



Estudi de la unió de la toxina èpsilon de *Clostridium perfringens* a diferents teixits i el seu pas a través de la barrera hematoencefàlica

Jonatan Dorca Arévalo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Programa de Doctorat de Neurociències

Bienni 2005/07

Estudi de la unió de la toxina èpsilon de
***Clostridium perfringens* a diferents teixits i el seu**
pas a través de la barrera hematoencefàlica

Tesi doctoral

Jonatan Dorca Arévalo

Laboratori de Neurobiologia Cel·lular i Molecular
Departament de Patologia i Terapèutica Experimental
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Directors de tesi:

Dr. Joan Blasi Cabús

Dra. Mireia Martín Satué

“The important thing is not to stop questioning”

Albert Einstein

AGRAÏMENTS

Bé, estar escrivint aquest apartat deu voler dir que en breu defensaré la meva tesi doctoral!! Ostres...encara no m'ho crec! Sembla mentida que ja hagin passat sis anys!

En primer lloc, vull agrair als meus directors de tesi: Joan i Mireia per haver-me donat aquesta oportunitat en el món de la ciència i haver-me ensenyat d'una manera molt amena, pacient i meticulosa tot el que ara sé. Gràcies!.

A tu Imma, vull donar-te les gràcies per tota la teva ajuda diària i l'alegria que m'has transmés que m'ha acompanyat durant tot aquest temps al laboratori.

Carles i Artur, gràcies pels bons moments compartits i també pels bons consells que m'heu aportat durant tota aquesta etapa. Gràcies!.

Eli, és un plaer treballar al teu costat i tenir-te com a companya de laboratori. Molta sort en la teva tesi!! Per cert, felicitats per deixar de fumar!.

Àlex, gràcies pels teus primers consells en arribar al laboratori. I gràcies a tu també, Adriana, per la teva ajuda en les meves primeres immunos, westerns, solucions, etc...! M'ha agradat tenir-te de companya de poiata durant gran part de la meva estada al laboratori!.

Carme, he gaudit molt tenint-te com a companya de poiata! I gràcies pels teus consells al laboratori! Sort en la teva nova feina!.

Laura Diaz, he disfrutado mucho enseñandote lo que sé sobre la toxina épsilon y gracias por ayudarme con los mutantes de la toxina durante la realización de tu máster en nuestro laboratorio! Mucha suerte!.

Paolo, (*que pasa, tío!*) thank you for your pieces of advice and also for your company in the lab and your happiness! Good luck in the future!

També vull agrair als meus companys de feina del laboratori 4112 la seva alegria i els bons moments compartits:

a l'Anna Priscil·la, que vam començar la tesi en la mateixa època!! - Quina tela eh?! Sort al Canadà i tapa't!.

al David Albrecht, que és un Sant!. - Es un placer tenerte de compañero y ánimo en tu escritura! Ya verás que la disfrutarás! (como es aquel sonido que hacemos..? "Ahhhh....").

Agraïments

al Fran que és un non-stop! - También es un placer trabajar contigo! Eh...es como si yo....hola! hago yoga!...pues yo soy el oso yogui!jeje... Mucha suerte en tu estancia aquí!

a l'Helena que és un tractor! - Sort amb els *Xenopus* i la teva neteja dels divendres! "Vaja!" -Això s'enganxa com el pega tu!... *Sus scrofa*! (paraula acompanyada d'un so difícil d'escriure).

al Xavi que va fer una estada al nostre laboratori! - M'ha agradat molt haver-te conegut. Molta sort amb el teu nou màster!

al David Soto, que compartim gustos musicals similars. - Que tinguis molta sort en els teus nous experiments! i...Olé per megahertz!!jeje...Merci!

També vull agrair als meus companys (i ex-companys) del laboratori 4143 tot el que hem compartit i gaudit durant tot aquest temps:

a l'Anna Nualart que ja fa temps que va arribar i sembla que fos ahir. - Com passa el temps...! Espero que hakis gaudit molt de la teva estada per U.S.A i hakis après moltes cosetes! Gràcies també per la teva companyia i alegria.

a la Cris. - Molta sort amb la SOD..a veure si s'agrega...o què! A veure si ens tornem a veure en alguna preestrena...jeje.

al Rafa. - Mucha suerte en tu máster que empiezas ahora y también en tu posterior tesis! Gracias por tu compañía y mucha suerte! Y eso de vivir al lado del laboratorio está muy, pero que muy, bien!

També he d'agrair moltíssim als serveis científicotècnics. En concret al Benja: (Benjamín, Benjamín....corriendo un gran peligro..como va mi tesis?) Gràcies per ser tan alegre i per ensenyar-me a manipular el microscopi confocal com cal, ja que com tu molt bé saps, és una eina indispensable en aquesta tesi! Gràcies!

Gràcies també a tota la gent que ja no hi és però ha passat pel lab!: Laura (el niño se doctora...! Merci per la teva alegria!), Saki (merci per ensenyar-me a fer el *teasing* i pels bon moments compartits!), Marc (al final no he fet una samarreta del pollo mix...jeje...em fa vergonya!), Gemma (triki-triki-tri...merci per la teva alegria!), Marcel (aupa Ramones i sort amb la tesi!...Let's go!), Rubén (me ha gustado haberte conocido! Mucha suerte en el futuro...que es ya!).

També he d'agrair a tota la gent de la cinquena planta que compartim seminari cada dilluns: Mercè, Santi, Natalia, Ana, Pau... Gràcies per la vostra companyia i consells!

També vull agrair a l'Alberto de la cinquena planta per ajudar-me amb aquells cultius de glia de rata... i comptar cèl·lules! I ara, recentment, amb els papers de la tesi (que los hemos hecho a la par...). Suerte en el futuro.

No sé si em deixo a algú...!! El que sí que puc dir és que durant aquests sis anys al laboratori he gaudit de la companyia de tots d'una manera molt positiva! Moltes gràcies companys i companyes!

També, he d'agrair als meus pares i al meu germà que m'han ajudat, aconsellat i recolzat quan ho he necessitat! Sou fantàstics i us estimo molt!

I a tu Roser, què t'he de dir? Gràcies per ajudar-me, recolzar-me i estimar-me cada dia. Sóc el més feliç del món al teu costat i encara dono gràcies per aquell dia en que ens vam conèixer! Gràcies per omplir de felicitat la meva vida. T'estimo molt!

ÍNDEX

ABREVIATURES	1
INTRODUCCIÓ	7
1. L'espècie <i>Clostridium perfringens</i>	10
2. La toxina èpsilon	11
2.1. Estructura de la protoxina-ϵ i toxina-ϵ	12
2.2. Mecanisme citotòxic de la toxina-ϵ	14
2.3. Efectes de la toxina-ϵ	15
2.3.1. Efectes <i>in vivo</i> de la toxina-ϵ	15
2.3.1.1. Via d'entrada i distribució de la toxina- ϵ	15
2.3.1.2. Efectes intestinals de la toxina- ϵ	17
2.3.1.3. Efectes sistèmics de la toxina- ϵ	18
2.3.1.4. Efectes neurològics de la toxina- ϵ	19
2.3.1.5. Efectes renals de la toxina- ϵ	21
2.4. Models experimentals de la toxina-ϵ	21
2.4.1. Estudis en cèl·lules MDCK	23
2.4.2. Estudis en cèl·lules mpkCCD_{c14} i HRETC	25
3. Diagnòstic i prevenció de l'enterotoxèmia en bestiar	26
OBJECTIUS	29
MATERIALS I MÈTODES	33
1. Expressió de toxina recombinant	35
2. Quantificació de proteïna produïda	38
2.1. Obtenció de la toxina-ϵ-GFP activa	39
3. Electroforesi de gels d'acrilamida (SDS-PAGE) i Western blot	39
3.1. Electroforesi de gels d'acrilamida	39
3.2. Anàlisi de la protoxina-ϵ-GFP i toxina-ϵ-GFP purificades per Western blot	39
4. Producció d'antisèrums de conill contra la protoxina-ϵ	40
5. Titulació dels antisèrums contra la protoxina-ϵ	40
6. Obtenció i preparació dels diferents teixits i òrgans per al seu estudi	41
6.1. Obtenció d'òrgans de ratolí	41
6.2. Obtenció d'òrgans d'altres espècies	42
6.3. <i>Tesaing</i> de nervis perifèrics	42
7. Obtenció de fraccions sinaptosomals de rata i ratolí	42

8. Cultiu de cèl·lules MDCK	43
9. Incubació de cèl·lules i teixits amb protoxina-ε-GFP o amb toxina-ε-GFP i detecció per microscòpia de fluorescència	43
10. Estudis de citotoxicitat	44
11. Immunofluorescència en fraccions sinaptosomals, cèl·lules i teixits	45
12. Incubació de cèl·lules i teixits amb lectines	46
13. Tractaments a cèl·lules i teixits	47
13.1. Tractament amb Pronasa E	47
13.2. Tractament amb detergents	48
13.3. Tractament amb N-glicosidasa F	48
13.4. β-eliminació	49
14. Detecció de la protoxina-ε-GFP unida a cèl·lules MDCK mitjançant una tècnica d'ELISA	49
15. Cross-linking i immunoprecipitació amb cèl·lules MDCK	51
16. Elaboració de gels bidimensionals (SDS-PAGE 2D)	53
17. Tinció amb nitrat de plata dels gels d'acrilamida	53
18. Assaig de secreció de glutamat en sinaptosomes aïllats de cervell de rata i ratolí	54
19. Obtenció dels mutants de protoxina-ε-GFP	55
20. Obtenció de la construcció 6xHis-prototoxina-ε	56
20.1. Cross-linking amb 6xHis-prototoxina-ε i 6xHis-toxina-ε a cèl·lules MDCK	57
21. Estudis <i>in vivo</i> amb protoxina-ε-GFP o amb toxina-ε-GFP en un model murí	58
22. Solucions	60
RESULTATS	69
A- Obtenció de les toxines recombinants i caracterització de la seva unió a diferents òrgans, teixits i cèl·lules MDCK	71
1. Titulació dels anticossos policlonals obtinguts dels conills immunitzats amb la protoxina-ε	73
2. Caracterització de les diferents formes recombinants de la toxina-ε	74
2.1. Anàlisi de les toxines recombinants en gels d'acrilamida	74
2.2. Estudis de citotoxicitat de les toxines recombinants en cèl·lules MDCK	75
3. Caracterització de la unió de la toxina-ε a teixits i cèl·lules	77

3.1. Estudi de la unió de la toxina-ϵ a sistema renal de ratolí i d'altres espècies	78
3.1.1. Tractaments a sistema renal	82
3.1.1.1. Tractament amb Pronasa E a seccions de ronyó i bufeta de ratolí	83
3.1.1.2. Tractament amb detergents a seccions de ronyó de ratolí	84
3.1.1.3. Tractaments amb N-glicosidasa F i β -eliminació a ronyó i bufeta de ratolí	86
3.1.1.4. Tractaments de β -eliminació en talls de ronyó i bufeta d'altres espècies	90
3.2. Estudi de la unió de la protoxina-ϵ-GFP a cèl·lules MDCK	92
3.2.1. Tractament amb detergents a cèl·lules MDCK	93
3.2.2. Tractament amb N-glicosidasa F en cèl·lules MDCK	94
3.2.3. Tractament de β -eliminació en cèl·lules MDCK	95
3.2.4. Estudis d'afinitat de la protoxina- ϵ -GFP en cèl·lules MDCK fixades mitjançant la tècnica d'ELISA (<i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i>)	96
3.3. Estudi de la unió de la toxina-ϵ a sistema nerviós de ratolí i d'altres espècies	101
3.3.1. Unió de la toxina- ϵ a estructures mielíniques de seccions de cervell de ratolí	103
3.3.2. Unió de la toxina- ϵ a estructures mielíniques d'altres espècies	106
3.3.3. Unió de la toxina- ϵ a estructures mielíniques de nervi perifèric de ratolí i humà	107
3.3.4. Tractaments a sistema nerviós	107
3.3.4.1. Tractament amb Pronasa E a seccions de cerebel i múscul esquelètic de ratolí	108
3.3.4.2. Tractament de seccions de cerebel de ratolí amb detergents	109
3.3.4.3. Tractaments amb N-glicosidasa F i β -eliminació a cerebel de ratolí	111
B- Estudi de la distribució de la toxina-ϵ i els seus mutants <i>in vivo</i>	115

1. Estudis de la distribució de la toxina-ε administrada intravenosament a ratolí	117
2. Estudis de les mutacions Etx-V56C/F118C, Etx-I51C/A114C i Etx-H106P en l'àmbit del SNC	119
3. Estudi dels components de la barrera hematoencefàlica implicats en l'acció de la toxina-ε	121
ANNEX	123
A- Unió de la protoxina-ε-GFP a glàndules salivals i timus de ratolí	125
A.1. Unió de la toxina-ε a timus de ratolí	126
A.1.1. Tractament amb Pronasa E a seccions de timus de ratolí	130
A.1.2. Tractament amb detergents a seccions de timus de ratolí	130
B- Tractament amb detergents sobre seccions de ronyó de ratolí	134
C- Tractament amb detergents sobre seccions de cerebel de ratolí	138
D- Unió de la GST-protoxina-ε-GFP a estructures mielíniques, túbuls distals de ratolí i cultius de cèl·lules MDCK	142
E- Estudis de les diferents mutacions de la toxina-ε	143
E.1. Producció dels diferents mutants de la toxina i estudi de la seva citotoxicitat en cèl·lules MDCK	143
E.2. Distribució dels mutants de la toxina-ε administrats intravenosament (i.v) a ratolí	146
F- Estudis de cross-linking i immunoprecipitacions a cèl·lules MDCK	147
F.1.1. Incubacions de les cèl·lules MDCK amb protoxina-ε i toxina-ε amb els diferents cross-linkers	148
F.1.2. Incubació de les cèl·lules MDCK amb protoxina-ε-GFP i cross-linker DMS	151
F.1.3. Incubació de les cèl·lules MDCK amb protoxina-ε i anàlisi per gels SDS-PAGE bidimensionals	152
F.1.4. Incubacions de les cèl·lules MDCK amb protoxina-ε o toxina-ε amb els cross-linker DMS i separació de les seves bandes en un gel d'acrilamida de 20 x 16 cm	153
F.1.5. Incubacions de les cèl·lules MDCK amb 6xHis-protoxina-ε o 6xHis-toxina-ε amb el cross-linker DMS i separació de les seves bandes en un gel d'acrilamida de 20 x 16 cm	155
DISCUSSIÓ	157
A. Generació d'eines moleculars per a l'estudi de la toxina-ε	159

B. Caracterització de la unió de la toxina-ε	160
B.1. Determinació de l'afinitat de la unió de la toxina-ε a cèl·lules MDCK	160
B.2. Caracterització de la unió de toxina-ε a cèl·lules MDCK	161
B.3. Caracterització de la unió de la toxina-ε a sistema renal	163
B.4. Unió de la toxina-ε a sistema nerviós	164
B.5. Valoració general de la unió de la toxina-ε a sistema renal i nerviós	166
B.6. Unió de la toxina-ε a altres òrgans	169
C. Cross-linking i immunoprecipitacions en cèl·lules MDCK	170
C.1. Identificació i seqüenciació de la banda on es localitza el receptor de la toxina-ε	171
C.2. Conclusions obtingudes dels tractaments amb cross-linkers, i especulacions sobre els possibles receptors de la toxina-ε	172
D. Caracterització dels diferents mutants de la toxina-ε. Estudi de la distribució de la toxina-ε i els seus diferents mutants <i>in vivo</i>	173
D.1. Distribució i efectes de la toxina-ε-GFP i dels diferents mutants a ronyó	174
D.2. Distribució i efectes de la toxina-ε i els diferents mutants a sistema nerviós	176
E. Consideracions finals	181
CONCLUSIONS	183
BIBLIOGRAFIA	187
PUBLICACIONS	203
- Distribution of <i>Clostridium perfringens</i> epsilon toxin in the brains of acutely intoxicated mice and its effect upon glial cells (TOXICON, 2007)	
- Binding of ε-toxin from <i>Clostridium perfringens</i> in the nervous system (VETERINARY MICROBIOLOGY, 2008)	
- Characterization of the high affinity binding of epsilon toxin from <i>Clostridium perfringens</i> to the renal sytem (enviat a VETERINARY MICROBIOLOGY)	

ABREVIATURES

2D	Dues dimensions, bidimensional
aa	Aminoàcid
Å	Angstrom
ANB-NOS	<i>N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimide</i>
AMPc	Monofosfat d'adenosina cíclic
AQ2	Aquaporina 2
AQ4	Aquaporina 4
ATP	Trifosfat d'adenosina
β-PFT	<i>Beta Pore-Forming Toxins</i> , família beta de toxines formadores de porus
BCA	<i>Bicinconinic acid</i> , àcid bicinconínic
BHE	Barrera hematoencefàlica
B_{max}	Quantitat màxima de receptors ocupats
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albumina bovina sèrica
cDNA	DNA complementari
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
CMC	Concentració micel·lar crítica
Cx32	Connexina 32
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMS	<i>Dimethyl suberimidate · 2HCl</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , àcid desoxiribonucleic
DSS	<i>Disuccinimidyl suberate</i>
DTSSP	<i>3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionate]</i>
DO	Densitat òptica
DRM	<i>Detergen-Resistant Membranes</i> , dominis de membrana resistents a detergent
DTT	Ditrioteitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminiscence</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , àcid etilendiaminotetraacètic
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i> , àcid tetraacètic del glicol d'etilè
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , sèrum boví fetal
G-402	<i>Human renal leiomyoblastoma cell line</i> , línia cel·lular epitelial renal d'origen humà.
GDH	Glutatió Deshidrogenasa
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> , proteïna àcida fibrilar glial
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , proteïna verda fluorescent
GPI	Glicosil fosfatidilinositol
GST	Glutatió-S-Transferasa
h	Hores
H/E	Hematoxilina-Eosina

Abreviatures

HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rave
HRTEC	<i>Human renal tubular epithelial cells</i> , línia de cèl·lules epitelials tubulars renals humanes
IAA	Iodoacetamida
i.v	Intravenós
IPTG	<i>Isopropyl β-D-thiogalactopiranoside</i>
kDa	Kilodaltons
K_d	Constant de dissociació
l	Litres
LB	Luria-Bertani
LD₅₀	<i>Lethal dosis 50</i> , dosi letal 50
LSL	<i>Laetiporus sulphureus lectin</i> , lectina de <i>Laetiporus sulphureus</i>
M	Molar
MAG	<i>Myelin associated glycoprotein</i> , glicoproteïna associada a la mielina
MAL/VIP17	<i>Myelin and lymphocyte-associated protein</i> , proteïna associada a mielina i limfòcits
MAP-2	<i>Microtubules associated protein 2</i> , proteïna associada a microtúbuls 2
MβCD	Metil- β -ciclodextrina
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i> , proteïna bàsica de la mielina
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
min	Minuts
ml	Mil·lilitres
MOBP	<i>Myelin oligodendrocyte basic protein</i> , proteïna bàsica de la mielina d'oligodendròcits
mpkCCD_{c14}	<i>Cultured mouse renal collecting duct principal cells</i> , línia cel·lular murina de conductes col·lectors corticals
MTT	3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide reduced</i> , Dinucleòtid d'adenina nicotinamida reduït
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced</i> , Dinucleòtid d'adenina nicotinamida fosfat reduït
NGS	<i>Normal Goat Serum</i> , sèrum normal de cabra
O.C.T	<i>Optimal Cryostat Temperature</i>
PB	<i>Phosphate buffer</i> , tampó fosfat
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , tampó de fosfat salí
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacció en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehid
PI	Punt isoelèctric
PLP	<i>Proteolipid protein</i> , proteïna proteolípida
PM	Pes molecular

PMSF	<i>Phenylmethylsulfonylfluoride, fluorur de fenilmetilsulfonil</i>
RIA	Radio Immuno Assaig
rpm	Revolucions per minut
RTE	Resistència trans-epitelial
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate, dodecilsulfat sòdic</i>
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, electroforesi en gel d'acrilamida en presència de SDS</i>
SNC	Sistema nerviós central
SNP	Sistema nerviós perifèric
TA	Temperatura ambient
TBP	Tributil fosfina
TEMED	N,N,N', N'-tetra-metil-etilendiamina
TBS	<i>Tris Buffered saline, tampó salí Tris</i>
TPP	<i>Techno Plastic products</i>
UV	Ultraviolat
V	Volts
wt	<i>Wild-type, tipus salvatge</i>

INTRODUCCIÓ

El gènere *Clostridium* (del grec *closter*, que significa fus) comprèn bacteris anaerobis formadors d'espores, essent la majoria d'espècies Gram-positives. L'esporeta, en ser més ampla en diàmetre que la cèl·lula en si (Figura I-1), causa la seva dilatació donant lloc a la forma de fus a la qual es refereix el nom del gènere (Hatheway, 1989).



Figura I-1. Espores del gènere *Clostridium* amb la clàssica forma de fus o de raqueta.

El gènere *Clostridium* comprèn diverses espècies causants de greus afeccions gastrointestinals (com l'enterocolitis pseudomembranosa provocada per *C. difficile*) així com espècies productores de toxines, incloent-hi les més potents que es coneixen (*C. tetani*, *C. botulinum*, i *C. perfringens*).

L'enterocolitis pseudomembranosa provocada per *C. difficile* és produïda principalment per les toxines A i B (Kelly i LaMont, 2008). Aquestes toxines s'uneixen a la membrana de la cèl·lula hoste produint-hi un porus (Barth *et al.*, 2001; Giesemann *et al.*, 2006) penetrant així al citosol, on glicosilen diverses GTPases de la família Rho i Ras en la treonina 35/37, inhibint la senyalització i funció d'aquestes proteïnes (Just *et al.*, 1995). La malaltia, caracteritzada per una diarrea, és causada per l'administració d'antibiòtics que provoquen una alteració en la flora normal de l'intestí amb el consegüent creixement en excés d'aquest clostridi enfront la resta de la microflora intestinal.

D'altra banda, *C. tetani* i *C. botulinum* produeixen les neurotoxines tetànica i botulínica, respectivament. Ambdues s'uneixen específicament a cèl·lules neuronals; presenten activitat metal·loproteasa específica sobre proteïnes SNARE, provocant el consegüent bloqueig en l'alliberació de neurotransmissor (Schiavo *et al.*, 1992). La manifestació clínica de l'efecte d'aquestes toxines és el tètanus, en el cas de la toxina tetànica, i el botulisme, en el cas de les toxines botulíniques, que es caracteritzen per una paràlisi espàstica i flàccida respectivament.

L'espècie *C. perfringens* és la principal causant de les malalties entèriques clostridials en animals de granja (Songer, 1996). Hi ha diverses soques que produeixen diferents

toxines (entre elles la toxina èpsilon); les malalties més destacades produïdes per aquesta espècie són la mionecrosi, gangrena gasosa, l'enteritis necròtica, l'enteritis hemorràgica, l'enterotoxèmia i l'enterocolitis (Taula 1).

1. L'espècie *Clostridium perfringens*.

L'espècie *Clostridium perfringens* es pot trobar al sòl, a l'aigua i als aliments (sobretot a carns que no estan ben cuinades). També és un hoste habitual dels intestins de moltes espècies animals (Niilo *et al.*, 1980), incloent-hi la humana (Johnson *et al.*, 1997) i, de fet, la detecció de petites quantitats d'algunes de les seves toxines, com és el cas de la toxina èpsilon (toxina-ε), als budells d'algunes espècies animals es consideren innòcues. Quan hi ha una alteració intestinal a causa d'algun canvi en la dieta o altres factors, aquests bacteris proliferen i produeixen diverses toxines molt potents que poden causar malalties com l'enteritis necròtica o la gangrena gasosa que poden ser fatals.

Clostridium perfringens es classifica en diferents soques basant-se en les toxines que produeix (α, β, ε i ι). Els efectes i el ventall d'hostes afectats també varia d'una soca a l'altra (Taula 1). Així, les malalties produïdes per aquest bacteri solen afectar al tracte digestiu i van des d'una colitis a greus enterotoxèmies.

Soca	Toxina	Malaltia
A	α	Mionecrosi, enverinament, enteritis necròtica a aus i porcs, enterotoxèmia a vaques i ovelles; possible colitis equina, gastroenteritis hemorràgica canina.
B	α, β, ε	Disenteria a bens, enteritis crònica a ovelles adultes, enteritis hemorràgica a vedells i aus, enterotoxèmia hemorràgica a ovelles adultes.
C	α, β	Enteritis necròtica a humans i a aus; enterotoxèmia necròtica o hemorràgica a porcs, bens, vedells, cabres i aus neonatals; enterotoxèmia aguda a ovelles adultes.
D	α, ε	Enterotoxèmia a ovelles (<i>pulpy kidney</i>) i cabres, enterocolitis a cabres, possible enterotoxèmia a vaques adultes.
E	ι	Enterotoxèmia a vaques i bens, enteritis a conills; tipus de malaltia i ventall d'hostes poc clars.
A-E	Enterotoxina	Enteritis canina i porcina; possible enteritis bovina i equina.

Taula 1. Quadre on s'anomenen les diferents soques de *C. perfringens*, les toxines que produeixen i les malalties associades. En negreta les malalties atribuïbles a la toxina-ε.

2. La toxina èpsilon.

La toxina-ε és la toxina clostridial més potent després de les neurotoxines tetànica i botulínica. Provoca enterocolitis a cabres i enterotoxèmia a ovelles (Niilo, 1980; Uzal i Kelly, 1998a) i, ocasionalment, a vaques (Barker *et al.*, 1993). Rarament també s'ha trobat a camells (Radostis *et al.*, 2000), cavalls (Stubblings, 1990) i a humans (Gleeson-White i Bullen, 1955; Khon i Warrack, 1955).

La toxina-ε és produïda per les soques B i D de *C. perfringens*. Aquest bacteri prolifera a l'intestí en condicions en què es crea un entorn anaeròbic òptim com és el canvi d'alimentació, al substituir la llet pel pinso, o després d'una ingesta abundant i rica en midó. La toxina-ε és secretada pels bacteris a l'intestí en la forma inactiva (protoxina-ε), i esdevé activa per l'acció de la tripsina i α-quimiotripsina intestinals (Hunter *et al.*, 1992; Miyata *et al.*, 2001) o per l'activitat metal·loproteasa de la toxina λ produïda pel propi bacteri (Jin *et al.*, 1996; Minami *et al.*, 1997). La toxina activa entra a la circulació sistèmica a través de la mucosa intestinal i produeix els seus efectes en diversos òrgans, principalment cervell, ronyons, pulmons i cor (Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2003a). En els animals infectats la toxina-ε és detectable a l'intestí i també a fluids corporals, com l'humor aquós i el líquid pericàrdic (Layana *et al.*, 2006).

L'enterotoxèmia provocada per la toxina-ε és una causa de la mort sobtada, malaltia per sobrealimentació i malaltia del ronyó esponjós (*pulpy kidney disease*); aquesta darrera s'anomena així a causa de l'aspecte malmès i del tacte tou que presenten els ronyons de les ovelles afectades. Aquestes lesions són a causa de la ràpida autòlisi post-mortem que pateixen els teixits danyats per la toxina (Figura I-2).



Figura I-2. Aspecte hemorràgic que presenten els ronyons d'un be mort per enterotoxèmia (*pulpy kidney*).

Val a dir que sembla que existeixen diferències importants entre les conseqüències de la malaltia a ovelles i a les cabres. Així, les ovelles presenten una greu afectació del sistema nerviós central (Uzal *et al.*, 2003) i una degeneració de les cèl·lules endotelials del cervell després de l'exposició a la toxina (Buxton i Morgan, 1976). En canvi, a cabres el més freqüent és la producció d'enteritis (diarrea i colitis hemorràgica) encara

que també s'observen, en menor grau que a les ovelles, afectacions en el sistema nerviós central (Uzal i Kelly, 1998a).

L'enterotoxèmia és molt ràpida pel que fa als seus efectes, i la majoria de vegades resulta mortal. Així doncs, la vacunació del bestiar és pràcticament l'única manera de lluitar contra la malaltia, i això és el que es fa de manera rutinària en les explotacions animals. La vacuna consisteix en la injecció del toxoide (de la Rosa *et al.*, 1997; Uzal *et al.*, 1998b i 1999b; Ebert *et al.*, 1999), però també s'ha vist que anticossos contra un sol epítop de la molècula són igualment eficaços per protegir els animals (Percival *et al.*, 1990). Malgrat s'han fet molts avenços en aquest camp, es continua treballant per millorar els mètodes de vacunació, ja que la innoculació del toxoide no ofereix una protecció completa a cabres (Finnie, 2003; McClain *et al.*, 2006).

2.1. Estructura de la protoxina-ε i toxina-ε.

El gen que codifica per la toxina-ε es troba localitzat en un plasmidi d'alt pes molecular (Betancor *et al.*, 1999). La proteïna se sintetitza en forma de protoxina inactiva i requereix de dos talls proteolítics, un a cada extrem de la molècula, per activar-se (Figura I-3).

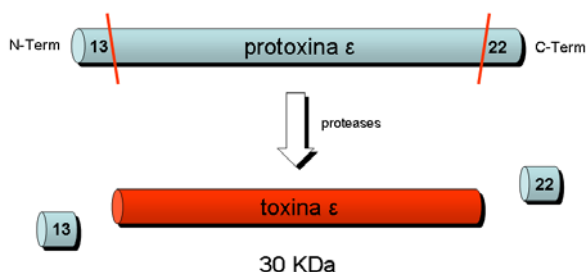


Figura I-3. Activació de la protoxina-ε mitjançant el tall proteolític de 13 aa a l'extrem aminoterminal i un tall de 22 aa a l'extrem carboxiterminal.

En la hidròlisi s'alliberen un petit pèptid de 22 aa a l'extrem C-terminal i un altre de 13 aa a l'extrem N-terminal. La hidròlisi en l'extrem C-terminal és realment essencial per l'activació de la protoxina (Habeerb *et al.*, 1973; Bhowan *et al.*, 1977), mentre que el tall que es dona a N-terminal potencia la toxicitat de la proteïna (Minami *et al.*, 1997).

Estudis bioquímics han permès identificar residus essencials per a l'activitat de la toxina, com són l'únic triptòfan que conté la molècula (Sakurai i Nagahama, 1985a i b), un residu de tirosina (Nagahama *et al.*, 1990), un d'histidina i alguns grups carboxil (Sakurai i Nagahama, 1987a i b). Sembla ser que el residu d'histidina estaria implicat en el lloc actiu de la toxina-ε (Sakurai i Nagahama, 1987c; Oyston *et al.*, 1998), i el

triptòfan i la tirosina en el lloc d'unió de la toxina (Sakurai, 1985b). Vuit residus de lisina es relacionen amb el manteniment de la conformació de la proteïna (Sakurai i Nagahama., 1986). La modificació d'aquests residus de lisina evita l'activació de la protoxina per la tripsina (però no per la quimi tripsina) i, a la toxina, provoca la pèrdua de la seva activitat letal (Sakurai i Nagahama., 1986).

Altres estudis han demostrat que l'estructura tridimensional de la protoxina té molta homologia estructural (no de seqüència) amb la toxina aerolisina d'*Aeromonas hydrophyla* i amb la lectina produïda pel fong paràsit *Laetiporus sulphureus* (LSL) (Figura I-4), que formen part de la família β de toxines formadores de porus (β -PFT). La toxina- ϵ també mostra una homologia de seqüència del 24 i 21% amb les toxines mosquitocides de *Bacillus sphaericus*, Mtx-3 (Liu *et al.*, 1996) i Mtx-2 (Thanabalu *et al.*, 1996), respectivament.

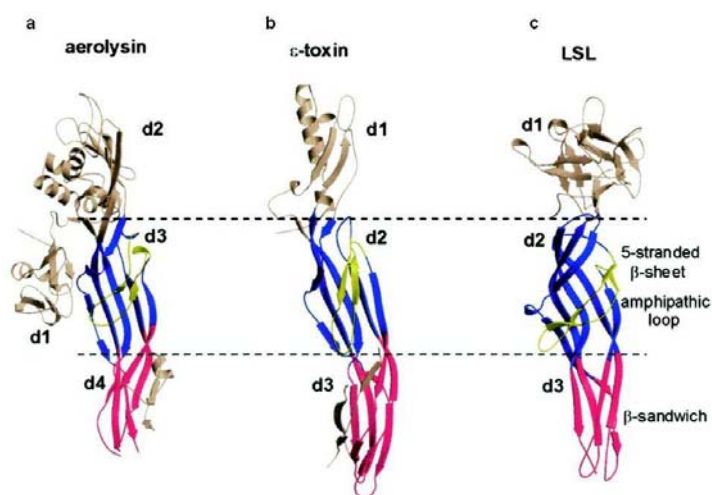


Figura I-4. Estructures tridimensionals de l'aerolisina (a), de la toxina- ϵ (b) i de la LSL (c). El domini d2 i d3 de la toxina- ϵ mostren homologia estructural amb el domini d3 i d4 de l'aerolisina i amb el domini d2 i d3 de la LSL, respectivament. Les molècules es mostren colorejades des de gris, a l'extrem N-terminal, fins a vermell, al C-terminal. En groc es mostren els loops amfipàtics que podrien ser els que facilitarien una primera inserció transmembrana (Mancheño *et al.*, 2005).

La LSL és una toxina amb un domini I (d1) que actua com a lectina reconeixent carbohidrats que contenen galactosa, un domini II (d2) hidrofòbic i d'inserció a la membrana i un domini III (d3) formador de porus, responsable d'oligomeritzar la LSL formant hexàmers en solució (Mancheño *et al.*, 2005). De manera similar, el mecanisme d'acció de l'aerolisina inclou la seva oligomerització a la membrana de la cèl·lula diana en forma d'anell per formar un porus que permeabilitza la cèl·lula (Fivaz *et al.*, 2001). La toxina- ϵ també presenta l'estructura amb tres dominis i la capacitat de formar porus, ja que s'ha demostrat que s'acomplexa en forma d'heptàmer a la membrana de les cèl·lules diana, formant un porus permeable al pas d'ions, i per això se l'ha classificat dins de la família β -PFT (Cole *et al.*, 2004).

Posteriorment, s'ha descobert que un residu de serina localitzat en la posició 156 (dins el domini II de la toxina- ϵ , en les cadenes beta formadores de porus) té un rol important en la citotoxicitat de la toxina- ϵ essent essencial en la formació del porus, ja que diverses mutacions en aquest aminoàcid (S156E i S156C, canvi d'una serina per un àcid glutàmic i cisteïna, respectivament) promouen una reducció en la citotoxicitat i una reducció en la resistència transepitelial (RTE) en les cèl·lules Madine-Darby Canine Kidney (MDCK, una línia cel·lular molt sensible a la toxina- ϵ , veure més endavant apartat 2.4.1) en comparació amb el control. A més, la incubació d'aquestes toxines mutades amb membranes lipídiques artificials van revelar una reducció en la mida del porus i de la conductivitat del canal format, essent ambdues propietats crítiques per la citotoxicitat de la toxina (Knapp *et al.*, 2009).

Recentment, s'han construït dos mutants més de la toxina- ϵ als que se'ls ha introduït un parell de substitucions per cisteïnes, bloquejant el domini II d'inserció a la membrana i evitant la posterior formació del complex a la membrana plasmàtica. Aquestes dues construccions es coneixen com Etx-I51C/A114C i Etx-V56C/F118C i ambdues presenten les mateixes propietats, sent dominants negatius per la toxina- ϵ , ja que en concentracions equimolars amb la toxina- ϵ salvatge inhibeixen la formació del porus i la posterior mort cel·lular en la línia MDCK (Pelish i McClain, 2009). Aquests mutants poden esdevenir actius (novament tòxics) a l'incubar-los amb un agent reductor com és el DTT, indicant que les seves propietats es deuen a la formació de ponts disulfur (Pelish i McClain, 2009).

2.2. Mecanisme citotòxic de la toxina- ϵ .

La toxina- ϵ presenta activitat citotòxica en algunes línies cel·lulars, incloent diverses línies cel·lulars d'origen renal de diferents espècies. La més estudiada i sensible de totes, és la línia MDCK, que són cèl·lules epitelials de túbul distal de ronyó de gos, on la toxina- ϵ s'uneix a un receptor localitzat als DRM's de la part apical de la seva membrana plasmàtica (revisat per Popoff, 2011). Un cop unida, la toxina- ϵ oligomeritza formant un complex (heptàmer) d'alt pes molecular i s'inserta en la membrana de les cèl·lules formant un porus, provocant la permeabilitat cel·lular amb el consegüent desequilibri iònic i la posterior mort de la cèl·lula (Petit *et al.*, 1997; Miyata *et al.*, 2002).

Per tal d'estudiar més a fons el tipus d'interacció de la toxina-ε amb el seu receptor, i així com la posterior formació de complexos a la membrana, i veure fins a quin punt els lípids estarien implicats en aquesta interacció, el grup del Dr. Popoff, va incubar la toxina-ε amb membranes lipídiques artificials i va observar que la toxina-ε era capaç de formar-hi porus sense la necessitat d'interaccionar amb cap receptor proteic en concret (Petit *et al.*, 2001). Aquest fet no és estrany ja que moltes toxines citolítiques bacterianes com la toxina-α de *S. aureus* i l'aerolisina d'*A. sobria* també formen porus en membranes lipídiques sense la necessitat d'un receptor específic, malgrat aquestes toxines en necessiten per desenvolupar la seva activitat biològica. Per tant, es creu que les toxines podrien interaccionar amb les cadenes hidrocarbonades de les membranes lipídiques i insertar-se sense la necessitat de cap receptor específic (Nelson *et al.*, 2000). A més, s'ha demostrat que la fluïdesa de les membranes promou l'oligomerització de la toxina-ε en liposomes (membranes lipídiques artificials recircularitzades), de manera que com més fuida és una membrana, més fàcilment pot oligomeritzar la toxina. La toxina-ε doncs, s'uniria a regions hidrofòbiques de les membranes on no hi ha receptors específics, encara que sí que necessitaria aquests receptors per dur a terme la seva activitat biològica (Nagahama *et al.*, 2006).

Encara no se sap l'ordre exacte dels passos que segueix la toxina-ε per inserir-se a la membrana però s'especula que la toxina-ε, un cop activada, heptameritza a la membrana de la cèl·lula hoste, on es formaria un complex preporus. El pas final seria la inserció del porus a la membrana plasmàtica (Bokori-Brown *et al.*, 2011). S'ha vist, però, que en algunes condicions l'heptamerització de la toxina-ε pot tenir lloc sense la formació del porus a la membrana (Pelish i McClain, 2009).

2.3. Efectes de la toxina-ε.

2.3.1. Efectes *in vivo* de la toxina-ε.

2.3.1.1 Via d'entrada i distribució de la toxina-ε.

C. perfringens entra a l'organisme per via oral. Normalment, els bovins ingereixen quantitats contínues d'aquests bacteris, però els processos fermentatius i els moviments peristàltics del tracte digestiu eviten la seva proliferació. Però quan es donen canvis en l'alimentació, com són el pas de l'alletament al pinso o una gran ingesta de menjar en algun moment puntual, aquest bacteri adquireix avantatge respecte la resta de flora

intestinal i pot proliferar i produir toxina en grans quantitats. La toxina té capacitat de permeabilitzar i travessar la mucosa intestinal i arribar a la circulació sanguínia, donant lloc a greus efectes sistèmics (revisat per Finnie, 2004). Aquesta permeabilització de la mucosa causada per la toxina- ϵ , es produiria per una reducció de la resistència paracel·lular, permetent així el pas del flux d'ions entre les cèl·lules. Com a conseqüència la mucosa intestinal esdevindria més permeable i entrarien al lumen aigua i electròlits que produirien una acumulació de fluid intestinal, fet que podria explicar l'aparició de les diarrees (Goldstein *et al.*, 2009). Estudis de microscòpia electrònica han revelat l'existència de mort cel·lular apoptòtica de cèl·lules de la làmina pròpia de la mucosa i l'obertura de les unions estretes de les cèl·lules epitelials. La disrupció d'aquestes unions, amb un increment en la permeabilitat per macromolècules, induiria canvis degeneratius en la làmina pròpia (Goldstein *et al.*, 2009).

Per tal d'estudiar la distribució de la toxina un cop es troba en el torrent sanguini, diversos laboratoris hem utilitzat models animals. La toxina- ϵ (i la protoxina- ϵ) injectades i.v a ratolins, s'uneixen a la part luminal de l'endoteli vascular de molts vasos sanguinis cerebrals (Buxton, 1976; 1978a; Soler-Jover *et al.*, 2007). Al ronyó, s'han localitzat a la part luminal de les nanses de Henle, als túbuls contornejats distals, i en petites quantitats, als capil·lars (Buxton, 1978a; Tamai *et al.*, 2003; Soler-Jover *et al.*, 2004). Al fetge, s'ha trobat unió de la toxina- ϵ i protoxina- ϵ a la part luminal dels sinusòids, a algunes venes centrelobulillars i a alguns conductes biliars (Buxton, 1978a). També s'acumulen a cor, pulmons, estómac (Nagahama i Sakurai, 1990) i als cornets nasals, on sembla ser que hi ha una gran quantitat de receptors per a la toxina- ϵ (Tamai *et al.*, 2003). No s'han trobat ni a budell, ni múscul esquelètic, ni a múscul llis (Buxton, 1978a).

Els efectes nocius de la toxina poden ser evitats per l'administració prèvia de protoxina tractada amb formol, indicant que ambdues competeixen *in vivo* pels mateixos llocs d'unió (Buxton, 1976). Curiosament, dels diferents òrgans on es detecta la unió de la toxina- ϵ , únicament la que s'observa a cervell és desplaçable amb la protoxina o la toxina- ϵ sense marcar (freda), demostrant la seva alta especificitat d'unió en aquest òrgan (Soler-Jover *et al.*, 2007).

2.3.1.2 Efectes intestinals de la toxina-ε.

L'enterocolitis, caracteritzada per fortes diarrees, és molt més greu a cabres que a ovelles. En canvi, l'enterotoxèmia, causant dels efectes sistèmics i neurològics, és molt greu a ovelles però pràcticament inexistent en les formes comunes de la infecció a cabres (Uzal *et al.*, 1998a). Estudis *in vivo* han demostrat que la toxina-ε és capaç de danyar les cèl·lules epitelials de la mucosa del budell gros, tant a cabres com a ovelles, tot i que els canvis són més marcats a cabres (Fernandez Miyakawa, *et al.*, 2003b). Així doncs, a ovelles la toxina-ε seria absorbida en l'àmbit del budell prim, produint l'enterotoxèmia, mentre que a cabres passaria més ràpidament cap al budell gros i la seva absorció al budell prim seria menor (Uzal *et al.*, 1999a). Encara que no s'observen lesions intestinals a ovelles afectades d'enterotoxèmia (Finnie, 2003), sí s'observen, lesions a la mucosa del còlon de cabres afectades per la malaltia, tant en condicions sub-agudes com cròniques (Barker *et al.*, 1993) o quan es fan inoculacions de toxina-ε a segments relligats de còlon tant a ovelles com a cabres (Uzal i Kelly, 1997; Fernandez Miyakawa *et al.*, 2003a; Fernandez Miyakawa *et al.*, 2003b). De manera semblant, s'han observat marcats canvis histològics en la mucosa del còlon, però no del budell prim, de ratolins tractats amb la toxina-ε (Figura I-5). En aquests experiments es va observar que una concentració elevada en glucosa feia augmentar l'absorció intestinal de la toxina-ε i un increment en la concentració de clorur de sodi feia reduir la supervivència dels ratolins tractats amb toxina-ε. Aquests resultats van ajudar a entendre l'enterotoxèmia a remugants, on grans quantitats de glucosa deuen estar presents en el budell prim després de grans ingestes de midó acompanyat d'un augment dels nivells de sodi (Lee, 1977). Aquestes alteracions en el budell prim farien augmentar l'absorció de la toxina-ε provocant així l'enterotoxèmia (Losada-Eaton *et al.*, 2008). Estudis més recents demostren que la toxina-ε inoculada tant oralment com intravenosament a ratolí provoca una reducció de la motilitat del tracte gastrointestinal que tindria un paper important en el desenvolupament de l'enterotoxèmia (Losada-Eaton *et al.*, 2010).

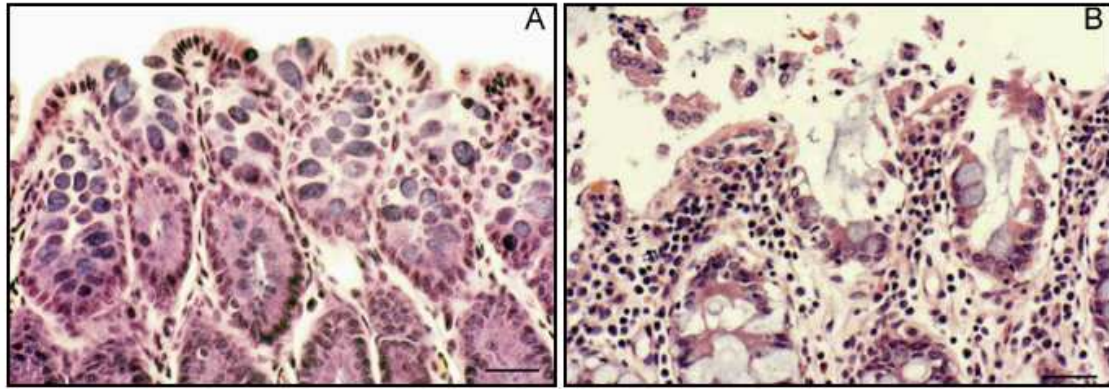


Figura I-5. Efectes morfològics produïts per la toxina- ϵ a còlon de ratolí, on es veu un deteriorament de la mucosa. Secció de còlon incubat amb la solució vehicle (A) o amb 600 LD₅₀ de toxina- ϵ (B). Tinció amb hematoxilina-eosina; la barra equival a 40 μ m. (Losada-Eaton *et al.*, 2008).

A més, a ratolins s'ha vist que d'altres toxines produïdes per la soca D de *C. perfringens* com la toxina- α i la perfringolisina-O actuen de manera sinèrgica amb la toxina- ϵ , incrementant l'efecte letal d'aquesta, tot i que no se sap si aquests efectes es podrien observar en intoxicacions naturals per *C. perfringens* (Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2008).

2.3.1.3. Efectes sistèmics de la toxina- ϵ .

La toxina provoca la mort sobtada, però si l'animal viu temps suficient, presenta símptomes clínics com pal·lidesa, opistotonus i convulsions. En casos crònics, on els temps de supervivència són molt més llargs, es donen altres símptomes com desorientació, ceguesa o incapacitat per menjar (revisat per Songer, 1996).

En l'àmbit del sistema vascular, un dels efectes més clars de la toxina- ϵ és el greu edema generalitzat que s'observa a cervell, pulmons i altres òrgans. La toxina és capaç d'augmentar la permeabilitat vascular (Buxton, 1978b; Nagahama *et al.*, 1991b), i fins i tot de permeabilitzar la barrera hematoencefàlica (BHE) (Gardner, 1973b; Morgan *et al.*, 1975; Finnie, 1984a; Ghabriel *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001), a més de produir danys a les cèl·lules endotelials de la microvasculatura del cervell (Finnie, 1984b). Per altra banda, la sang dels animals afectats no presenta cap canvi en la concentració d'ions de sodi, potassi i clor però sí que presenten un hematòcrit, uns nivells d'hemoglobina i de glucosa més alts que els animals no afectats (Gardner, 1973a), a més els animals afectats també presenten glicosúria (Gardner, 1973a; Uzal i Kelly, 1998a; Uzal *et al.*, 2004a). La toxina també provoca un augment dels nivells d'AMPc en sang, que podrien

ser responsables de l'augment de la glucèmia, ja que l'AMPc pot estimular la glucogenòlisi a nivell hepàtic (Buxton, 1978b; Worthington *et al.*, 1979).

La toxina-ε injectada intravenosament provoca un augment de la pressió sanguínia sense afectar el ritme cardíac ni l'electrocardiograma, és a dir, sense actuar a nivell cardíac. D'altra banda, aquest augment en la pressió sanguínia va acompanyada d'una disminució del flux sanguini cutani, suggerint que la toxina-ε té un efecte vasoconstrictor (Sakurai *et al.*, 1983).

