primario es de conejo, por lo cual el anticuerpo secundario es anti-conejo a 1/2000.
- 13.10. Lavado con buffer TBS-T 1x durante 5min (5 veces).
- 13.11. Colocar la membrana sobre una hoja fina de plástico transparente y añadir 600uL de luminol optimizado para revelar. Quitar el exceso con un papel.
- 13.12. Colocar otra hoja igual a la anterior encima y quitar posibles burbujas.
- 13.13. Analizar con el revelador óptico y obtener la imagen digital CCD por quimioluminiscencia.

14. DESHIBRIDACIÓN (“STRIPPING”) DE LAS MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

- 14.1. Preparación del “Stripping Buffer” en agua destilada:
 - Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8
 - SDS 2%
 - Beta-mercaptoethanol 100mM
- 14.2. Calentar previamente el buffer a 60°C en el baño termostático.
- 14.3. Colocar una cubeta con las membranas en el baño y cubrir completamente con el buffer.
- 14.4. Incubar la membrana a 60°C durante 45 minutos con agitación suave.
- 14.5. Preparación del buffer TBS-T 1x.
- 14.6. Lavar la membrana con agua MQ durante 1min.
- 14.7. Realizar 6 lavados con TBS-T 1x, durante 5 minutos cada uno.