El ronyó també és un òrgan diana de la toxina. En ovelles mortes per enterotoxèmia s'observa una degeneració *post mortem* molt ràpida d'aquest òrgan. S'ha proposat que l'acumulació de toxina al ronyó seria una mena de defensa de l'organisme contra la toxina, disminuint la quantitat de toxina-ε en circulació i retardant els seus efectes neurològics. Una prova d'això és que una nefrectomia bilateral a ratolins injectats amb toxina-ε incrementa la letalitat d'aquesta (Tamai *et al.*, 2003).

2.3.1.4. Efectes neurològics de la toxina-ε.

Els efectes al cervell depenen de la dosi de toxina aplicada. Si la dosi és alta provoca la mort sobtada, essent els efectes al cervell microscòpics i derivats d'un edema vasogènic sever i generalitzat. En canvi, a dosi més baixes, situació que es dona en animals parcialment immunitzats, l'animal triga més en morir i les lesions al cervell esdevenen macroscòpiques, evolucionant des d'un edema vasogènic inicial fins a un focus de malàcia (estovament anormal de l'estructura) (Figura I-6A) que seria la responsable dels símptomes més tardans com la ceguesa, desorientació, atàxia, bruxisme, augment de la pressió cranial, nistagme, opistotonus, convulsions i coma (Finnie JW, 2003).

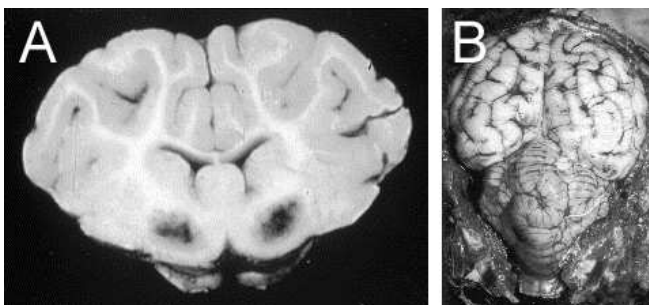


Figura I-6. Cervell d'ovella infectada amb *C. perfringens* tipus D. S'observa en la imatge A una encefalomalàcia simètrica on apareix hemorràgia simètrica bilateral amb necròsi del *globus pallidus* (taques fosques). S'observa en la imatge B una hemorràgia generalitzada essent més acusada en el vermix del cerebel (Uzal, 2003).

La toxina provoca una sèrie de lesions microscòpiques, com és l'augment del volum dels astròcits, a nivell dels seus peus perivasculars, probablement a causa de la sortida

de líquid de la microvasculatura, que seria absorbit per aquests peus (Finnie, 1984b). Aquest efecte no es dona de manera generalitzada a tot el cervell, i també varia segons l'espècie. A ratolí, per exemple, el cerebel és la zona més afectada, mentre que a rata no es veuen efectes en aquesta zona (Finnie, 1984a). S'ha observat un increment d'expressió de l'aquaporina 4 (AQ4) en els astròcits de rates injectades amb toxina-ε, suggerint-se que l'AQ-4 jugaria un rol de protecció o de reducció de l'edema dels cervells danyats per la toxina-ε (Finnie *et al.*, 2008).

D'altra banda, s'ha proposat que una diana per la toxina-ε podrien ser les cèl·lules endotelials de la microvasculatura del cervell. Aquestes cèl·lules se separen poc després de l'exposició a la toxina-ε, probablement a causa d'una disrupció de les unions estretes d'aquestes cèl·lules. Com a conseqüència, es perd la integritat vascular amb l'aparició de l'edema (Buxton i Morgan, 1976). Aquestes cèl·lules inicialment mostren un inflament i una pèrdua dels seus orgànuls amb la posterior reducció del citoplasma i aparició de nuclis picnòtics. Aquests canvis patològics es donen a cèl·lules endotelials dels capil·lars (Gould, 1972; Finnie, 1984b), però no en artèries o arterioles. No obstant, no se sap amb certesa si els efectes a nivell cel·lular es donen per una acció directa de la toxina sobre les cèl·lules, o si es tracta d'un efecte indirecte de l'edema provocat a nivell vascular (Miyamoto *et al.*, 1998).

Altres estudis amb injeccions intravenoses a rates demostren que les dosi letals provoquen dany neuronal de manera generalitzada, en canvi si les injeccions són a dosi subletals causen dany neuronal predominantment a les zones CA1 i CA3 de l'hipocamp. En aquestes zones, les cèl·lules piramidals esdevenen arronsades i els seus nuclis queden picnòtics, perdent aquestes cèl·lules la immunoreactivitat contra la proteïna associada a microtúbuls-2 (MAP-2, marcador postsinàptic i dendrític) (Miyamoto *et al.*, 1998). També a rates injectades amb toxina-ε, es va observar una disminució de la concentració de zinc associada a la secreció de les vesícules de glutamat a la regió CA3 de l'hipocamp. Aquesta observació revela que la toxina-ε estaria actuant via sistema glutamatèrgic produint una secreció excessiva de glutamat amb la conseqüent excitotoxicitat (Miyamoto *et al.*, 1998 i 2000). A més, la secreció de glutamat en aquests animals intoxicats disminueix amb la injecció prèvia de riluzol, un inhibidor de la secreció presinàptica de glutamat, reforçant la hipòtesi que la toxina-ε promou la secreció excessiva de glutamat (Miyamoto *et al.*, 2000). D'altra banda, se sap que dosis

més altes provoquen l'augment de dopamina al cervell de ratolí (Nagahama i Sakurai, 1993).

2.3.1.5. Efectes renals de la toxina-ε.

Mitjançant tècniques immunohistoquímiques, s'ha descrit l'acumulació de la toxina-ε als ronyons després de la seva injecció intravenosa en ratolins, detectant-se principalment a glomèruls, capil·lars, i cèl·lules epitelials de túbuls col·lectors, distals i també lleugerament als proximals. En les cèl·lules epitelials dels túbuls proximals la immunoreactivitat per la toxina es detecta a la seva part luminal, mentre que en els túbuls distals es detecta a la part basolateral. Entre els canvis morfològics detectats s'ha evidenciat un encongiment dels glomèruls amb una dilatació de l'espai de Bowman. Els túbuls proximals es mostren intactes, mentre que els distals i col·lectors degeneren, observant-se nuclis picnòtics i desorganització de l'epiteli (Tamai *et al.*, 2003; Soler-Jover *et al.*, 2004).

En el nostre laboratori vàrem produir proteïnes recombinants de la toxina-ε i la protoxina-ε amb la *green fluorescent protein* (toxina-ε-GFP i protoxina-ε-GFP, respectivament), permetent detectar per fluorescència la toxina o protoxina. Aquestes proteïnes injectades a ratolí van mostrar unió a l'endoteli vascular de diversos òrgans, especialment al cervell, tot i que la majoria de fluorescència estava acumulada als ronyons. Únicament els ratolins injectats amb la toxina-ε-GFP van mostrar greus alteracions als ronyons, incloent hemorràgia medul·lar i degeneració dels túbuls distals. Coinjeccions amb la protoxina-ε (freda) i protoxina-ε-GFP van mostrar que hi havia un desplaçament de la unió de la protoxina-ε-GFP en els túbuls distals, i no en els proximals, demostrant que als túbuls distals la unió és específica, mentre que en els proximals no ho és (Soler-Jover *et al.*, 2004).

2.4. Models experimentals de la toxina-ε.

Cultius primaris: La primera aproximació a l'estudi de l'efecte de la toxina-ε sobre cultius cel·lulars la trobem l'any 1978, quan Buxton va fer estudis de toxicitat sobre cultius cel·lulars primaris de diferents espècies. Només els macròfags peritoneals de conill d'índies es van mostrar sensibles a la toxina, mentre que la resta de cèl·lules

Introducció

estudiades, incloent-hi d'altres cèl·lules de la línia blanca de conill d'índies, o macròfags peritoneals d'altres espècies, es van mostrar resistents (Buxton, 1978c).

Línies cel·lulars: Més endavant, el grup del Dr. Brown va crivellar diferents línies cel·lulars i, d'entre totes, només la línia epitelial renal MDCK es va mostrar sensible a la toxina-ε (Payne *et al.*, 1994). Posteriorment, s'ha trobat la línia G-402, epitelial renal d'origen humà, sensible als efectes de la toxina, però en un grau molt menor que les MDCK (Shortt *et al.*, 2000). Més recentment, una altra línia cel·lular murina de conductes col·lectors corticals (mpkCCD_{c14}) s'ha identificat sensible per la toxina (Chassin *et al.*, 2007), al igual que els cultius primaris de cèl·lules epitelials humanes de túbuls renals (HRTEC) (Fernandez Miyakawa *et al.*, 2010).

Endoteli: Tot i que s'ha vist que les cèl·lules endotelials de cervell són sensibles a l'efecte de la toxina *in vivo* (Finnie, 1984b), els intents de reproduir aquesta mort *in vitro* han fallat, si bé sempre s'ha provat en cultius endotelials no provinents de cervell (Uzal *et al.*, 1999b). Per tal d'estudiar l'efecte de la toxina en les cèl·lules endotelials, el grup d'Adamson va fer estudis *in vitro* on es va perfundir amb la toxina-ε petites venes aïllades de la microvasculatura del mesenteri de rata, revelant un augment en les seves propietats hidràuliques i demostrant que aquesta microvasculatura era sensible a la toxina de manera temps i dosi depenent. La toxina-ε va provocar canvis ultraestructurals en aquesta microvasculatura. Aquests canvis incloïen forats tant entre les cèl·lules com a través d'elles, essent la majoria de les cèl·lules endotelials necròtiques. També es va veure un dany directe sobre els pericits que envolten aquesta microvasculatura. Aquests canvis serien els responsables de l'increment de permeabilitat. Així doncs, aquests resultats confirmen que la toxina interacciona amb les cèl·lules endotelials de la microvasculatura, causant un dany directe que incrementa la permeabilitat dels vasos amb la posterior aparició d'edema i facilitant l'accés de la toxina al teixit circumdant (Adamson *et al.*, 2005).

Sistema nerviós: El grup del Dr. Okabe va proposar l'augment en la secreció de glutamat per les neurones de l'hipocamp després de l'administració de la toxina-ε via i.v (Miyamoto *et al.*, 1998). Amb la idea d'estudiar més a fons aquesta interacció van incubar la toxina-ε amb fraccions sinaptosomals de cervell de rata, observant-se un sol tipus d'unió i d'alta afinitat. A més, diversos tractaments postulen que la unió es deu a un receptor de natura proteica, probablement una sialoglicoproteïna, i que un ambient lipídic determinat seria important per permetre aquesta interacció (Nagahama i Sakurai,

1992). Curiosament, la toxina- ϵ és capaç de formar oligomers en els DRMs de les fraccions sinaptosomals de cervell de rata, igual que ho fa en el cas de les cèl·lules MDCK, tal i com demostren estudis fets amb diferents detergents (Miyata *et al.*, 2002).

Posteriorment, estudis realitzats en el nostre laboratori demostren que la toxina- ϵ -GFP injectada i.v a ratolí, a banda d'unir-se a les cèl·lules endotelials de la microvasculatura, també s'uneix a algunes cèl·lules gials, tant a astròglia com a micròglia, on podria estar produint un efecte citotòxic. Per estudiar més a fons aquest efecte es van tractar cultius primaris mixtes gials (d'astròglia i micròglia) amb la toxina- ϵ , revelant un efecte citotòxic en ambdues poblacions de cèl·lules (Soler-Jover *et al.*, 2007). Més recentment, s'ha demostrat que la toxina- ϵ també és capaç d'unir-se a cèl·lules granulars de cerebel de ratolí, provocant un increment del Ca^{2+} intracel·lular i de la secreció de glutamat. A més, la toxina- ϵ provoca una reducció en la resistència de la membrana neuronal associada amb l'obertura del porus i la despolarització de la membrana (Lonchamp *et al.*, 2010).

Sistema renal: Tot i els efectes observats amb les injeccions i.v de la toxina comentats anteriorment, en el nostre laboratori hem dut a terme altres models experimentals per tal d'estudiar la unió de la toxina- ϵ al ronyó. Hem realitzat incubacions amb les proteïnes recombinants protoxina- ϵ -GFP i toxina- ϵ -GFP sobre crioseccions de ronyó de diferents espècies (ratolí, rata, ovella, vaca i humana). Hem vist que aquesta s'uneix de manera específica a la part luminal dels túbuls distals del ronyó. La especificitat d'aquesta interacció va ser demostrada mitjançant la coincubació amb protoxina- ϵ (freda) en excés, on la marca de la protoxina- ϵ -GFP va disminuir considerablement a totes les espècies provades. Estudis en cèl·lules MDCK van demostrar que aquest tipus d'unió es dona principalment als DRMs, ja que pretractaments de les mostres amb Tritó X-100 al 0.2% van revelar una disminució en la unió de la toxina- ϵ , coincidint així amb el tipus d'unió en les fraccions sinaptosomals anteriorment comentades (Soler-Jover *et al.*, 2004).

2.4.1. Estudis en cèl·lules MDCK.

Les cèl·lules MDCK, han estat el principal model cel·lular per a l'estudi de la toxina- ϵ . Tant la toxina- ϵ com la protoxina- ϵ es poden unir a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK, i ho fan amb més afinitat pel domini apical de la cèl·lula que pel domini basolateral (Petit *et al.*, 1997). La unió de la proteïna recombinant protoxina- ϵ -

GFP a la membrana cel·lular és desplaçable tant per toxina-ε com per protoxina-ε, indicant l'existència de llocs d'unió específics comuns (Soler-Jover *et al.*, 2004). En canvi, només la toxina és citotòxica, i provoca canvis morfològics als cultius de cèl·lules MDCK, caracteritzats per l'inflament i la deformació de les cèl·lules, acabant amb la mort per lisi. La toxina no entra dins la cèl·lula, si no que roman en la membrana durant tot el procés, formant uns complexos amb una mobilitat electroforètica en gels d'acrilamida d'aproximadament 155 kDa que es formen amb més estabilitat si la incubació es fa a 37°C que no pas si es fa a 4°C (Petit *et al.*, 1997). Posteriorment s'ha vist que aquest complex és en realitat un heptàmer format per molècules de toxina (Miyata *et al.*, 2001) i que permeabilitza la cèl·lula al pas d'ions, obrint porus de diàmetre d'almenys 2 nm (Petit *et al.*, 2001), mentre que la protoxina no és capaç de formar-los. Així, la toxina provocaria una sortida ràpida d'ions K^+ i una entrada més lenta d'ions Cl^- i Na^+ , i finalment una entrada lenta d'ions Ca^{2+} que desestabilitzarien la cèl·lula (Petit *et al.*, 2001). La toxina-ε fa disminuir la RTE (resistència transepitelial) de les cèl·lules MDCK sense tenir cap tipus d'efecte sobre les unions intercel·lulars i el citoesquelet d'actina, i de fet, la permeabilitat de la via paracel·lular no es veu modificada. S'ha suggerit que aquesta reducció de la RTE pot ser deguda a l'increment de transport d'ions i petites molècules carregades a través de la membrana cel·lular (Petit *et al.*, 2003).

Pel que fa als complexos que la toxina forma a la membrana de les cèl·lules, es va definir que la toxina-ε oligomeritza exclusivament en els dominis resistents a detergents DRMs (o lípid rafts) (Miyata *et al.*, 2002), ja que tractaments amb MβCD i inhibidors de la síntesi del colesterol van evidenciar una disminució en la formació d'heptàmers i de la citotoxicitat de la toxina (Miyata *et al.*, 2002; Chassin *et al.*, 2007; Lonchamp *et al.*, 2011). La presència d'esfingomielina i gangliòsids en els lípid rafts tenen una important influència en la unió de la toxina-ε a la cèl·lula facilitant l'heptamerització i citotoxicitat (Shimamoto *et al.*, 2005; Nagahama *et al.*, 2006). A més, un inhibidor de la síntesi d'esfingomielina o l'addició externa del gangliòsid GM1 disminueix la unió de la toxina-ε i la seva subseqüent heptamerització en cèl·lules MDCK (Shimamoto *et al.*, 2005).

Encara no s'ha trobat cap candidat pel receptor de la toxina-ε, però estudis fets amb columnes d'afinitat amb la toxina han permès aïllar una proteïna d'uns 37 kDa de la membrana de les cèl·lules MDCK com a possible receptor (Petit *et al.*, 1997). Més

recentment, estudis amb insercions mutacionals sobre cèl·lules MDCK han permès identificar diverses mutacions en diversos gens, que estarien directament relacionats amb la sensibilitat per a la toxina-ε. Un dels gens detectats és el gen que codifica pel receptor 1 del virus de l'hepatitis A (HAVCR1), que és altament expressat en algunes línies cel·lulars humanes provinents de ronyó, com és la línia ACHN, també sensible a la toxina-ε (Ivie *et al.*, 2011). A més, estudis d'RNA d'interferència pel gen que codifica per l'HAVCR1 tant en cèl·lules MDCK com en cèl·lules ACHN van produir un increment en la resistència per la toxina-ε, confirmant la implicació d'aquest receptor en la citotoxicitat. Reforçant aquesta hipòtesi, estudis *in vitro* demostren que la toxina-ε és capaç d'unir-se a l'HAVCR1. Tot i això, no es considera en si mateix el receptor funcional ja que l'expressió d'HAVCR1 a cèl·lules HEK-293 (una línia cel·lular resistent a la toxina i que no expressa de manera natural HAVCR1), no va evidenciar cap increment en la unió o sensibilitat per la toxina-ε (Ivie *et al.*, 2011) i per tant s'ha catalogat l'HAVCR1 com a possible coreceptor

2.4.2. Estudis en cèl·lules mpkCCD_{C14} i HRETC.

Recentment s'han identificat nous models de cèl·lules sensibles a la toxina-ε. Entre elles hi ha una nova línia cel·lular provinent de túbuls col·lectors renals de ratolí, mpkCCDC₁₄, sensible a la toxina-ε. La toxina s'uneix i forma complexos de 220 kDa en els DRMs de la seva membrana plasmàtica, de manera similar a com ho fa en les cèl·lules MDCK.

Les proteïnes unides a la membrana plasmàtica a través d'un grup glicosil fosfatidilinositol (GPI) no estarien implicades en la unió de la toxina-ε en aquestes cèl·lules, ja que tractaments per extreure proteïnes unides a aquests grups, no modifiquen la formació de l'oligomer (Chassin *et al.*, 2007). L'oligomerització als DRMs fa estimular l'absorció de sodi que indueix un augment del calci intracel·lular amb una ràpida depleció de l'ATP. Aquest fet permeabilitza les membranes mitocondrials i produeix una mort cel·lular independent de caspases. Curiosament, la disrupció dels DRMs amb MβCD impedeix la formació dels oligòmers però no inhibeix la depleció cel·lular d'ATP ni la posterior mort cel·lular. Aquets resultats indiquen que la toxina-ε indueix una ràpida necrosi cel·lular en les cèl·lules mpkCCD_{C14}, però el mecanisme seria diferent de com ho fan la resta de toxines formadores de porus

conegudes fins ara, ja que la mort de la cèl·lula no estaria relacionada amb la permeabilització de la membrana cel·lular ni amb la conseqüent difusió d'ions (Chassin *et al.*, 2007).

Un nou model cel·lular d'utilitat per estudiar la toxina-ε són les cèl·lules epitelials tubulars renals humanes, HRTEC, que exposades a la toxina mostren un inflamament, una vacuolització i una reducció de la viabilitat depenent de la dosi i el temps. La sensibilitat en les cèl·lules HRTEC és 25 cops més baixa que en les cèl·lules MDCK, no obstant la toxina-ε s'uneix a les cèl·lules HRTEC formant un complex de 160 kDa similar al de les cèl·lules MDCK. Per aquest motiu aquestes cèl·lules podrien ser un bon model per entendre el mecanisme d'acció involucrat en el dany cel·lular promogut per la toxina a cèl·lules humanes (Fernandez Miyakawa *et al.*, 2010).

3. Diagnòstic i prevenció de l'enterotoxèmia en bestiar.

L'enterotoxèmia produïda a ovelles joves és molt ràpida en els seus efectes ja que en situacions d'intoxicació aguda pot portar a la mort de l'animal entre pocs minuts fins a poques hores (no més de 12 h) després de ser intoxicat (revisat per Popoff, 2011). Així doncs, la vacunació del bestiar és pràcticament l'única manera de lluitar contra la malaltia, i es fa de manera rutinària a les explotacions animals. A cabres, però, la vacunació és menys efectiva a causa que la titulació d'anticossos i la seva durada és menor que en ovelles (Uzal *et al.*, 1998b).

En casos en què la vacunació no és eficaç, o en animals no vacunats, és molt important la detecció i la diagnosi de l'enterotoxèmia, i sobretot la rapidesa amb què es fa. Així, són nombrosos els treballs encaminats a millorar aquests factors, i s'han desenvolupat tècniques de Radio Immuno-Assaig (RIA) (Bernath *et al.*, 1975 i 1976), tècniques de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) i *Polymerase Chain Reaction* (PCR) per detectar les toxines en el contingut intestinal del duodè i de l'il·li o en fluids corporals com l'orina, fluid pericàrdic, humor aquós i sèrum (Weddel *et al.*, 1984; Sojka *et al.*, 1989; Nagahama *et al.*, 1991b; El Idrissi *et al.*, 1992; Uzal *et al.*, 1996 i 1997; Kadra *et al.*, 1999; Gkioutzidis *et al.*, 2001; Layana *et al.*, 2006).

Pel que fa a la vacunació, clàssicament s'ha fet amb la injecció de toxoide, toxina o protoxina pretractades amb formol (de la Rosa *et al.*, 1997; Uzal *et al.*, 1998b i 1999b; Ebert *et al.*, 1999), però també s'ha vist que anticossos contra un sol epítip de la

molècula són igualment eficaços per protegir els animals (Percival *et al.*, 1990). Més recentment, s'han descrit dos anticossos que neutralitzen l'efecte citotòxic de la toxina-ε (anticossos 5B7 i 4D7). Aquests reconeixen els aminoàcids compresos entre el 134 i el 145 de la toxina, inhibint l'acció d'aquesta. En estudis *in vitro* amb cèl·lules MDCK, es demostra que els anticossos inhibeixen la unió de la toxina a les cèl·lules, i per tant no permeten la seva posterior oligomerització i formació del porus a la membrana plasmàtica.

A més, també s'ha descrit que a ratolí les injeccions del mutant Etx-H106P, que té una substitució d'una histidina per una prolina en l'aminoàcid 106 de la toxina-ε, permet protegir l'animal enfront la toxina-ε activa, ja que indueix la formació d'anticossos contra aquesta, quedant protegits contra una dosi 1000 LD₅₀ de toxina salvatge (Oyston *et al.*, 1998). Actualment, tal com s'ha dit abans, la pràctica més comú per combatre els efectes de la toxina-ε a les explotacions animals continua sent la vacunació amb toxoide concentrat o amb cultius inactivats de diferents soques de *C. perfringens*. Nous mètodes de vacunació amb proteïnes recombinants de la toxina-ε estan en procés d'investigació (Oyston *et al.*, 1998; Titball., 2009; Lobato *et al.*, 2010; Mathur *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2010). Per exemple, nous mutants als que se'ls ha fet un parell de substitucions per cisteïnes, coneguts com Etx-I51C/A114C i Etx-V56C/F118C i que no presenten citotoxicitat, poden ser bons candidats com a nou mètode de vacunació (Pelish i McClain., 2009).

Més recentment, s'ha descobert que tres components químics (*N*-cycloalkylbenzamida, furo[2,3-*b*]quinolina i 6*H*-antra[1,9-*cd*]isoxazol) tenen la capacitat d'inhibir l'activitat del canal format per la toxina i la posterior mort cel·lular, però no la unió de la toxina al seu receptor i tampoc la seva oligomerització. Aquests inhibidors probablement bloquegen el porus o interfereixen amb factors de la cèl·lula hoste encara no coneguts que estarien involucrats en produir la citotoxicitat (Lewis *et al.*, 2010).

D'altra banda, estudis *in vitro* demostren que el creixement de *C. perfringens*, obtinguts d'intestins d'animals sans i intoxicats, es redueix en presència de tanins de quebratxo, castany o combinacions d'ambdós, reduint-se també la citotoxicitat en cultius de cèl·lules MDCK tractats conjuntament amb toxina-ε (també amb toxina-α) i tanins. Aquests resultats suggereixen que una dieta complementada amb tanins podria ajudar a prevenir malalties produïdes per clostridis (Elizondo *et al.*, 2010).

OBJECTIUS

La toxina- ϵ de *Clostridium perfringens* és la tercera toxina més potent que existeix després de les toxines tetànica i botulínica. Causa grans pèrdues econòmiques a les explotacions animals. No es coneix un mètode per curar la malaltia una vegada s'han iniciat els efectes de la infecció en l'animal, i la vacunació és l'única eina de prevenció de la malaltia que existeix actualment. Darrerament, s'ha avançat molt en el coneixement a nivell molecular de la toxina- ϵ , de la seva estructura i del seu mecanisme d'acció. No obstant, es desconeix gran part dels mecanismes cel·lulars implicats en els passos inicials de la seva acció tòxica com, per exemple, el reconeixement de les cèl·lules diana, la natura del seu receptor, i el mecanisme d'inserció i oligomerització a la membrana plasmàtica.

Els hostes habituals de *C. perfringens* són animals de granja com xais, cabres i vaques. En comptades ocasions la toxina- ϵ també s'ha detectat a humans encara que no se n'han descrit efectes associats. Les rates i els ratolins són molt sensibles a la toxina- ϵ i han resultat ser un model idoni per al seu estudi al laboratori.

Al nostre laboratori hem generat valuoses eines moleculars com són les proteïnes de fusió recombinants de la protoxina- ϵ i la toxina- ϵ amb la proteïna verda fluorescent (GFP), que faciliten l'estudi de la distribució de la toxina- ϵ *in vivo*, en un model murí d'intoxicació aguda per toxina- ϵ .

L'objectiu general d'aquesta tesi és **aprofundir en el coneixement de les primeres etapes de la intoxicació per la toxina- ϵ , tot caracteritzant la seva unió i distribució en els diferents òrgans i sistemes, en especial en el renal i nerviós.**

Per dur a terme aquest objectiu es van plantejar els següents objectius parcials:

- **Estudiar la distribució i caracteritzar la unió de la protoxina- ϵ -GFP i toxina- ϵ -GFP a diversos teixits i òrgans (de ratolí i d'altres espècies).**

Aquest primer objectiu s'ha dut a terme mitjançant incubacions de la protoxina- ϵ -GFP i la toxina- ϵ -GFP sobre crioseccions de diferents òrgans i teixits de ratolí i d'altres espècies hoste per a la toxina- ϵ (Apartat A de resultats i Annex).

Un cop establert quins òrgans i estructures estaven implicats en la unió de la toxina- ϵ , el següent pas va ser estudiar aquest tipus d'unió, fent ús de diversos tractaments (proteases, glicanases i detergents), sobre les seccions on posteriorment faríem les incubacions amb la protoxina- ϵ -GFP. Els mateixos estudis es van fer en cultius de cèl·lules MDCK ja que és una línia cel·lular molt sensible a la toxina- ϵ , que presenta

Objectius

llocs d'unió específics i d'alta afinitat a la membrana plasmàtica (Apartat A de resultats). A més, s'han utilitzat diferents cross-linkers a fraccions de cèl·lules MDCK i s'han realitzat tècniques d'immunoprecipitació i *pull-down* per tal d'aïllar el receptor de la toxina- ϵ (Annex). Així doncs, el nostre segon objectiu ha estat:

- **Caracteritzar els elements que intervenen en la unió de la toxina- ϵ a cèl·lules MDCK.**

La toxina- ϵ injectada, a banda de presentar el seu efecte renal, produint la malaltia del ronyó esponjós, també provoca greus efectes neurològics i és capaç de permeabilitzar la BHE (Apartat B de resultats). Poc se sap però, sobre el seu efecte al sistema nerviós.

El nostre darrer objectiu ha estat:

- **Estudiar i caracteritzar el pas de la toxina- ϵ a través de la BHE i el seu efecte al sistema nerviós.**

Aquest objectiu s'ha complertat produint diverses mutacions de la toxina- ϵ -GFP amb la posterior injecció intravenosa d'aquesta a ratolins i la següent extracció, fixació i anàlisi dels seus òrgans diana amb diverses proves immunohistoquímiques (Apartat B de resultats i Annex). Amb aquest objectiu també es pretén trobar una mutació de la toxina- ϵ capaç de travessar la BHE però que no presenti toxicitat per l'animal.

MATERIALS I MÈTODES

1. Expressió de toxina recombinant.

El cDNA de fusió entre la GFP i la protoxina-ε (que a partir d'ara s'anomenarà protoxina-ε-GFP) es va clonar al vector d'expressió de proteïnes en bacteris pGEX 4T (Figura M-1). Es van utilitzar bacteris de la soca BL21(DE3)pLys (Rosetta) per produir les proteïnes de fusió GST-prototoxina-ε-GFP i la GST-prototoxina-ε.

La GST permet la purificació de la proteïna en un sol pas, utilitzant una columna d'afinitat amb glutatió. Posteriorment, la GST s'elimina mitjançant la incubació amb trombina, que té un lloc de tall específic entre la GST i la proteïna que volem purificar (Figures M-1 i M-2).

Els passos seguits per la producció i purificació són els següents:

- S'inicia un cultiu bacterià a petita escala inoculant els bacteris que contenen el plàsmid en 3 ml de medi LB (veure apartat solucions) suplementat amb ampicil·lina (50 µg/ml).
- Es deixa créixer el cultiu durant la nit a 37°C i en moviment constant (220 rpm).

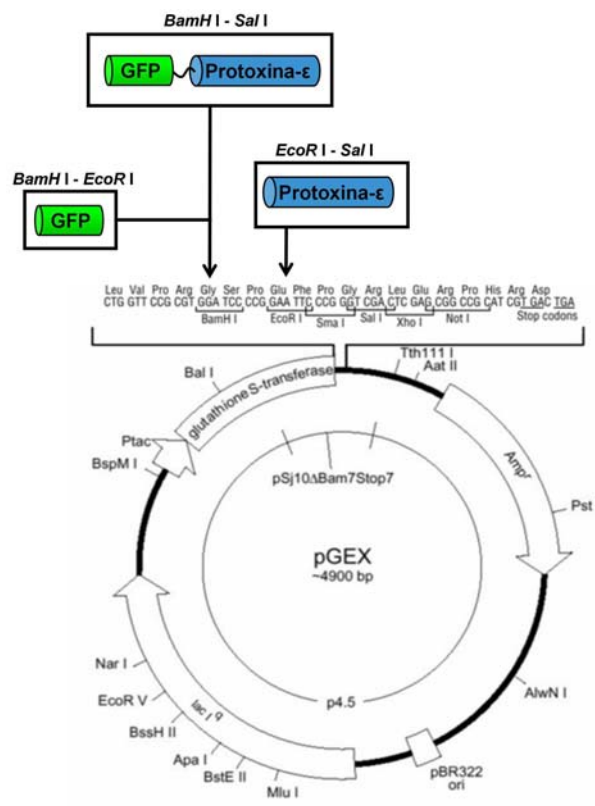


Figura M-1. Vector pGEX-4T on es va clonar el cDNA de protoxina-ε-GFP, GFP o protoxina-ε per produir una proteïna de fusió amb la GST. A sobre de cada requadre s'indiquen els enzims de restricció utilitzats per clonar cada insert.

Materials i Mètodes

- S'inocula un matràs d'Erlenmeyer que conté 250 ml de medi LB suplementat amb ampicil·lina (50 µg/ml) amb el cultiu bacterià crescut durant la nit.
- S'incuba a 37°C i amb moviment constant (220 rpm) durant 2-3h fins que la D.O₆₀₀ se situa entre 0.6 i 0.9, fet que indica que el cultiu es troba en fase exponencial de creixement.
- S'afegeix 1 mM d'isopropil β-D-tiogalactopiranòsid (IPTG) per induir l'expressió de proteïnes.
- S'incuba durant la nit a temperatura ambient (TA) i en moviment constant (220 rpm). En el cas de les construccions que contenen GFP també s'incuba resguardat de la llum.
- Els cultius se centrifuguen a 5000 rpm (rotor GSA, Sorval) durant 20 min a 4°C per tal de concentrar els bacteris. El pellet es resuspèn en 20 ml de tampó PB-1 (veure apartat solucions) i es congela a -20°C per un mínim de 2h; aquest procés inicia la lisi dels bacteris. Els pellets descongelats se soniquen durant 30 seg (repetint el procés 2 cops) i se centrifuguen durant 20 min a 10.000 rpm (rotor SS-34, Sorvall) a 4°C.
- El sobrenedant obtingut es passa per columnes de glutatió-sefarosa (Glutathione SepharoseTM 4B, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemanya) prèviament equilibrades amb tampó PB-1 (veure apartat solucions) durant 1h, a 4°C i protegit de la llum. A continuació es fan 3 rentats amb tampó PB-1.
- Per tal de separar la proteïna recombinant d'interès de la GST, la glutatió-sefarosa es disposa en tubs eppendorf i s'incuba amb 5 U/ml de trombina (Sigma Aldrich T 6884) en presència de CaCl₂ 1mM durant la nit en moviment constant i a 4°C (veure Figura M-2).

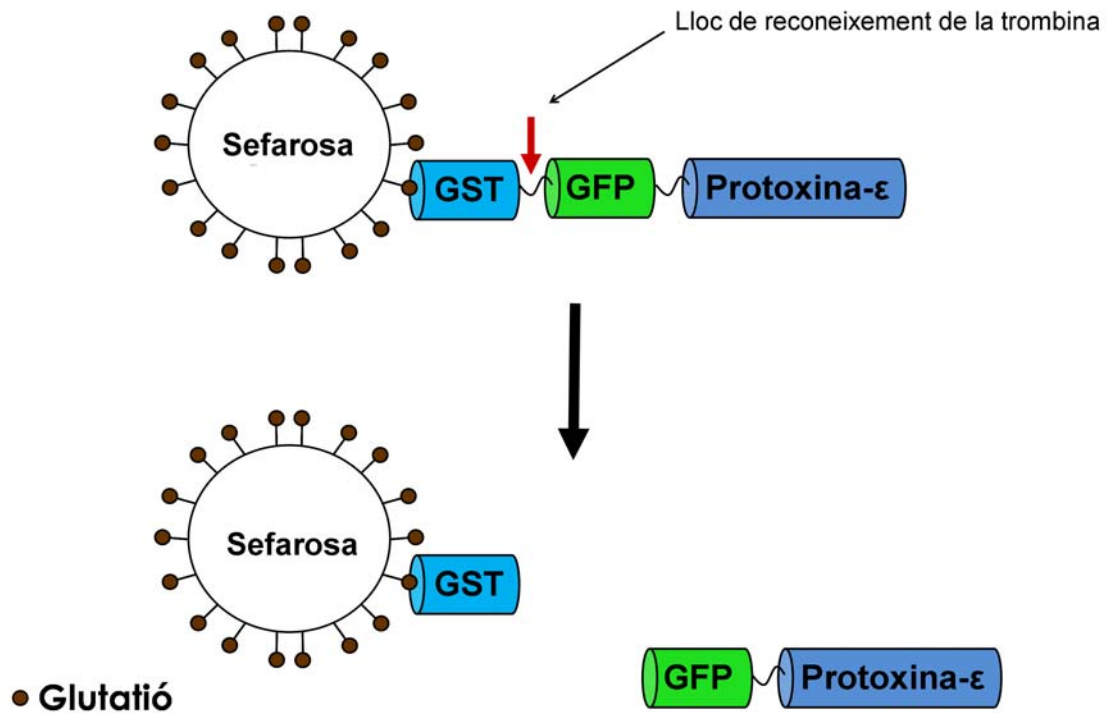


Figura M-2. Boles de glutatió-sefarosa on el glutatió reconeix la GST, capturant així, la proteïna recombinant. També es mostra el lloc de tall de la trombina entre la GST i la protocina-ε-GFP on es produeix la hidròlisi.

- A continuació se centrifuguen els eppendorfs a 20.000 x g durant 1 min a 4°C i es recupera el sobrenedant, que conté la proteïna d'interès.

Les boles de glutatió-sefarosa que queden després de la incubació amb trombina es guarden per la seva anàlisi posterior amb un gel d'acrilamida.

Alternativament es pot obtenir GST-protocina-ε-GFP o GST-protocina-ε eluint amb 10 ml de glutatió 10 mM en PB-1 i dialitzant posteriorment (Slide-A-Lyzer[®] Dialysis Cassette de 10,000 MWCO, Thermo Scientific) en 3 L de PBS durant la nit a 4°C per eliminar l'excés de glutatió (veure Figura M-3). Seguidament, es quantifica la proteïna dialitzada, s'aliqota i es guarda a - 80°C fins la seva utilització.

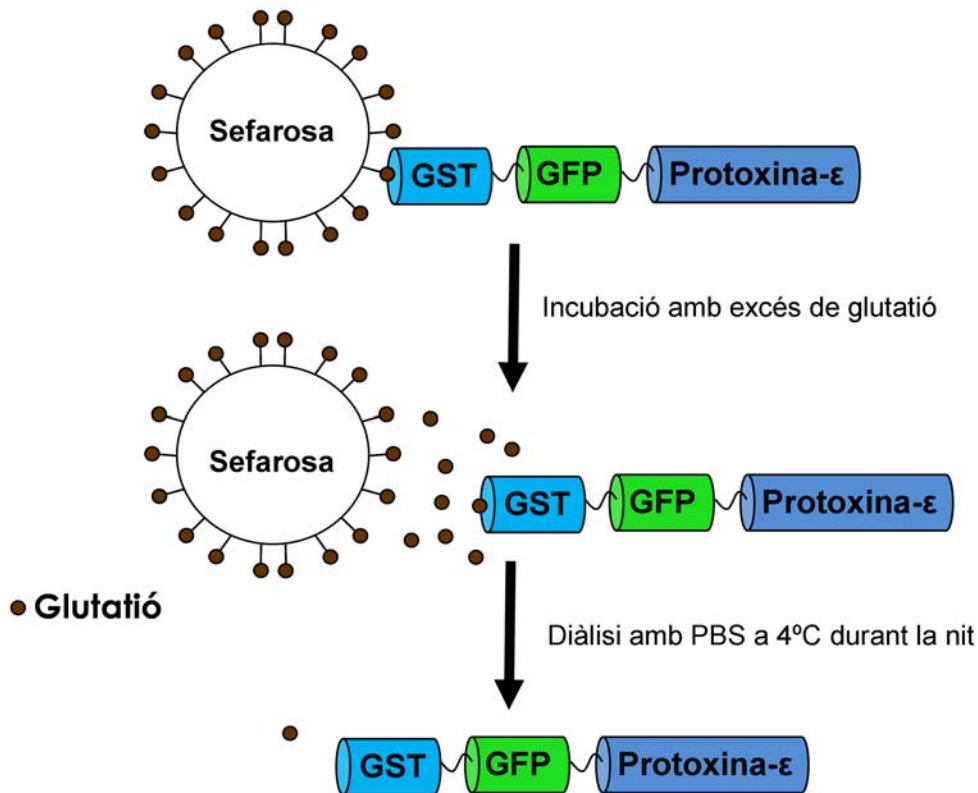


Figura M-3. Esquema del procés d'elució de la GST-protòxina-ε-GFP de les boles de glutatió-sefarosa. Per a l'elució s'utilitza un excés de glutatió (boles marrons) i posteriorment es dialitza amb PBS per obtenir la GST-protòxina-ε-GFP pura.

2. Quantificació de la proteïna produïda.

Es va dur a terme pel mètode colorimètric de Bradford (Bradford, 1976). Per a la corba patró es van utilitzar 0, 2, 5, 10, 15 i 20 µg de BSA.

En aquest mètode, les mostres s'incuben amb solució de Bradford (veure solucions) durant 5 min a TA i es llegeixen els seus valors d'absorbància a una longitud d'ona de 595 nm. Aquests valors s'interpolen a la recta patró per obtenir la concentració de proteïna de les mostres utilitzant el programa informàtic RADLIG (Biosoft, UK).

Pels nostres experiments, una concentració adequada se situa entorn els 900 µg/ml de proteïna i quan no s'ha obtingut aquesta concentració les mostres han estat concentrades posteriorment utilitzant uns dispositius concentradors de filtració per centrifugació (Centricon, Millipore).

2.1. Obtenció de la toxina- ϵ -GFP activa.

La protoxina- ϵ -GFP es pot activar a toxina- ϵ -GFP mitjançant la incubació durant 30 min a TA amb 0.2 U/ml de tripsina (Sigma). Amb aquesta incubació es produeix el tall proteolític en l'extrem C-terminal, necessari per a l'activació de la toxina.

3. Electroforesi de gels d'acrilamida (SDS-PAGE) i Western blot.

3.1. Electroforesi de gels d'acrilamida.

Per comprovar l'estat de la proteïna (i veure si l'enzim ha actuat correctament) es van analitzar 2 μ g de la mostra, prèviament preparats en tampó de mostres (veure apartat solucions), en un gel d'acrilamida. La fase concentradora del gel es va fer al 4%, i la fase separadora al 12% d'acrilamida (veure apartat solucions), i l'electroforesi es va efectuar durant 45 min a 200 V (font d'alimentació BioRad), resguardat de la llum.

A continuació es va fotografiar el gel al transil·luminador amb llum UV, donat que la GFP és fluorescent, per visualitzar la protoxina- ϵ -GFP i la toxina- ϵ -GFP com a bandes fluorescentes (Figura de resultats R2, A). Posteriorment el gel es va tenyir amb Coomassie Brilliant Blue R250 (veure apartat solucions).

3.2. Anàlisi de la protoxina- ϵ -GFP i toxina- ϵ -GFP purificades per Western blot.

Alternativament a la tinció amb Coomassie, es van transferir els gels a membranes de nitrocel·lulosa (BioRad; Hercules, CA), per realitzar el Western blot amb anticossos contra la toxina- ϵ o contra la GFP.

Un cop transferits els gels, es van bloquejar les unions inespecífiques amb solució de bloqueig (veure apartat solucions) durant 45 min i les membranes es van incubar amb els anticossos primaris policlonals de conill, anti-toxina- ϵ o anti-GFP, a una dilució 1:2000 en el mateix tampó de bloqueig durant 1h a TA. Les membranes es van rentar 3 cops amb TBS (veure solucions) i es van incubar amb immunoglobulines anti-IgG de conill conjugades amb peroxidasa de rave (HRP) durant 1h a TA (DAKO; Glostrup, Dinamarca). Després de 5 rentats amb TBS, les membranes es van incubar amb els reactius quimioluminiscent de l'ECL (*Enhanced Chemilluminescence*) durant 1 min

(veure apartat de solucions) i es van exposar fins a 10 min (captant imatges cada minut) en el Gene Gnome (Syngene Bio Imaging), utilitzant el software Gene Snap.

4. Producció d'antisèrums de conill contra la protoxina-ε.

Es van immunitzar conills per produir sèrum contra la protoxina-ε. Abans de la primera injecció es va extreure sang per obtenir un sèrum preimmune.

Com a pauta d'immunització es van injectar subcutàniament en la regió escapular del conill una mescla de protoxina-ε (100 µg) prèviament tractada amb paraformaldehid al 0.2%, per assegurar la seva inactivació, i adjuvant complet de Freund (1:1 en volum). La mescla va ser prèviament sonicada per obtenir una emulsió homogènia.

A les tres setmanes de la injecció es va extreure 5 ml de sang a cada conill. Després de 4h a TA, es va deixar a 4°C durant la nit. El sèrum s'obté del sobrenedant després de centrifugar a 800 x g durant 15 min.

Es va fer una segona immunització amb la mescla però amb adjuvant incomplet de Freund. A les tres setmanes es van sagnar els conills per obtenir tot el sèrum restant.

Els sèrums dels diferents conills van ser aliquotats i conservats a – 80°C.

5. Titulació dels antisèrums contra la protoxina-ε.

Per tal de dur a terme la titulació dels anticossos es va fer un dot blot amb membranes de nitrocel·lulosa on s'hi va afegir quantitats conegudes de protoxina-ε-GFP (0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 i 1000 ng per dot).

Després d'incubar amb solució de bloqueig (veure apartat solucions) durant 45 min, la membrana es va incubar durant la nit a 4°C amb els sèrums anti-protoxina-ε (dilucions 1:1000 i 1:5000). Com a control es va utilitzar els sèrums preimmunes dels conills a una dilució 1:1000.

Després de 3 rentats amb solució de bloqueig, la membrana es va incubar amb anti-IgG de conill unides amb HRP durant 1h a TA.

Les membranes es van rentar 3 cops amb solució de bloqueig i després de 2 rentats més amb PBS (veure apartat solucions) es van revelar per quimioluminiscència amb l'ECL tal i com s'ha explicat anteriorment.

6. Obtenció i preparació dels diferents teixits i òrgans per al seu estudi.

6.1. Obtenció d'òrgans de ratolí.

Vàrem utilitzar ratolins OF1 mascles de 20-25 g de pes que havien estat estabulats en habitacions climatitzades amb lliure accés a menjar i aigua. Tots els experiments amb ratolins s'han dut a terme segons les lleis de la EU (86/609/EU) i les lleis espanyoles (BOE 67/8509-12, 1988) per l'ús d'animals al laboratori i el protocol experimental ha estat aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la UB.

Es van anestesiar els ratolins amb una mescla de 100 mg/kg de 2-(2-clorofenil)-2-metilamino-ciclohexà-1 (ketamina, Ketolar^R) i 10 mg/kg de clorhidrat de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (xilazina, Rompun^R) i es van perfundir amb paraformaldehid al 4% durant 30 min. Es van disseccionar els animals per obtenir els següents teixits i òrgans: cervell, medul·la espinal, ronyons, bufeta, pulmons, cor, llengua, glàndules salivals, esòfag, estómac, intestí prim, intestí gruixut, pàncrees, fetge, gangli limfàtic, melsa, timus, vesícules seminals, testicles (amb epidídim i conducte deferent), pròstata, múscul de cuixa i ull.

Els òrgans es van incubar 24h més amb fixador i després es van crioprotegir traspasant-los a una solució de sacarosa al 30% durant 48h a 4°C.

A continuació, es van englobar en O.C.T (Optimal Cryostat Temperature) (Tissue-Tek[®], Sakura) utilitzant uns motlles. A continuació, es van congelar els motlles que ja van quedar llestos per obtenir seccions. Els teixits i òrgans es van seccionar al criòstat (Cryocut 1800, Reichert-Jung) a -23°C, efectuant talls de 10 µm de gruix. Aquests talls es van enganxar a portaobjectes polilisinats (veure apartat solucions) o pretractats (Superfrost Plus, Thermo scientific).

6.2. Obtenció d'òrgans d'altres espècies.

Els òrgans frescos de cabra, vaca i xai es van obtenir de l'Escorxador de Barcelona, on van ser ràpidament trossejats i introduïts en solució fixadora (paraformaldehid 4%) durant al menys 24h a 4°C. Els òrgans obtinguts varen ser: cervell, cerebel, medul·la espinal, ronyó i bufeta.

Les mostres de cervell humà es van obtenir de l'Institut de Neuropatologia, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, i les mostres de ronyó i bufeta humanes del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital de Bellvitge. Les mostres de ronyó i bufeta humanes van ser englobades en O.C.T sense ser fixades i per això, els talls fets al criòstat es van fixar durant 2 min en PFA 4% i posteriorment es van rentar 3 cops amb PBS abans de fer-los servir.

6.3. *Teasing* de nervis perifèrics.

Per tal d'obtenir fibres nervioses aïllades, es va dur a terme el *teasing* de nervis perifèrics de ratolí (nervi ciàtic) i de *cauda equina* humana. Un cop separades les fibres amb l'ajuda d'unes pinces, es van col·locar en portaobjectes SuperFrost, varen ser fixades amb PFA 4% durant 10 min, rentades amb PBS i congelades a -20°C fins a la seva utilització.

7. Obtenció de fraccions sinaptosomals de rata i ratolí.

Per a l'obtenció de sinaptosomes vam emprar una rata de 150 g o tres ratolins de 20 g per experiment. Després de sacrificar els animals es va extreure ràpidament el cervell i el cerebel i es van submergir en sacarosa 320 mM. Es va homogeneïtzar el teixit en un potter (B. Braun Biotech International) a 600 rpm (10 pujades i baixades de pistó), i es va centrifugar l'homogenat a 5000 rpm en un rotor SS34 (Sorvall) durant 2 min a 4°C. El sobrenedant resultant es va tornar a centrifugar a la mateixa centrífuga a 11.000 rpm durant 12 min a 4°C. El nou sobrenedant es va descartar i el pellet es va resuspendre en 4 ml de sacarosa 320 mM. Aquest volum es va carregar sobre un gradient discontinu de Ficoll amb les següents fases: 4 ml de Ficoll al 12%, 1 ml al 9% i 4 ml al 5%.

El gradient es va centrifugar a 22.500 rpm durant 35 min a 4°C en un rotor vasculant SW41 a l'ultracentrífuga Beckman L-60. Amb aquest procés es formen dues fraccions

enriquides en sinaptosomes (a les interfases entre el 5% i el 9%, i entre 9% i el 12% de Ficoll). Es van recuperar les fraccions i es va determinar la concentració de proteïna pel mètode de Bradford (Bradford, 1976). Després de quantificar-ne la concentració de proteïna total, es van fer alíquotes de 500 µg i es van centrifugar a 20.800 x g en una microcentrífuga Eppendorf 5417R durant 12 min a 4°C. El pellet resultant de les fraccions sinaptosomals es pot mantenir en gel durant varies hores sense que els sinaptosomes perdin la seva capacitat d'alliberar glutamat.

8. Cultiu de cèl·lules MDCK.

La línia cel·lular MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) prové de cèl·lules epitelials de túbuls distals de ronyó de gos i és una línia disponible comercialment (ATCC, CCL-34).

Les cèl·lules s'han mantingut en cultiu a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%, amb medi DMEM-F12 suplementat amb 10% de sèrum fetal boví (FBS) i amb 1% de penicil·lina-streptamicina.

Per a alguns experiments les cèl·lules es van fer créixer fins a la confluència en plaques de 24 pous sobre cobreobjectes polilisinats i es van fixar amb PFA al 4%. Per a la fixació, es va aspirar el medi de cultiu, es van rentar els cobreobjectes 2 cops amb PBS, es va afegir el PFA al 4% durant 15 min i per últim es van fer 3 rentats de 5 min amb PBS, abans de dur a terme els experiments.

Per als estudis de citotoxicitat les cèl·lules es van fer créixer directament a les plaques de 24 pous.

9. Incubació de cèl·lules i teixits amb protoxina-ε-GFP o amb toxina-ε-GFP i detecció per microscòpia de fluorescència.

Hem utilitzat un sistema de muntatge dels portaobjectes en carros per realitzar les incubacions (Sequenza™ Slide Rack and Coverplate™ system), evitant així la dessecació del teixit. Les incubacions s'han fet a les fosques per tal de no malmetre la fluorescència de la GFP.

Els portaobjectes amb les seccions de teixit es van deixar descongelar durant uns 10 min i es van rentar 3 cops amb PBS. Les unions inespecífiques es van bloquejar amb tampò

de bloqueig (veure solucions) durant 1h a TA. A continuació, es van incubar les mostres amb 300 nM de protoxina- ϵ -GFP (o toxina- ϵ -GFP) amb tampó d'incubació (veure apartat solucions) durant 1h a TA.

Les mostres es van rentar 3 cops amb PBS i es van incubar amb el marcador de nuclis TO-PRO-3 (Molecular Probes) diluït 1:1000 en PBS durant 7 min a TA. Seguidament, es van rentar 3 cops amb PBS i es van muntar amb medi de muntatge aquós (GEL/MOUNT TM, Biomedica corp.) per a la seva observació al microscopi de fluorescència.

Les preparacions van ser observades i fotografiades amb un microscopi confocal LEICA TCS-SL (spectral confocal) als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona al Campus de Bellvitge (CCiTUB). Per tal de comparar les diferents situacions experimentals, dins de cada experiment, es van mantenir els mateixos paràmetres a l'hora de captar les imatges.

En el cas de les cèl·lules MDCK crescudes en cobreobjectes i fixades, es va seguir el mateix protocol però utilitzant plaques de 24 pouets (TPP) per a les incubacions.

10. Estudis de citotoxicitat.

La citotoxicitat de les diferents construccions de la protoxina- ϵ o toxina- ϵ es va analitzar sobre cèl·lules MDCK. Aquestes es van fer créixer fins a un 80% de confluència i es van incubar amb les diferents construccions de toxina- ϵ i protoxina- ϵ a una concentració de 50 nM durant 1h a 37°C, ja que aquesta és la concentració en què es veuran diferències clares entre la citotoxicitat produïda per la protoxina- ϵ i la toxina- ϵ (Soler-Jover *et al.*, 2004). Es va comprovar la viabilitat dels cultius amb l'assaig de MTT (Sigma Aldrich M5655), afegint 0.5 mg/ml de MTT a cada pou i mantenint-ho durant 30 min a 37°C. La reacció es va aturar amb una solució d'isopropanol-HCl (veure apartat solucions) en un volum equivalent al volum de medi. Aquest assaig es basa en la capacitat de les cèl·lules vives de reduir el tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) a formazan, generant equivalents reduïts com NADH i NADPH. El formazan acumulat és de color porpra i es pot solubilitzar i quantificar per espectrofotometria. La quantitat generada és proporcional al nombre de cèl·lules vives.

Un cop el formazan acumulat s'ha dissolt completament, s'agafa una mostra de 100 μ l per mesurar-ne l'absorbància a 550 nm en una placa de 96 pouets en un lector de plaques (ASYS).

11. Immunofluorescència en fraccions sinaptosomals, cèl·lules i teixits.

Hem utilitzat immunofluorescència per detectar la toxina- ϵ i protoxina- ϵ a fraccions sinaptosomals, crioseccions de teixits i cèl·lules MDCK.

D'entrada les unions inespecífiques es van bloquejar amb tampó de bloqueig (veure apartat solucions) durant 1h a TA. Després es va incubar l'anticòs primari a les concentracions indicades a la Taula M-1, en tampó d'incubació (veure apartat solucions) durant la nit a 4°C.

Les mostres es van rentar 3 cops amb PBS i es van incubar amb l'anticòs secundari [anticossos contra immunoglobulines de ratolí o de conill conjugats amb fluorocroms Alexa 488 (verd) o Alexa 546 (vermell), Molecular Probes] en tampó d'incubació durant 1h a TA. Pels dobles marcatges, es va coincubar en aquest pas l'anticòs secundari amb la protoxina- ϵ -GFP o la toxina- ϵ -GFP durant 1h a TA.

Les mostres es van rentar 3 cops amb PBS, es van tenyir els nuclis i es van muntar les preparacions com ja s'ha descrit anteriorment.

Anticòs primari	Origen	Dilució òptima	Font
Anti-CD68	Rata	1:100	Serotec MCA1957GA, clon FA-11
Anti-F4/80	Rata	1:50	Serotec MCA497R, clon A3-1
Anti-Citoqueratina	Rata	1:100	DAKO N1590, clon AE1/AE3
Anti- PNA _d	Rata	1:50	BD Pharmingen 553863, clon MECA-79
Anti-CD11b	Rata	1:100	Serotec MCA711G, clon 5C6
Anti-GFAP	Conill	1:500	DAKO Z0334
Anti-MBP	Conill	1:300	SIGMA M3821
Anti-SNAP 25	Conill	1:100	Sèrum obtingut a partir d'SNAP25 recombinant (Binz et al., 1994)
Anti-GFP	Conill	1:100	Produït per nosaltres
Anti-S100 β	Conill	1:500	DakoCytomation Z0311
Anti-Iba 1	Conill	1:400	Wako 019-19741
Anti- ϵ -toxin	Conill	1:100	Produït per nosaltres
Anti-NG2	Conill	1:200	Millipore AB5320
Anti- α SMA	Conill	1:100	abcam ab5694
Anti-MAL	Conill	1:200	abcam ab15418
Anti-AQ4	Ratolí	1:500	abcam ab11026, clon 3D2
Anti-CD31	Ratolí	1:50	Chemicon MAB1393Z, clon MEC13.3
Anti-galectina 3	Ratolí	1:500	Affinity BioReagents MA1-940, clon A3A12
Anti-Anexina 2A	Ratolí	1:100	BD Transduction Laboratories 610068, clon 5
Anti-VAMP 2	Ratolí	1:300	SYSY 104211, clon 69.1
Anti-Neurofilament	Ratolí	1:100	Chemicon MAB5262, clon RT-97

Taula M-1. Taula de les característiques dels diferents anticossos utilitzats per immunofluorescència.

12. Incubació de cèl·lules i teixits amb lectines.

Es va seguir el mateix protocol per incubar lectines tant a crioseccions de teixit com a cèl·lules fixades.

Es van incubar les seccions (o les cèl·lules) amb PBS-BSA 1% durant 30 min a TA per tal de bloquejar les unions inespecífiques. A continuació, es van incubar les mostres amb PBS-BSA 1% durant 1h a TA amb les diferents lectines biotilades: *Datura stramonium* (DSA), *Canavalia ensiformis* (ConA), *Lycopersicum esculentum* (LT),

Arachis hypogaea (PNA), *Dolichos biflorus* (DBA), *Ulex europaeus* (UEA-1) i *Amaranthus caudatus* (ACA) (Taula M-2).

Les mostres es van rentar 3 cops amb PBS i es van incubar amb PBS-BSA 1% durant 1h a TA amb estreptavidina-Alexa 546 (1:500). Després de 3 rentats amb PBS, es van muntar com ja s'ha indicat anteriorment.

En el cas dels dobles marcatges amb la lectina i la protoxina- ϵ -GFP, després de la incubació amb la lectina i els corresponents rentats, es va coincubar la protoxina- ϵ -GFP a 300 nM amb l'estreptavidina-Alexa 546 i, finalment, es va rentar i muntar com està descrit anteriorment.

Lectina	Unió específica	Detecció	Concentració utilitzada ($\mu\text{g/ml}$)	Proveïdor
<i>Amaranthus caudatus</i> agglutinin (ACA)	Gal β 1-3GalNAc, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc	O-glycans	30	EY Laboratories
<i>Canavalia ensiformis</i> agglutinin (Con A)	α -Man, α -Glc, α -GlcNAc	N-glycans	20	SIGMA
<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin (DBA)	α -GalNAc	O-glycans	50	SIGMA
<i>Datura stramonium</i> agglutinin (DSA)	Gal β 1-4GlcNAc	N-glycans	10	Vector lab.
<i>Lycopersicon esculentum</i> agglutinin (LEA)	N-acetyl- β -D-glucosamine oligomers	N-glycans	10	SIGMA
<i>Arachis hypogaea</i> agglutinin (PNA)	Gal β 1-3GalNAc, α -Gal, β -Gal	O-glycans	50	SIGMA
<i>Ulex europaeus</i> agglutinin (UEA-1)	α -L-Fucose	N-glycans	10	SIGMA

Taula M-2. Taula de les característiques de les lectines utilitzades en les incubacions.

Estudis de la toxina- ϵ in vitro.

13. Tractaments a cèl·lules i teixits.

13.1. Tractament amb Pronasa E.

Es van utilitzar seccions de cerebel, ronyó, timus, múscul esquelètic, llengua i bufeta de ratolí i cobreobjectes de cèl·lules MDCK fixades.

Es van incubar amb diferents concentracions de Pronasa E (Sigma) (de 0.1 a 1 mg/ml) a 37°C durant diferents temps (5, 10, 30 i 60 min) en PBS 0.1 M. Després del tractament,

les mostres es van rentar amb PBS i es van incubar amb la protoxina- ϵ -GFP com ja s'ha indicat anteriorment.

Com a control de l'experiment es van incubar les seccions i les cèl·lules amb PBS 0.1 M en absència de Pronasa E durant els temps indicats en cada cas, i es va continuar amb el protocol esmentat més amunt.

13.2. Tractament amb detergents.

Es van utilitzar seccions de cerebel, ronyó, timus, bufeta i llengua de ratolí i sobreobjectes de cèl·lules MDCK fixades.

Les seccions es van tractar prèviament amb els següents detergents: Tritó X-100 (Sigma), nonidet p-40 (Sigma) i CHAPS (Boehringer Mannheim) a unes concentracions de 0.5% i 2% en PB-2 (veure apartat solucions) durant 1h a 4°C. En el cas del ronyó, cerebel i timus també es va utilitzar colat de sodi (Sigma) i deoxicolat de sodi (Sigma) a unes concentracions del 0.5 i del 2% en PB-2 durant 1h en 3 condicions de temperatura: 4°C, TA i 37°C.

Les cèl·lules MDCK es van tractar amb Tritó X-100, nonidet p-40, CHAPS, colat de sodi i deoxicolat de sodi a concentracions del 0.5% i del 2% en PB-2 durant 1h a 4°C, TA i 37°C.

Cada mostra es va rentar 3 cops amb PBS a 4°C, TA o 37°C segons la temperatura de pretractament utilitzada per tal d'eliminar l'excés de detergent. Seguidament, cada mostra es va incubar amb la protoxina- ϵ -GFP tal i com s'ha indicat anteriorment.

Com a control es van incubar les seccions i cèl·lules MDCK amb PB en absència de detergents durant 1h a 4°C, TA o 37°C.

13.3. Tractament amb N-glicosidasa F.

Es van utilitzar seccions de cerebel, ronyó, timus, bufeta i llengua de ratolí i sobreobjectes de cèl·lules MDCK fixades.

Les seccions es van incubar amb 10 U/ml de N-Glicosidasa F (Roche) a 37°C durant la nit en PB-2. En el cas de les seccions de ronyó també es van incubar amb 100 U/ml de N-Glicosidasa F a 37°C durant la nit en PB-2.

Les cèl·lules MDCK es van incubar amb 1, 10, 20 i 50 U/ml en PB-2 durant la nit a 37°C.

Després del tractament es van rentar les mostres amb PBS i es van incubar amb la protoxina-ε-GFP com ja s'ha indicat anteriorment.

Com a control de l'experiment es van incubar les seccions i les cèl·lules MDCK amb PB-2 en absència de N-Glicosidasa F.

13.4. β-eliminació.

Es van utilitzar seccions de ronyó i bufeta de ratolí, vaca, xai, cabra i humana i seccions de cerebel de ratolí i cobreobjectes de cèl·lules MDCK fixades.

Les seccions i les cèl·lules MDCK es van incubar amb 0.055 N de NaOH a 37°C durant diferents temps: 1h, 3h i durant la nit, i en el cas de les bufetes de vaca, xai i cabra fins a un màxim de 5 dies.

Es va aturar la reacció amb 0.055 N H₂SO₄ durant 30 seg. Es van rentar les mostres amb PBS i es van incubar amb la protoxina-ε-GFP com ja s'ha indicat anteriorment.

Com a control de l'experiment es van incubar les seccions i les cèl·lules MDCK amb aigua mQ en absència de NaOH.

14. Detecció de la protoxina-ε-GFP unida a cèl·lules MDCK mitjançant una tècnica d'ELISA.

Es van fer créixer les cèl·lules MDCK en plaques de 96 pouets (Techno Plastic Products, TPP, Switzerland) fins a la confluència, es van rentar 3 cops amb PBS, i es van fixar amb PFA al 4%. A continuació, les cèl·lules es van bloquejar amb PBS-BSA 3% durant 1h a TA.

Després de rentar amb PBS, les cèl·lules es van incubar amb concentracions creixents de protoxina-ε-GFP (0, 0.2, 0.4, 0.8, 2, 4, 8, 20, 40, 100 nM) en PBS-BSA 1% durant 1h a TA.

A continuació, les cèl·lules es van rentar 4 cops amb PBS i es van incubar amb l'anticòs policlonal anti-GFP a una dilució 1:1000 en PBS-BSA 1% durant 1h a TA i en agitació.

Després de rentar 4 cops amb PBS, les cèl·lules es van incubar amb immunoglobulines anti-conill conjugades amb la peroxidasa de rave (HRP) (DAKO, Glostrup, Denmark) a una dilució 1:1000 en PBS-BSA 1% durant 1h a TA.

Les cèl·lules es van rentar 4 cops i l'activitat peroxidasa es va revelar utilitzant una solució preparada amb pastilles d'*o*-Fenilendiamina dihidroclorur (SIGMAFASTTM OPD). L'absorbància es va mesurar amb l'espectrofotòmetre de plaques (ASYS) a una longitud d'ona de 450 nm.

Per eliminar les unions inespecífiques es van preincubar les cèl·lules amb un excés de protoxina- ϵ (freda) (2 μ M) durant 30 min abans d'afegir les concentracions creixents de protoxina- ϵ -GFP abans esmentades.

La unió específica es va calcular sostraint la unió inespecífica de la unió total.

Com a control negatiu, algunes cèl·lules es van incubar amb concentracions creixents de GFP en lloc de fer-ho amb protoxina- ϵ -GFP.

Els estàndards es van fer afegint diferents quantitats de protoxina- ϵ -GFP (0, 0.2, 0.4, 0.8, 2, 4, 8, 20, 40, 100 ng) a pouets buits durant 1h a TA. Després de rentar 3 cops amb PBS, els pouets es van tractar com s'ha descrit anteriorment però ometent les coincubacions amb protoxina- ϵ (freda) i protoxina- ϵ -GFP.

Els resultats es van ajustar a una anàlisi de regressió no-lineal utilitzant el programa informàtic Graph Pad Prism 3, on es va calcular la constant de dissociació (K_d) i el nombre màxim de llocs d'unió (B_{max}).

Per tal de calcular l'afinitat d'unió de la toxina- ϵ activa a les cèl·lules MDCK, es van realitzar experiments utilitzant la toxina- ϵ -GFP en comptes de la protoxina- ϵ -GFP, i per tal de calcular la unió inespecífica es van fer les coincubacions amb toxina- ϵ (freda). També es va realitzar el mateix experiment que s'ha explicat anteriorment amb la protoxina- ϵ -GFP però, en alguns casos, es va fer després d'un tractament de β -eliminació durant 6h a 37°C, i en altres casos, després d'haver tractat les cèl·lules amb l'1 i/o el 2% de colat de sodi durant 1h a 4°C. En tots els casos es va calcular la K_d i la B_{max} mitjançant el mateix programa informàtic.

15. Cross-linking i immunoprecipitació amb cèl·lules MDCK.

La línia cel·lular MDCK es va fer créixer en plaques de 10 cm de diàmetre fins a la confluència. Després de rentar les cèl·lules amb 5 ml de medi Ringer (veure apartat solucions), es van incubar amb protoxina- ϵ -GFP, toxina- ϵ -GFP, GST-protoxina- ϵ o GFP (com a control) en medi Ringer a una concentració de 100 nM durant 1h a TA.

Passat aquest temps, es van rentar les cèl·lules 3 cops amb PBS i es van incubar amb el cross-linker (DMS, DTSSP, DSS o ANB-NOS) (Pierce) a una concentració de 2 mM en medi Ringer durant 10 min a TA (veure figura M-4).

Els cross-linkers ANB-NOS (fotoactivable) i DSS no són solubles en aigua i, per tant, prèviament s'han de dissoldre amb un dissolvent orgànic com el DMSO. Els altres cross-linkers sí són solubles en aigua. En qualsevol cas, la concentració final de DMSO no va superar l'1%, concentració que no afecta els assaigs tal com van mostrar els controls pertinents.

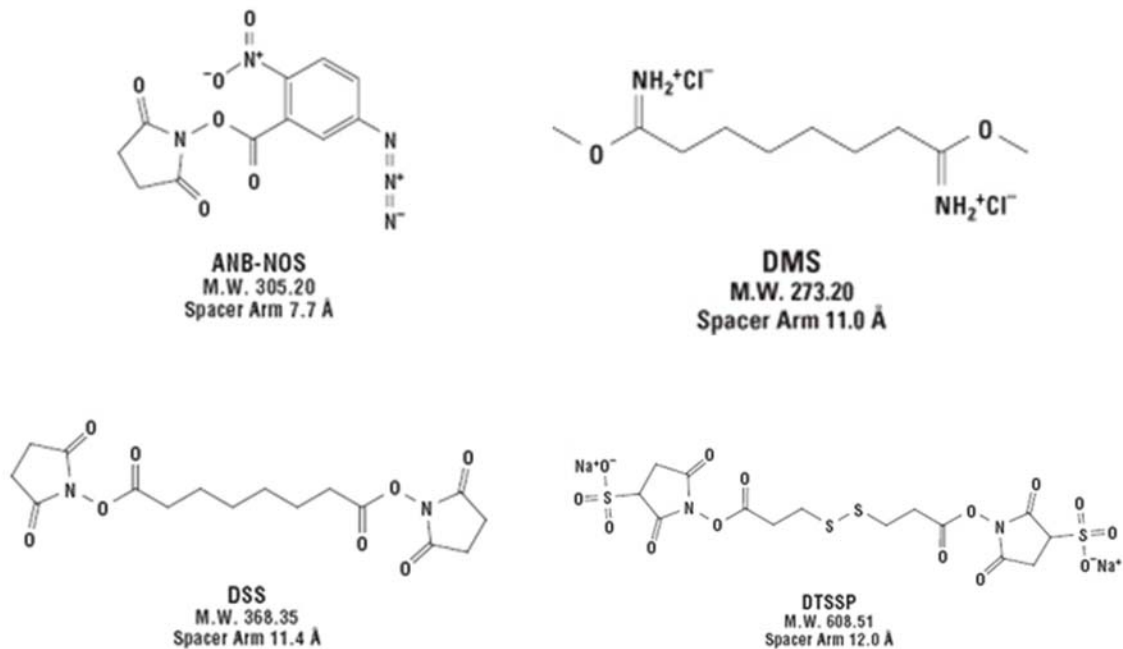


Figura M-4. Cross-linkers utilitzats. El cross-linker ANB-NOS és fotoactivable i s'ha d'utilitzar a les fosques fins que s'irradia amb llum UV a 360 nm i llavors la seva unió a les proteïnes esdevé irreversible. El cross-linker DTSSP es pot hidrolitzar mitjançant un agent reductor (s'observa al mig del seu braç un pont disulfur).

Materials i Mètodes

Seguidament es va saturar el cross-linker i es van inhibir les posteriors unions afegint NH_4Cl 50mM durant 10 min a TA.

Després de rentar 3 cops amb PBS, es van aixecar les cèl·lules amb 1 ml de PBS amb inhibidors de proteases (veure apartat solucions) i es va centrifugar la mostra a 14.000 rpm durant 5 min en una microcentrífuga Eppendorf 5417R.

A continuació es va afegir 50 μl de tampó de càrrega a cada pellet resultant i es va incubar a 95 °C durant 3 min.

Es va córrer la mostra en un gel d'acrilamida al 10% i es va transferir a una membrana de nitrocel·lulosa per fer un Western blot per tal de detectar la GFP.

En el cas de les immunoprecipitacions, el pellet es va incubar amb 0.5 ml de PBS-Tritó X-100 a l'1% durant 15 min a 4°C i en moviment per tal de solubilitzar les proteïnes, i es va centrifugar posteriorment a 14.000 rpm durant 5 min. El sobrenedant resultant es va incubar amb anticòs anti-GFP policlonal a una dilució de 1:2000 en tampó PBS-Tritó X-100 al 0.2% (per evitar que la part de membranes solubilitzades precipitessin) durant 1h a TA i en moviment.

A continuació, es va incubar amb 40 μl de suspensió de proteïna G-sefarosa (Protein G Sepharose, GE Healthcare) durant 1h a TA i es va centrifugar a 14.000 rpm durant 5 min.

Es va descartar el sobrenedant i es van rentar les boles 3 cops amb PBS-Tritó X-100 al 0.2%.

Es va afegir 40 μl de tampó de càrrega a les boles de proteïna G-sefarosa i es va incubar la mostra a 95°C durant 3 min (per separar i desnaturalitzar la proteïna unida a proteïna G-sefarosa).

A continuació es va córrer la mostra en un gel d'acrilamida al 10% i es va realitzar un Western blot amb l'anticòs policlonal anti-protòxina- ϵ a una dilució 1:2000.

En els casos en què es van incubar les cèl·lules amb GST-protòxina- ϵ , un cop aixecades les cèl·lules es van incubar amb 100 μl de boles magnètiques recobertes amb glutatió (MagneGSTTM Protein Purification System, Promega), prèviament equilibrades amb PBS, durant 1h a TA. Després, les boles es van rentar 3 cops amb PBS i s'hi va afegir tampó de càrrega per córrer un gel d'acrilamida al 10% i realitzar el mateix Western blot explicat anteriorment.

16. Elaboració de gels bidimensionals (SDS-PAGE 2D).

Després de fer els tractaments amb els cross-linkers (explicat en l'apartat anterior) i un cop obtingut el pellet de les cèl·lules MDCK, aquest es va tractar amb 30 µl de tampó de lisi per 2D (veure apartat solucions) durant 10 min a TA, i seguidament es va centrifugar a 20.000 x g durant 10 min. El sobrenedant resultant es va passar a un altre tub afegint 300 µl de tampó de lisi-2 per 2D (veure apartat solucions).

Es van rehidratar dues tires de gel d'acrilamida de 18 cm (ImmobilineTM DryStrip pH 3-10 NL, 18 cm, Amersham) amb els 330 µl del sobrenedant, durant la nit a TA i protegides de la dessecació cobrint-les amb oli mineral. Cada tira es va destinar a fer un gel, un per tinció de plata i l'altre per Western blot per detectar la toxina-ε.

Seguidament es va fer l'isoelectroenfoc de les tires (Ettan TPGPhor3 d'Amersham Biosciences) aplicant diferents voltatges. Tots el voltatges es van aplicar en la mateixa tira que havia estat en contacte amb la mostra: 50 V durant 8h, 250 V durant 1h, 500 V durant 1h, 1000 V durant 1h, 8000 V durant 7h i 50 V durant 5h.

Les tires es van tractar durant 10 min amb 2 ml de tampó d'equilibri amb DTT al 2% (veure apartat solucions), i a continuació es va treure el tampó amb DTT i es van incubar les tires durant 10 min amb 2 ml de tampó d'equilibri amb IAA al 2,5% (veure apartat solucions).

Finalment, es va treure el tampó amb IAA i es van deixar les tires amb 2 ml de tampó de transferència (veure apartat solucions).

Es van preparar dos gels de 20 x 16 cm d'acrilamida al 10% on es van col·locar les tires isoelectroenfocades, com a gel concentrador d'aquest nou gel, on se separen les proteïnes segons el seu pes molecular. Finalment es van córrer els gels a 50 V durant la nit.

17. Tinció amb nitrat de plata dels gels d'acrilamida.

Per realitzar la tinció amb nitrat de plata del gel d'acrilamida, es va incubar el gel amb una solució fixadora (metanol al 40% i àcid acètic al 10%) 2 cops durant 15 min.

A continuació es va tractar el gel amb la solució I (veure apartat solucions) durant 30 min i es van fer 5 rentats de 5 min amb aigua mQ.

A continuació, es va tractar amb la solució II (veure apartat solucions) durant 20 min, resguardat de la llum, i seguidament es van fer 2 rentats d' 1 min amb aigua mQ.

Seguidament, es va incubar el gel amb solució III (veure apartat solucions) on el temps d'incubació òptim per visualitzar la nostra marca va ser de 8 min.

Finalment, es va aturar la reacció traient la solució III i afegint la solució IV (veure apartat solucions) durant 10 min. Després el gel es va rentar 2 cops amb aigua mQ i es va deixar cobert amb aigua mQ a 4°C.

En el casos en què va interessar seqüenciar alguna banda, aquestes es van retallar i es van enviar a seqüenciar per MALDI-TOF als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB).

18. Assaig de secreció de glutamat en sinaptosomes aïllats de cervell de rata i ratolí.

Els sinaptosomes (terminals nerviosos aïllats) mantenen les seves propietats fisiològiques durant unes quantes hores. Si despolaritzem la membrana en presència de Ca^{2+} , aquest entra dins el sinaptosoma i estimula la fusió de vesícules sinàptiques amb la conseqüent alliberació de neurotransmissor, glutamat en el cas que ens interessa. L'alliberació de glutamat es pot mesurar en un fluorímetre gràcies a la reacció de la glutamat deshidrogenasa (GDH) que, en convertir el glutamat a α -cetoglutarat, redueix el NADP^+ a NADPH. L'aparició de NADPH pot ser mesurada en un espectrofluorímetre excitant a una longitud d'ona de 340 nm i mesurant la fluorescència emesa a 440 nm.

Per comprovar si la toxina- ϵ era capaç d'estimular la secreció de glutamat en sinaptosomes, tant de rata com de ratolí, es van utilitzar alíquotes de sinaptosomes de 500 μg de proteïna cada una (obtinguts segons s'explica en l'apartat 7 de materials i mètodes). Els sinaptosomes es van resuspendre en 500 μl de tampó de sodi i es van atemperar durant 15 min a 37°C. Després es van afegir 1500 μl de tampó de sodi preescalfat a 37°C i es van afegir els reactius necessaris per la mesura de l'alliberació de glutamat: 1 mM NADP^+ , 0.5 mM CaCl_2 i 60 U GDH.

La despolarització de la membrana dels sinaptosomes control es va fer amb una concentració final de KCl 50 mM, i es va mesurar l'aparició de NADPH en un

espectrofluorímetre Shimadzu RF-500 IPC durant 8 min, abans d'afegir una quantitat control de 10 nmols de glutamat com a estàndard. La quantitat de glutamat secretat es calcula comparant l'àrea sota la corba del pic control amb l'alliberada per la despolarització.

Per comprovar si la toxina- ϵ era capaç de despolaritzar per sí sola la membrana dels sinaptosomes, es va substituir el KCl per toxina- ϵ i es van provar dues concentracions finals diferents, una a 50 nM i l'altra a 100 nM i es va mesurar l'aparició de NADPH de la manera descrita.

19. Obtenció dels mutants de protoxina- ϵ -GFP.

Per a l'obtenció del DNA mutat vam reproduir al nostre laboratori els estudis descrits per Pelish i McClain, generant els dos mutants dominant negatius per la toxina- ϵ : Etx-I51C/A114C i Etx-V56C/F118C (Pelish i McClain, 2009). També vam produir un mutant Etx-H106P que és una toxina- ϵ inactiva (Oyston *et al.*,1998).

Partint del DNA plasmídic de la protoxina- ϵ -GFP, es van generar les mutacions mitjançant el kit de mutagènesi “*QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene)” utilitzant els encebadors indicats a la Taula M-3. L'amplificació de les mutacions es va fer per PCR segons un programa d' 1 cicle d' 1 min a 95°C seguit de 30 cicles d' 1 min a 95°C, 1 min a 55°C i 10 min finals a 65°C.

El producte de la PCR es va digerir utilitzant 1 μ l de l'enzim de restricció *Dpn* I (proporcionat pel kit) durant 1h a 37°C, que digereix el DNA metilat i hemimetilat de la cadena mare.

Amb el DNA mutat obtingut, de cadena simple, es va transformar cèl·lules ultracompetents XL10-Gold per produir la cadena doble. La transformació es va dur a terme per shock tèrmic (30 seg a 42°C).

Els bacteris transformats es van seleccionar en plaques de medi LB suplementat amb ampicil·lina (50 μ g/ml).

Mutants	Encebadors
Etx-I51C/A114C (Mutant 1)	5' AGGAAATGATTTTTATTGTAATAATCCTAAAGTTG 3' 5' GGGAACTTCGATACAATGTACTGCTAAGTTTACTG 3'
Etx-V56C/F118C (Mutant 2)	5' TATTAATAATCCTAAATGTGAATTAGATGGAGAAC 3' 5' ACAAGCAACTGCTAAGTGTACTGTTCCCTTTAATG 3'
Etx-H106P (Mutant 3)	5' AACTGCAACTACTACTCCTACTGTGGGAACTTCGA 3'

Taula M-3. Encebadors utilitzats per fer les mutacions de la protoxina-ε-GFP.

De les colònies crescudes en les plaques es van seleccionar cinc i es va extreure el DNA amb QIAprep[®] Spin Miniprep kit (Qiagen), i es van seqüenciar (Sistemas Genòmicos, València).

Finalment es va transformar bacteris de la soca BL21(DE3)pLys (Rosetta) amb el DNA mutat per a la producció de la proteïna.

20. Obtenció de la construcció 6xHis-protocina-ε.

Es va insertar la cua d'histidines en pauta de lectura a la part amino terminal de la protoxina-ε, per tal de no perdre-la en el cas de tractar la protoxina-ε amb tripsina per a l'obtenció de la toxina activa.

Es van dissenyar els oligonucleòtids específics (D: directe i I: invers) que codifiquen per una cua de 6 histidines. Els extrems dels oligonucleòtids contenen els nucleòtids corresponents a les seqüències de tall dels enzims de restricció adjacents per digerir el vector pGEX-4T (que té prèviament insertat el DNA de la protoxina-ε en pauta de lectura amb la GST) tal i com es representa en el quadre següent (veure també la figura M-1, on la inserció de la cua d'histidines seria semblant al de la GFP, ja que ambdós casos es tallen amb els mateixos enzims de restricció).

Oligonucleòtids	Enzims restricció
D: 5' CGCGGATCCCATCATCACCATCACCACGAATTCCGC 3'	5': Bam <i>H</i> I
I: 5' GCGGAATTCGTGGTGATGGTGATGATGGGATCCGCG 3'	3': Eco <i>R</i> I

Per generar les dobles cadenes dels oligonucleòtids es van incubar concentracions equimolars de cada oligonucleòtid (200 μ M) en tampó d'unió per oligonucleòtids (veure solucions) a 95°C durant 4 min, i a continuació es va deixar refredar la mescla durant 20 min a TA. Es va digerir amb els enzims de restricció adients i es va eliminar l'excés d'enzim de restricció i impureses mitjançant el protocol de "desalting" per fragments <100 pb, de QIAEX II Gel extraction kit (QIAGEN).

Per altra banda, es va digerir el vector p-GEX-4T amb els mateixos enzims de restricció i es va córrer un gel d'agarosa 1%, la banda del vector digerit es va retallar i es va eluir de l'agarosa mitjançant el kit de purificació de DNA QIAEXII (QIAGEN).

Seguidament, es va fer la lligació del vector (200 ng) amb l'oligonucleòtid de doble cadena (1 μ g) en presència de l'enzim T4 DNA Lligasa (Fermentas) en el tampó del propi enzim, durant 1h a 22°C.

Amb el producte resultant es van transformar bacteris competents de la soca XL-1 Blue d'*E. coli* igual que es va fer en el cas de les cèl·lules ultracompetents XL10-Gold comentades en l'apartat anterior.

Les colònies obtingudes es van fer créixer en 3 ml de medi LB i es va obtenir el seu DNA plasmídic amb el kit de mini-preps de QIAGEN. Un cop identificades les colònies positives, se'n van fer stocks glicerinat i es van guardar a -80°C. Amb el DNA es van transformar bacteris de la soca BL21(DE3)pLys (Rosetta) per a la producció de proteïnes tal i com està explicat anteriorment.

20.1. Cross-linking amb 6xHis-protòxina- ϵ i 6xHis-toxina- ϵ a cèl·lules MDCK.

La línia cel·lular MDCK es va fer créixer en plaques de 10 cm de diàmetre fins a la confluència. Les cèl·lules es van incubar amb 6xHis-protòxina- ϵ i 6xHis-toxina- ϵ a una concentració de 50 nM en 4 ml del mateix medi durant 20 min a 37°C, ja que aquestes són les condicions suficients per a que la toxina- ϵ oligomeritzi (Petit *et al.*, 1997).

Després de rentar les cèl·lules 2 cops amb PBS, es van incubar amb el cross-linker DMS (tal i com està explicat en l'apartat 15 de materials i mètodes).

Les cèl·lules es van rentar 3 cops amb PBS, amb inhibidors de proteases, i es van aixecar amb 150 µl del mateix tampó. A continuació es van centrifugar a 600 x g per separar els nuclis, i el sobrenedant resultant es va centrifugar a 100.000 x g per tal d'obtenir en el pellet les membranes plasmàtiques.

El pellet es va solubilitzar amb 100 µl de tampó de solubilització (veure apartat solucions) durant 1h a 25°C i es va centrifugar a 100.000 x g durant 30 min a 4°C. El sobrenedant es va incubar durant 30 min amb 15 µl de boles de reïna (IMAC) acomplexades amb cobalt (Metal Affinity Resin, TALON[®]), que tenen una alta afinitat per unir-se a histidines. A continuació, les boles es van rentar 3 cops amb PBS i es va afegir tampó de càrrega. Les mostres es van córrer en dos gels d'acrilamida de 16 x 20 cm al 8%, un dels quals es va tenyir amb plata i l'altre es va transferir per realitzar un Western blot per detectar la toxina-ε (tal i com està explicat anteriorment).

Estudis *in vivo*.

21. Estudis *in vivo* amb protoxina-ε-GFP o amb toxina-ε-GFP en un model murí.

El protocol experimental utilitzat ha estat aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la UB (tal i com s'explica en l'apartat 6.1 de materials i mètodes).

Es van utilitzar en cada condició 5 ratolins mascles OF1 Swiss de 20 g. La toxina-ε-GFP o la protoxina-ε-GFP (en PBS amb BSA al 1%) es van injectar intravenosament per la vena caudal a una dosi de 2.5 µg/g de ratolí. Tots els animals injectats amb la toxina-ε-GFP van acabar morint als 7 min, i els animals injectats tant amb protoxina-ε-GFP com amb GFP sola es van sacrificar després de transcorrer el mateix temps. En alguns experiments els ratolins es van coinjectar amb la toxina-ε-GFP (o protoxina-ε-GFP) conjuntament amb 200 µg de BSA-Alexa 647. En altres casos, els ratolins es van injectar simultàniament amb protoxina-ε i protoxina-ε-GFP o toxina-ε-GFP (10:1 relació molar). Finalment, alguns animals es van coinjectar amb toxina-ε i GFP.

Altres experiments es van realitzar amb l'injecció dels diferents mutants (Etx-I51C/A114C, Etx-V56C/F118C i Etx-H106P) conjuntament amb 200 µg de BSA-Alexa 647.

En tots els casos, es van extreure els ronyons i cervell, es van fixar amb PFA al 4%, es van submergir posteriorment amb sacarosa al 30% i es van tallar amb el criòstat. Alguns talls es van muntar immediatament i es van observar pel microscopi confocal. Altres talls, com els de cervell, es van utilitzar per fer estudis d'immunofluorescència. En aquests casos, les unions inespecífiques es van bloquejar incubant els talls amb tampó de bloqueig (veure apartat solucions) durant 1h a TA. Seguidament, es va incubar durant la nit a 4°C en tampó d'incubació (veure apartat de solucions) amb anticòs primari anti-GFAP per marcar els astròcits, amb anti-SMA per marcar pericits (Taula M-1) o amb lectina de tomàquet biotinitada (LEA) per marcar la micròglia (Taula M-2). Finalment es va incubar amb l'anticòs secundari corresponent o amb estreptavidina-Alexa 546 en el cas de la lectina biotinitada. Les preparacions es van muntar i es van observar al microscopi confocal LEICA TCS-SL (spectral confocal) als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona al Campus de Bellvitge (CCiTUB).

22. Solucions.

Gel Concentrador:

Es prepara en H₂O mQ:

- 4% acrilamida/bisacrilamida
- Tampó concentrador al 25% (veure solucions)
- 0.1% N,N,N',N'-tetra-metil-etilendiamina (TEMED)
- 0.2% persulfat d'amoni

Gel Separador:

Es prepara en H₂O mQ:

- 8-12% acrilamida/bisacrilamida
- Tampó separador al 25% (veure solucions)
- 0.1% TEMED
- 0.1% persulfat d'amoni

Gradients de Ficoll:

- 5%, 9% i 12% (p/v) de Ficoll en 320 mM de sacarosa
- 5 mM Hepes/NaOH pH 7.4

Medi Luria-Bertani (LB) agar:

- 10% triptona
- 5% extracte de llevat
- 10% NaCl pH 7.0

Medi NZY⁺:

- 1g de NZ amine (hidrolisat de caseina)
- 0.5 g d'extracte de llevat
- 0.5 g de NaCl pH 7.5
- 100 ml amb aigua mQ i s'autoclava.

A aquesta solució se li afegeix, prèviament al seu ús, els següents suplementes esterilitzats:

- 1.25 ml d' 1M MgCl₂
- 1.25 ml d' 1 M MgSO₄
- 2 ml de glucosa 20% (p/v)

Medi Ringer (pH 7.4 i 290 mOsm):

- 130 mM NaCl
- 2.7 mM KCl
- 2 mM MgCl₂
- 10 mM Hepes
- 1 mM CaCl₂
- 10 mM glucosa

Paraformaldehid al 4%:

Es prepara en H₂O mQ:

- 25% de paraformaldehid stock al 16%
- PB 0.1 M pH 7.4.
- Filtrar i guardar a TA.

Paraformaldehid al 16%:

Per preparar 1l de paraformaldehid al 16%, es barregen 160 g de paraformaldehid en pols (Fluka) en 600 ml d'aigua mQ a 60-65°C. A continuació, s'afegeix a poc a poc NaOH 10M i es deixa agitant fins que la solució es torni transparent.

S'enrasa fins a 1l amb aigua mQ, es filtra, s'aliqota i es guarda a -20°C.

PBS 0.1M:

Es prepara en H₂O mQ:

- 120 mM NaCl
- PB 0.1M.

Solució de bloqueig per Western blot:

- 5 % de llet en pols desnatada
- TBS 1x (veure solucions).

Solució tenyidora Coomassie:

Es prepara en H₂O mQ:

- 25% d'isopropanol
- 10% d'àcid acètic
- 0.15% (p/v) de colorant Coomassie brilliant blue R250

Solució de Bradford:

Es prepara en H₂O mQ:

- 0.012% (p/v) de Coomassie brillant G250 (Sigma)
- 6% (v/v) d'etanol al 95%
- 12% (v/v) d'àcid fosfòric al 85%

S'agita molt bé, es filtra i es guarda a TA.

Solució destenyidora turbo:

Es prepara en H₂O mQ:

- 25% d'isopropanol
- 10% d'àcid acètic.

Solució per l'ECL:

La solució de l'ECL està formada per la mescla de dos reactius: el reactiu A i el reactiu B en una proporció 1:1.

- Reactiu A: Tris 100 mM pH 8.5, 0.5% àcid cumàric i 1% Luminol.
- Reactiu B: Tris 100 mM pH 8.5, 0.06% H₂O₂ al 30%.

Solució d'isopropanol-HCL:

Es prepara en H₂O mQ:

- 45% d'isopropanol
- 1.85% d'HCl
- 5% Tritó X-100

Solució de poli-L-lisina (per polilisinar els portaobjectes):

Es prepara una solució al 50% de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) en aigua mQ.

Tampó de bloqueig per immunofluorescència:

Es prepara en PBS:

- Gelatina 0.2%
- NGS 20%

Tampó concentrador:

0.5 M Tris-HCl a pH 6.8.

Tampó d'electrodes 10x:

Es prepara en H₂O mQ:

- 1.92M de Glicina
- 0.25M de Tris
- 1% de SDS

Tampó equilibri IAA 2.5%:

Es prepara en H₂O mQ:

- Urea 6M
- Tris-HCl 375 mM, pH 8.8
- SDS 2%
- Glicerol 20%
- IAA 2.5% (p/v)

Tampó equilibri DTT 2%:

Es prepara en H₂O mQ:

- Urea 6M
- Tris-HCl 375 mM, pH 8.8
- SDS 2%
- Glicerol 20%
- DTT 2% (p/v)

Tampó fosfat 0.2 M (PB 0.2M):

El tampó fosfat està format per una mescla de dos solucions A i B en una relació A/B: 19/81 i portat a un pH de 7.4.

- Solució A (àcida): 0.2 M fosfat sòdic monobàsic (NaH₂PO₄).
- Solució B (bàsica): 0.2 M fosfat sòdic dibàsic (Na₂HPO₄).

Tampó fosfat-1 (PB-1):

Es prepara en H₂O mQ:

- PB 20 mM
- NaCl 250 mM
- pH 7.5

Tampó fosfat-2 (PB-2):

Es prepara en H₂O mQ:

- PB 20 mM
- EDTA 10 mM
- pH 7.2

Tampó fosfat salí (PBS):

Es prepara en H₂O mQ:

- 10 mM PB
- 150 mM NaCl
- 2.7 mM KCl

Tampó fosfat salí (PBS) amb inhibidors de proteases:

Es prepara en PBS:

- 0.1 mg/ml de phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)
- 1 μ M d'EGTA
- 10 μ g/ml de leupeptina
- 10 μ g/ml d'aprotinina

Tampó d'incubació per immunofluorescència:

Es prepara en PBS:

- Gelatina 0.2%
- NGS 1%

Tampó de lisi per a gels bidimensionals:

Es prepara en H₂O mQ:

- Tris 40 mM
- Urea 7M
- Tiourea 2M
- Chaps 4%

Tampó de lisi 2 per a gels bidimensionals:

Es prepara en H₂O mQ:

- Tris 40 mM
- Urea 7M
- Tiourea 2M
- Chaps 4%
- Tributíl fosfina 2 mM (TBP) (ReadyPrepTM TBP Reducing Buffer, Bio-Rad)
- Amfòlits 0.2% (Bio-Lyte 3/10, Bio-Rad)
- 2% de blau de bromofenol al 0.1%

Tampó de mostres:

Es prepara en H₂O mQ:

- 120 mM de Tris a pH 6.8
- 40% (v/v) de SDS al 10%
- 20% de glicerol
- 0.004% de Blau de bromofenol

Tampó separador:

Es prepara en H₂O mQ:

- 1.5 M Tris-HCl a pH 8.8
- 0.1% SDS

Tampó de sodi:

Es prepara en H₂O mQ:

- Hepes/NaOH 20 mM, pH 7.4
- Glucosa 10 mM
- KCl 5 mM
- NaCl 140 mM
- NaHCO₃ 5 mM
- MgCl₂ 1 mM
- Na₂HPO₄ 1.2 mM

Tampó de solubilització:

Es prepara en PBS:

- 8M urea
- 1% de Tritó X-100
- Inhibidors de proteases (veure solucions)

Tampó de Tris Salí (TBS):

Es prepara en H₂O mQ i s'ajusta a pH 7.4:

- 10 mM de Tris
- 140 mM de NaCl
- 1% de Tween-20

Tampó de transferència 10x:

Es prepara en H₂O mQ:

- 1.92M de Glicina
- 0.25M de Tris

Per preparar tampó de transferència 1x es fa una dilució 1/10 d'aquest tampó i s'afegeix 20% de metanol.

Tampó d'unió per oligonucleòtids:

- 25 mM Tris-HCl
- 5 mM MgCl₂
- 50 mM NaCl.

Tinció amb nitrat de plata:

Per fer la tinció dels gels d'acrilamida amb nitrat de plata es va utilitzar un kit per tenyir les proteïnes (Silver Staining kit, Protein, Amersham).

- Solució I: 30% de metanol, 5 ml de tiosulfat de sodi (solució preparada al kit al 5%), 8.5 g d'acetat sòdic i es porta a un volum de 125 ml amb aigua mQ.
- Solució II: 12.5 ml solució de plata (solució preparada al kit al 2.5 %) i es porta a un volum de 125 ml amb aigua mQ.
- Solució III: 3.12 g de carbonat de sodi, 50 µl de formaldehid (s'afegeix a l'últim moment) i es porta a un volum final de 125 ml d'aigua mQ.
- Solució IV: 1.82 g d'EDTA Na₂·2H₂O i s'ajusta a un volum de 125 ml d'aigua mQ.

RESULTATS

A- Obtenció de les toxines recombinants i caracterització de la seva unió a diferents òrgans, teixits i cèl·lules MDCK.

1. Titulació dels anticossos policlonals obtinguts dels conills immunitzats amb la protoxina-ε.

Per tal de titular els anticossos contra la protoxina-ε generats als conills es van dur a terme experiments de dot blot amb diferents concentracions de protoxina-ε.

Es demostra que els anticossos obtinguts dels conills immunitzats són aptes per realitzar estudis de Western blot i detectar la protoxina-ε o la toxina-ε. Els sèrums diluïts 1:1000 detecten entre 1 i 2 ng de protoxina-ε (Figura R1).

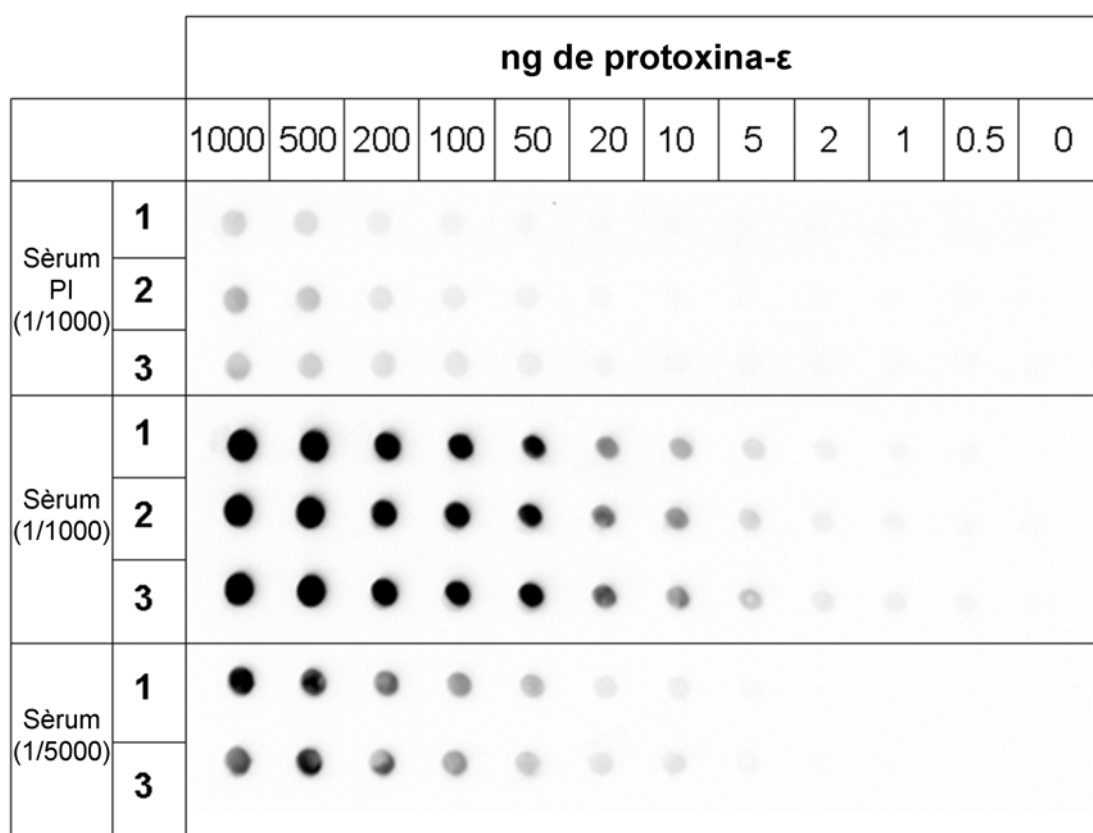


Figura R1. Dot blot on les tres primeres fileres corresponen a sèrums preimmunes (PI), les tres següents a sèrums diluïts 1:1000 i les dues del final a la dilució 1:5000. S'observa com el sèrum diluït 1:1000 (filera central) detecta entre 1 i 2 ng de la protoxina-ε.

2. Caracterització de les diferents formes recombinants de la toxina- ϵ .

2.1. Anàlisi de les toxines recombinants en gels d'acrilamida.

Vàrem córrer en paral·lel dos gels d'acrilamida al 12% amb les proteïnes de fusió: protoxina- ϵ , protoxina- ϵ -GFP, GST-protoxina- ϵ , GST-protoxina- ϵ -GFP, i les respectives formes activades amb tripsina. Un gel es va tenyir amb Coomassie Blue i l'altre es va transferir a una membrana de nitrocel·lulosa per fer Western blot.

Abans de tenyir amb Coomassie les proteïnes de fusió amb GFP varen ser visualitzades i fotografiades amb llum UV (Figura R2, A).

Els Western blots amb anticossos contra GFP (Figura R2, B) i protoxina- ϵ (Figura R2, D), així com el gel tenyit amb Coomassie Blue (Figura R2, C) van permetre identificar els pesos moleculars de les diferents proteïnes obtingudes: 61 kDa la protoxina- ϵ -GFP, 33 kDa la protoxina- ϵ , 90 kDa la GST-protoxina- ϵ -GFP, 62 kDa la GST-protoxina- ϵ , 59 kDa la toxina- ϵ -GFP (asterisc vermell, Figura R2, C) i 30 kDa la toxina- ϵ (asterisc negre, Figura R2, C).

En el cas de la **protoxina- ϵ -GFP** obtenim una petita banda per sobre dels 61 kDa (fletxa vermella, Figura R2, C) i en la **GST-protoxina- ϵ -GFP** obtenim una altra per sobre dels 90 kDa (fletxa negra, Figura R2, C). No tenim identificades aquestes bandes, que no es detecten a l'irradiar amb llum UV (Figura R2, A), però que sí s'hi detecten al revelar tant amb anti-toxina- ϵ com amb anti-GFP policlonals produïts al nostre laboratori. Es pensa que pot tractar-se d'una contaminació amb proteïna bacteriana.

De les digestions realitzades amb tripsina, per tal d'activar la toxina, varen donar una petita banda adicional de baix pes molecular que podria correspondre a la GST o a un fragment d'aquesta (triangle negre i vermell, Figura R2, C) ja que no s'identifiquen amb cap dels anticossos utilitzats, anti-GFP i anti-protoxina- ϵ .

Les mateixes membranes es van incubar amb anti-GFP monoclonal detectant-se només les bandes que corresponen a 61 i 90 kDa, respectivament (imatge no mostrada), reforçant la idea que aquestes bandes més fines que s'observen corresponen a una contaminació de proteïna bacteriana.

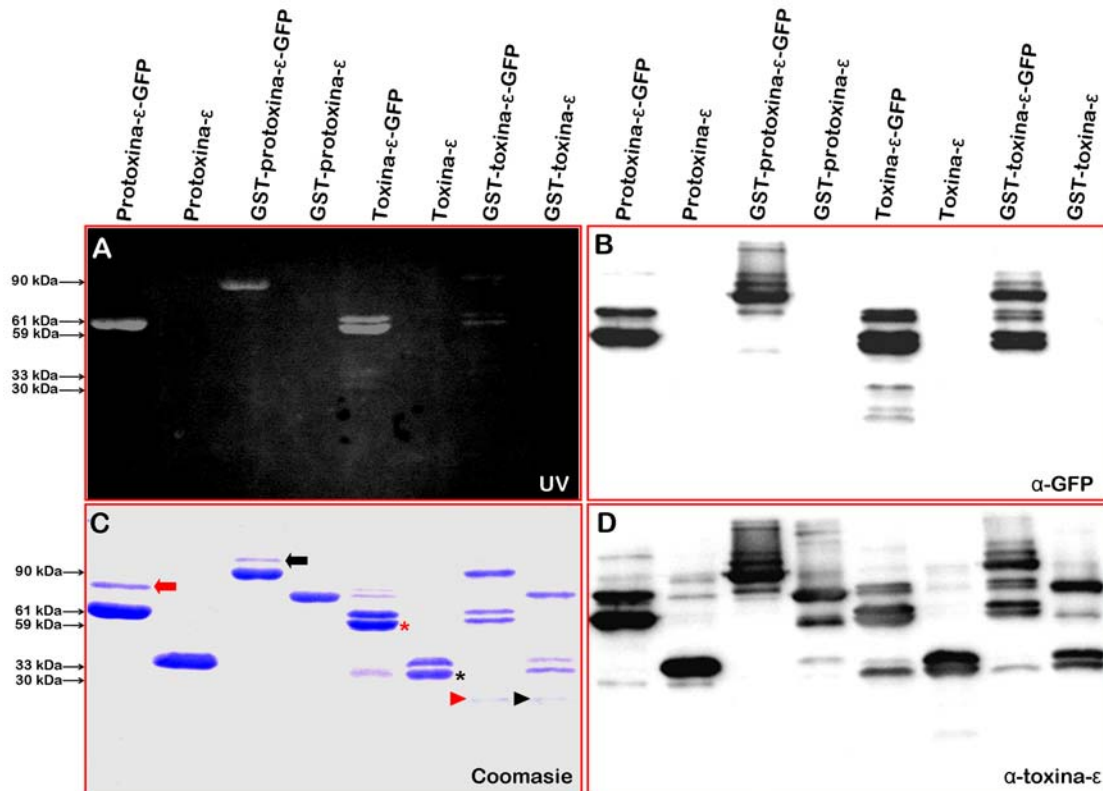
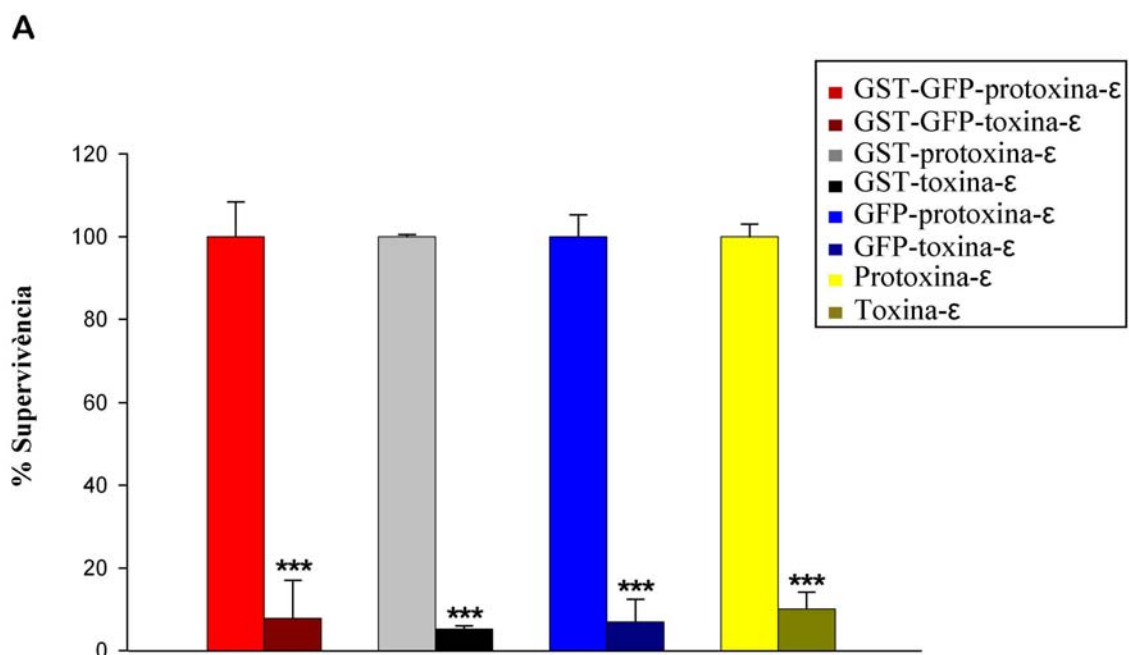


Figura R2. A) Fotografia del gel d'acrilamida a l'aplicar llum ultraviolat en el transil·luminador (UV) on s'indiquen els diferents pesos moleculars de les proteïnes i s'observa la fluorescència de la protoxina-ε-GFP, toxina-ε-GFP i GST-prototoxina-ε-GFP. B) Western blot amb l'anticòs contra la GFP (α-GFP) on s'observa el mateix resultat. C) Fotografia del gel d'acrilamida tenyit amb Coomassie Blue (Coomassie) on s'indiquen els diferents pesos moleculars de les proteïnes. Les fletxes corresponen a petites contaminacions de proteïnes bacterianes tant en el cas de protoxina-ε-GFP com de GST-prototoxina-ε-GFP. Els asteriscs corresponen a la toxina-ε activa tant en el cas de toxina-ε-GFP com de toxina-ε. Els triangles corresponen a la GST hidrolitzada o a un fragment d'aquesta per l'efecte de la tripsina. D) Western blots amb l'anticòs contra la protoxina-ε i la toxina-ε (α-toxina-ε) on s'observen els mateixos resultats.

2.2. Estudis de citotoxicitat de les toxines recombinants en cèl·lules MDCK.

Es van incubar les cèl·lules MDCK amb protoxina-ε, protoxina-ε-GFP, GST-prototoxina-ε, GST-prototoxina-ε-GFP, toxina-ε, toxina-ε-GFP, GST-toxina-ε i GST-toxina-ε-GFP a una concentració de 50 nM. La figura R3 mostra els resultats de supervivència de les cèl·lules tractades obtinguts mitjançant un assaig MTT.

En tots els casos, vàrem detectar diferències significatives entre els tractaments amb protoxina-ε i toxina-ε. Mentre que la supervivència en presència de protoxina-ε va ser del 100%, en el cas de la toxina-ε només va ser entre el 5 i el 10%.



B

Proteïna	% Supervivència
GST-GFP-protòxina-ε	100 ± 8.4
GST-GFP-toxina-ε	7.98 ± 9.2
GST-protòxina-ε	100 ± 0.47
GST-toxina-ε	5.18 ± 0.86
GFP-protòxina-ε	100 ± 5.3
GFP-toxina-ε	6.96 ± 5.52
Protòxina-ε	100 ± 2.98
Toxina-ε	10.11 ± 4.05

Figura R3. Assaig de supervivència MTT en cèl·lules MDCK. A) Histograma on es mostra la supervivència de les cèl·lules MDCK després de ser tractades amb les diferents proteïnes recombinants de protòxina o toxina-ε a una concentració de 50 nM durant 1h a 37°C. S'observa diferències significatives (***) p<0.001 entre els tractats amb toxina-ε i amb protòxina-ε. B) Taula on es mostren els valors numèrics de l'experiment.

3. Caracterització de la unió de la toxina-ε a teixits i cèl·lules.

Per tal de caracteritzar la unió de la toxina-ε a diferents òrgans i teixits de ratolí vàrem incubar seccions histològiques, obtingudes al criòstat, amb protoxina-ε-GFP.

Estudis previs del nostre laboratori van revelar que la toxina-ε-GFP injectada i.v a ratolí s'acumulava en gran part als ronyons, on hi produeix greus alteracions, incloent hemorràgia medul·lar i degeneració selectiva dels túbuls distals, unint-se específicament a la part luminal d'aquests. També es va demostrar que la protoxina-ε i la toxina-ε tenen el mateix lloc d'unió, podent-se utilitzar la protoxina-ε, no tòxica, per a la caracterització de la unió de la toxina. A més, incubacions de la toxina-ε-GFP sobre seccions de ronyó van revelar unió específica a l'epiteli de revestiment dels túbuls distals, coincidint amb el patró dels experiments *in vivo*. El mateix patró d'unió es va confirmar en d'altres espècies animals (Soler-Jover *et al.*, 2004).

En aquest apartat s'amplia l'estudi de l'unió de la toxina-ε al sistema renal així com la seva unió específica a l'epiteli de transició de la bufeta, urèters i uretra i es mostren les constants d'afinitat de la unió de la toxina a la línia cel·lular MDCK. Finalment, es mostren els estudis realitzats en el sistema nerviós on demostrem que la protoxina-ε-GFP s'uneix a estructures mielíniques tant a SNC com a SNP (Dorca-Arévalo *et al.*, 2008).

ÒRGAN/TEIXIT	ESTRUCTURA	INTENSITAT UNIÓ
Ronyó	Túbuls distals	+++
Ureter	Epitel·li de revestiment (Uroteli)	++
Bufeta	Epitel·li de revestiment (Uroteli)	+++
Uretra	Epitel·li de revestiment (Uroteli)	++
Cerebel (SNC)	Substància blanca (mielina)	+++
Medul·la espinal (SNC)	Substància blanca (mielina)	+++
Múscul cuixa (SNP)	Nèrvi (mielina)	+++
Glàndules salivals	Conductes excretors	+
Timus	(No identificat)	++

Taula R1. Taula on es mostren els diferents òrgans i teixits de ratolí als que s'uneix la toxina-ε. La intensitat d'unió es representa segons la simbologia:

+++ : intensitat elevada, ++ : intensitat mitja, + : intensitat baixa

3.1. Estudi de la unió de la toxina-ε a sistema renal de ratolí i d'altres espècies.

En el present treball hem volgut caracteritzar de manera precisa la unió de la toxina-ε a ronyó i identificar la possible unió de la toxina-ε a altres estructures del sistema renal.

La figura R4 mostra la unió de la toxina-ε a l'epiteli de revestiment dels túbuls distals (A), de la bufeta (B), del urèter (C) i de la uretra (D).

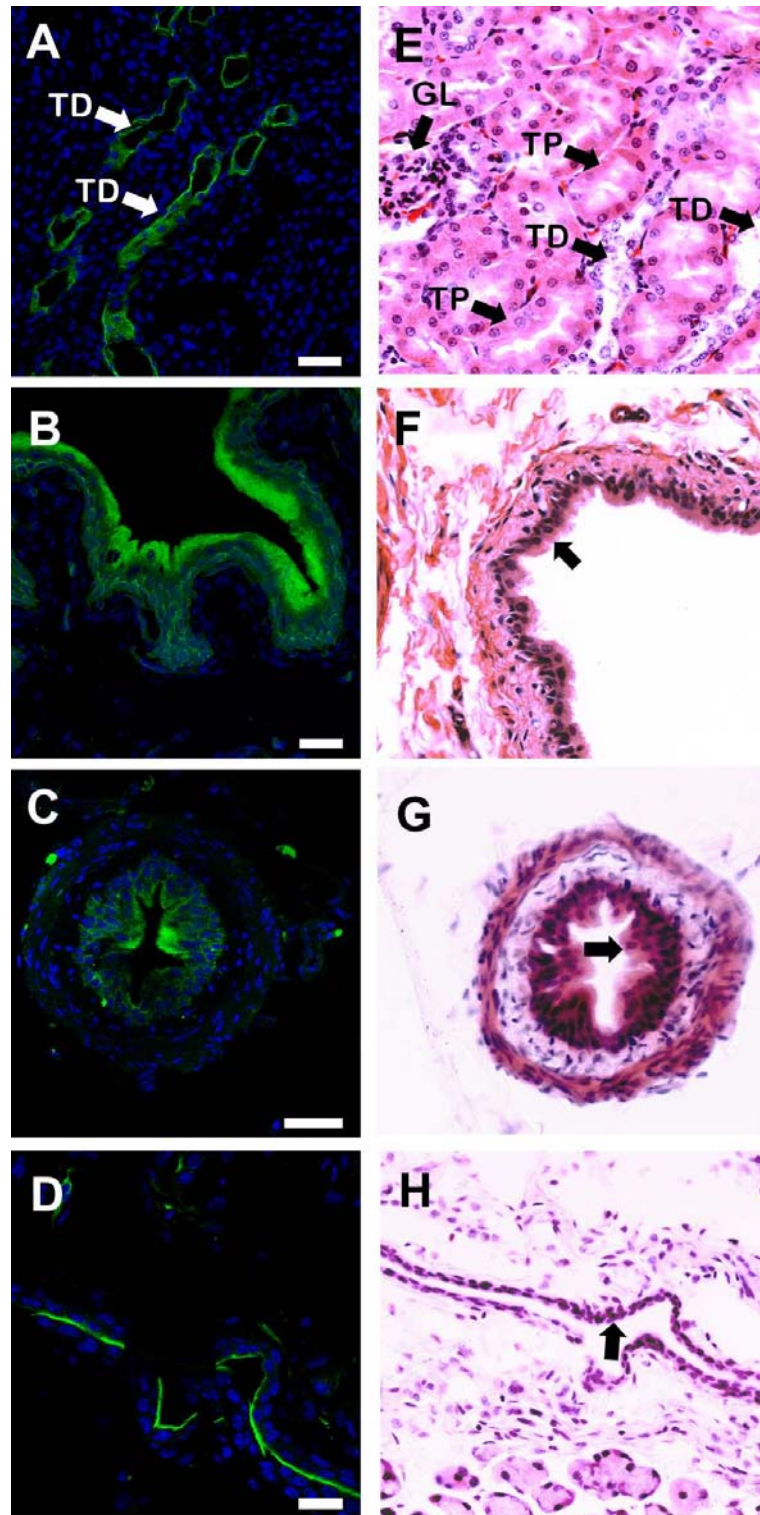


Figura R4. Unió de la protoxina-ε-GFP a diferents òrgans i teixits del sistema urinari de ratolí. La columna de l'esquerra correspon a fotografies de microscòpia de fluorescència confocal, on s'identifica en verd la protoxina-ε-GFP i en blau els nuclis cel·lulars del ronyó (A), bufeta (B), urèter (C) i uretra (D). Es localitza marca fluorescent associada a l'epiteli de revestiment dels túbuls distals del ronyó (TD, A), de la bufeta (B), de l'urèter (C) i de la uretra (D). La columna de la dreta correspon a fotografies de microscòpia de camp clar de seccions dels mateixos teixits, tenyits amb hematoxilina-eosina (E: ronyó, F: bufeta, G: urèter i H: uretra). Les barres corresponen a 40 μm (imatges A, B i C), i a 20 μm (imatge D). TD: Túbul distal; GL: Glomèrul i TP: Túbul proximal. Les fletxes negres de les imatges F, G i H marquen l'uroteli de la bufeta, urèter i uretra, respectivament.

Resultats

Per estudiar més a fons els tipus de túbuls als que s'està unint la toxina-ε vàrem utilitzar lectines, proteïnes que s'uneixen amb alta especificitat a glúcids.

Als éssers vius es troba una gran diversitat de glúcids, tant a cèl·lules procariotes com eucariotes, i en ambdós casos els glúcids poden ser del tipus O-glicans o N-glicans.

En els vertebrats, els N-glicans són oligosacàrids que s'uneixen mitjançant una N-acetilglucosamina a un residu d'asparragina que forma part d'una seqüència consens del tipus : Asn-Xaa-Ser/Thr. Els O-glicans són oligosacàrids que s'uneixen mitjançant una N-acetilgalactosamina a un residu de serina/treonina (Varki *et al.*, 1999).

La següent taula resumeix la unió de les diverses lectines en els túbuls renals de ronyó de ratolí i la unió de la toxina-ε (Taula R2). Les incubacions demostren que la unió de la toxina-ε es realitza a l'epiteli de revestiment dels túbuls col·lectors i de la nansa d'Henle ascendent (Figura R5).

Lectina	Túbuls proximals	Túbuls distals (nansa Henle ascendent + Túbul contornejat distal)	Túbuls col·lectors	Colocalització amb toxina-ε?
<i>Arachis hypogaea</i> (PNA)	+	+ (nansa Henle ascendent) - (túbul contornejat distal)	++	Sí, a nansa d'Henle ascendent i túbuls col·lectors
<i>Dolichos biflorus</i> (DBL)	-	-	++	Parcialment
<i>Datura stramonium</i> (DSA)	++	-	-	No

Taula R2. Taula on es mostra un resum de les diferents estructures del ronyó reconegudes per les diferents lectines que s'han utilitzat en aquest estudi (Hanai *et al.*, 1994; Laitinen *et al.*, 1987) i la colocalització amb la toxina-ε.

(++) intensitat elevada, (+) intensitat mitja, (-) no hi ha unió.

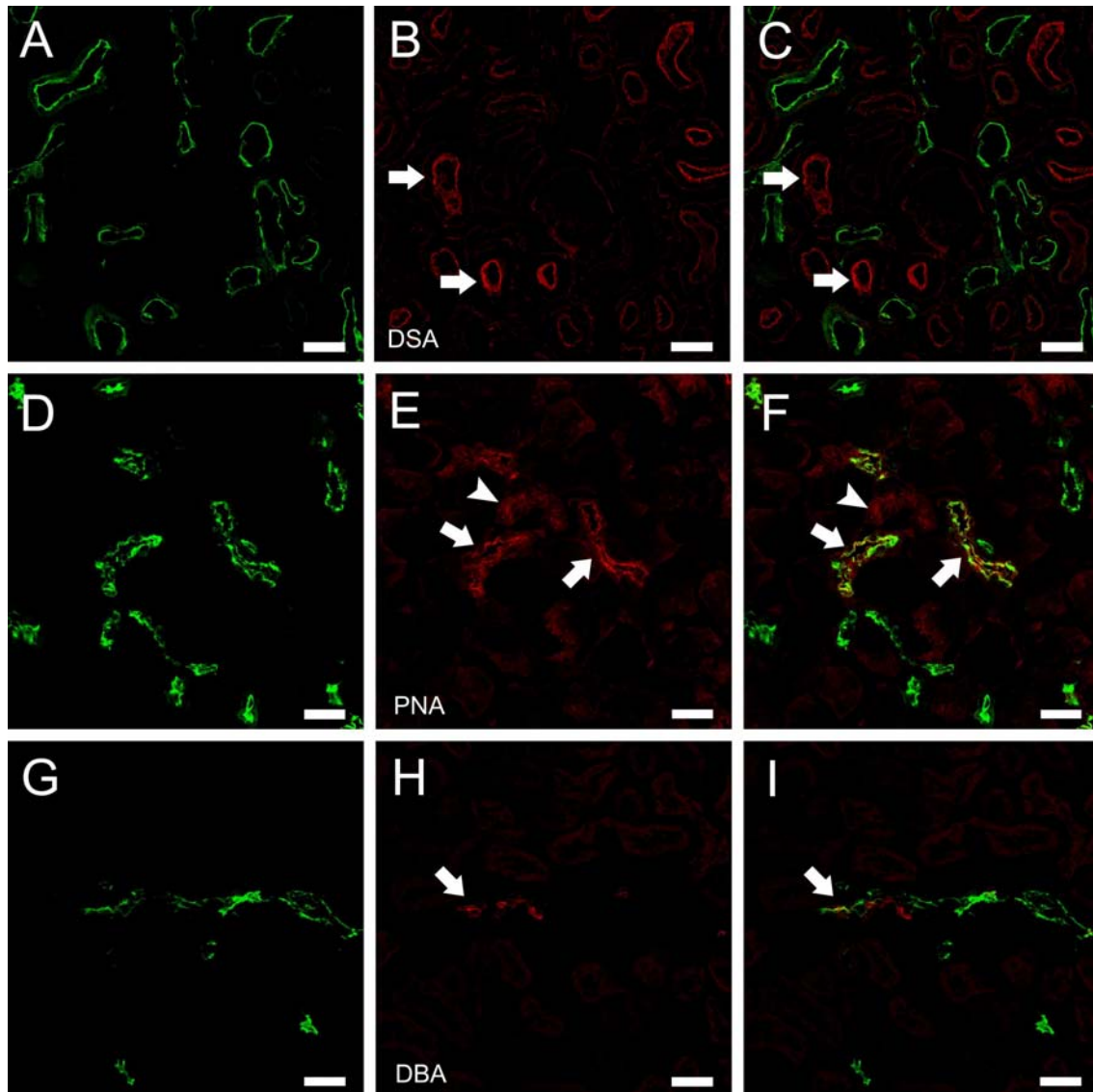


Figura R5. Imatges de microscòpia confocal on s'observa la unió de la toxina- ϵ a túbuls distals i col·lectors de ronyó de ratolí. Es mostren seccions de ronyó de ratolí que s'han incubat conjuntament amb protoxina- ϵ -GFP (verd) i diferents lectines (vermell). La imatge B i C correspon al marcatge dels túbuls proximals (fletxes) amb la lectina *Datura stramonium* DSA. La imatge E i F correspon al marcatge dels túbuls col·lectors o nanses d'Henle ascendents (fletxes) i proximals (puntes de fletxa) amb la lectina *Arachis hypogaea* PNA. La imatge H i I correspon al marcatge dels túbuls col·lectors (fletxa) amb la lectina *Dolichos biflorus* DBA. Les imatges C, F i I són superposicions de les diferents lectines amb la protoxina- ϵ -GFP on es mostra la colocalització als túbuls col·lectors o nanses d'Henle ascendents (F) i col·lectors (I). Les barres corresponen a 40 μ m.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, estudis previs al nostre laboratori van revelar que la toxina- ϵ incubada sobre seccions de ronyó d'altres espècies (vaca, ovella, cabra i humana) també mostra unió específica als túbuls distals (Soler-Jover *et al.*, 2004).

3.1.1. Tractaments a sistema renal.

Per tal de caracteritzar la natura de la unió de la protoxina-ε-GFP en el sistema renal, es van dur a terme diferents tractaments en alguns dels seus components, com el ronyó i la bufeta.

D'una banda, per determinar la implicació de proteïnes en la unió de la toxina-ε, vàrem tractar els teixits amb Pronasa E, una proteasa d'ampli espectre formada per una mescla d'enzims proteolítics (cinc serin-proteases, dos endopeptidases, dos leucin-aminopeptidases i una carboxipeptidasa).

D'altra banda, per determinar la implicació dels lípids i la integritat de la membrana en la unió de la toxina-ε, vàrem tractar els teixits amb diferents detergents: Tritó X-100, Nonidet p-40, CHAPS, colat de sodi i deoxicolat de sodi, mostrats en la taula següent (Taula R3).

Detergent		CMC % (w/v)	CMC Molaritat	Propietats
No iònic	Tritó X-100	0.021	3.0×10^{-4}	Hidrolitza la unió lípid-lípid, i lípid-proteïna. Tenen poca capacitat per hidrolitzar la unió proteïna-proteïna.
	Nonidet p-40	0.017	3.0×10^{-4}	
Zwitteriònic	CHAPS	0.49	1.4×10^{-3}	Combina propietats de les sals biliars i N-alkil sulfobetaines. Protegeix l'estructura nativa de la proteïna sense alterar la seva càrrega.
Aniònic	Colat de sodi	0.60	1.4×10^{-2}	Combinen propietats de les sals biliars. Provoquen la completa disrupció de les estructures cel·lulars.
	Deoxicolat de sodi	0.21	5.0×10^{-3}	

Taula R3. Taula on es mostra algunes de les propietats de cada un dels detergents utilitzats en aquest estudi. Tots ells solubilitzen proteïnes de membrana. La CMC dona el valor de la concentració micel·lar crítica, corresponent els valors més baixos per als detergents més agressius (Biochemica information, boehringer mannheim).

Per tal de determinar la implicació dels glúcids en la unió, d'una banda vàrem tractar els teixits amb N-glicosidasa F, enzim que hidrolitza els oligosacàrids (N-glicans). D'altra

banda, vàrem fer estudis de β -eliminació per tal d'hidrolitzar els O-glicans (Desantis *et al*, 2006).

3.1.1.1. Tractament amb Pronasa E a seccions de ronyó i bufeta de ratolí.

Les crio-seccions de ronyó i bufeta de ratolí van ser tractades amb diferents concentracions de Pronasa E (0.1, 0.2, 0.5 i 1 mg/ml) durant diferents temps (5, 15, 30 i 60 min) a una temperatura de 37°C, abans de ser incubats amb protoxina- ϵ -GFP.

La figura R6 correspon a un tractament amb Pronasa E a una concentració significativa de 0.5 mg/ml durant 30 min a 37°C. S'observa una forta disminució de la unió després del tractament. Tractaments per sota de 0.5 mg/ml no van tenir efectes evidents en la unió de la protoxina- ϵ -GFP i els tractaments a 1 mg/ml van donar uns resultats similars als de 0.5 mg/ml.

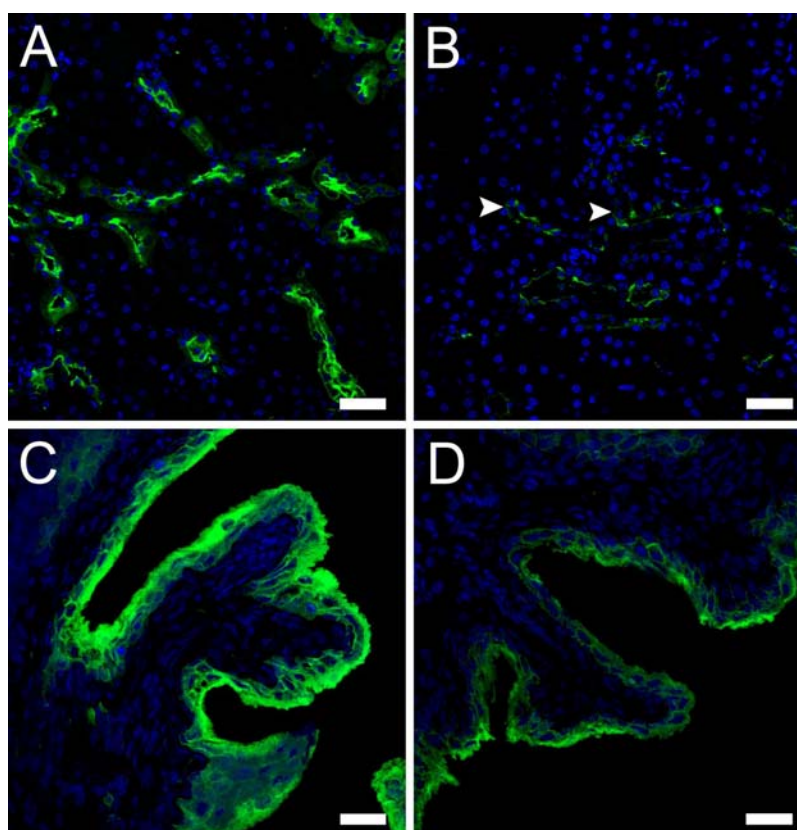


Figura R6. Imatges de microscòpia confocal que corresponen a ronyó (A i B) i bufeta de ratolí (C i D). Les imatges A i C corresponen als controls, sense tractar, i les imatges B i D corresponen a talls tractats amb Pronasa E a una concentració de 0.5 mg/ml durant 30 min a 37°C. S'observa que el tractament amb Pronasa E fa disminuir la marca de la protoxina- ϵ -GFP tant als túbuls distals (B, puntes de fletxa), com a l'epiteli de revestiment de la bufeta (D). S'observa en verd la unió de la protoxina- ϵ -GFP i en blau els nuclis cel·lulars. Les barres corresponen a 40 μ m.

3.1.1.2. Tractament amb detergents a seccions de ronyó de ratolí.

Les crioseccions de ratolí van ser tractades amb diferents detergents: Tritó X-100 (detergent no iònic), Nonidet p-40 (detergent no iònic), CHAPS (detergent zwitteriònic), colat de sodi (detergent aniònic) i deoxicolat de sodi (detergent aniònic).

Les concentracions utilitzades dels detergents van ser: de 0.5 i 2% a 4°C durant 1h pel Nonidet p-40 i el CHAPS. Pel Tritó X-100, colat de sodi i deoxicolat de sodi vam utilitzar concentracions de 0.1, 0.5, 1 i 2% durant 1h a 4°C, TA i 37°C.

La següent figura mostra l'efecte que tenen els diferents detergents en la unió de la protoxina-ε-GFP a ronyó. En aquesta imatge s'observa una reducció de la unió de la toxina als túbuls distals i col·lectors del ronyó en tractar amb el 2% de Nonidet p-40 i CHAPS a 4°C però no amb el colat de sodi (Figura R7).

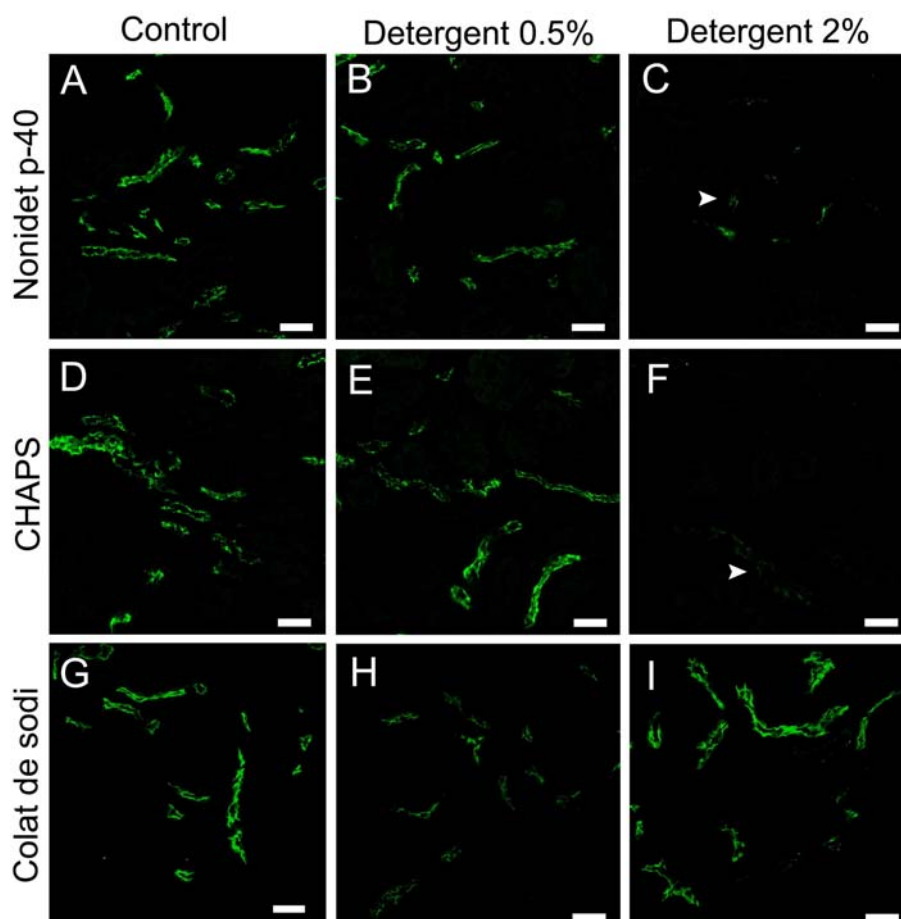


Figura R7. Imatges de microscòpia confocal que corresponen a talls de ronyó de ratolí control o tractats amb Nonidet p-40 (A, B i C), CHAPS (D, E i F) i colat de sodi (G, H i I) durant 1h a 4°C. Els diferents detergents s'han utilitzat a una concentració del 0.5% (B, E i H) i del 2% (C, F i I). Les imatges A, D i G corresponen a controls (sense detergents) amb les mateixes condicions de temps i temperatura. S'observa que els tractaments amb Nonidet p-40 i

CHAPS al 2% (C i D, respectivament) fan disminuir considerablement la unió protoxina- ϵ -GFP als túbuls distals i col·lectors del ronyó respecte al control (puntes de fletxa). En canvi, no s'observen diferències en el cas del tractament amb colat de sodi. Les barres corresponen a 40 μ m.

La unió, però, a TA i 37°C augmenta amb el colat de sodi al 2% (veure figura AN11 de l'annex).

Per últim, s'observa un lleuger augment de la unió de protoxina- ϵ -GFP en el tractament amb Tritó X-100 al 0.5% en qualsevol condició provada (veure figura AN9 de l'annex), augment que també té lloc en el tractament al 0.5% amb deoxicolat de sodi a 37°C (veure figura AN10 de l'annex). En tots dos casos, hi ha, però, una disminució en la unió després dels tractaments al 2% per a qualsevol temperatura.

Els resultats dels diferents tractaments a concentracions de 0.5 i del 2% es resumeixen en la taula següent (Taula R4).

DETERGENT CONCENTRACIÓ	DETERGENT					T°C
	TRITÓ X-100	NONIDET p-40	CHAPS	COLAT DE SODI	DEOXICOLAT DE SODI	
0.5%	+	=	=	=	=	4°C
2%	-	-	-	=	-	
0.5%	+	Np	Np	=	=	TA
2%	-	Np	Np	+	-	
0.5%	+	Np	Np	=	+	37°C
2%	-	Np	Np	+	-	

Taula R4. Es va utilitzar el Nonidet p-40 i el Tritó X-100 com a detergents no iònics, el CHAPS com a detergent zwitteriònic i el colat de sodi i deoxicolat de sodi com a detergents aniònics. Es mostra la intensitat d'unió de la protoxina- ϵ -GFP als túbuls distals i col·lectors de ronyó segons el tractament utilitzat.

(+) : Augment del marcatge, (-) : Disminució del marcatge, (=) : No hi ha diferències, (Np) : No provat

3.1.1.3. Tractaments amb N-glicosidasa F i β -eliminació a ronyó i bufeta de ratolí.

Per tal d'estudiar la implicació dels glúcids en la unió de la protoxina- ϵ -GFP es van fer tractaments amb N-glicosidasa F i β -eliminació.

Després del tractament amb 10 U/ml de N-glicosidasa F a 37°C s'observa un augment del marcatge de la protoxina- ϵ -GFP als túbuls distals i col·lectors del ronyó i a l'epiteli de revestiment de la bufeta (Figura R8).

En canvi, tractaments amb 100 U/ml de N-glicosidasa F a 37°C durant la nit, no van revelar diferències respecte el control en la unió de la protoxina- ϵ -GFP als túbuls distals i col·lectors de ronyó de ratolí (Figura R9). Tot i que sí que s'observa una reducció en la unió de la lectina *Datura stramonium* que reconeix N-glicans, i no en la lectina *Arachis hypogaea* que reconeix O-glicans (veure taula M-2 de l'apartat de materials i mètodes), demostrant que la N-glicosilasa F ha actuat correctament.

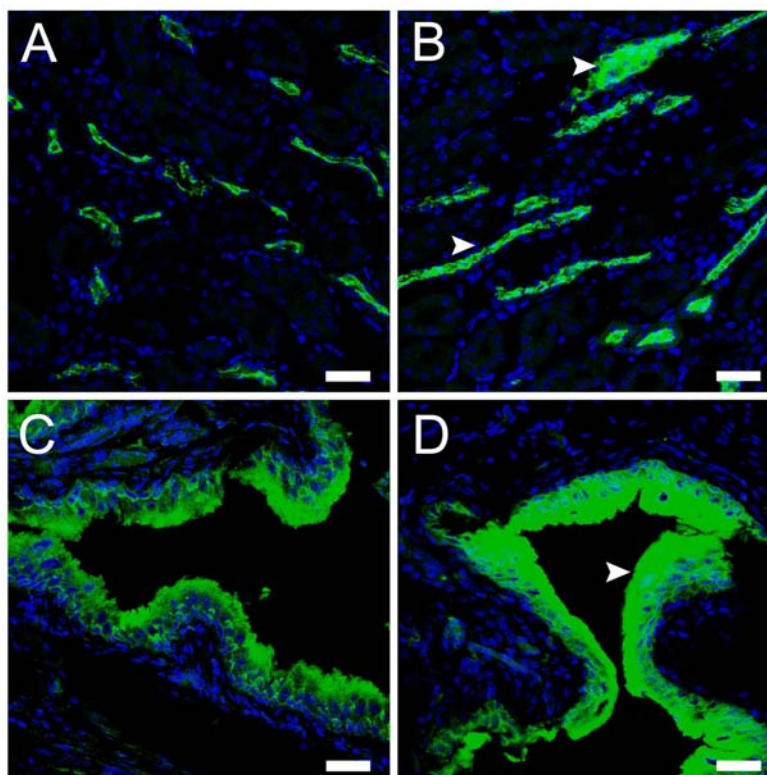


Figura R8. Imatges de microscòpia confocal que corresponen a talls de ronyó (A i B) i bufeta (C i D) de ratolí tractats amb N-glicosidasa F a 37°C durant la nit. Les imatges A i C corresponen a talls sense tractar amb N-glicosidasa F (control), mentre que les imatges B i D corresponen a talls tractats amb 10 U/ml de N-glicosidasa F. S'observa un lleuger augment en la unió de la protoxina- ϵ -GFP tant a l'epiteli de revestiment dels túbuls distals (B, puntes de fletxa) com de la bufeta (D, punta de fletxa). S'observa en verd la unió de la protoxina- ϵ -GFP i en blau els nuclis cel·lulars. Les barres corresponen a 40 μ m.

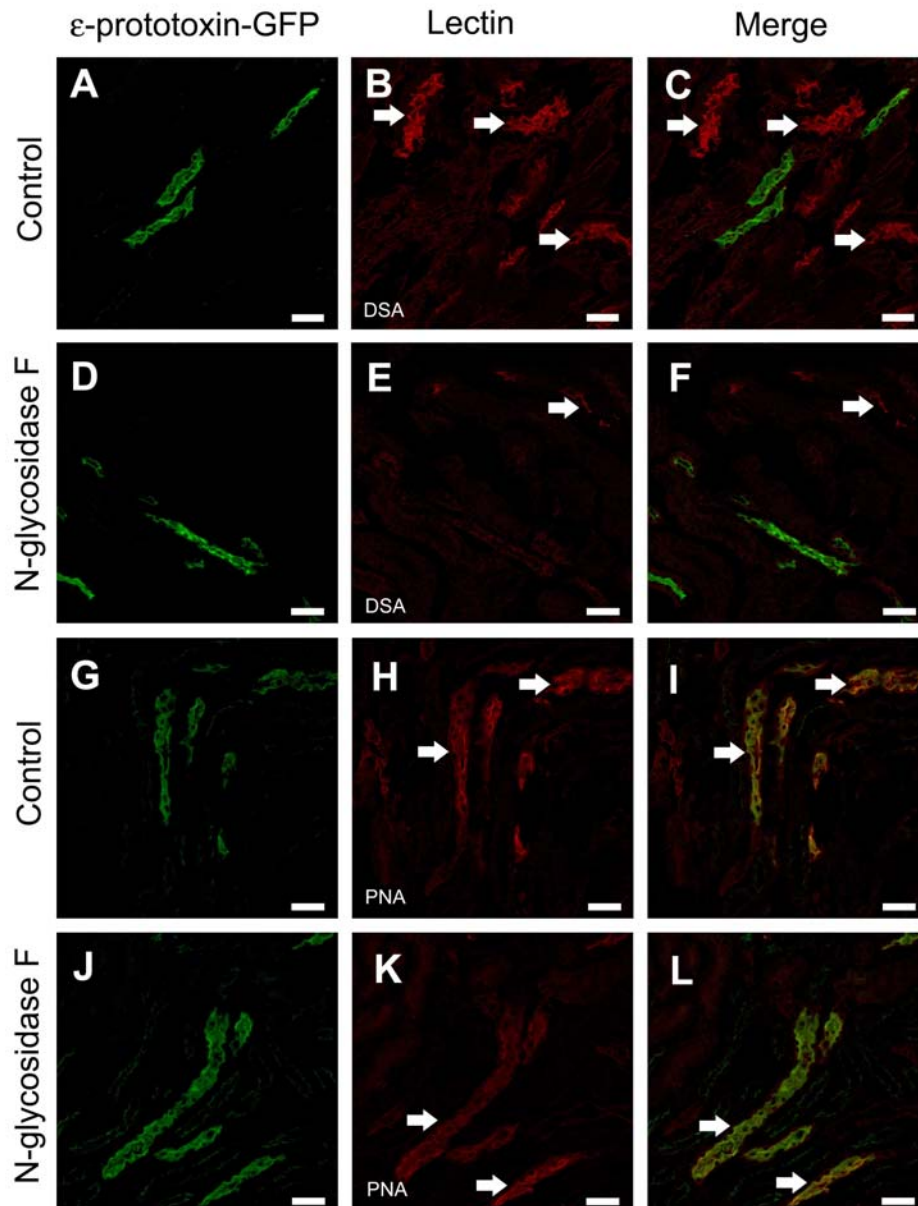


Figura R9. Imatges de microscòpia confocal que corresponen a talls de ronyó de ratolí tractats amb N-glicosidasa F a 37°C durant la nit. A-C i G-I corresponen a talls sense tractar amb N-glicosidasa F (control), mentre que les imatges D-F i J-L corresponen a talls tractats amb 100 U/ml de N-glicosidasa F. S'observa en verd la unió de la protoxina-ε-GFP (1a i 3a columnes), en vermell el marcatge per la lectina *Datura stramonium* (DSA) que reconeix N-glicans (fletxes, B, C, E i F) i el marcatge per la lectina *Arachis hypogaea* (PNA) que reconeix O-glicans (fletxes, H, I, K i L). No s'observa cap canvi en la unió de la protoxina-ε-GFP a l'epiteli dels túbuls distals del ronyó de ratolí després del tractament (D, F, J i L). S'observa una pèrdua de la marca per la lectina *Datura stramonium* (E i F) després de fer el tractament, en canvi no s'observen canvis per a la lectina *Arachis hypogaea* (K i L). Les barres corresponen a 40 μm.

Per tal de determinar la implicació dels O-glicans en la unió de la toxina-ε, vam fer tractaments de β-eliminació a ronyó i bufeta de ratolí.

Resultats

S'observa com, després de la β -eliminació, la unió de la protoxina- ϵ -GFP pràcticament desapareix tant en els túbuls distals i col·lectors de la zona cortical del ronyó (Figura R10) com de la zona medul·lar (Figura R11) així com la marca de la lectina PNA, demostrant que els O-glicans estan involucrats en la unió de la protoxina- ϵ -GFP en el ronyó.

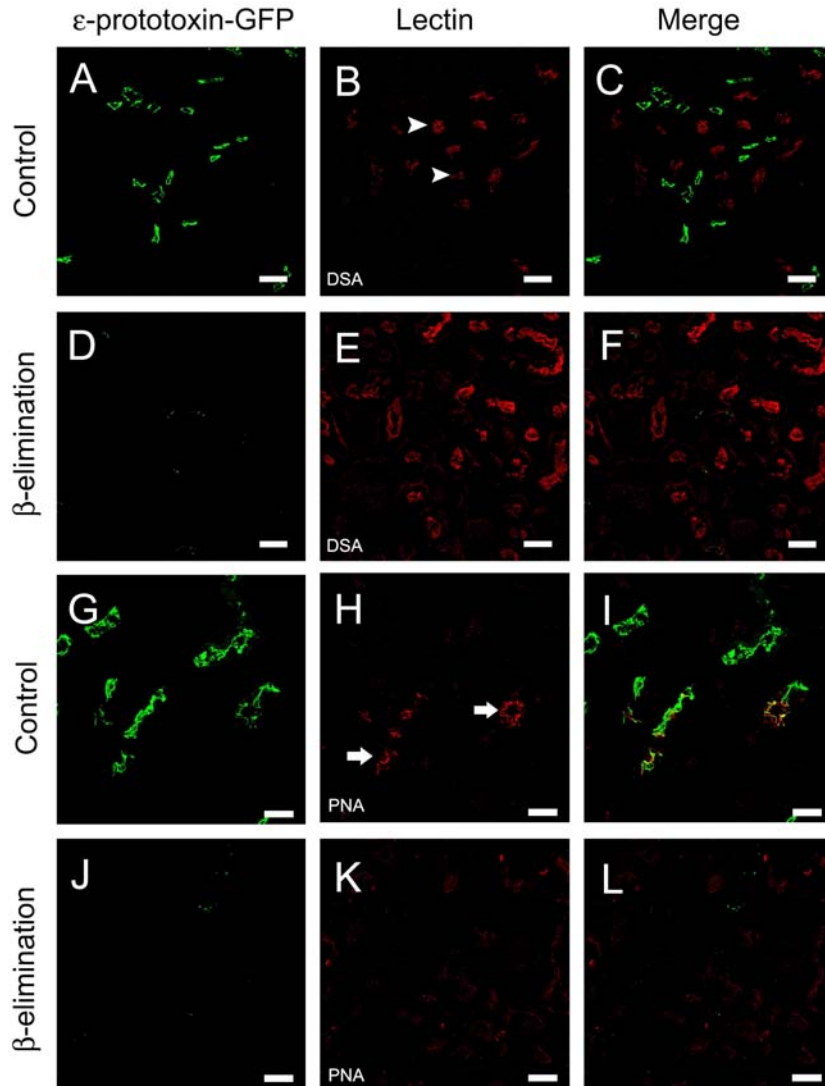


Figura R10. Imatges de microscòpia confocal que corresponen a talls de ronyó de ratolí després del tractament de β -eliminació D-F i J-L. Com a control algunes seccions es van tractar amb aigua miliQ en les mateixes condicions A-C i G-I. Les seccions es van incubar amb la protoxina- ϵ -GFP (1a i 3a columnes) després de la preincubació amb la lectina *Datura stramonium* DSA (vermell, B, C, E i F) i la lectina *Arachis hypogaea* PNA (vermell, H, I, K i L). La DSA marca els N-glicans dels túbuls proximals (puntes de fletxa) i la PNA marca els O-glicans dels túbuls distals i túbuls col·lectors (fletxes). S'observa una disminució en la unió de la protoxina- ϵ -GFP (D, F, J i L) i la PNA (K i L) però un increment en la unió de la DSA (E i F) després del tractament. Les barres corresponen a 40 μ m.

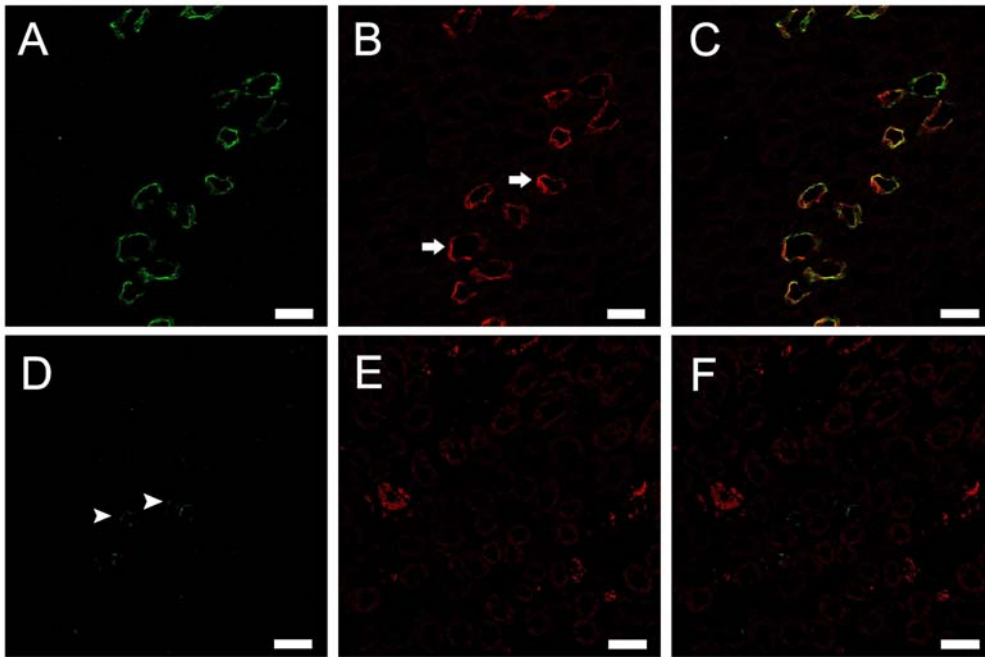


Figura R11. Imatges de microscòpia confocal que corresponen a l'efecte de la β -eliminació en la unió de la protoxina- ϵ -GFP i la PNA a seccions de medul·la renal de ratolí. A-C són controls de teixit no tractat i D-F és teixit sotmès a β -eliminació. S'observa la unió de la PNA als túbuls distals i col·lectors (fletxes en B) i una colocalització completa entre la protoxina- ϵ -GFP i la PNA (C). El tractament de β -eliminació disminueix considerablement la unió de la protoxina- ϵ -GFP (puntes de fletxa, D) i la PNA (E) als túbuls distals i col·lectors. Les barres corresponen a 40 μ m.

La marca de la protoxina- ϵ -GFP a l'epiteli de revestiment de la bufeta de ratolí també disminueix dràsticament després de la β -eliminació (Figura R12).

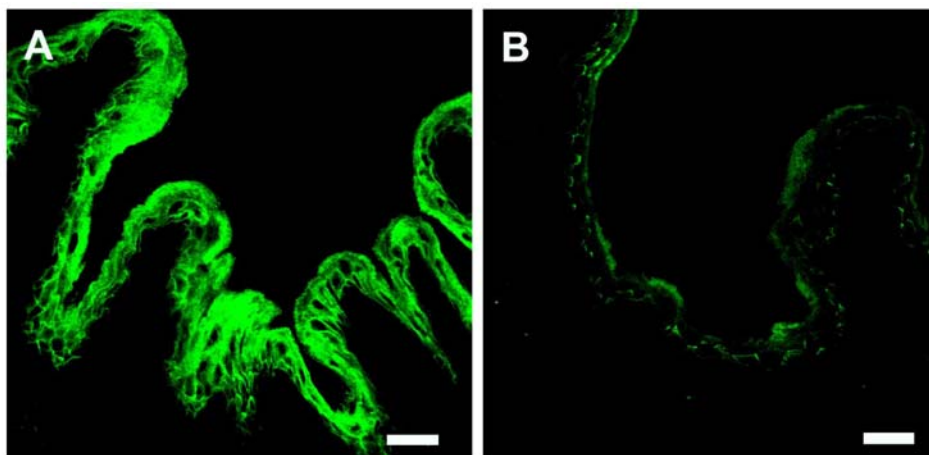


Figura R12. Imatges de microscòpia confocal que corresponen a l'efecte de la β -eliminació en la unió de la protoxina- ϵ -GFP en seccions de bufeta de ratolí. El tractament de β -eliminació (B) disminueix considerablement la unió de la protoxina- ϵ -GFP a l'uroteli. (A) és el control sense tractar. Les barres corresponen a 40 μ m.

3.1.1.4. Tractaments de β -eliminació en talls de ronyó i bufeta d'altres espècies.

La toxina- ϵ és capaç d'unir-se als túbuls distals i col·lectors de ronyó d'altres espècies com rata, ovella, vaca i humà tal i com ho fa en ratolí (Soler-Jover *et al.*, 2004). Amb l'objectiu d'aprofundir en l'estudi de la unió de la toxina- ϵ en aquestes espècies es van dur a terme tractaments de β -eliminació a talls de ronyó d'ovella, vaca, cabra i humà.

En la següent imatge (Figura R13) s'observa com la marca de la protoxina- ϵ -GFP és més intensa en els túbuls distals i col·lectors de cabra i ovella, els hosts naturals de la toxina, que en els de vaca i humà. En totes les espècies, la unió de la protoxina- ϵ -GFP pràcticament desapareix després del tractament.

Incubacions amb la protoxina- ϵ -GFP sobre seccions de bufetes de cabra, vaca i ovella també van revelar la seva unió a l'epiteli de revestiment. El tractament de β -eliminació també va disminuir la unió de la protoxina- ϵ -GFP. Aquesta disminució es va veure, però, a partir dels 5 dies de tractament (Figura R14).

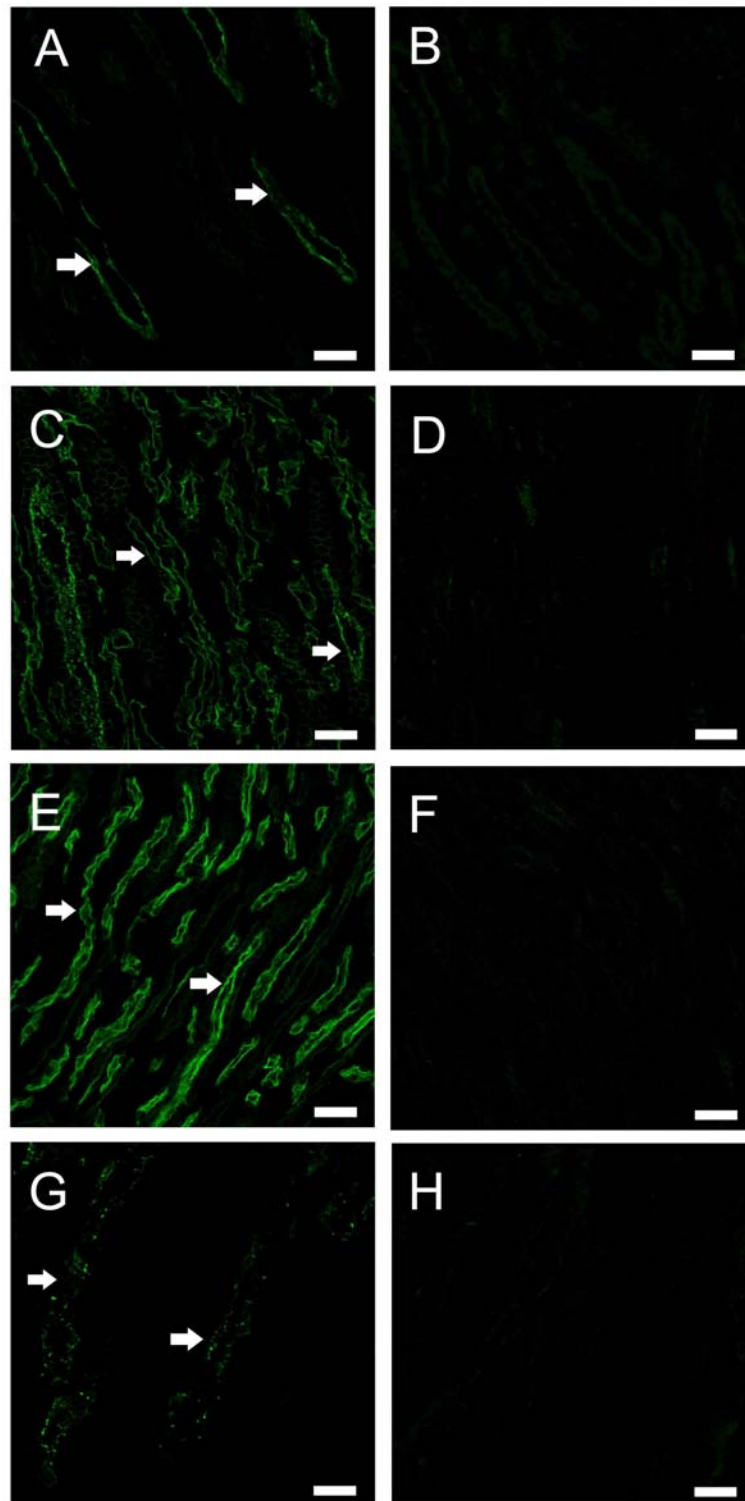


Figura R13. Imatges de microscòpia confocal on es mostra l'efecte de la β -eliminació en la unió de la protoxina- ϵ -GFP als túbuls distals i col·lectors de ronyó de vaca (A i B), cabra (C i D), ovella (E i F) i humà (G i H). Les seccions de ronyó de vaca (B), cabra (D), ovella (F) i humà (H) es van tractar amb (0.055 N de NaOH a 37°C durant la nit) i com a control algunes seccions es van tractar amb aigua miliQ a les mateixes condicions (A, C, E i G). S'observa la unió de la protoxina- ϵ -GFP als túbuls distals i col·lectors a totes les espècies provades (fletxes), havent-hi molta més marca en el cas de la cabra (C) i l'ovella (E) que en els altres casos. La unió de la protoxina- ϵ -GFP pràcticament desapareix després del tractament a totes les espècies. Les barres corresponen a 40 μ m.

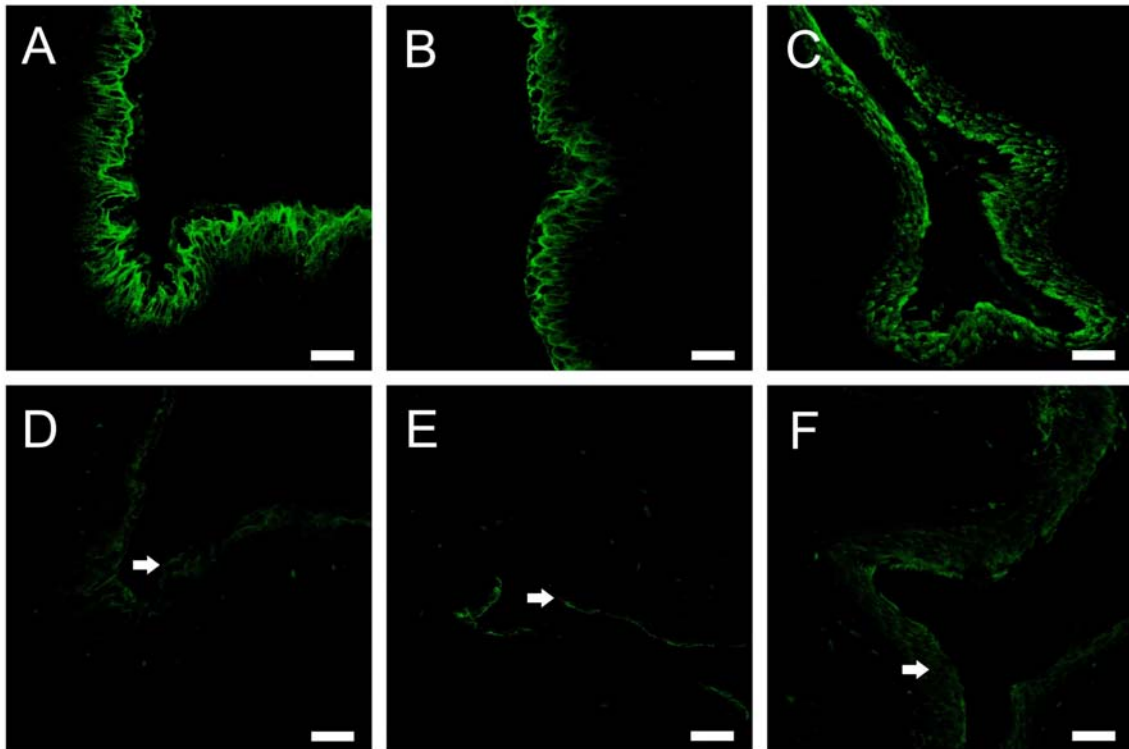


Figura R14. Imatges de microscòpia confocal on es mostra l'efecte de la β -eliminació en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a l'epiteli de revestiment de la bufeta de vaca (A, D), cabra (B, E) i ovella (C, F). A-C són els controls i D-F els tractaments. S'observa la unió de la protoxina- ϵ -GFP a l'epiteli de revestiment de la bufeta a les tres espècies (verd). La unió de la protoxina- ϵ -GFP després del tractament disminueix considerablement en tots els casos (fletxes). Les barres corresponen a 40 μ m.

3.2. Estudi de la unió de la protoxina- ϵ -GFP a cèl·lules MDCK.

L'any 1994 es va identificar la línia cel·lular MDCK com el model cel·lular més sensible a la toxina- ϵ (Payne *et al.*, 1994) i, posteriorment, el grup del Dr. Popoff va demostrar que la toxina- ϵ oligomeritzava en la membrana d'aquestes cèl·lules formant uns porus que provocaven la mort cel·lular (Petit *et al.*, 1997). Es desconeixia, però, el possible receptor per a la toxina- ϵ . Així doncs, amb l'objectiu de caracteritzar la natura del possible receptor en les cèl·lules MDCK vàrem realitzar tractaments amb Pronasa E, detergents, N-glicosidasa F, així com β -eliminacions; semblants als fets en teixit. No es va poder reproduir el tractament amb Pronasa E en les cèl·lules MDCK fixades, ja que aquest tractament desenganxava les cèl·lules del cobreobjectes, inclús reduint la concentració d'enzim i el temps d'incubació.

3.2.1. Tractament amb detergents a cèl·lules MDCK.

Les cèl·lules MDCK van ser tractades amb diferents detergents: Tritó X-100, Nonidet p-40, CHAPS, colat de sodi i deoxicolat de sodi.

Es va observar que tant el Tritó X-100 com el deoxicolat de sodi al 2% provoquen una disminució de la unió de la protoxina- ϵ -GFP (Figura R15).

En el cas del colat de sodi al 2% no es va observar cap diferència amb el seu control al fer tractaments a 4°C, però sí que es va observar una davallada de la unió de la protoxina- ϵ -GFP amb els tractaments a TA i 37°C. S'observa que el patró d'unio de la protoxina- ϵ -GFP a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK esdevé puntejat després del tractament amb colat de sodi a TA (Figura R15).

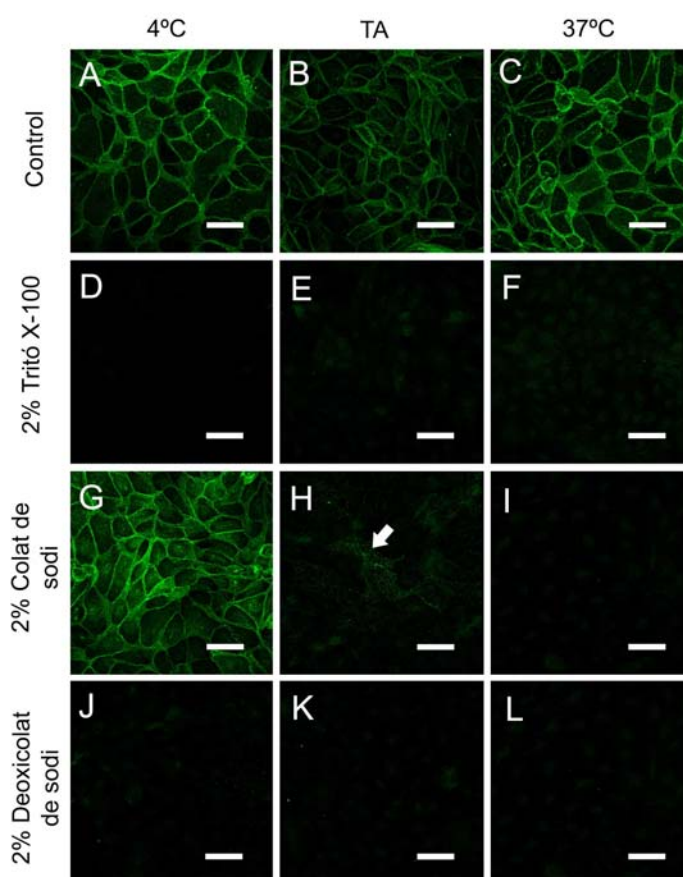


Figura R15. Imatges de microscòpia confocal de cèl·lules MDCK fixades i incubades amb la protoxina- ϵ -GFP després de fer un tractament amb diversos detergents. Les cèl·lules van ser tractades amb Tritó X-100 (D-F), colat de sodi (G-I) i deoxicolat de sodi (J-L) al 2% durant 1h. Els controls es van incubar en absència de detergent (A-C). Els experiments es van realitzar a diferents temperatures: 4°C (columna de l'esquerra), TA (columna central) i a 37°C (columna de la dreta). S'observa una reducció en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a la membrana plasmàtica després de tractar amb Tritó X-100 i deoxicolat de sodi a qualsevol temperatura. La unió no varia al tractar amb colat de sodi a 4°C. Es mostra una reducció de la unió al tractar amb colat de sodi a 37°C i s'observa un patró puntejat en la unió de la protoxina- ϵ -GFP (fletxa) al tractar a temperatura ambient. Les barres corresponen a 40 μ m.

Resultats

Els resultats dels diferents tractaments a concentracions de 0.5 i del 2% es resumeixen en la taula següent (Taula R5).

DETERGENT CONCENTRACIÓ	TRITÓ X-100	NONIDET P-40	CHAPS	COLAT DE SODI	DEOXICOLAT DE SODI	T°C
0.5%	-	-	+	+	-	4°C
2%	-	-	=	=	-	
2%	-	Np	Np	- (puntejat)	-	TA
2%	-	Np	Np	-	-	37°C

Taula R5. Es va utilitzar el Nonidet p-40 i el Tritó X-100 com a detergents no iònics, el CHAPS com a detergent zwitteriònic i el colat de sodi i deoxicolat de sodi com a detergents aniònics. Es mostra la intensitat d'unió de la protoxina-ε-GFP a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK segons el tractament utilitzat.

(+) : Augment del marcatge, (-) : Disminució del marcatge, (=) : No hi ha diferències, (Np) : No provat

3.2.2. Tractament amb N-glicosidasa F en cèl·lules MDCK.

Les cèl·lules MDCK van ser tractades amb N-glicosidasa F (per eliminar els N-glicans) a unes concentracions de 10, 20 i 50 U/ml a 37°C durant la nit.

A continuació, es van rentar, es van incubar amb la protoxina-ε-GFP i es van muntar tal i com s'ha descrit anteriorment a l'apartat dels materials i mètodes.

Com a controls de l'efecte enzimàtic del tractament amb N-glicosidasa F es va utilitzar la lectina *Datura stramonium* (DSA) que reconeix N-glicans i la lectina *Arachis hypogaea* (PNA) que reconeix els O-glicans.

Tal com era d'esperar, en la figura següent (Figura R16) s'observa una disminució dels N-glicans (detectats per la lectina DSA) després del tractament amb N-glicosidasa F a 50 U/ml, en canvi, no s'observa cap reducció en els O-glicans, on s'hi uneix la lectina PNA.

Respecte a la unió de la protoxina- ϵ -GFP, no s'observa cap canvi després de fer el tractament amb la N-glicosidasa F a cap de les concentracions provades, demostrant que la unió de la protoxina- ϵ -GFP no depèn de N-glicans en les cèl·lules MDCK.

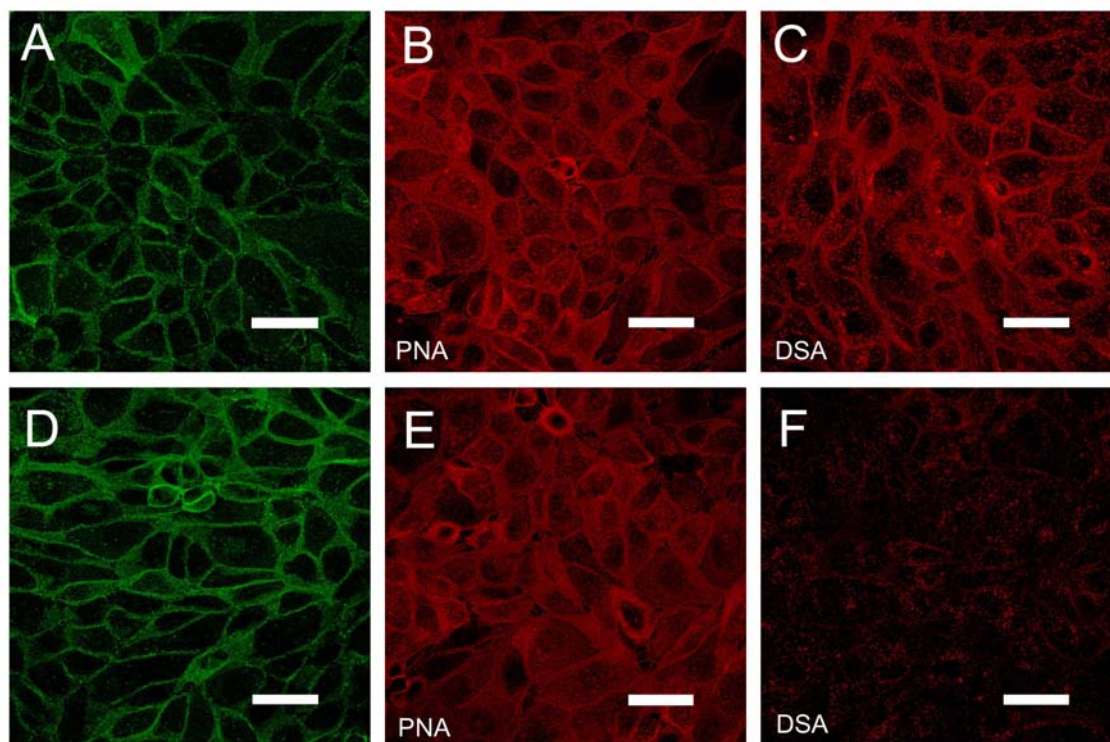


Figura R16. Imatges de microscòpia confocal de cèl·lules MDCK tractades amb N-glicosidasa F a 37°C durant la nit. Les imatges A-C corresponen a cèl·lules sense tractar (control), i les imatges D-F corresponen a cèl·lules tractades amb 50 U/ml de N-glicosidasa F. S'observa la unió de la protoxina- ϵ -GFP (A i D), de la lectina *Arachis hypogaea* PNA, que reconeix O-glicans (vermell, B i E) i la lectina *Datura stramonium* DSA, que reconeix N-glicans (vermell, C i F). El tractament amb N-glicosidasa F no afecta la marca de la protoxina- ϵ -GFP a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK. Les barres representen 40 μ m.

3.2.3. Tractament de β -eliminació en cèl·lules MDCK.

Per valorar la possible implicació dels O-glicans en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a les cèl·lules MDCK, es van fer tractaments de β -eliminació sobre còmbreobjectes de cèl·lules fixades tal com està explicat en l'apartat de materials i mètodes.

A la següent imatge (Figura R17) es veu com després de fer la β -eliminació hi ha una disminució quasi total de la unió de la protoxina- ϵ -GFP a la membrana plasmàtica de les cèl·lules, així com també de la lectina PNA, que reconeix els O-glicans, mentre que fins i tot hi ha un augment en la unió de la lectina DSA, que reconeix N-glicans.

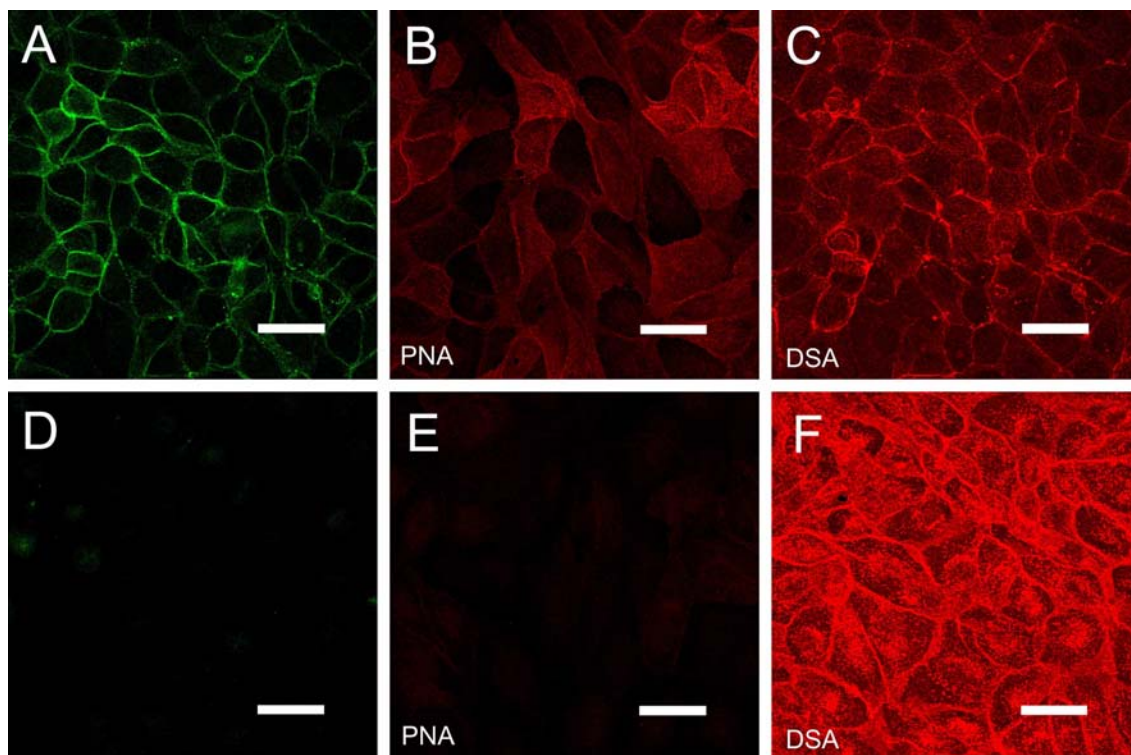


Figura R17. Imatges de microscòpia confocal on es mostra l'efecte de la β -eliminació en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK (verd, A i D), la lectina *Arachis hypogaea* PNA (vermell, B i E) i la lectina *Datura stramonium* DSA (vermell, C i F). Les cèl·lules es van tractar amb 0.055 N NaOH durant 1h a 37°C (D-F), i com a control algunes cèl·lules es van tractar amb aigua miliQ a les mateixes condicions (A-C). La β -eliminació aboleix la unió de la protoxina- ϵ -GFP (D) i de la lectina *Arachis hypogaea* (E), mentre que s'incrementa la unió de la lectina *Datura stramonium* (F). Les barres representen 40 μ m.

Paral·lelament, hem quantificat la constant de dissociació (K_d) i el nombre màxim de receptors ocupats (B_{max}) per les cèl·lules MDCK un cop fet el tractament de β -eliminació. Els resultats van indicar una davallada de la (B_{max}) al voltant d'un 95% en comparació amb el no tractat, en canvi no es va mostrar diferència significativa respecte la constant de dissociació (K_d) (veure següent apartat).

3.2.4. Estudis d'afinitat de la protoxina- ϵ -GFP en cèl·lules MDCK fixades mitjançant la tècnica d'ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*).

Estudis previs realitzats amb la toxina- ϵ radioactiva marcada amb 125 I (Nagahama i Sakurai, 1992) havien demostrat una alta afinitat d'unió de la toxina- ϵ a homogenats de cervell de rata i a les fraccions sinaptosomals, presentant un sol tipus d'unió amb unes constants de dissociació (K_d) de 2.5 i 3.3 nM, respectivament.

No obstant, encara no hi havia dades sobre l'afinitat de la unió de la toxina en un model renal. Per estudiar les constants de dissociació de la toxina- ϵ vàrem utilitzar la línia cel·lular MDCK. Per portar a terme els experiments vàrem utilitzar cèl·lules MDCK fixades, havent vist que una vegada fixades, les cèl·lules mantenen les propietats d'unió a la toxina- ϵ , tal com ho demostren els nostres estudis de microscòpia de fluorescència.

Per tal de calcular la constant de dissociació i determinar si la unió de la protoxina- ϵ -GFP era saturable, vàrem desenvolupar un assaig d'ELISA, incubant la proteïna de fusió protoxina- ϵ -GFP i/o la toxina- ϵ -GFP sobre les cèl·lules i utilitzant un anticòs contra GFP.

Per tal d'eliminar les unions inespecífiques, es va coincubar la protoxina- ϵ -GFP (en les diferents concentracions) amb la protoxina- ϵ en excés sobre els cultius de cèl·lules MDCK, i aquest valor es va sostraure al valor que s'obté en la incubació de la protoxina- ϵ -GFP amb les cèl·lules MDCK.

Les corbes d'afinitat obtingudes es van ajustar a una anàlisi de Scatchard on es demostra que la unió de la protoxina- ϵ -GFP correspon a un sol tipus de població amb una constant de dissociació K_d de 3.8 ± 1.9 nM i una unió màxima B_{max} de 67.3 ± 10.2 pmol/mg de proteïna (Figura R18, A). Es van obtenir resultats similars en la K_d en el cas de fer l'assaig amb toxina- ϵ -GFP activada amb tripsina (Figura R18, B) però amb un increment significatiu en la B_{max} (5.8 ± 4.7 nM i 201 ± 49 pmol/mg, respectivament).

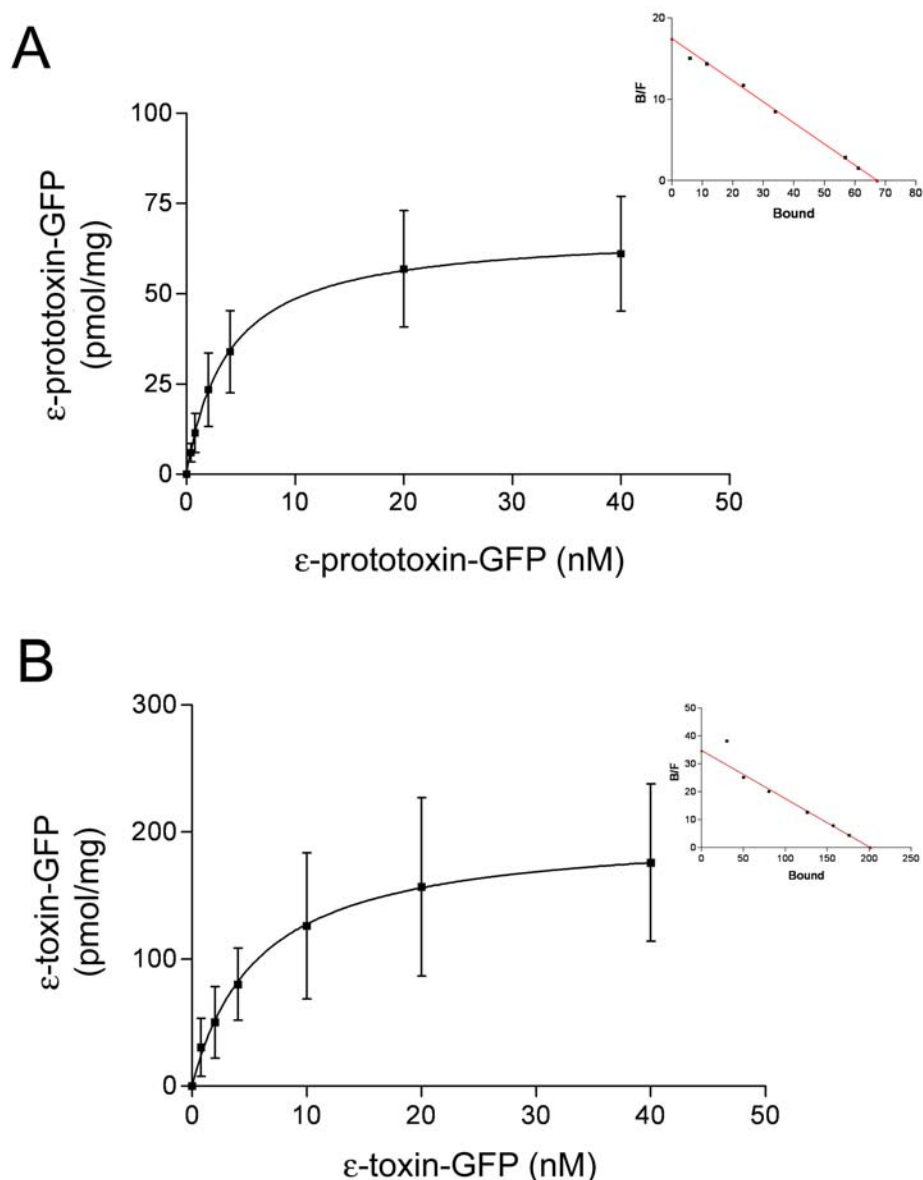


Figura R18. Unió de la protoxina- ϵ -GFP (A) i toxina- ϵ -GFP (B) a cèl·lules MDCK. Les cèl·lules MDCK es van fer créixer en una placa de 96 pouets fins a la confluència (0.8-1.8 μ g de proteïna/pou segons la determinació per Bradford). Un cop fixades les cèl·lules, es van incubar en PBS-BSA 1% amb concentracions creixents de protoxina- ϵ -GFP o toxina- ϵ -GFP. Per determinar la unió específica, abans d'incubar amb la protoxina- ϵ -GFP o toxina- ϵ -GFP, les cèl·lules es van preincubar amb protoxina- ϵ o toxina- ϵ (fredes) durant 30 min. La inserció mostra l'ajustament a una corba Scatchard mitjançant el programa informàtic GraphPad Prism 3. B/F, protoxina- ϵ -GFP o toxina- ϵ -GFP unida/protoxina- ϵ -GFP o toxina- ϵ -GFP lliure. S'observa un increment del triple en la B_{max} en l'assaig amb toxina- ϵ -GFP respecte al de protoxina- ϵ -GFP ($p=0.002$).

Amb aquest mètode, també vàrem poder determinar la unió de la protoxina- ϵ -GFP a les cèl·lules MDCK després de fer els tractaments amb detergents i β -eliminació.

Pel que fa als detergents, prèviament havíem observat un augment en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a ronyó després de tractar les seccions amb colat de sodi al 2% i amb Tritó X-100 al 0.5%. Així doncs, vam voler estudiar l'afinitat de la unió de la protoxina- ϵ -GFP després de tractar les cèl·lules MDCK amb colat de sodi a l'1 i al 2% a 4°C. En el cas dels tractaments al 2% de colat de sodi no vam trobar diferències en la K_d i la B_{max} respecte el control sense tractar (no mostrat). En canvi, els tractaments amb colat de sodi a l'1% van revelar un augment significatiu ($p=0.002$) d'aproximadament un 40% en la B_{max} amb un valor de 115.8 ± 14.9 pmol/mg, i una tendència a la reducció de la K_d amb un valor d' 1.65 ± 0.81 nM (Figura R19, A).

Per altra banda, els estudis amb protoxina- ϵ -GFP i microscòpia confocal havien demostrat que després del tractament de β -eliminació hi havia una reducció gairebé completa en la unió de la protoxina- ϵ -GFP, tant a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK com a les cèl·lules epitelials dels túbuls distals i col·lectors del ronyó de ratolí. Per tal de caracteritzar la unió de la protoxina- ϵ -GFP després de la β -eliminació, es va realitzar el mateix experiment que en els casos anteriors però, prèviament, les cèl·lules fixades es van tractar amb 0.055 N de NaOH durant 6h a 37°C. No es van trobar variacions en la constant de dissociació K_d 3.3 ± 2.3 nM però sí que es va trobar una disminució significativa ($p \leq 0.001$), al voltant del 95%, en el màxim de receptors ocupats B_{max} 3.4 ± 0.62 pmol/mg de proteïna (Figura R19, B).

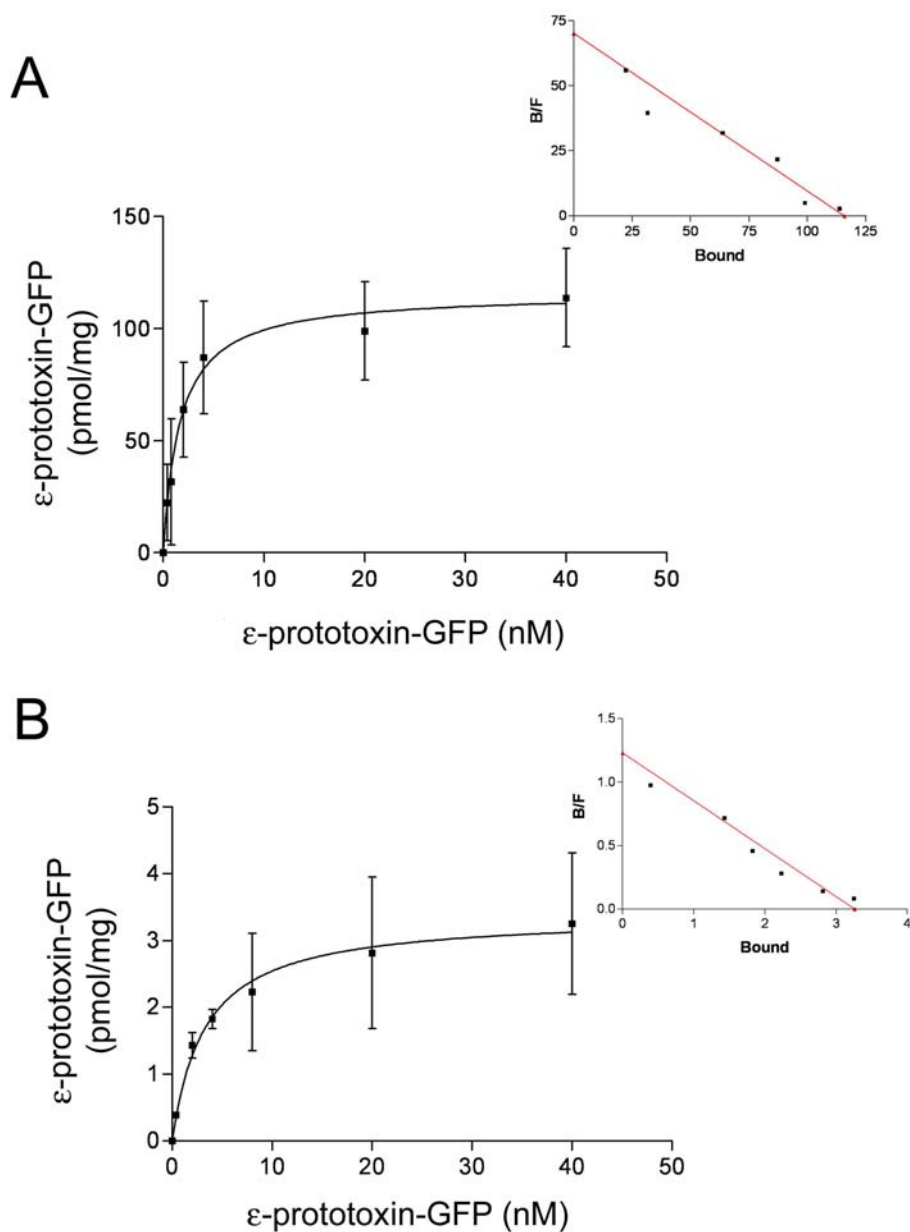


Figura R19. Unió de la protoxina- ϵ -GFP a cèl·lules MDCK fixades després de fer un tractament amb colat de sodi a l'1% durant 1h a 4°C (A) i després d'un tractament de β -eliminació amb 0.055 N NaOH durant 6h a 37°C (B). Les cèl·lules MDCK es van fer créixer en una placa de 96 pouets fins a la confluència (0.8-1.8 μ g de proteïna/pou segons la determinació per Bradford). Les cèl·lules fixades es van incubar en PBS-BSA 1% amb concentracions creixents de protoxina- ϵ -GFP. Per determinar la unió específica, abans d'incubar amb la protoxina- ϵ -GFP, les cèl·lules es van preincubar amb protoxina- ϵ (freda) durant 30 min. La inserció mostra l'ajustament a una corba Scatchard mitjançant el programa informàtic GraphPad Prism 3. B/F, protoxina- ϵ -GFP unida/protoxina- ϵ -GFP lliure. No s'observa una modificació significativa en la K_d després dels tractaments, encara que sí s'observa un increment significatiu en la B_{max} després dels tractaments amb l'1% de colat de sodi ($p=0.002$) i una reducció significativa del 95% després de la β -eliminació ($p<0.001$).

3.3. Estudi de la unió de la toxina- ϵ a sistema nerviós de ratolí i d'altres espècies.

La toxina- ϵ té un greu efecte neurològic, provocant la mort de les cèl·lules endotelials de la microvasculatura del cervell (Gould, 1972; Finnie, 1984b). També s'ha suggerit que provoca la mort neuronal per una acció via sistema glutamatèrgic, que produeix una secreció excessiva de glutamat amb la conseqüent excitotoxicitat (Miyamoto *et al.*, 1998).

En aquest apartat mostrem com les injeccions i.v tant de protoxina- ϵ -GFP com de toxina- ϵ -GFP a ratolins provoquen la unió a l'endoteli, i que la toxina- ϵ -GFP també té la capacitat de travessar la BHE i arribar al parènquima del cervell on desenvoluparia el seu efecte neurotòxic, en canvi, la protoxina- ϵ -GFP no presenta aquesta capacitat (Soler-Jover *et al.*, 2007).

Per tal de caracteritzar la unió de la toxina- ϵ en el sistema nerviós, hem realitzat incubacions de la protoxina- ϵ -GFP i toxina- ϵ -GFP sobre diverses seccions del sistema nerviós de ratolí i l'hem comparat amb el marcatge obtingut en injectar la protoxina- ϵ -GFP i toxina- ϵ -GFP.

Tal i com estava previst, les injeccions a ratolí de protoxina- ϵ -GFP i toxina- ϵ -GFP mostraven la unió d'aquestes a l'endoteli de la microvasculatura del cervell. En el cas de la toxina- ϵ -GFP també es detectava edema i extravasació de la toxina (Figura R30, apartat B). En canvi, les incubacions de protoxina- ϵ -GFP i toxina- ϵ -GFP sobre seccions revelaven unió a estructures mielíniques, tant en sistema nerviós central com en el perifèric, sense marcar les cèl·lules endotelials (Figura R20). Per altra banda, incubacions amb protoxina- ϵ -GFP i toxina- ϵ -GFP sobre crioseccions de cervell d'altres espècies (oví i boví) van mostrar unió a estructures mielíniques, com en el cas del ratolí, però també a cèl·lules endotelials.

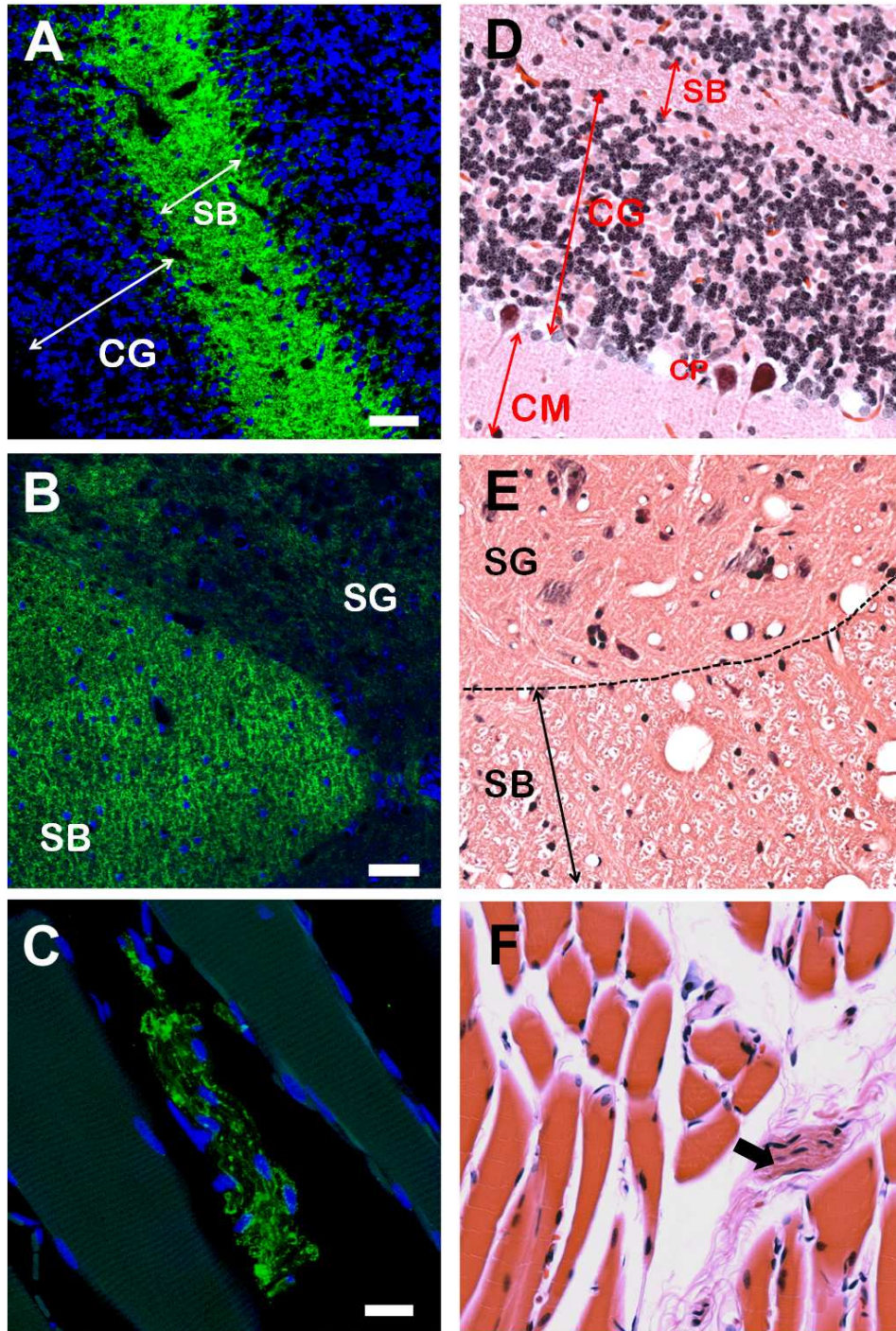


Figura R20. La columna de l'esquerra correspon a fotografies de microscòpia de fluorescència confocal, on s'identifica en verd la protoxina- ϵ -GFP i en blau els nuclis cel·lulars del cerebel (A), medul·la espinal (B) i múscul esquelètic (C). La columna de la dreta correspon a fotografies de microscòpia de camp clar de seccions dels mateixos teixits, tenyits amb hematoxilina-eosina (D: cerebel, E: medul·la espinal i F: múscul esquelètic). Es localitza marca fluorescent associada a la substància blanca del cerebel (A) i de la medul·la espinal (B) així com a la mielina d'un nervi perifèric (C) situat entre fibres musculars esquelètiques (fletxa, F). Les barres corresponen a 40 μ m (imatges A i B), i a 20 μ m (imatge C). SB: Substància blanca; CG: Capa granular; CP: Capa de cèl·lules Purkinje; CM: Capa molecular i SG: Substància grisa.

3.3.1. Unió de la toxina- ϵ a estructures mielíniques de seccions de cervell de ratolí.

Estudis previs realitzats pel grup del Dr. Okabe van suggerir que la neurotoxicitat de la toxina- ϵ venia donada per una acció directa sobre el sistema glutamatèrgic, provocant una secreció excessiva de glutamat, que portaria a la mort neuronal (Miyamoto *et al.*, 1998 i 2000). A més, s'havia descrit que la toxina- ϵ s'uneix específicament a les membranes de sinaptosomes aïllats de cervell de rata (Nagahama i Sakurai, 1992).

Vam voler estudiar aquesta unió i la capacitat de la toxina- ϵ per provocar la secreció de glutamat dels terminals nerviosos, d'acord amb la hipòtesi excitotòxica. Els nostres resultats, però, van mostrar que la toxina- ϵ no era capaç d'estimular la secreció de glutamat de terminacions nervioses aïllades de cervell de rata o ratolí (sinaptosomes) (Figura R21).

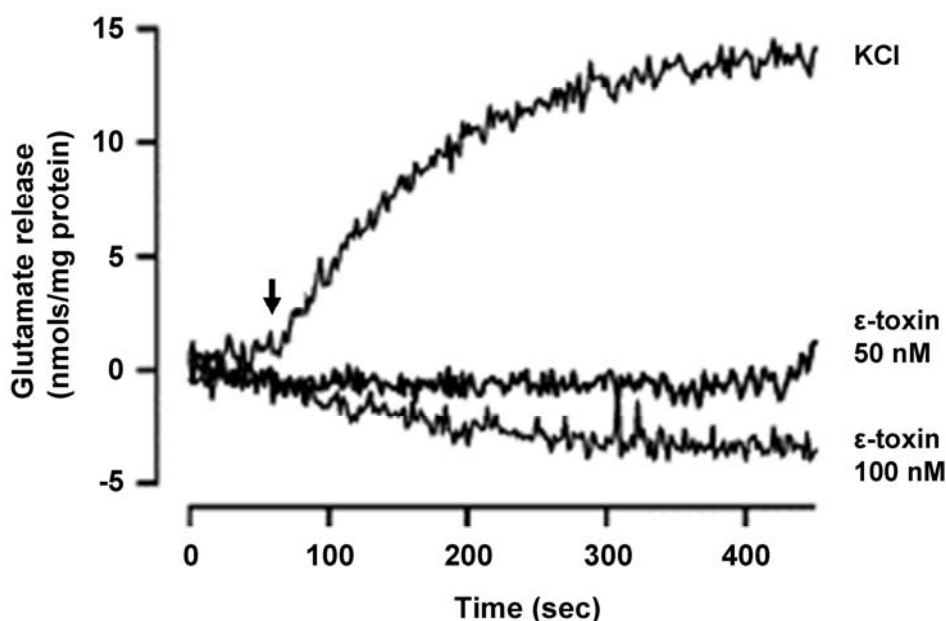


Figura R21. Gràfic on es mostra l'alliberació de glutamat en fraccions sinaptosomals de ratolí. Es va mesurar l'alliberació de glutamat després de despolaritzar químicament els sinaptosomes (50 mM KCl) i després d'afegir la toxina- ϵ 50 o 100 nM (fletxa). No s'observa sortida de glutamat dels sinaptosomes en cap de les concentracions de toxina- ϵ utilitzades (Dorca-Arévalo *et al.*, 2008).

A més, estudis de doble marcatge per la toxina- ϵ i la proteïna bàsica de la mielina (MBP) sobre fraccions sinaptosomals van evidenciar que la toxina- ϵ no s'estava unint als sinaptosomes sinó a petites estructures de mielina recircularitzada que s'aïllen amb la fracció sinaptosomal (Figura R22).

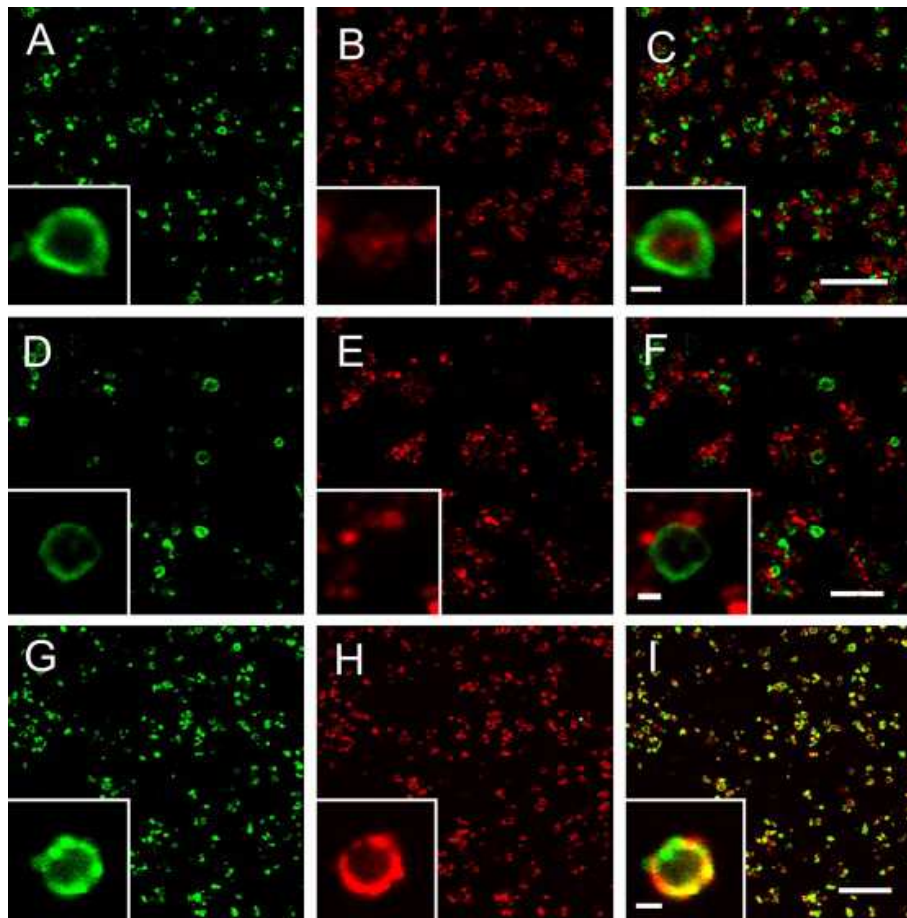


Figura R22. Imatges de microscòpia confocal corresponents a fraccions sinaptosomals fixades sobre cobreobjectes i incubades amb protoxina- ϵ -GFP (verd, A, C, D, F, G i I) després de preincubar-les amb els anticossos contra SNAP-25 (vermell, B i C), sinaptobrevina/VAMP2 (vermell, E i F) i MBP (vermell, H i I). C, F i I són superposicions de les imatges de protoxina- ϵ -GFP amb els diferents anticossos. Les ampliacions corresponen a un detall de la superposició on es mostra colocalització entre la protoxina- ϵ -GFP i la MBP (I) i la manca de colocalització entre la protoxina- ϵ -GFP i la SNAP-25 (C) i entre la protoxina- ϵ -GFP i la sinaptobrevina/VAMP2 (F). Les barres corresponen a 20 μ m (C i I) i a 10 μ m (F). Les barres a les ampliacions corresponen a 1 μ m (Dorca-Arévalo *et al.*, 2008).

Així mateix, vàrem demostrar, mitjançant dobles marcatges en talls de cervell de ratolí, que la unió de la toxina- ϵ es produïa a estructures mielíniques.

En la següent figura (Figura R23) s'observa com la unió de la protoxina- ϵ -GFP a cervell de ratolí colocalitza amb el marcatge d'estructures mielíniques (detectades per l'anti-MBP), i no colocalitza amb altres estructures del sistema nerviós bàsicament associades a neurones i detectades amb anti-SNAP25 (proteïna associada a la membrana presinàptica) o anti-RT97 (neurofilaments).

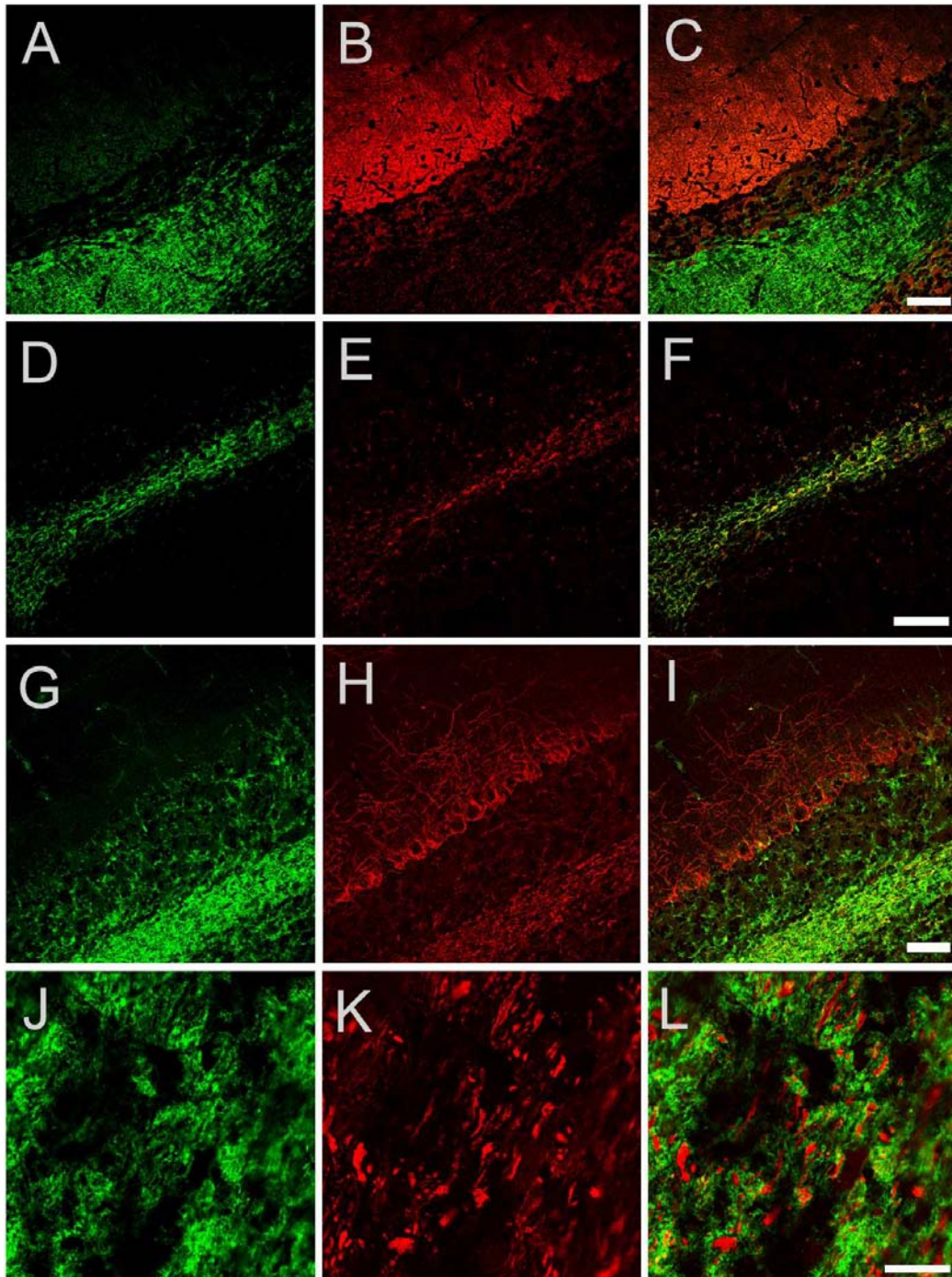


Figura R23. Unió de la prototoxina- ϵ -GFP al cervell i colocalització de la prototoxina- ϵ -GFP amb components de la mielina. Les crioseccions de cervell de ratolí es van incubar amb prototoxina- ϵ -GFP (A, C, D, F, G, I, J i L) juntament amb anti-SNAP-25 (B, C), MBP (E, F) o marcador de neurofilaments (RT97, H, I, K i L). S'observa colocalització entre la prototoxina- ϵ -GFP i l'anticòs contra MBP (F). J, K i L mostren una ampliació de la substància blanca on s'observa l'absència de colocalització entre la prototoxina- ϵ -GFP i l'anticòs contra neurofilament RT97. S'observa que RT97 marca axons neuronals i aquests estan envoltats per prototoxina- ϵ -GFP. C, F, I i L són superposicions d'imatges de la prototoxina- ϵ -GFP amb els diferents anticossos. Les barres corresponen a 50 μ m, excepte a J, K i L que corresponen a 15 μ m (modificat de Dorca-Arévalo *et al.*, 2008).

3.3.2. Unió de la toxina- ϵ a estructures mielíniques d'altres espècies.

La toxina- ϵ és capaç de reconèixer tant estructures mielíniques de ratolí com d'altres espècies (ovella i vaca), tal i com queda representat en la figura R24. Però a ovella i vaca la protoxina- ϵ -GFP marca, a més de les estructures mielíniques, l'endoteli de la microvasculatura del cervell, unió que no s'observa a ratolí.

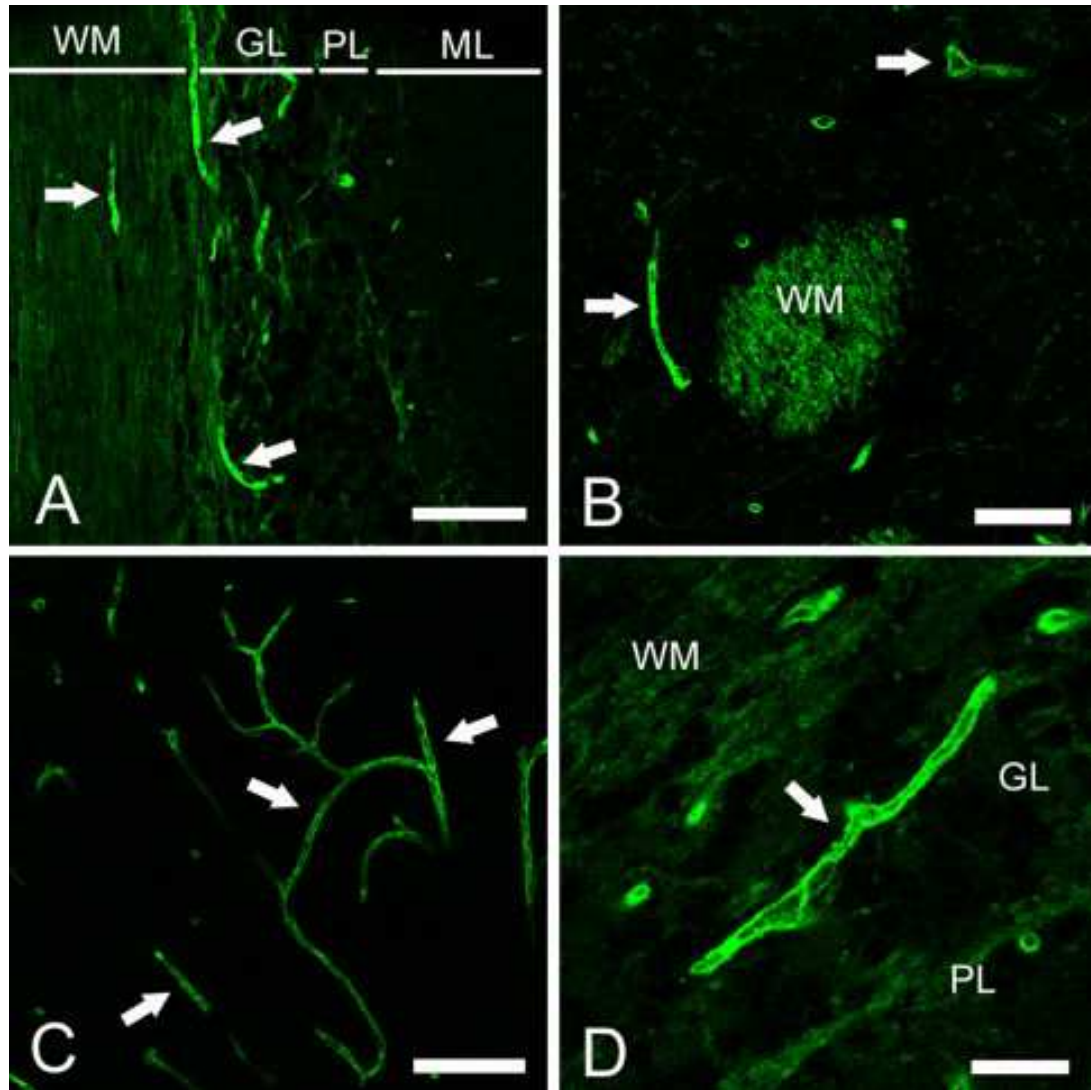


Figura R24. S'observa la unió de la protoxina- ϵ -GFP a estructures mielíniques de crioseccions de cervell d'ovella (A, B i C) i vaca (D). La imatge A correspon a una secció del cervell on es mostra la unió de la protoxina- ϵ -GFP a la substància blanca (WM) i microvasculatura (fletxes). La imatge B és un detall d'una secció d'estriat d'ovella on es mostra la unió de la protoxina- ϵ -GFP a estructures mielíniques (WM) i microvasculatura (fletxa). En la imatge C es pot veure la unió de la protoxina- ϵ -GFP a la microvasculatura (fletxes) de la capa molecular del cervell d'ovella. La imatge D correspon a un tall de cervell de vaca on es mostra la unió de la protoxina- ϵ -GFP a estructures mielíniques (WM) i microvasculatura (fletxa). WM: substància blanca; GL: capa granular; PL: capa de cèl·lules de Purkinje i ML: capa molecular. Les barres corresponen a 75 μ m (A i C), 40 μ m (B) i 25 μ m (D) (Dorca-Arévalo *et al.*, 2008).

3.3.3. Unió de la toxina- ϵ a estructures mielíniques de nervi perifèric de ratolí i humà.

La toxina- ϵ també reconeix estructures mielíniques del sistema nerviós perifèric, tal i com es veu en la següent imatge (Figura R25), tant a ratolí com a l'espècie humana.

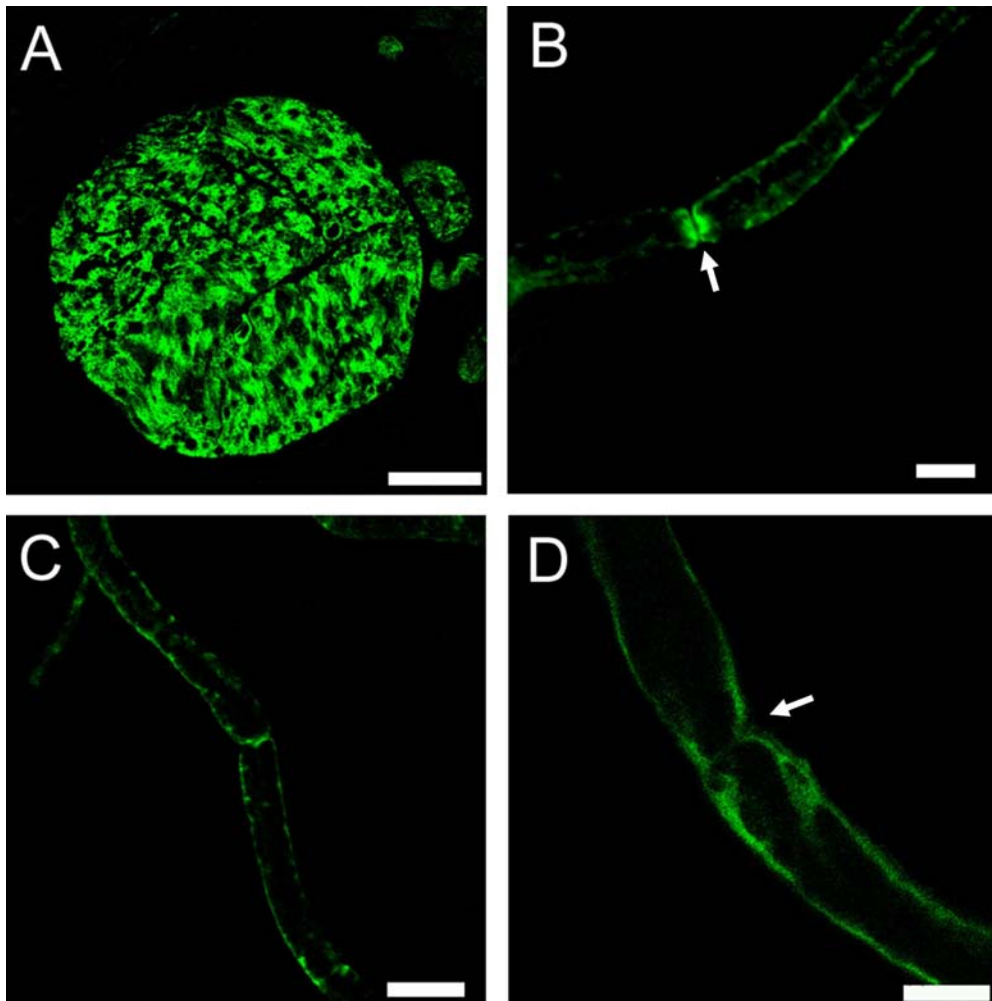


Figura R25. S'observa la unió de la toxina- ϵ a estructures mielíniques del sistema nerviós perifèric. A: secció transversal de nervi vagal de ratolí incubat amb la protoxina- ϵ -GFP. Incubacions de la protoxina- ϵ -GFP sobre fibres del *teasing* obtingudes de nervi ciàtic de ratolí (B) i de *cauda equina* d'humà (D). La imatge C correspon a la unió de la toxina- ϵ -GFP sobre fibres del *teasing* de nervi ciàtic de ratolí on es veu el mateix patró que amb protoxina- ϵ -GFP. En tots els casos es veu marcatge tant a la mielina com en els nodes de Ranvier (fletxes). Les barres corresponen a 40 μ m (A), 8 μ m (B), 20 μ m (C), i 15 μ m (D) (Dorca-Arévalo *et al.*, 2008).

3.3.4. Tractaments al sistema nerviós.

Per tal de caracteritzar la natura de la unió de la toxina- ϵ a les estructures mielíniques del sistema nerviós, es van dur a terme els mateixos tractaments que en el cas del

Resultats

sistema renal. Es van utilitzar seccions de cerebel de ratolí (SNC) i en alguns casos també seccions de múscul esquelètic (SNP).

3.3.4.1. Tractament amb Pronasa E a seccions de cerebel i múscul esquelètic de ratolí.

Les crioseccions de cerebel i múscul esquelètic de ratolí van ser tractades amb diferents concentracions de Pronasa E (0.1, 0.2, 0.5 i 1 mg/ml) durant diferents temps (5, 15, 30 i 60 min) a una temperatura de 37°C.

Les següents imatges corresponen a un tractament amb Pronasa E a una concentració significativa d'1 mg/ml durant 30 min a 37°C. Es mostra com la unió de la toxina disminueix sensiblement (Figura R26).

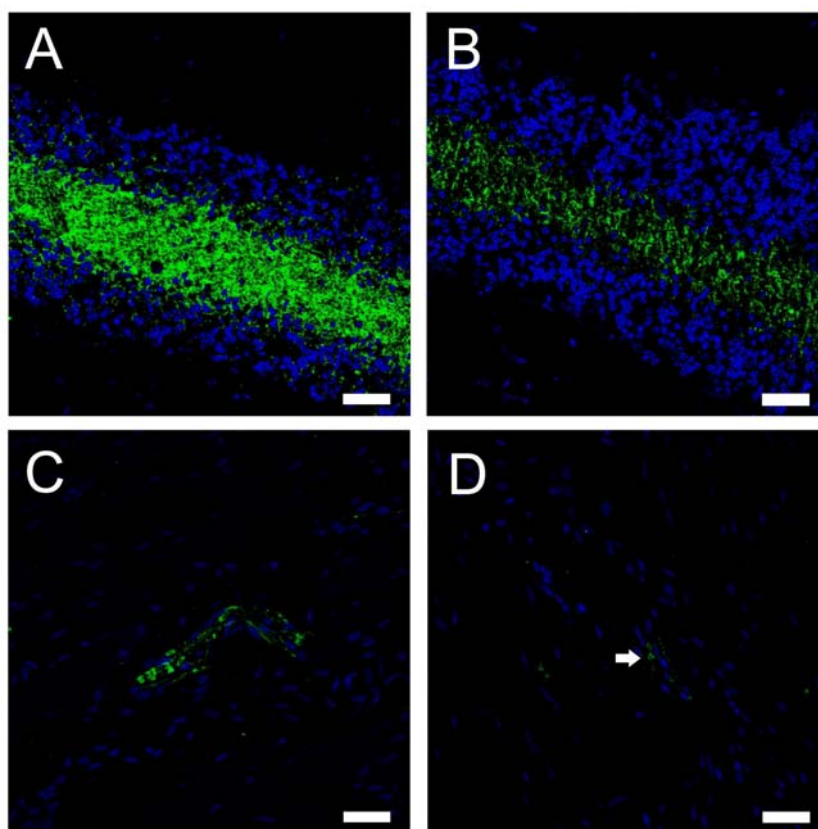


Figura R26. Imatges de microscòpia confocal que corresponen a seccions de cerebel (A, B) i de múscul esquelètic (C, D) de ratolí tractats o no amb Pronasa E a una concentració d'1 mg/ml durant 30 min a 37°C. Les imatges (A, C) corresponen als controls sense tractar i (B, D) corresponen a talls tractats amb Pronasa E. S'observa que el tractament amb Pronasa E fa disminuir la marca de la prototoxina-ε-GFP a la mielina tant al cerebel (B) com al nervi perifèric (D, fletxa). S'observa en verd el marcatge de la prototoxina-ε-GFP i en blau el marcatge dels nuclis cel·lulars. Les barres corresponen a 40µm.

3.3.4.2. Tractament de seccions de cerebel de ratolí amb detergents.

Es van tractar les seccions de cerebel de ratolí amb els mateixos detergents i en les mateixes condicions que en el cas del sistema renal (veure apartat 3.1.1.2 de resultats).

Cap dels detergents utilitzats va modificar la marca de la protoxina- ϵ -GFP en els tractes mielínics grans. En canvi, sí que vam observar però, variacions en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a tractes mielínics petits. A altes concentracions de detergents (Tritó X-100 i deoxicolat de sodi al 2%) a TA i 37°C vam observar una reducció en el marcatge de la protoxina- ϵ -GFP en tractes mielínics més petits, corresponents a petites agrupacions d'axons mielinitzats que travessen la capa granular del cerebel i arriben a la part medul·lar més gruixuda.

D'altra banda, els tractaments a 4°C van revelar un augment de la marca de la protoxina- ϵ -GFP a les petites fibres mielíniques que travessen la capa granular. Aquest augment també s'ha vist a qualsevol temperatura provada, utilitzant les concentracions més baixes dels detergents (al 0.5%). Curiosament en el cas del colat de sodi sempre s'ha vist un augment de la unió de la protoxina- ϵ -GFP en aquestes petites fibres mielíniques. A més, tractaments amb colat de sodi al 2% durant 1h a 37°C amb les posteriors coincubacions amb la protoxina- ϵ -GFP i α -MBP van revelar un augment tant de la marca de la protoxina- ϵ -GFP com de l' α -MBP demostrant que realment la protoxina- ϵ -GFP s'estava unint a fibres mielinitzades i que el detergent promou una desemascaració del possible receptor de la toxina- ϵ (veure figura AN15 annex).

La següent figura (Figura R27) mostra l'efecte de dos dels detergents més rellevants, el Tritó X-100 com a detergent no-iònic i el colat de sodi com a detergent aniònic, en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a cerebel. S'observa un augment de la unió a petites fibres mielíniques tractades amb Tritó X-100 al 0.5% i amb colat de sodi al 2%. En canvi, s'observa una reducció de la unió en aquestes fibres al tractar amb Tritó X-100 al 2%.

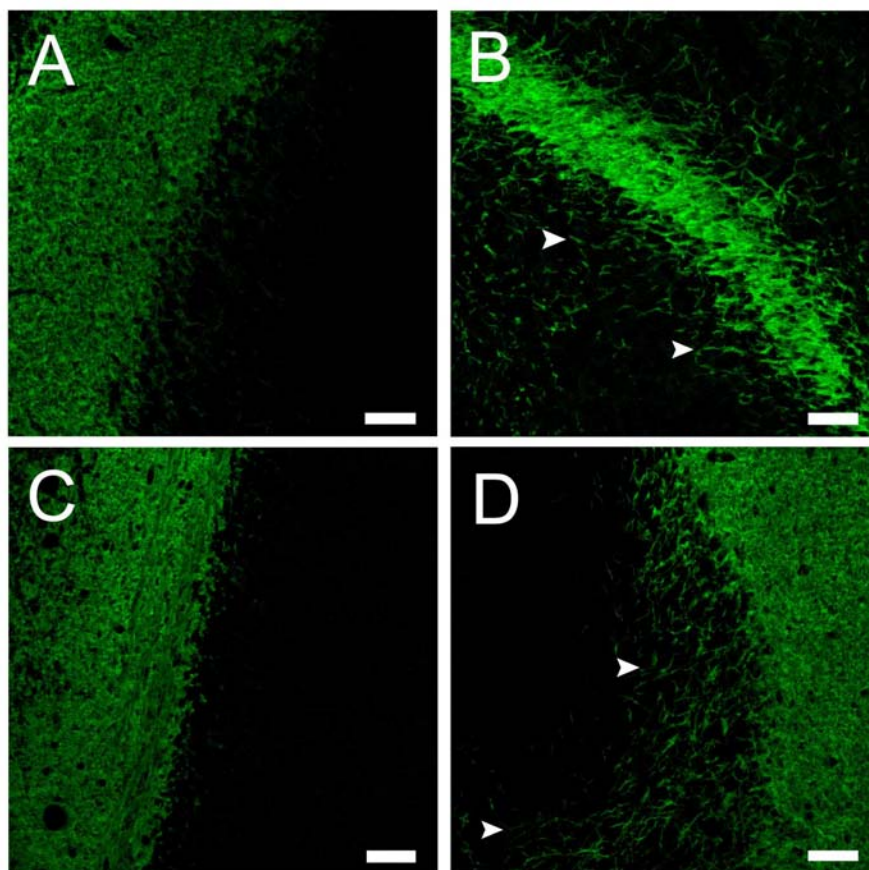


Figura R27. Imatges de microscòpia confocal que corresponen a talls de cerebel de ratolí tractats amb Tritó X-100 (B i C) i colat de sodi (D) durant 1h a TA. Els diferents detergents s'han utilitzat a una concentració del 0.5% (B) i del 2% (C i D). La imatge A correspon al control sense detergent. S'observa que els tractaments amb Tritó X-100 al 0.5% i colat de sodi al 2% (B i D, respectivament) fan augmentar el marcatge de la protoxina- ϵ -GFP als petits tractes mielínics respecte al control (puntes de fletxa). En canvi, comparant amb B i D, s'observa una reducció de la unió en aquestes fibres al tractar amb Tritó X-100 al 2% (C). Les barres corresponen a 40 μ m.

En els tractaments amb Tritó X-100 s'observa un augment de la marca a les petites fibres mielíniques tant als tractaments a TA com a 37°C a una concentració de 0.5%, en canvi s'observa una reducció de la unió a una concentració del 2% per a les mateixes temperatures (Figura AN12 de l'annex). Els mateixos resultats s'observen en els tractaments amb deoxicolat de sodi (Figura AN13 de l'annex). En el cas dels tractaments amb colat de sodi s'observa un augment de la marca a les petites fibres mielíniques a totes les condicions (Figura AN14 de l'annex).

Els resultats dels diferents tractaments es resumeixen en la següent taula (Taula R6).

DETERGENT CONCENTRACIÓ	TRITÓ X-100	NONIDET P-40	CHAPS	COLAT DE SODI	DEOXICOLAT DE SODI	T°C
0.5%	+	+	+	+	+	4°C
2%	+	+	+	+	+	
0.5%	+	Np	Np	+	+	TA
2%	-	Np	Np	+	-	
0.5%	+	Np	Np	+	+	37°C
2%	-	Np	Np	+	-	

Taula R6. Taula on s'indica la intensitat d'unió de la protoxina- ϵ -GFP a les petites fibres mielíniques segons el tractament utilitzat.

(+) : Augment del marcatge, (-) : Disminució del marcatge, (Np) : No provat.

3.3.4.3. Tractaments amb N-glicosidasa F i β -eliminació a cerebel de ratolí.

Per tal d'estudiar la implicació dels glúcids en la unió de la protoxina- ϵ -GFP al cerebel de ratolí, vàrem fer els mateixos tractaments amb N-glicosidasa F i tractaments de β -eliminació que en el cas del ronyó (veure apartat 3.1.1.3 de resultats).

En el cas del cerebel es va utilitzar la N-glicosidasa F a una concentració de 10 U/ml a 37°C durant la nit. Es va observar un lleuger augment de la unió de la protoxina- ϵ -GFP després de tractar amb N-glicosidasa F (Figura R28), podent concloure que la unió de la protoxina- ϵ -GFP no és dependent de N-glicans.

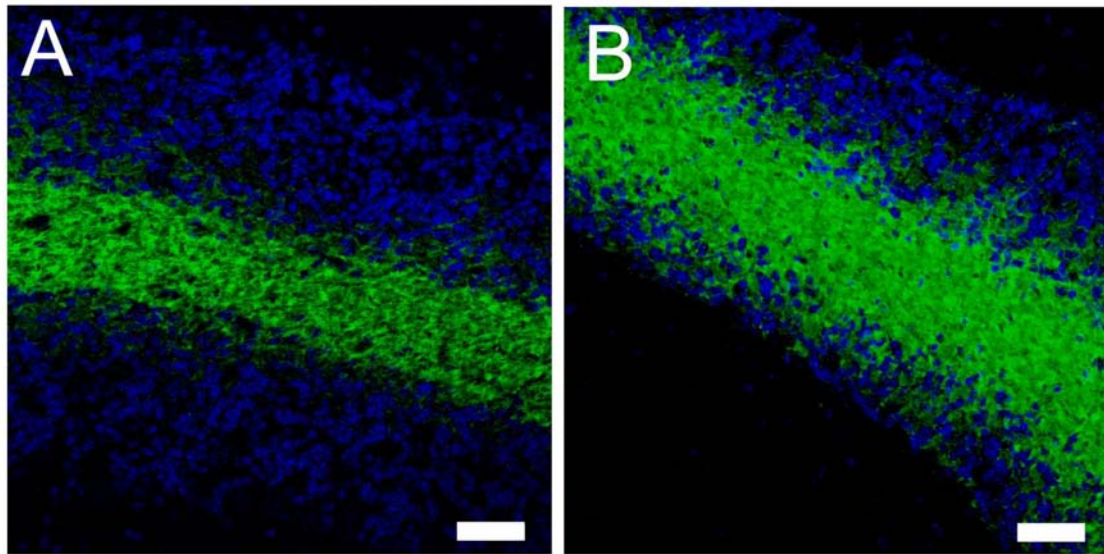


Figura R28. Imatges de microscòpia confocal que corresponen a talls de cerebel de ratolí tractats o no amb N-glicosidasa F a 37°C durant la nit. La imatge A correspon a un tall sense tractar (control), mentre que la imatge B correspon a un tall tractat amb 10 U/ml de N-glicosidasa F. S'observa un lleuger augment en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a la part medul·lar corresponent a estructures mielíniques. S'observa en verd el marcatge de la protoxina- ϵ -GFP i en blau el marcatge dels nuclis cel·lulars. Les barres corresponen a 40 μ m.

Per tal de provar si els O-glicans podrien estar involucrats en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a la mielina es van realitzar experiments de β -eliminació.

En la figura següent (Figura R29) es mostren diferents imatges on les seccions de cerebel s'han tractat amb β -eliminació, observant-se una disminució de la marca de la protoxina- ϵ -GFP després del tractament. Concloent, així, que la unió de la protoxina- ϵ -GFP és dependent d'O-glicans.

Com a control de l'experiment es van utilitzar dues lectines: la PNA (marca O-glicans) i la Con A (marca N-glicans). Després del tractament s'observa una disminució de la lectina PNA i cap canvi en la unió de la Con A.

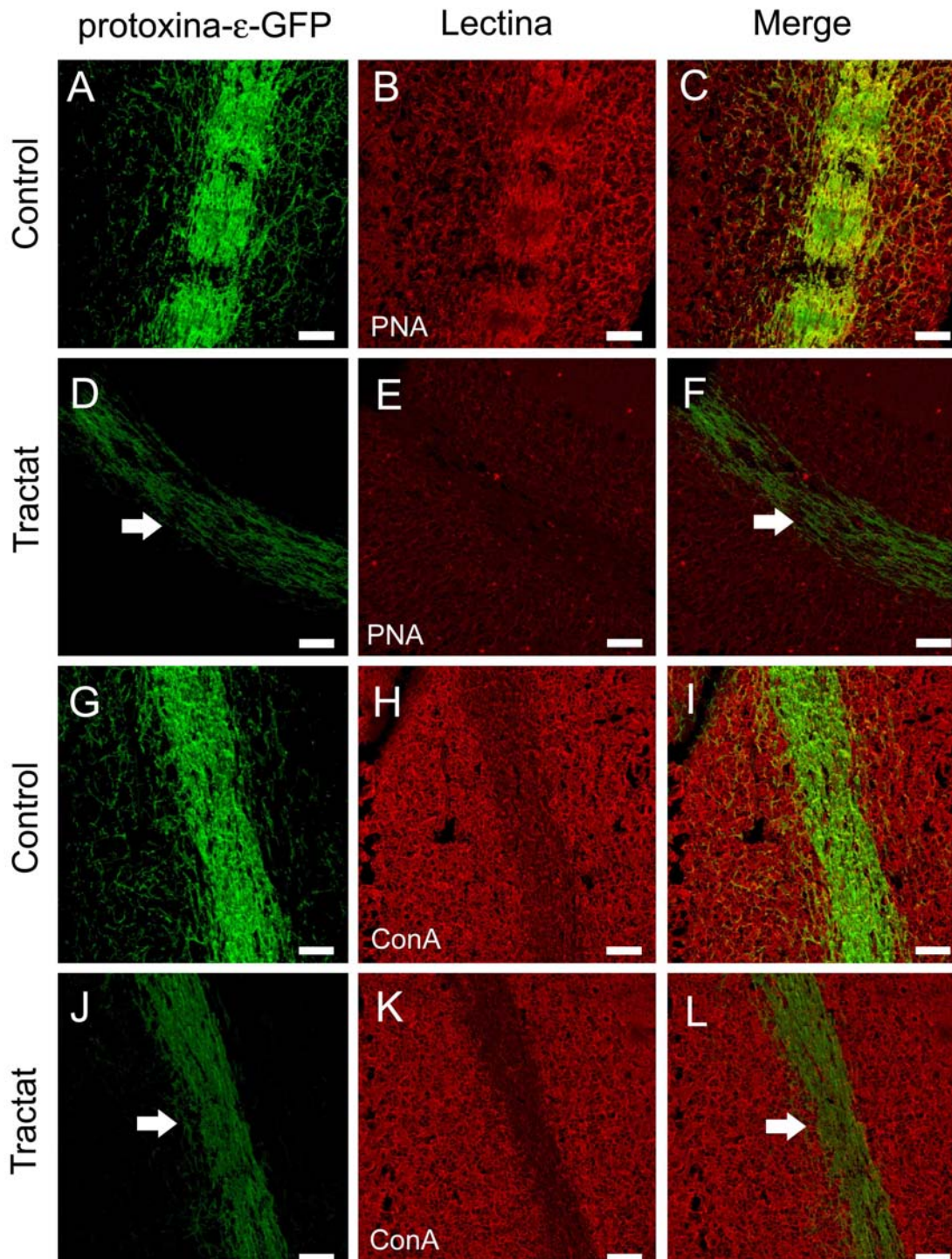


Figura R29. Imatge de microscòpia confocal on es mostren tractaments de β -eliminació sobre seccions de cerebel de ratolí. A-C i G-I són els controls sense tractar. D-F i J-L corresponen als tractaments. S'observa una disminució de la unió de protoxina- ϵ -GFP a les estructures mielíniques després del tractament (D, F, J i L, fletxes), i també s'observa una disminució de la lectina PNA que detecta O-glicans (vermell, E). No s'observa cap canvi en la unió de la lectina Con A que detecta N-glicans després del tractament (vermell, K). Les imatges (C, F, I i L) són superposicions de la protoxina- ϵ -GFP amb les respectives lectines. Les barres corresponen a 40 μ m.

B- Estudi de la distribució de la toxina- ϵ i els seus mutants *in vivo*.

1. Estudis de la distribució de la toxina- ϵ administrada intravenosament a ratolí.

Estudis utilitzant la toxina- ϵ radioactiva administrada i.v havien demostrat que aquesta s'acumulava principalment als ronyons i al cervell (Nagahama i Sakurai, 1991a). L'any 1998, Miyamoto i col·laboradors van descriure l'aparició de dany neuronal a diverses àrees del cervell després d'injectar la toxina- ϵ a una dosi letal (100 ng/kg). Les dosis subletals (50 ng/kg) van provocar dany neuronal predominantment a l'hipocamp, on les cèl·lules piramidals apareixien encongides i picnòtiques. A més, l'administració prèvia de riluzol, un inhibidor de la secreció de glutamat, o dels antagonistes glutamatèrgics CNQX i MK-801, va protegir les cèl·lules de l'hipocamp enfront l'efecte de la toxina- ϵ , suggerint que la toxina- ϵ actuaria en el sistema glutamatèrgic promovent una sobresecreció de glutamat que conduiria a la mort neuronal. Aquestes observacions demostren si més no que la toxina- ϵ té la capacitat d'accedir al sistema nerviós central on provoca tots aquests efectes.

Amb la finalitat d'estudiar la distribució de la toxina- ϵ en l'àmbit del sistema nerviós, es va injectar i.v toxina- ϵ -GFP o protoxina- ϵ -GFP juntament amb BSA conjugat amb un fluorocrom (BSA-Alexa 647). Els resultats obtinguts demostren que la toxina- ϵ -GFP té la capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica (BHE) i accedir al parènquima del cervell. La protoxina- ϵ -GFP, en canvi, queda limitada a la llum de la microvasculatura del cervell així com a les seves cèl·lules endotelials sense travessar la BHE. La BSA roman dins el vas en el cas de les injeccions amb protoxina- ϵ -GFP, però s'extrava en el cas de les injeccions amb toxina- ϵ -GFP (Figura R30) encara que queda retinguda pels peus astrocitaris, mentre que, la toxina- ϵ -GFP els travessa (Figura R31).

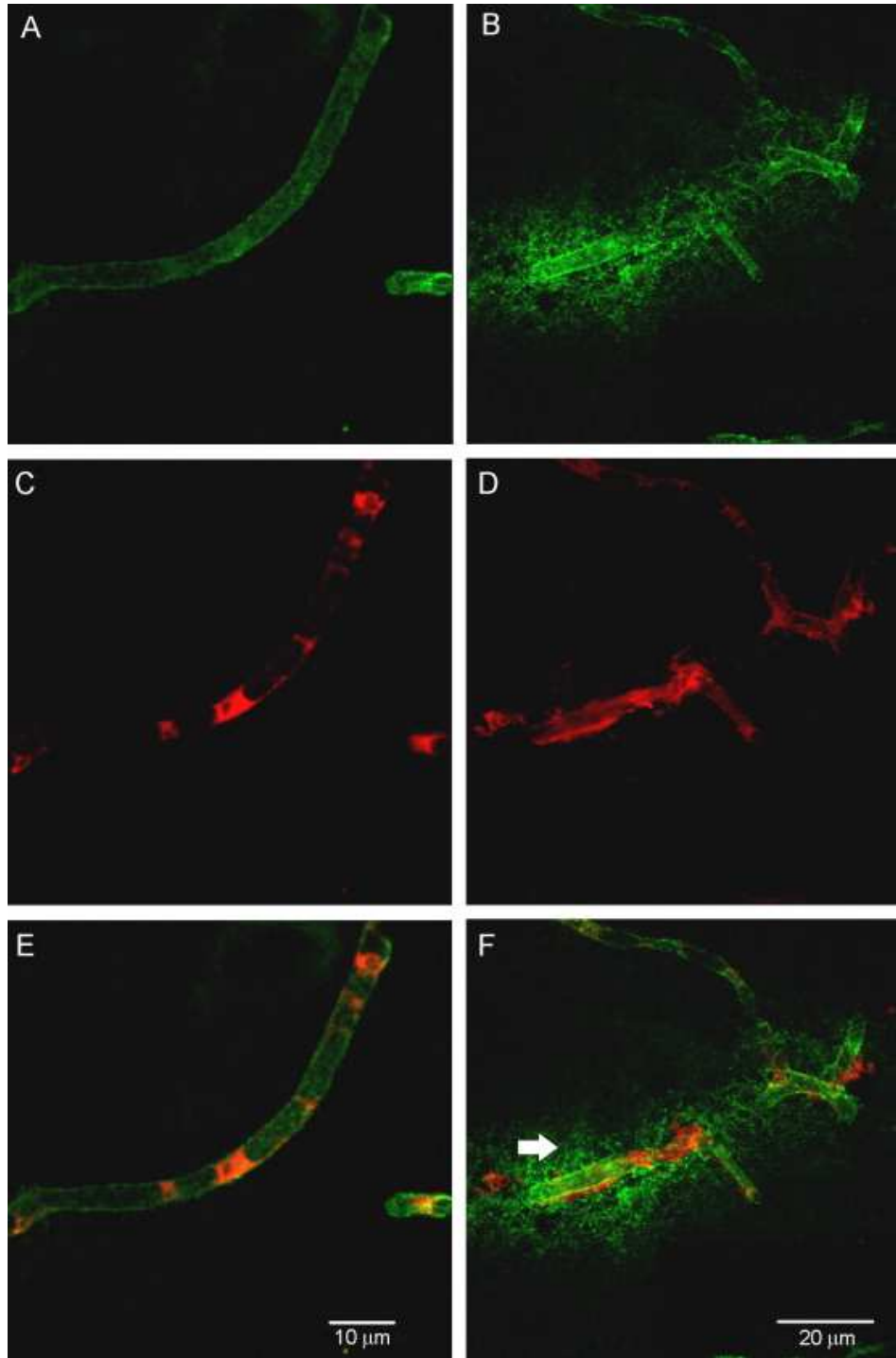


Figura R30. Localització de la BSA-Alexa 546 als vasos sanguinis després de l'administració i.v de protoxina- ϵ -GFP o toxina- ϵ -GFP a ratolí. Els ratolins es van injectar amb protoxina- ϵ -GFP (columna esquerra) o toxina- ϵ -GFP (columna dreta) en combinació amb BSA-Alexa 546. Es van obtenir seccions dels cervells al criòstat i es van examinar al microscopi de fluorescència confocal. La marca verda correspon a la protoxina- ϵ -GFP (A i E) o a la toxina- ϵ -GFP (B i F) i la marca vermella correspon a la BSA (C, D, E i F). S'observa que la protoxina- ϵ -GFP roman associada a la part luminal dels vasos sanguinis, mentre que la toxina- ϵ -GFP també s'observa en aquesta zona però a més, és capaç de travessar el vas i sortir al parènquima del cervell (fletxa). Les barres corresponen a 10 μ m a les imatges de l'esquerra i a 20 μ m a les imatges de la dreta (Soler-Jover *et al.*, 2007).

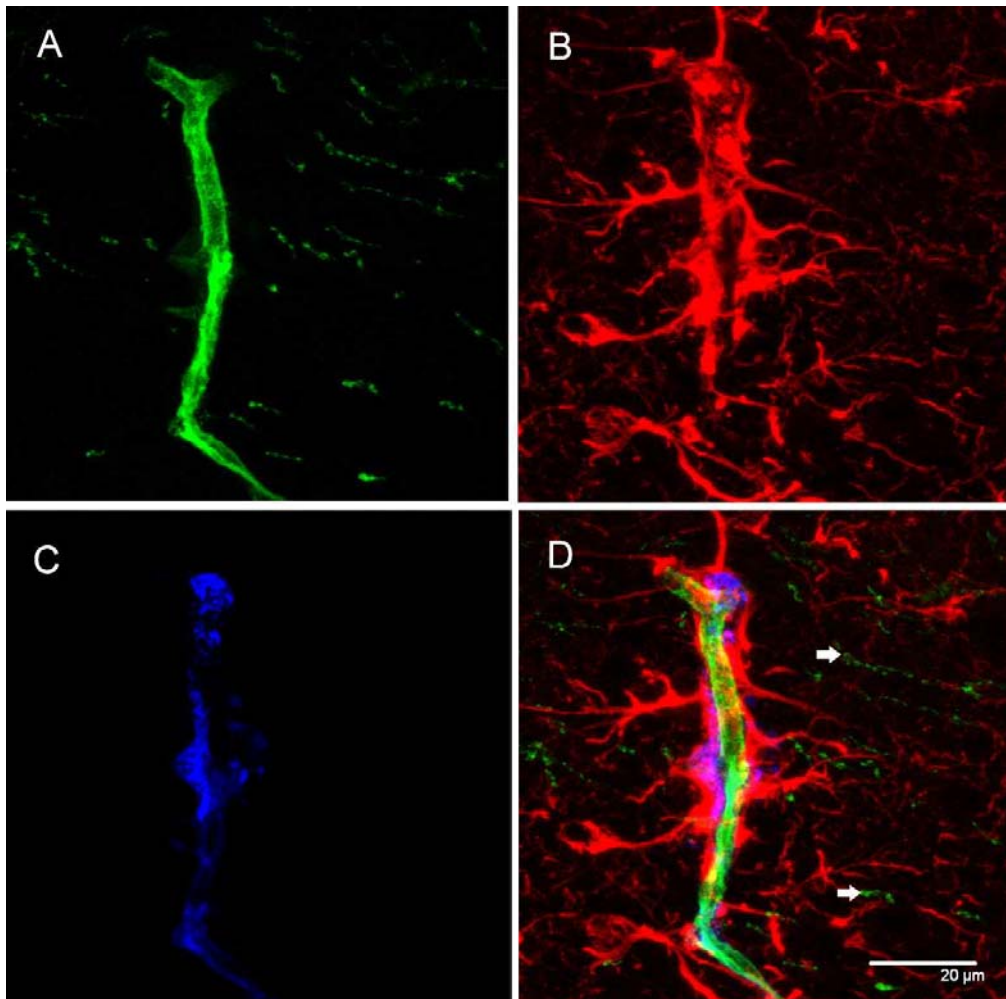


Figura R31. Localització de la BSA Alexa-546 i astròcits després d'una injecció intravenosa de toxina- ϵ -GFP a ratolí. La immunofluorescència es va realitzar contra la GFAP per detectar els astròcits (vermell, B) en crioseccions de cervell de ratolí coinjectat amb toxina- ϵ -GFP (verd, A) i BSA Alexa-546 (blau, C). La superposició de les imatges anteriors (D) mostra els astròcits (vermell) que estan envoltant els vasos sanguinis que contenen la toxina (verd) i la BSA (blau). S'observa com la BSA es pot trobar fora del vas però sempre està retinguda pels peus astrocitàris, en canvi, la toxina es localitza fora dels peus astrocitàris (fletxes) demostrant que aquesta té la capacitat de travessar la BHE i accedir al parènquima del cervell (Soler-Jover *et al.*, 2007).

2. Estudis de les mutacions Etx-V56C/F118C, Etx-I51C/A114C i Etx-H106P en l'àmbit del SNC.

Donada la capacitat de la toxina- ϵ de travessar la BHE, fóra de gran utilitat trobar un mutant no tòxic que mantingui la capacitat de travessar la barrera per utilitzar-lo com a vehicle i poder fer arribar certes molècules al parènquima del cervell, que per sí mateixes no tindrien aquesta habilitat.

Resultats

Per aquest motiu, vàrem construir tres mutants diferents, dos dels quals són mutants dominants negatius per a la toxina- ϵ , de manera que inhibeixen l'activitat tòxica de la toxina salvatge i la seva capacitat per formar porus en la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK (Pelish i McClain, 2009) (veure annex apartat E).

Els mutants Etx-I51C/A114C (mutant 1) i Etx-V56C/F118C (mutant 2) presenten un parell de substitucions per cisteïnes que formarien un pont disulfur intramolecular que inhibiria la posterior inserció de la toxina- ϵ a la membrana plasmàtica. El mutant Etx-H106P (mutant 3) té una substitució d'una histidina per una prolina en l'aa 106 i això li confereix la característica de ser una molècula no tòxica (Oyston *et al.*, 1998).

Per tal d'estudiar aquests mutants, es va injectar toxina- ϵ -GFP i protoxina- ϵ -GFP i.v de la mateixa manera que es va fer amb les formes no mutades (wt), coinjectant cada mutant amb BSA-Alexa 647 a ratolins. Es van fer seccions dels ronyons (veure annex apartat E.2) i dels cervells i es van observar al microscopi confocal.

Tant el mutant 1 com el mutant 2 provoquen la mort de l'animal en el mateix temps que ho fa la toxina- ϵ no mutada (wt). Ambdós mutants produeixen un edema generalitzat a ratolí i es detecten a ronyó. Distribuïnt-se pels capil·lars, túbuls proximals, distals i col·lectors (veure annex Figura AN20). De manera similar a com ho fa la toxina- ϵ -GFP (wt), on la unió a túbuls proximals és inespecífica i la unió a túbuls distals i col·lectors és específica.

Pel que fa al sistema nerviós, tant el mutant 1 com el 2 són capaços de travessar la BHE i arribar al parènquima del cervell igual que ho fa la toxina- ϵ no mutada (wt). En canvi, el mutant 3 es comporta igual que la protoxina- ϵ , i no té la capacitat de travessar la BHE (Figura R32).

Fins ara, tots els resultats correlacionen el fet de travessar la BHE amb la mort de l'animal. No obstant, encara està en estudi trobar alguna mutació per a la toxina- ϵ que presenti la capacitat de travesar la BHE però que no presenti toxicitat per a l'animal.

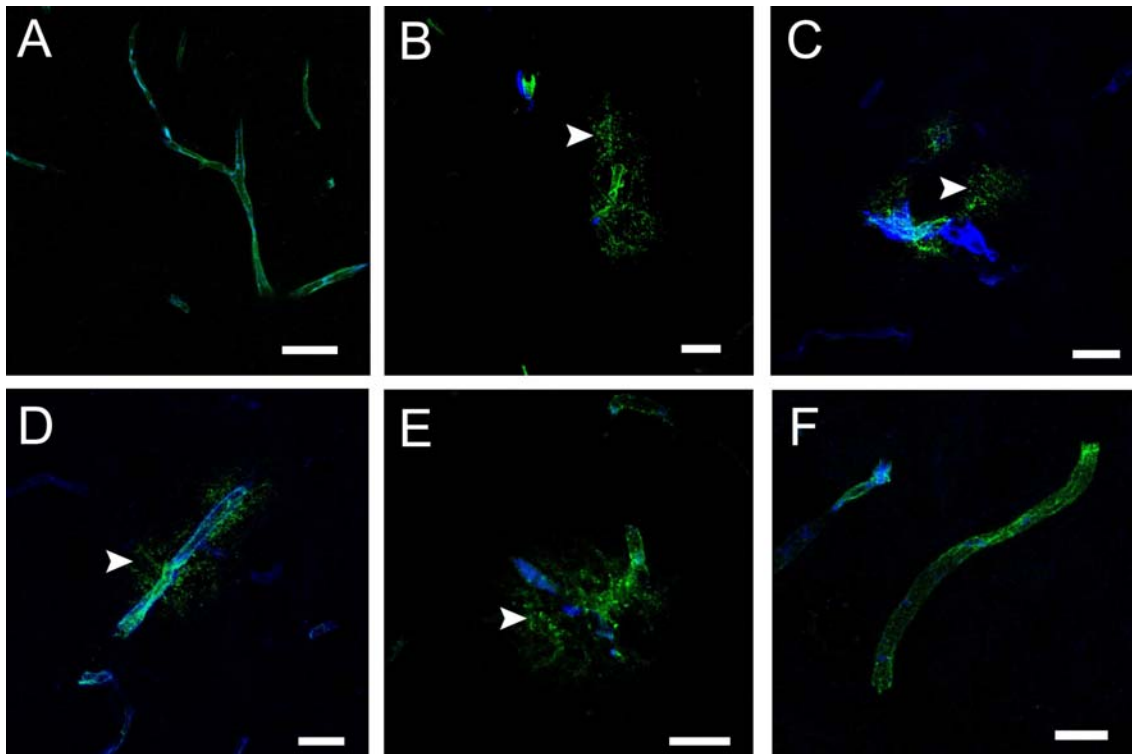


Figura R32. Imatges de crioseccions de cervells de ratolí coinjectats amb BSA-Alexa 647 (en blau) i protoxina- ϵ -GFP (A), toxina- ϵ -GFP (B i C), mutant 1 (D), mutant 2 (E) i mutant 3 (F). En tots els casos s'observa acumulació de la toxina- ϵ a l'endoteli vascular. La toxina- ϵ -GFP, el mutant 1 i el mutant 2 són capaços de travessar la BHE arribant així al parènquima del cervell (caps de fletxa), mentre que la protoxina- ϵ -GFP i el mutant 3 no tenen la capacitat de travessar la BHE i la marca roman a l'interior dels vasos. La barra de mesures correspon a 40 μm (A), 20 μm (B, C, D i E) i 16 μm (F).

3. Estudi dels components de la barrera hematoencefàlica implicats en l'acció de la toxina- ϵ .

La toxina- ϵ s'uneix a cel·lules glials tant d'astròglia com micròglia. A més, assajos de citotoxicitat sobre cultius primaris mixtes de cel·lules glials van demostrar l'efecte citotòxic de la toxina- ϵ sobre aquestes cel·lules (Soler-Jover *et al.*, 2007).

També havíem vist que la toxina- ϵ -GFP injectada, però no la protoxina- ϵ -GFP, reconeixia un tipus cel·lular al voltant de les cel·lules endotelials, que tant per la seva morfologia com per la seva localització, podrien correspondre a pericits (Figura R33 imatge I, fletxa). Aquestes són unes cel·lules que formen part de la BHE, es troben entre l'endoteli i els peus astrocitàris (Majno, 1965) i expressen actina de fibres musculars llises (SMA) i el proteoglicà NG2.

Resultats

En la següent imatge (Figura R33) es mostren dobles marcatges amb toxina- ϵ i SMA. S'observa que la toxina- ϵ -GFP travessa la BHE en les zones de microvasculatura on no es detecta SMA, en canvi, no s'observa extravasació quan sí que s'hi detecta.

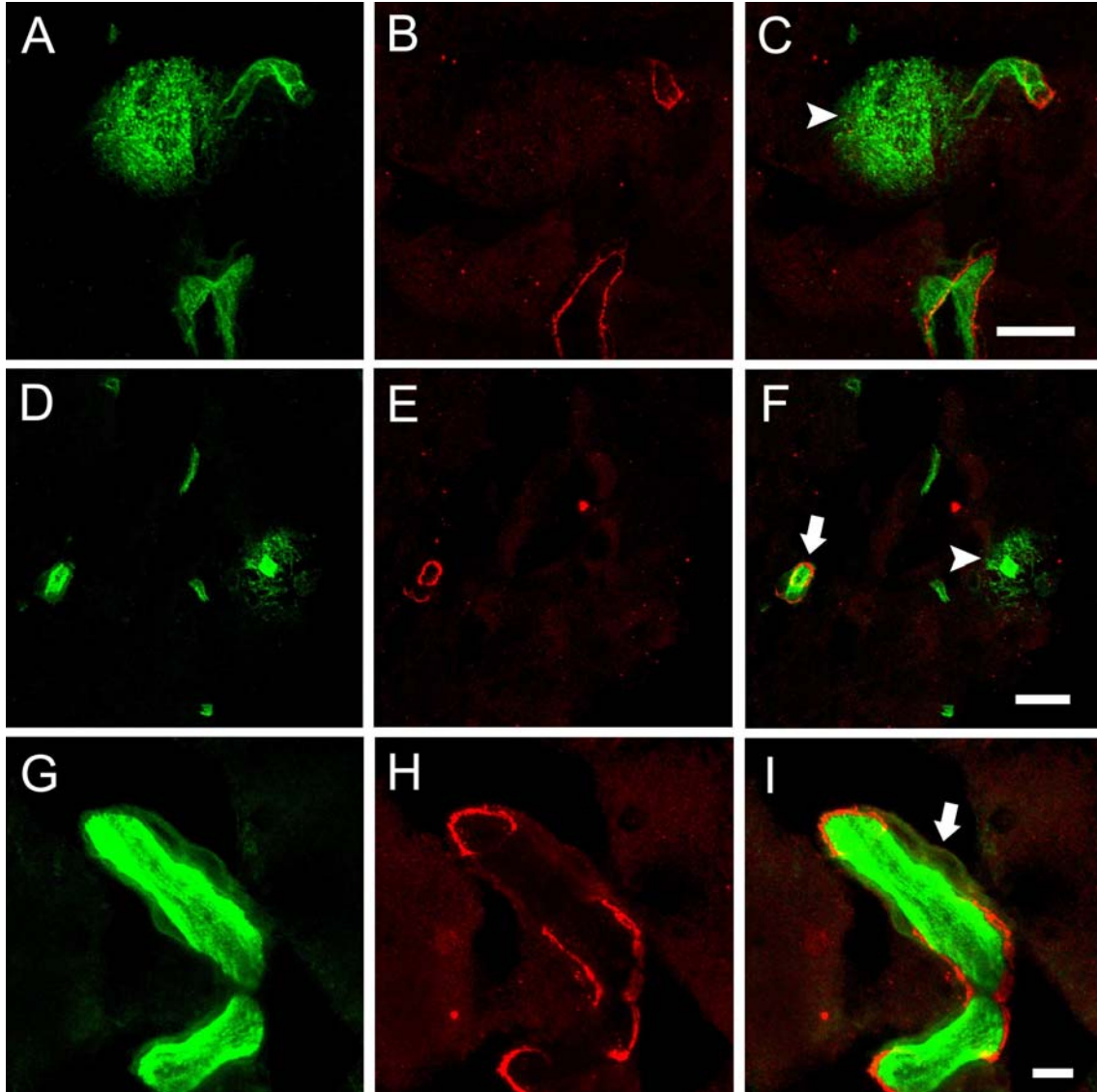


Figura R33. Imatges de microscòpia confocal on es mostren crioseccions de cervell de ratolí injectat amb la toxina- ϵ -GFP. S'observa la immunofluorescència contra la SMA (vermell, B, C, E, F, H i I) i la localització de la toxina- ϵ -GFP (verd, A, C, D, F, G i I). S'observa com la toxina travessa la BHE en alguns vasos arribant així al parènquima (cap de fletxa, C i F). Es veu com les zones dels vasos que queden marcats per l'anti-SMA no hi ha extravasació de la toxina (fletxa, F). S'observa un tipus cel·lular (possibles pericits) marcat amb la toxina que envolta el vas (fletxa, I). Les barres corresponen a 16 μ m (imatges A, B i C), 20 μ m (imatges D, E i F) i 8 μ m (imatges G, H i I).

A. Unió de la protoxina- ϵ -GFP a glàndules salivals i timus de ratolí.

Les incubacions de seccions de ronyó i cervell amb la protoxina- ϵ -GFP revelen unió d'aquesta a les cèl·lules epitelials dels túbuls distals i col·lectors del ronyó i a les estructures mielíniques tant de SNC i SNP tal com hem comentat anteriorment.

Fent un estudi més complert incubant diferents teixits i òrgans amb la toxina- ϵ -GFP o la protoxina- ϵ -GFP, vàrem observar que, a més d'unir-se a aquelles estructures, també ho feia a l'epiteli de revestiment dels conductes excretors de les glàndules salivals, i al timus a estructures amb un patró reticular que encara estan per identificar i que es detalla en l'apartat següent (Figura AN1).

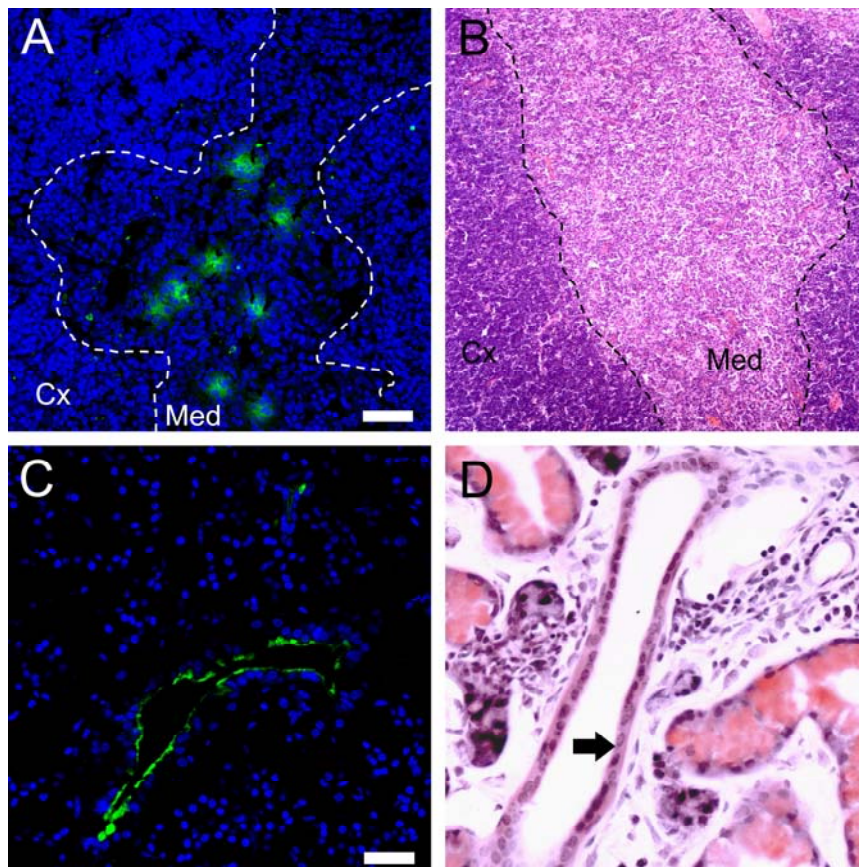


Figura AN1. Imatges de microscòpia confocal (columna esquerra), on s'identifica en verd la protoxina- ϵ -GFP i en blau els nuclis cel·lulars del timus (A) i glàndules salivals (C). La columna de la dreta correspon a fotografies de microscòpia de camp clar de talls obtinguts a partir del mateix bloc que els de la columna esquerra, tenyits amb hematoxilina-eosina (B i D). Es localitza marca fluorescent associada a l'epiteli de revestiment dels conductes excretors de les glàndules salivals (C), i també a la medul·la del timus (A). Les barres corresponen a 40 μ m. Les imatges d'hematoxilina-eosina corresponen a 10x (B) i 40x (D). Cx: Còrtex del timus, Med: Medul·la del timus.

A.1. Unió de la toxina-ε a timus de ratolí.

La marca de la toxina-ε en el timus es localitza a la zona medul·lar i corticomedul·lar. Aquesta unió es presenta amb un patró més aviat de tipus reticular que no pas de cèl·lula individual.

Hem provat d'identificar l'estructura a la que s'uneix la toxina-ε en seccions de timus de ratolí. Per fer això, s'han realitzat diversos immunomarcatsges per detectar possibles dianes cel·lulars que podrien estar relacionades amb la unió de la toxina-ε.

Per una banda, pensant que podria tractar-se de macròfags, s'han utilitzat marcadors com el CD68, que és una glicoproteïna que es troba a la membrana plasmàtica dels macròfags, o l'Iba-1, una proteïna que s'expressa a macròfags i micròglia. En cap cas s'ha vist una colocalització total amb la toxina-ε, si bé en alguna zona es veu una colocalització parcial. S'observa, però, que la marca de la toxina-ε i la dels macròfags es troben molt properes (Figura AN2), o com en el cas de l'Iba-1 hi ha zones on es veu com el macròfag envolta l'estructura marcada per la toxina-ε (Figura AN3).

Per altra banda, per tal d'estudiar si la unió de la toxina-ε podria estar relacionada amb un marcatge endotelial, vam fer incubacions dobles amb la toxina-ε i els anticossos contra CD31 i PNA que marquen endoteli. No vam trobar colocalització amb aquests marcadors (no mostrat).

En les següents imatges s'observa una localització molt propera entre la toxina-ε i els macròfags, detectats amb l'anti CD68 o l'Iba-1 (Figura AN2 i AN3, respectivament).

La unió de les lectines al timus està ben caracteritzada a la literatura. Hi ha lectines com la *Ulex europaeus agglutinin 1* (UEA 1) i la *Tetragonolobus purpureas* (TPA) que marquen estructures que es troben a la zona medul·lar. L'UEA 1 marca cèl·lules o conjunt de cèl·lules que tenen un patró de xarxa reticular, mentre que la TPA marca cèl·lules individuals. Ambdós reconeixen residus L-fucosa (Farr *et al.*, 1985; Odaka, 2009). Hi ha altres lectines que reconeixen la part cortical i corticomedul·lar del timus, com la lectina *Datura stramonium* (DSA) i la *Galanthus nivalis* (GNA) que detecten N-glicans. També hi ha l'*Arachis hypogaea* (PNA) que detecta timòcits immadurs de la zona cortical però no els madurs, que es troben majoritàriament a la medul·la; aquesta lectina detecta O-glicans. Hi ha altres lectines de marcatge més general com la lectina *Canavalia ensiformis* (ConA) i la *Pisum sativum* (PSA) que reacciona amb el cortex i medul·la; també detecten N-glicans. A més, les lectines DSA, UEA i PNA interactuen

amb la molècula CD31 (PECAM-1) (Paessens *et al.*, 2007), marcador d'endoteli i macròfags.

Així doncs, vàrem fer incubacions dobles amb la toxina i diverses lectines, DSA, UEA-1 i PNA, ja que són les que interactuen també amb el CD31 que marca macròfags i endoteli. A més, la UEA-1 es troba a la part medul·lar tal i com es troba la toxina-ε. També s'ha utilitzat la ConA ja que és una lectina de marcatge generalitzat i es troba tant a la medul·la com al cortex. Amb les lectines utilitzades no s'ha trobat colocalització amb la toxina-ε ni a la part corticomedul·lar ni a la part medul·lar del timus.

En el cas de l'UEA-1 en alguns casos el marcatge d'aquest es troba molt a prop al de toxina-ε-GFP, a més de tenir un patró d'unió molt similar. ConA, PNA i DSA no mostren ni aquest patró similar (Figura AN4).

Per veure si la marca del timus podria estar relacionada amb un marcatge epitelial, vam fer incubacions dobles amb la toxina-ε i l'anti-AE1/AE3, un anticòs que reconeix de manera generalitzada diferents tipus de citoqueratines. Les citoqueratines són proteïnes amb un pes molecular entre 40-70 kDa que formen el citoesquelet de les cèl·lules epitelials (Woodcock-Mitchell *et al.*, 1982). L'anticòs AE1/AE3 és una mescla de dos anticòs on l'anticòs AE1 identifica un determinant antigènic que presenta la majoria de citoqueratines de la família A (citoqueratines 10, 13, 14, 15, 16 i 19) i l'anticòs AE3 identifica un determinant antigènic compartit per citoqueratines de la família B (citoqueratines 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8).

No es va trobar colocalització entre la toxina-ε i el marcador de citoqueratines (imatge no mostrada).

També es van fer estudis d'immunofluorescència amb marcador d'apoptosi, ja que hi ha un elevat nombre de timòcits que pateixen apoptosi al timus i que són posteriorment eliminats pels macròfags. No es va obtenir cap colocalització (no mostrat).

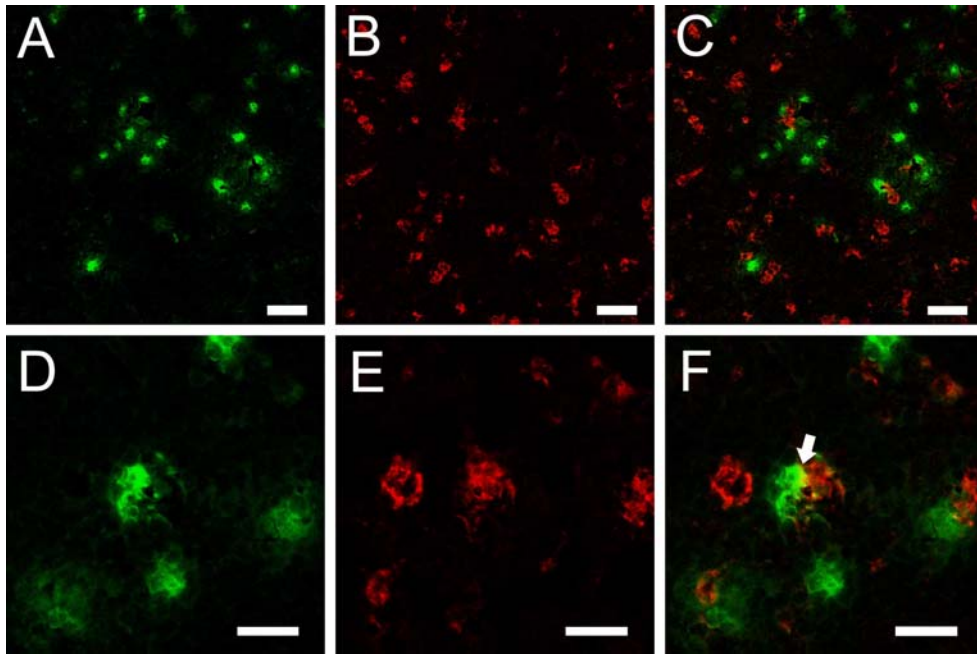


Figura AN2. Imatges de microscòpia confocal on es mostra el marcatge per la protoxina- ϵ -GFP (verd, A, C, D i F) i els macròfags marcats per l'anti-CD68 (vermell, B, C, E i F). D-F són una ampliació on s'observa en detall el patró d'unió de la toxina- ϵ i el CD68. Només en algun cas hi ha una colocalització parcial (fletxa, F). Les barres corresponen a 40 μ m (A-C). En les imatges D-F corresponen a 20 μ m.

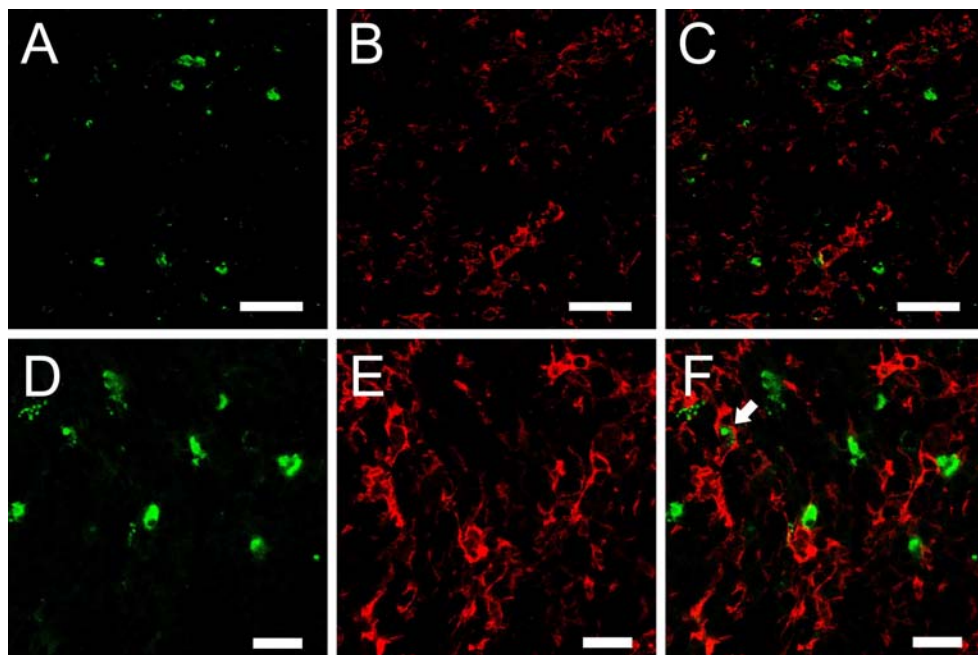


Figura AN3. Imatges de microscòpia confocal on es mostra el marcatge per la protoxina- ϵ -GFP (verd, A, C, D i F) i els macròfags marcats per l'anti-Iba-1 (vermell, B, C, E i F). D-F són una ampliació on s'observa en detall el patró d'unió de la toxina- ϵ i l'Iba-1. No hi ha colocalització, tot i que en alguns casos els macròfags embolcaven les estructures marcades per la toxina- ϵ (fletxa, F). Les barres corresponen a 40 μ m (A-C). En les imatges D-F corresponen a 20 μ m.

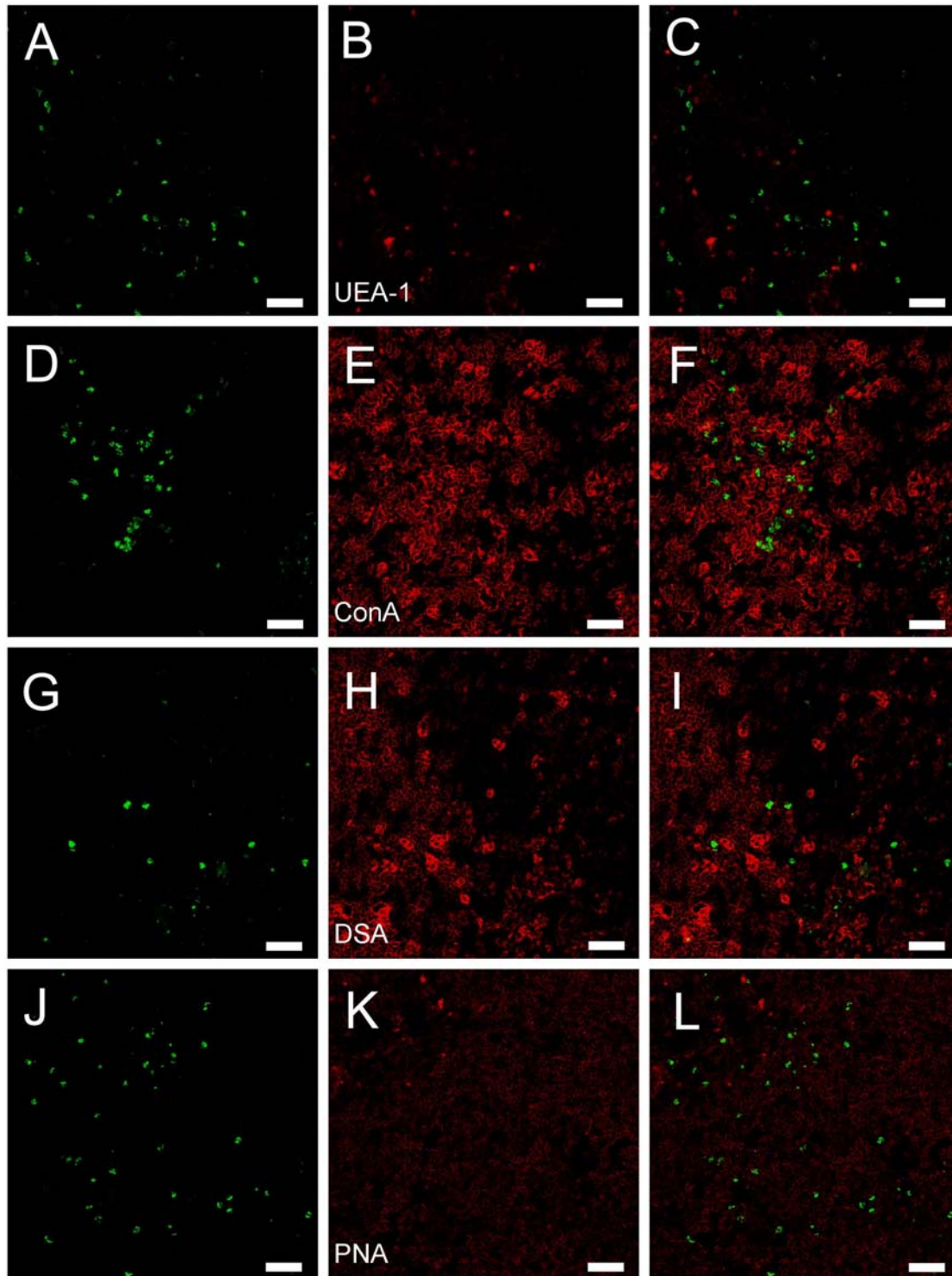


Figura AN4. Imatges de microscòpia confocal de crioseccions de timus de ratolí on es mostra el marcatge per la protoxina- ϵ -GFP (verd, A, C, D, F, G, I, J i L) i les següents lectines (vermell): UEA-1 (B i C), ConA (E i F), DSA (H i I) i PNA (K i L). No s'observa colocalització entre la toxina- ϵ i les lectines en cap cas. En el cas de l'UEA-1, però, el patró de distribució és molt similar al de toxina- ϵ , tots dos a la part medul·lar del timus. DSA i PNA detecten les zones cortical i corticomedul·lar i la ConA té una distribució més generalitzada, tant al cortex com a la medul·la. Les barres corresponen a 40 μ m.

A.1.1. Tractament amb Pronasa E a seccions de timus de ratolí.

De la mateixa manera que es va caracteritzar la natura de la unió de la toxina- ϵ en el sistema renal i nerviós de ratolí, també es va fer en el timus. Els tractaments utilitzats van ser amb pronasa E i diversos detergents.

Les crioseccions de timus de ratolí van ser tractades amb diferents concentracions de Pronasa E (0.1, 0.2, 0.5 i 1 mg/ml) durant diferents temps d'exposició (5, 15, 30 i 60 min) a 37°C.

La següent imatge correspon a un tractament amb Pronasa E a una concentració significativa de 0.2 mg/ml durant 30 min a 37°C. No s'observa unió de la toxina en les seccions tractades amb Pronasa E (Figura AN5).

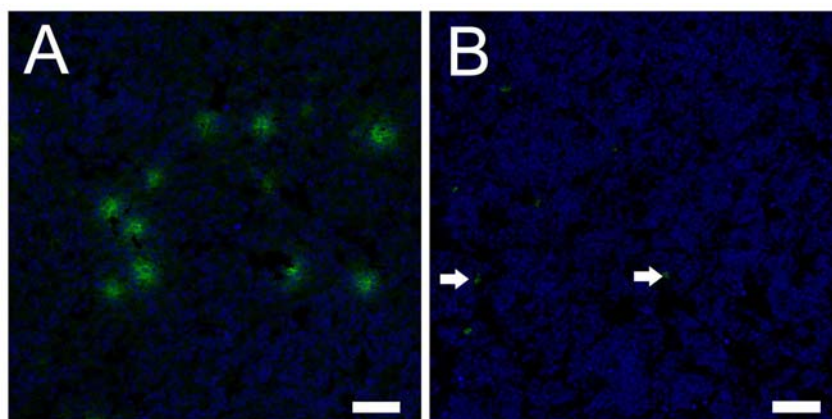


Figura AN5. Imatges de microscòpia confocal que corresponen a seccions de timus de ratolí tractats amb Pronasa E a una concentració de 0.2 mg/ml durant 30 min a 37 °C. La imatge A correspon a un tall control, sense tractar, i la imatge B correspon a un tall tractat amb Pronasa E. En verd és el marcatge de la protoxina- ϵ -GFP i en blau els nuclis cel·lulars. S'observa que el tractament amb Pronasa E evita la posterior unió de la protoxina- ϵ -GFP (fletxes, B). Les barres corresponen a 40 μ m.

A.1.2. Tractament amb detergents a seccions de timus de ratolí.

Es van tractar les seccions de timus de ratolí tal i com s'havia fet amb ronyó i cerebel, utilitzant els mateixos detergents i les mateixes condicions experimentals (veure secció 3.1.1.2 de resultats).

Els detergents Tritó X-100 (Figura AN6) i colat de sodi (Figura AN7) no van modificar la unió de la protoxina- ϵ -GFP al timus. En canvi, el tractament amb deoxicolat de sodi al 2% a 37°C va presentar una lleugera disminució (Figura AN8).

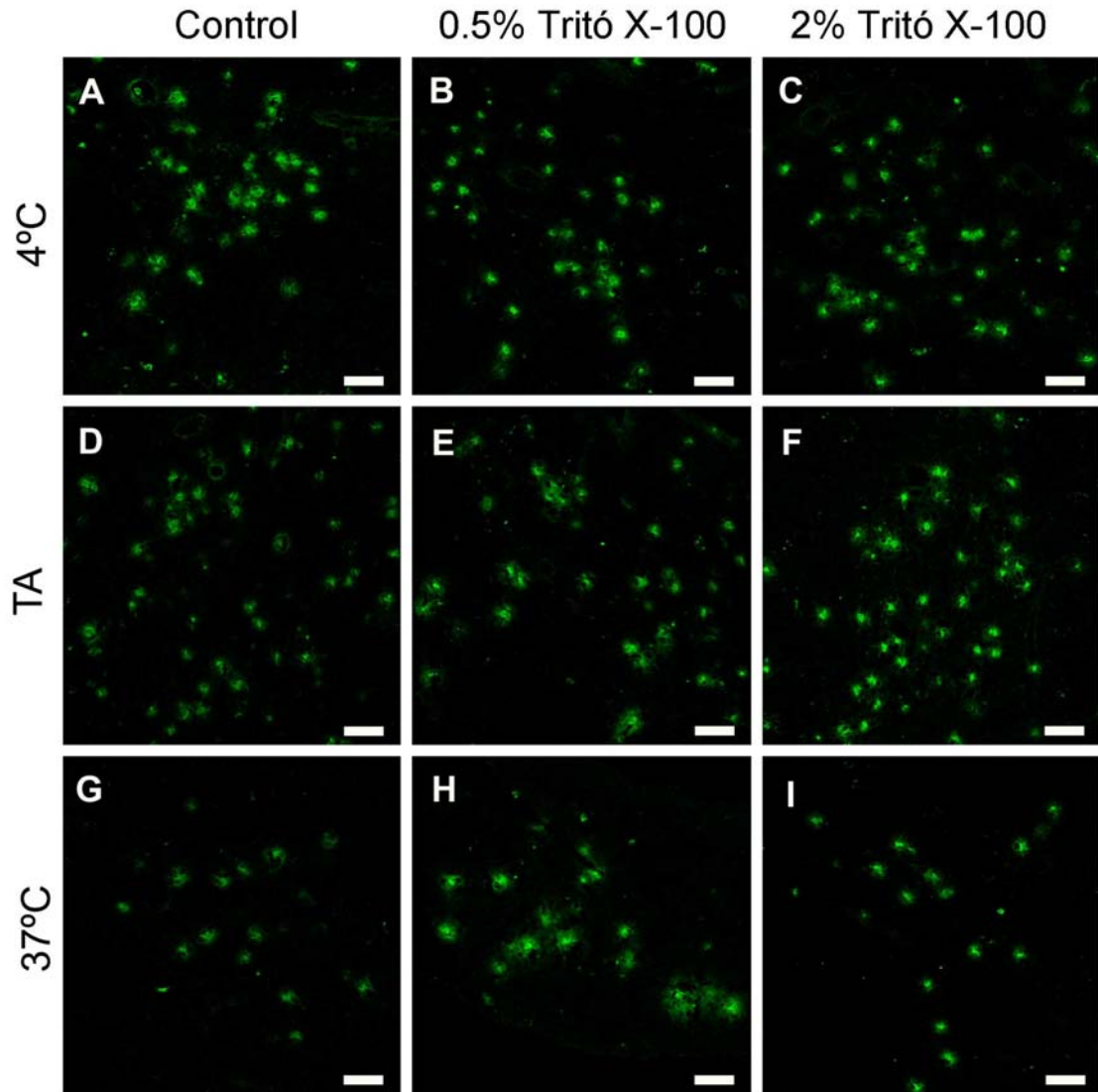


Figura AN6. Imatges de microscòpia confocal de seccions de timus de ratolí tractats amb Tritó X-100. A-C corresponen a tractaments a 4°C, D-F corresponen a tractaments a TA i G-I corresponen a tractaments a 37°C, durant 1h per a tots els casos. Les imatges A, D i G corresponen a controls (sense detergent). Les imatges B, E i H a 0.5% de Tritó X-100 i les imatges C, F i I a tractaments al 2%. No s'observen canvis en la unió de la protoxina-ε-GFP a cap de les condicions provades. Les barres corresponen a 40 μm.

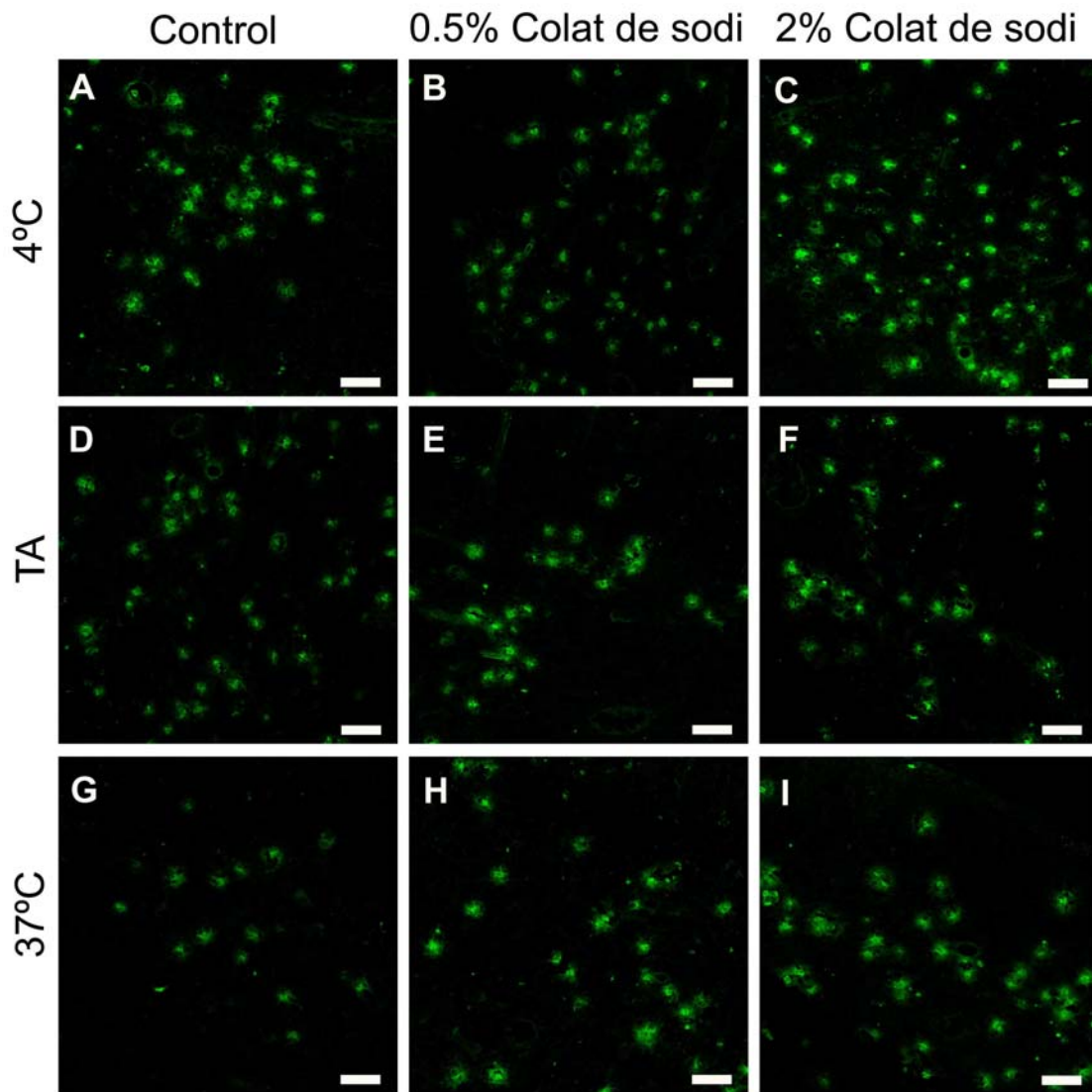


Figura AN7. Imatges de microscòpia confocal de talls de timus de ratolí tractats amb colat de sodi. A-C correspon a tractaments a 4°C, D-F correspon a tractaments a TA i G-I correspon a tractaments a 37°C, durant 1h per a tots els casos. Les imatges A, D i G corresponen a controls (sense detergent). Les imatges B, E i H a 0.5% de colat de sodi i les imatges C, F i I a tractaments al 2%. No s'observen canvis en la unió de la protoxina-ε-GFP a cap de les condicions provades. Les barres corresponen a 40 μm.

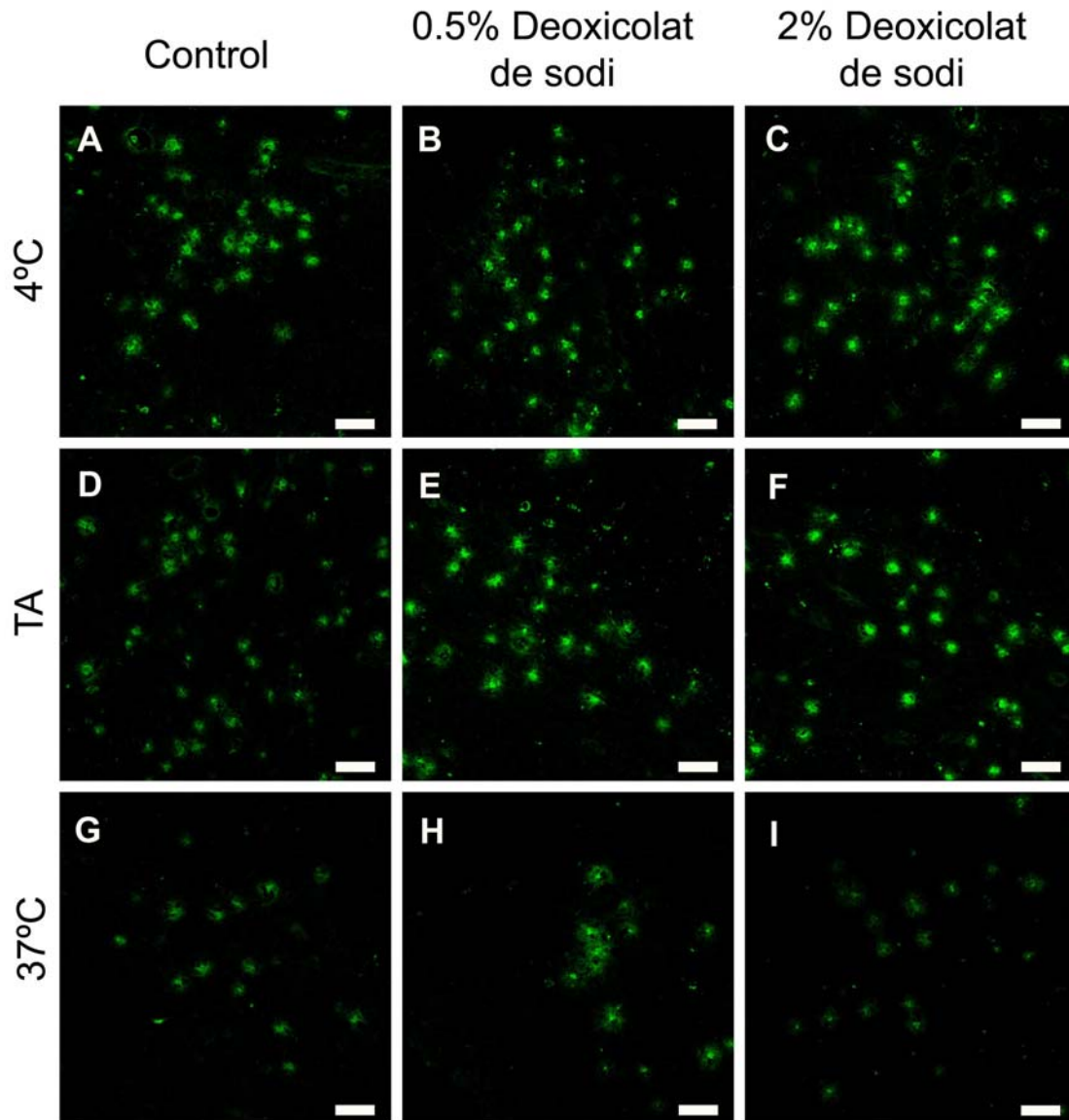


Figura AN8. Imatges de microscòpia confocal de talls de timus de ratolí tractats amb deoxicolat de sodi. A-C correspon a tractaments a 4°C, D-F correspon a tractaments a TA i G-I correspon a tractaments a 37°C, durant 1h per a tots els casos. Les imatges A, D i G corresponen a controls (sense detergent). Les imatges B, E i H a 0.5% de deoxicolat de sodi i les imatges C, F i I a tractaments al 2%. No s'observen canvis en la unió de la protoxina- ϵ -GFP, excepte en el tractament del 2% a 37°C (I) on s'observa una lleugera reducció. Les barres corresponen a 40 μ m.

B. Tractament amb detergents sobre seccions de ronyó de ratolí.

En el cas del ronyó, en paral·lel als tractaments amb CHAPS i Nonidet p-40, es van provar altres detergents com el Tritó X-100, el colat de sodi i el deoxicolat de sodi, a diverses temperatures i concentracions, tal i com està explicat en l'apartat 3.1.1.2 de resultats.

El tractament amb 0.5% de Tritó X-100 provoca un lleuger augment de la marca de la protoxina- ϵ -GFP als túbuls distals en totes les condicions de temperatura, però una gran disminució en els tractaments al 2%. Resultats similars en van observar per als tractaments amb deoxicolat de sodi.

Curiosament, en el cas dels tractaments amb colat de sodi es va observar un augment de la marca en els túbuls distals després de tractar amb el 2% en totes les condicions de temperatura, i no es van observar canvis respecte el control al tractar amb el detergent al 0.5% (Figures AN9, AN10 i AN11).

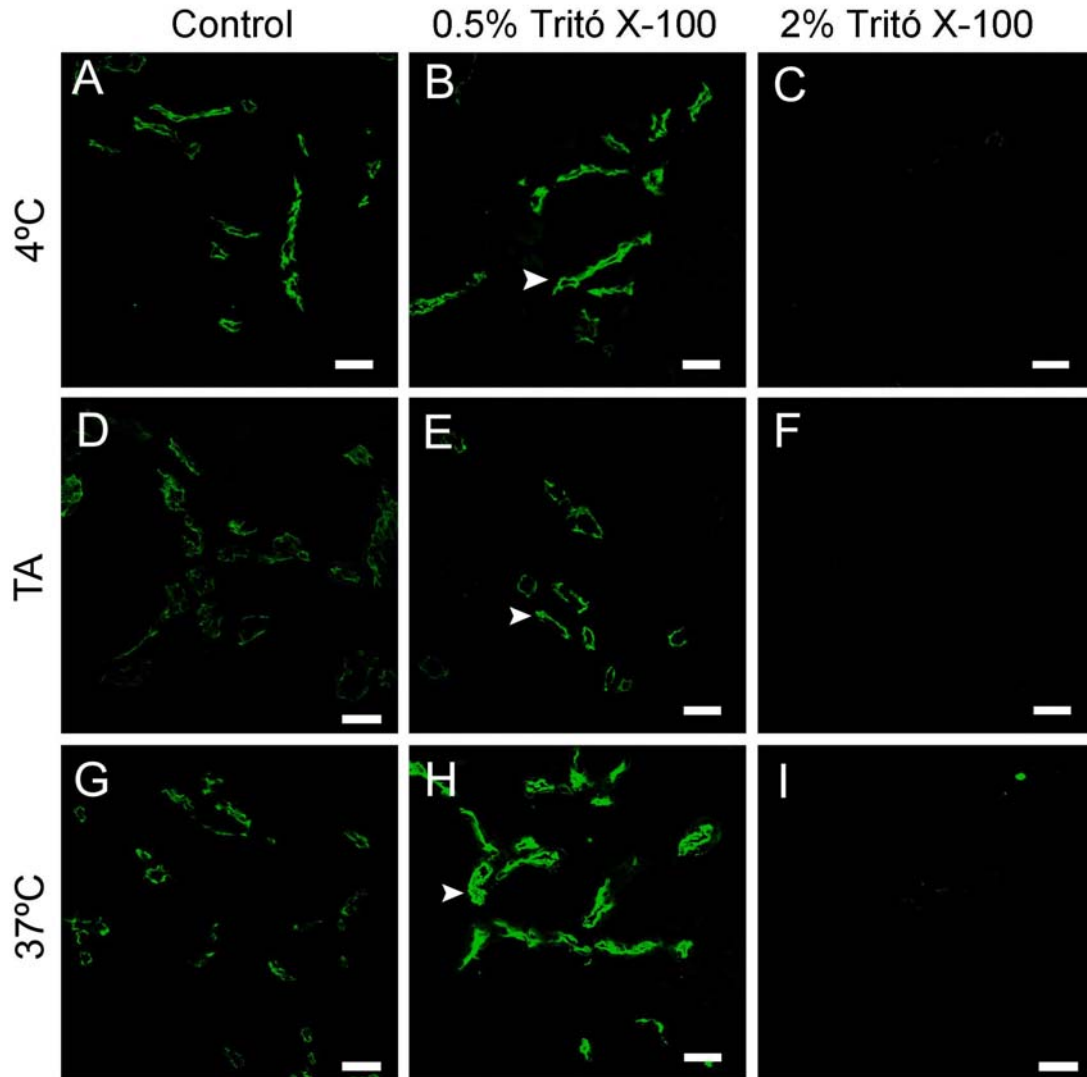


Figura AN9. Imatges de microscòpia confocal de talls de ronyó de ratolí tractats amb Tritó X-100. A-C corresponen a tractaments a 4°C, D-F corresponen a tractaments a TA i G-I corresponen a tractaments a 37°C, durant 1h per a tots els casos. Les imatges A, D i G corresponen a controls (sense detergent). Les imatges B, E i H a 0.5% de Tritó X-100 i les imatges C, F i I a tractaments al 2%. S'observa que en els tractaments amb 0.5% de Tritó X-100 hi ha un lleuger augment en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a l'epiteli dels túbuls distals (punta de fletxa, B, E i H), en canvi, en el tractament al 2% hi ha una disminució en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a l'epiteli dels túbuls distals. Les barres corresponen a 40 μ m.

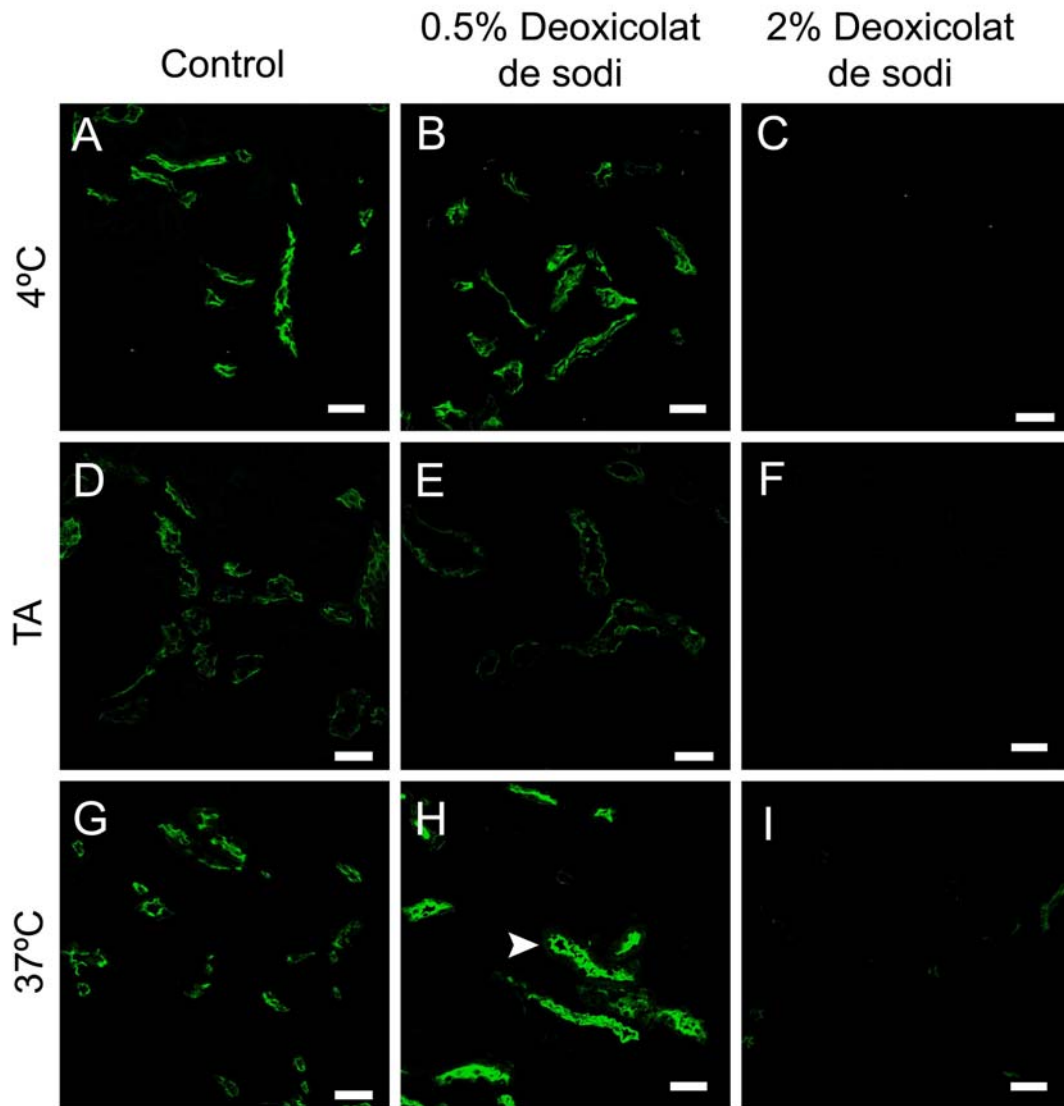


Figura AN10. Imatges de microscòpia confocal de talls de ronyó de ratolí tractats amb deoxicolat de sodi. A-C corresponen a tractaments a 4°C, D-F corresponen a tractaments a TA i G-I corresponen a tractaments a 37°C, durant 1h per a tots els casos. Les imatges A, D i G corresponen a controls (sense detergent). Les imatges B, E i H a 0.5% de deoxicolat de sodi i les imatges C, F i I a tractaments al 2%. S'observa un lleuger augment en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a l'epiteli dels túbuls distals al tractar a una concentració del 0.5% a 37°C (punta de fletxa, H), i una disminució de la unió al tractar al 2% a qualsevol temperatura. Les barres corresponen a 40 μ m.

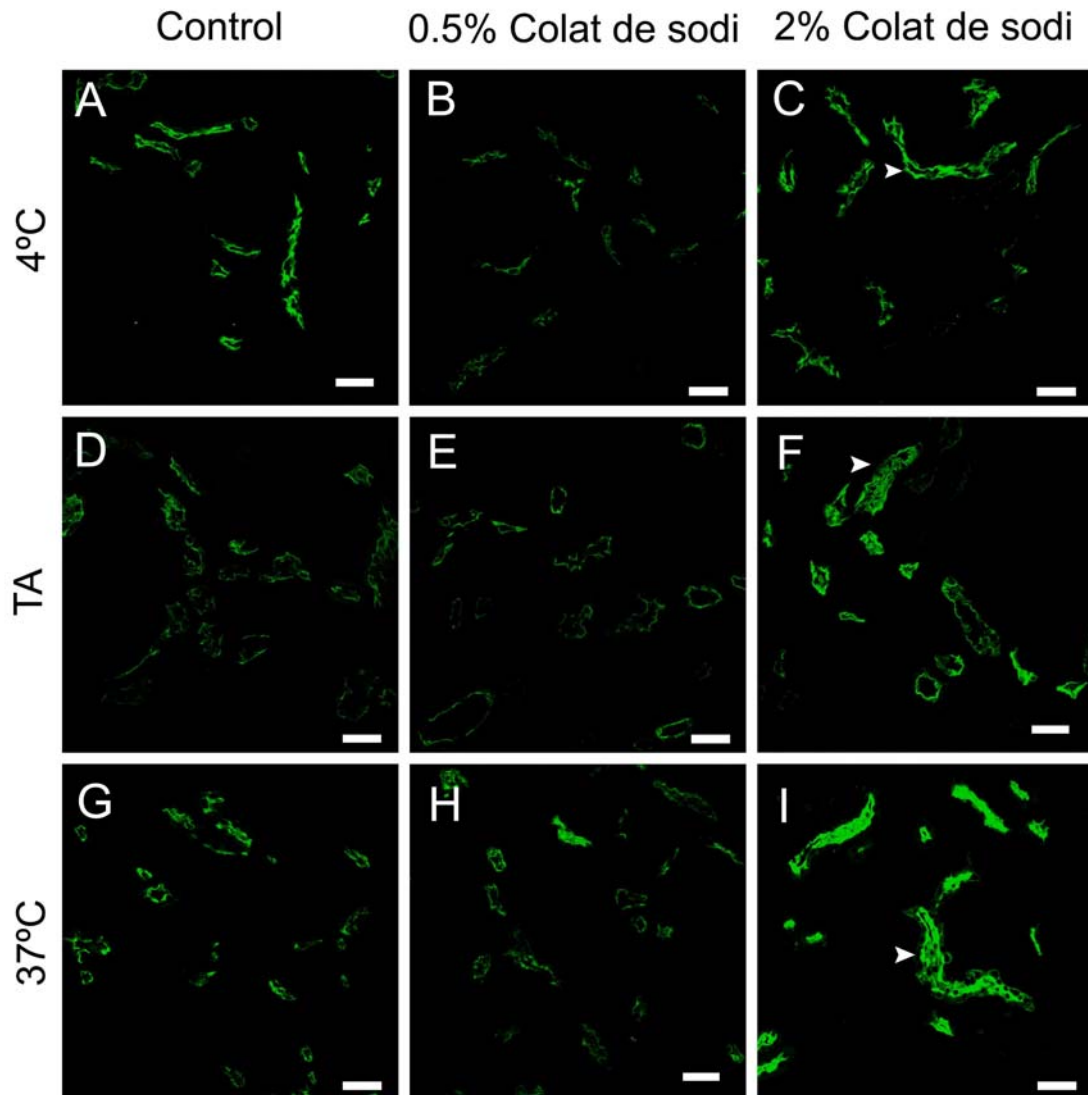


Figura AN11. Imatges de microscòpia confocal de talls de ronyó de ratolí tractats amb colat de sodi. A-C corresponen a tractaments a 4°C, D-F corresponen a tractaments a TA i G-I corresponen a tractaments a 37°C, durant 1h per a tots el casos. Les imatges A, D i G corresponen a controls (sense detergent). Les imatges B, E i H a 0.5% de colat de sodi i les imatges C, F i I a tractaments al 2%. S'observa un augment en la unió de la protoxina-ε-GFP a l'epiteli dels túbuls distals al tractar a una concentració del 2% a TA i 37°C (punes de fletxa, F i I). No hi ha canvis en la unió de la protoxina-ε-GFP al tractar a 4°C (punta de fletxa, C). Les barres corresponen a 40 µm.

C. Tractament amb detergents sobre seccions de cerebel de ratolí.

Les seccions de cervell incubades amb la toxina- ϵ revelen la unió d'aquesta a estructures mielíniques de ratolí i d'altres espècies (veure apartat 3.3 de resultats).

Per tal de caracteritzar la unió de la toxina- ϵ a les estructures mielíniques, les seccions de cerebel de ratolí les vàrem tractar amb els mateixos detergents que les seccions de ronyó.

Tal i com s'ha comentat anteriorment (veure apartat 3.3.4.2 de resultats), tractaments amb detergents al cerebel no van provocar canvis significatius en la unió de la protoxina- ϵ -GFP als grans tractes de mielina localitzats a la zona medul·lar, tot i que, en alguns casos es va observar un lleuger augment. El que sí vàrem detectar, després de tots els tractaments a 4°C, va ser un augment en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a petites fibres mielíniques que travessen la capa granular.

Aquest mateix patró es va repetir a d'altres temperatures per algunes condicions experimentals (Figures AN12, AN13 i AN14).

Per als tractaments amb Tritó X-100 i deoxicolat de sodi al 2% en les condicions de TA i 37°C vàrem observar una davallada de la unió de la protoxina- ϵ -GFP en aquestes fibres (Figures AN12 i AN13), en canvi, vam observar un augment de la unió de la protoxina- ϵ -GFP per a tots els tractaments amb colat de sodi (Figura AN14).

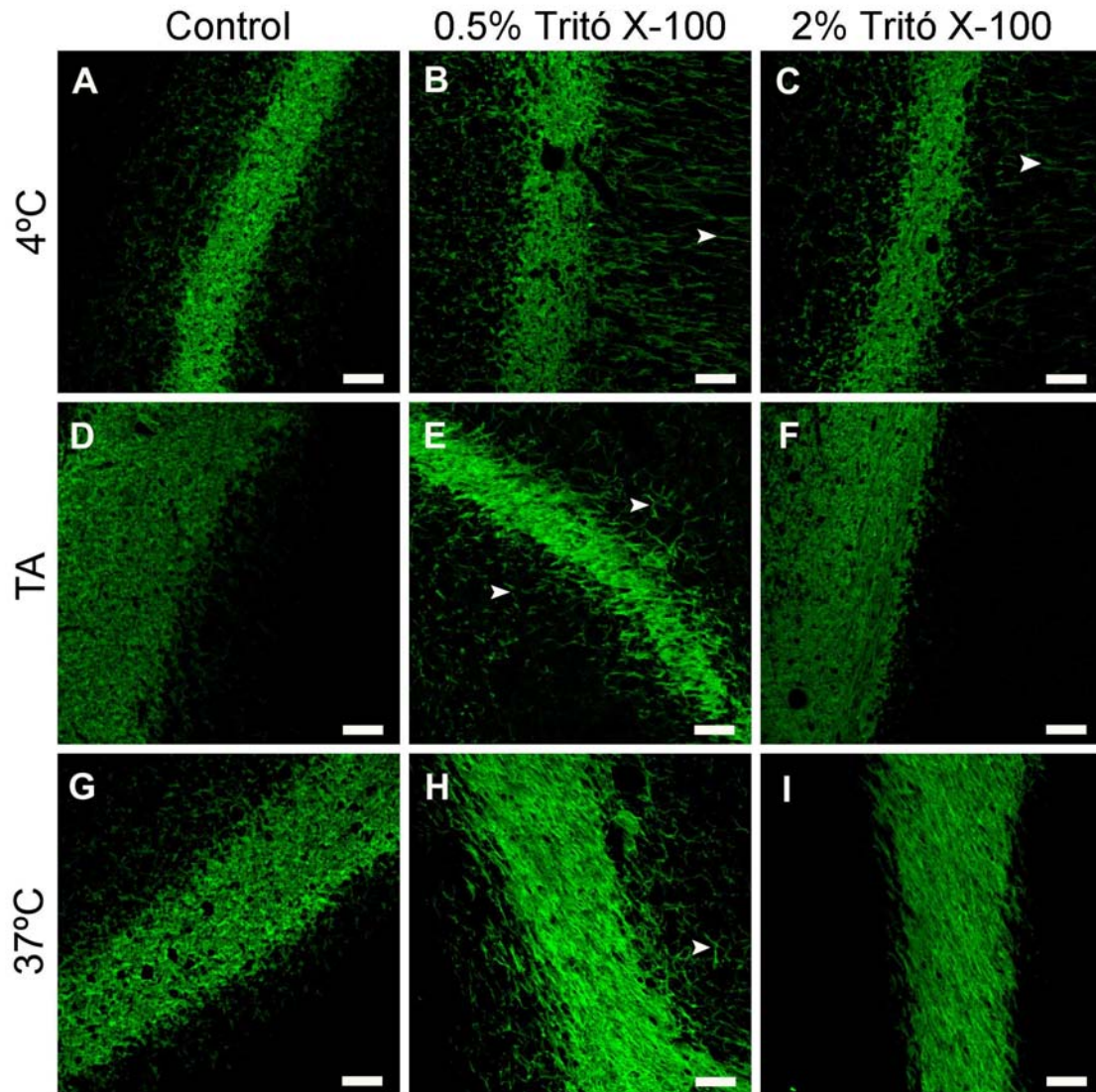


Figura AN12. Imatges de microscòpia confocal de talls de cerebel de ratolí tractats amb tritó X-100. A-C correspon a tractaments a 4°C, D-F correspon a tractaments a TA i les imatges G-I correspon a tractaments a 37°C, durant 1h per a tots els casos. Les imatges A, D i G corresponen a controls (sense detergent). Les imatges B, E i H a 0.5% de Tritó X-100 i les imatges C, F i I a tractaments al 2%. S'observa un petit augment en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a petites fibres mielíniques, que es troben al voltant del gran tracte central, a una concentració del 0.5% (punts de fletxa, B, E i H). En canvi, s'observa una reducció en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a una concentració del 2% a TA i/o 37°C (F i I), però no en el tractament a 4°C (punta de fletxa, C). Les barres corresponen a 40 μ m.

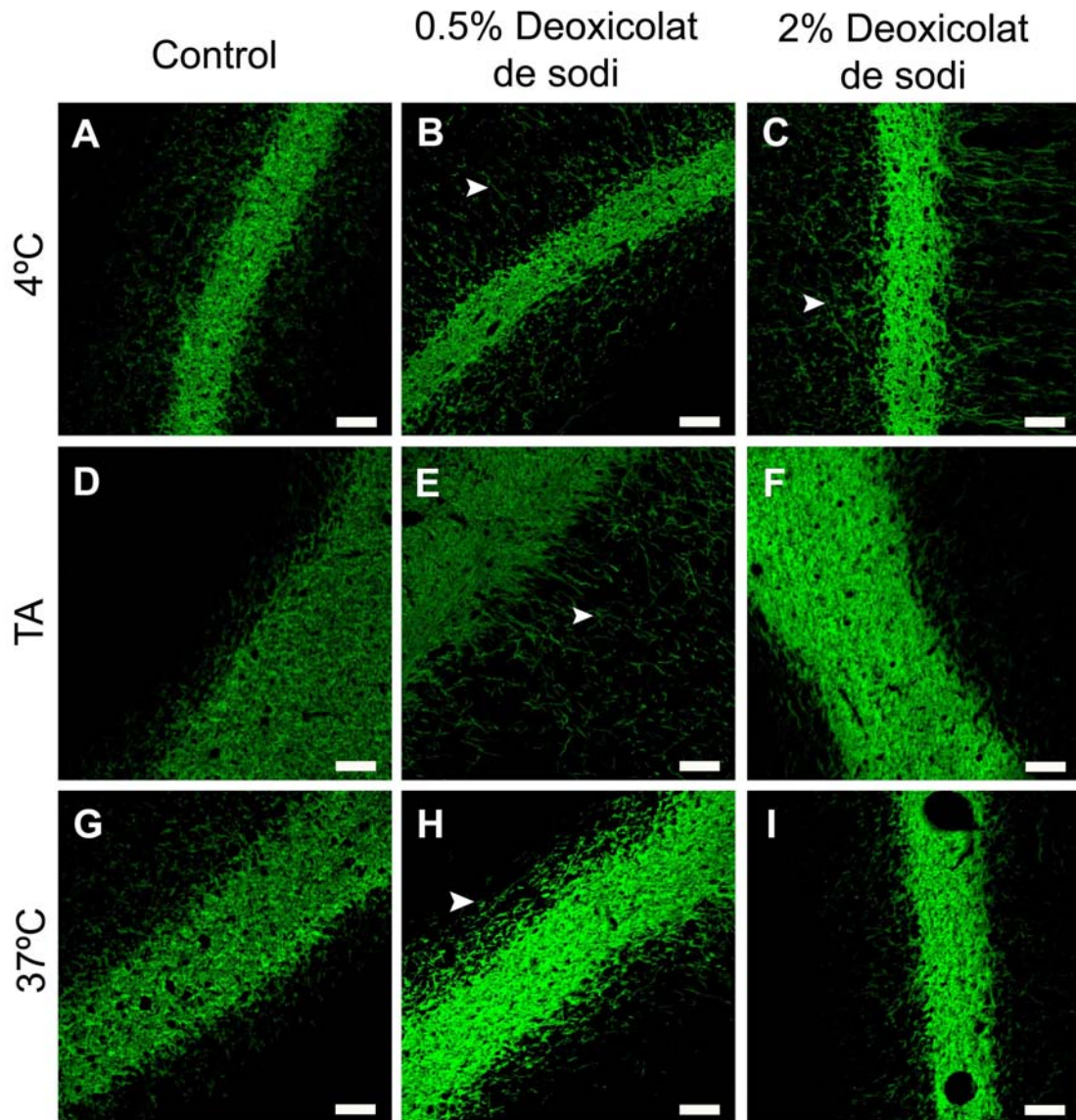


Figura AN13. Imatges de microscòpia confocal de talls de cerebel de ratolí tractats amb deoxicolat de sodi. A-C correspon a tractaments a 4°C, D-F correspon a tractaments a TA i G-I correspon a tractaments a 37°C, durant 1h per a tots els casos. Les imatges A, D i G corresponen a controls (sense detergent). Les imatges B, E i H a 0.5% de deoxicolat de sodi i les imatges C, F i I a tractaments al 2%. S'observa un petit augment en la unió de la protoxina-ε-GFP a petites fibres mielíniques, que es troben al voltant del gran tracte central, a una concentració del 0.5% (punts de fletxa, B, E i H). En canvi, s'observa una reducció en la unió de la protoxina-ε-GFP a una concentració del 2% a TA i/o 37°C (F i I), però no en el tractament a 4°C (punta de fletxa, C). Les barres corresponen a 40 μm.

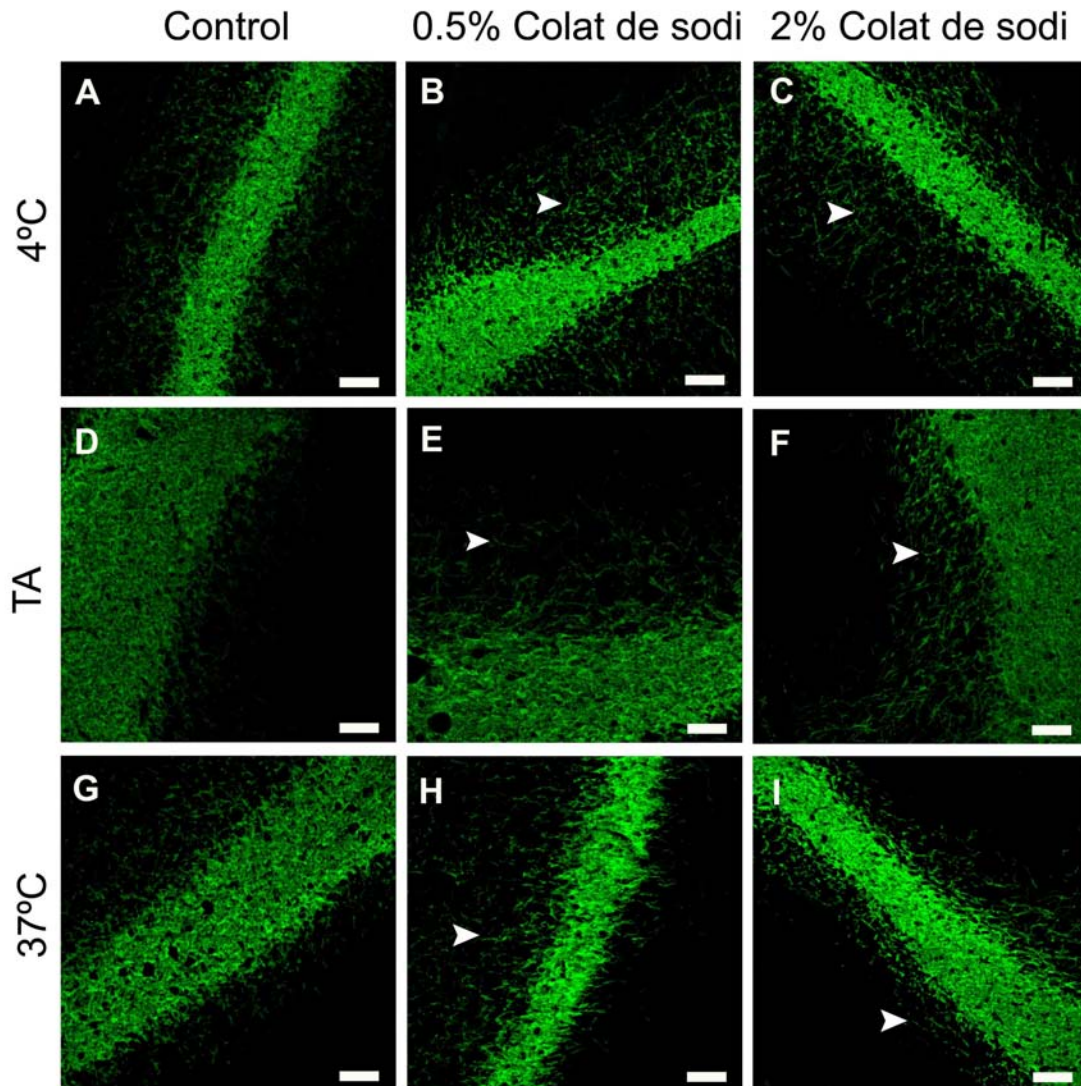


Figura AN14. Imatges de microscòpia confocal de talls de cerebel de ratolí tractats amb colat de sodi. A-C corresponen a tractaments a 4°C, D-F corresponen a tractaments a TA i G-I corresponen a tractaments a 37°C, durant 1h per a tots els casos. Les imatges A, D i G corresponen a controls (sense detergent). Les imatges B, E i H corresponen a 0.5% de colat de sodi i les imatges C, F i I a tractaments al 2%. S'observa un augment en la unió de la protoxina- ϵ -GFP a petites fibres mielíniques, al voltant del gran tracte central, en totes les condicions (puntes de fletxa, B, C, E, F, H i I). Les barres corresponen a 40 μ m.

Per tal de demostrar que aquestes petites fibres, després de tractar amb els detergents, eren mielíniques, vam fer un doble marcatge per l' α -MBP i la protoxina- ϵ -GFP. Observant una completa colocalització (Figura AN15).

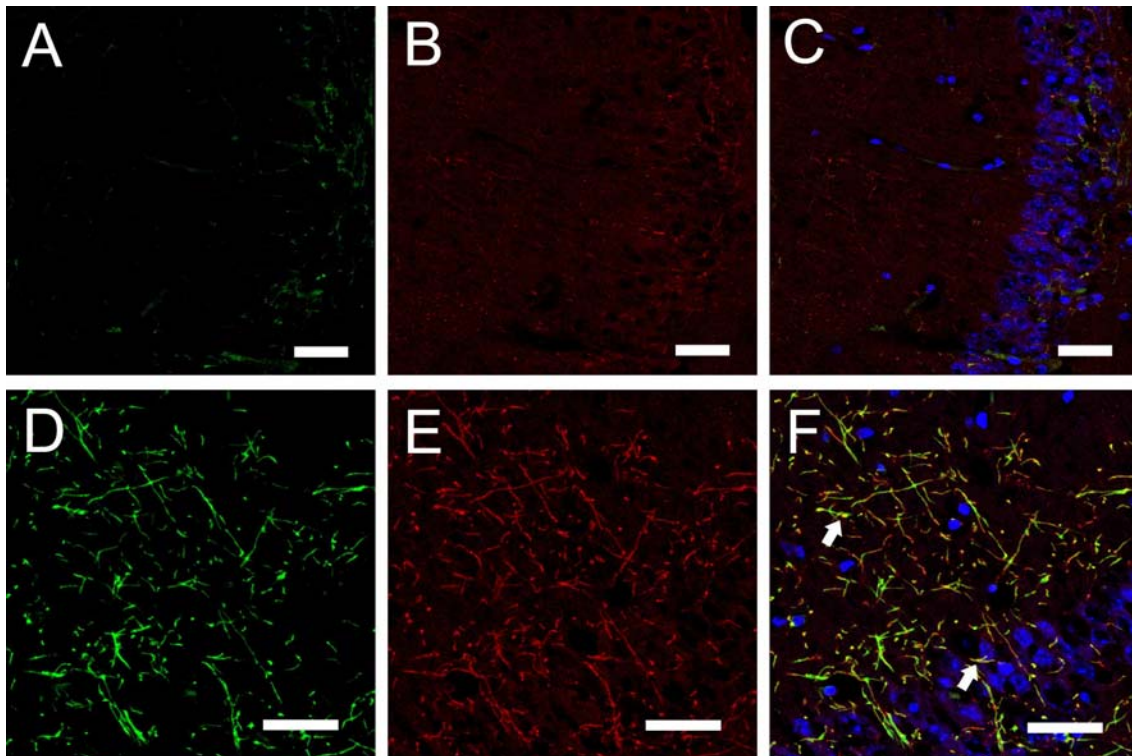


Figura AN15. Imatges de microscòpia confocal de seccions d'hipocamp de ratolí després de fer un tractament amb colat de sodi al 2% a 37°C durant 1h. A-C correspon al control (sense detergent) i D-E correspon al tractament amb colat de sodi al 2%. Les seccions es van incubar amb protoxina- ϵ -GFP (verd, A, C, D i F) i amb anti-MBP (vermell, B, C, E i F). S'observa un augment del nombre de fibres mielíniques al tractar amb colat de sodi (D-F) i es mostra una colocalització d'aquestes fibres amb la MBP (fletxes, F). Les barres corresponen a 40 μ m.

D. Unió de la GST-protoxina- ϵ -GFP a estructures mielíniques, túbuls distals de ratolí i cultius de cèl·lules MDCK.

Per veure si la GST-protoxina- ϵ -GFP té la capacitat d'unir-se a les mateixes estructures que ho fan la protoxina- ϵ -GFP o protoxina- ϵ vam incubar seccions de cerebel, de ronyó de ratolí i cobreobjectes amb cèl·lules MDCK fixades, tant amb GST-protoxina- ϵ -GFP com amb protoxina- ϵ -GFP a les mateixes concentracions, i vam comparar el patró d'unió en cada cas.

El patró d'unió tant per la GST-protoxina- ϵ -GFP com per la protoxina- ϵ -GFP era exactament el mateix, reconeixent estructures mielíniques i unint-se a l'epiteli de revestiment dels túbuls distals en seccions de cerebel i ronyó respectivament. També vam observar unió a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK (Figura AN16). Això demostra que també la GST-protoxina- ϵ -GFP és una bona eina per estudiar la unió de la toxina- ϵ .

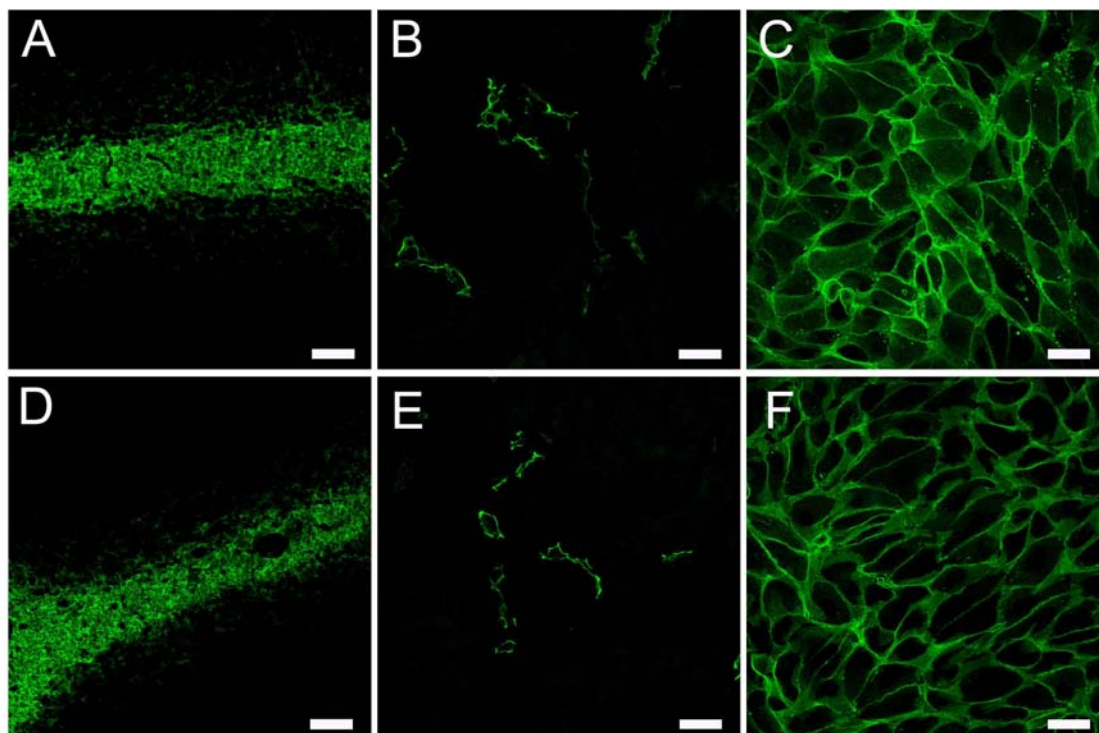


Figura AN16. Imatges de microscòpia confocal on s'observa la unió de la protoxina- ϵ -GFP (A, B i C) i la GST-protoxina- ϵ -GFP (D, E i F) a estructures mielíniques de cervell de ratolí (A i D), a túbuls distals i col·lectors de ronyó de ratolí (B i E) i a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK (C i F). Protoxina- ϵ -GFP i GST-protoxina- ϵ -GFP presenten el mateix patró d'unió en tots els casos. Les barres corresponen a 40 μ m.

E. Estudis de les diferents mutacions de la toxina- ϵ .

E.1. Producció dels diferents mutants de toxina i estudi de la seva citotoxicitat en cèl·lules MDCK.

Un dels nostres objectius és generar un mutant per a la toxina- ϵ que no presenti citotoxicitat però que mantingui la seva capacitat de travessar la BHE.

Pelish i Mc.Clain van construir uns mutants dominants negatius per a la toxina- ϵ (Etx-I51C/A114C i Etx-V56C/F118C, mutant 1 i 2 respectivament) que inhibien en les cèl·lules MDCK la formació de porus al incubar-les amb la toxina- ϵ (wt) en condicions equimolars. A més, aquests mutants no són citotòxics per a la cèl·lula.

Hem reproduït aquests mutants al laboratori, així com el mutant inactiu Etx-H106P (mutant 3), tal com està explicat en l'apartat de materials i mètodes.

Les proteïnes mutades van ser analitzades prèviament en gels d'acrilamida tenyits amb Coomassie Blue i també mitjançant un Western blot contra la GFP (Figura AN17).

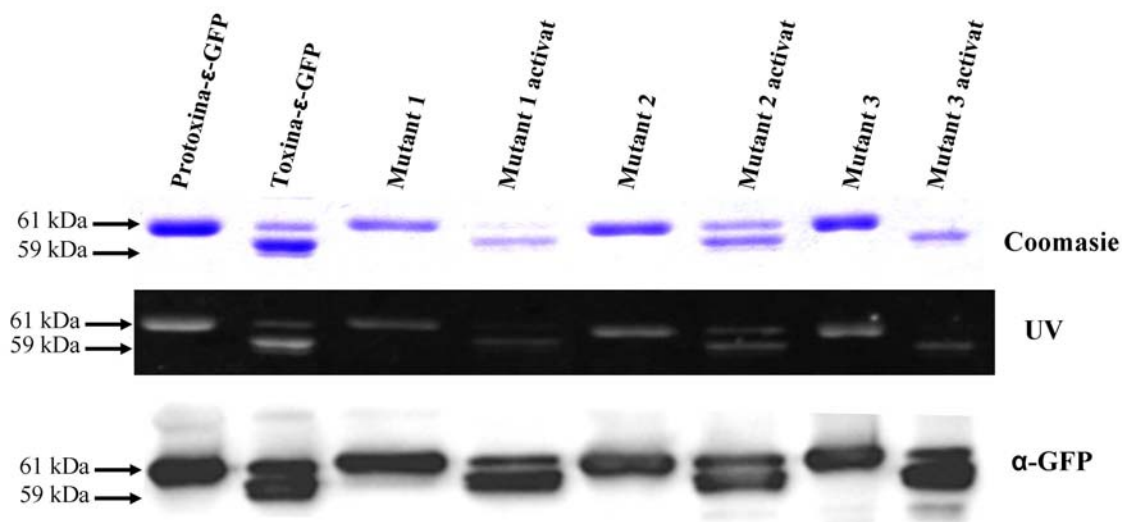


Figura AN17. Fotografia del gel d'acrilamida tenyit amb Coomassie Blue (Coomasie) on observem les bandes corresponents als diferents pesos moleculars de les proteïnes (61 kDa per a protoxina-ε-GFP i les seves mutacions, i 59 kDa per a toxina-ε-GFP activada amb tripsina, i les seves mutacions). En el transiluminador observem la fluorescència de les protoxines-ε-GFP i toxines-ε-GFP a l'aplicar llum ultraviolat (UV). També s'observen per Western blot les mateixes bandes utilitzant un anticòs contra la GFP (α-GFP).

La citotoxicitat de les mutacions va ser quantificada mitjançant assajos amb MTT, tal i com està explicat en l'apartat de materials i mètodes. Vam incubar cèl·lules MDCK amb les toxines mutades, així com amb les seves formes preincubades amb DTT. En el cas del mutant 3 també es va tractar amb DTT com a control negatiu, malgrat no té cap pont disulfur. Excepte en el cas de la protoxina-ε-GFP, la resta de formes de la toxina es van pretractar amb tripsina per tal d'activar-les.

Després de quantificar l'assaig amb MTT en les diferents formes de toxines (wt i mutants) es va observar mort cel·lular significativa en les cèl·lules tractades tant amb toxina-ε-GFP com amb el mutant 1 preincubat amb DTT. No hi va haver mort cel·lular en el cas dels mutants 2 i 3 (Figura AN18), pretractats o sense pretractar amb DTT.

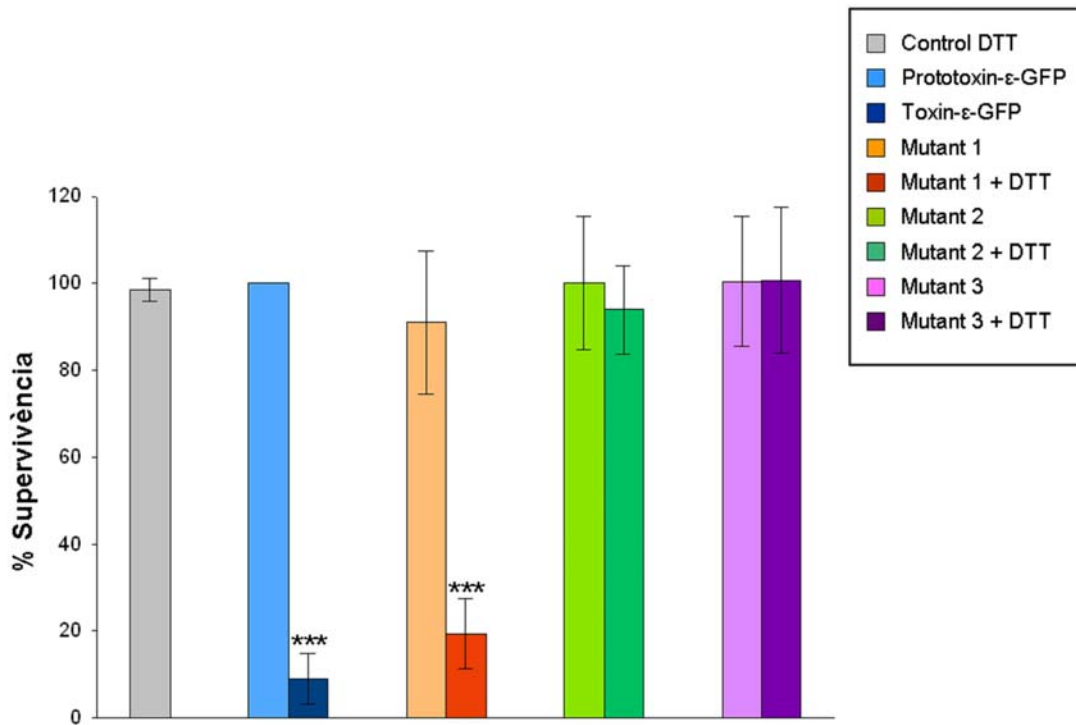


Figura AN18. Resultats de l'assaig de citotoxicitat on es mostra el percentatge de supervivència de les cèl·lules MDCK en presència de les diferents mutacions de la toxina-ε-GFP. Únicament s'observa mort cel·lular en el tractament amb toxina-ε-GFP (barra blau fosc) i en el tractament amb mutant 1 activat amb DTT (barra taronja fosc). No s'observa mort cel·lular significativa en cap dels altres casos. (***) $p < 0.001$.

La capacitat d'unió de les diferents formes mutades de la toxina va ser estudiada mitjançant incubacions d'aquestes sobre cultius de cèl·lules MDCK igual que es va fer en el cas de la protoxina-ε-GFP, explicat en l'apartat de materials i mètodes.

Les diferents mutacions mantenen la capacitat d'unir-se a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK (Figura AN19), tal i com ho fa la protoxina-ε-GFP. A més, els mutants mostren el mateix patró d'unió que el de la protoxina-ε-GFP i la toxina-ε-GFP a cerebel i a ronyó (imatge no mostrada).

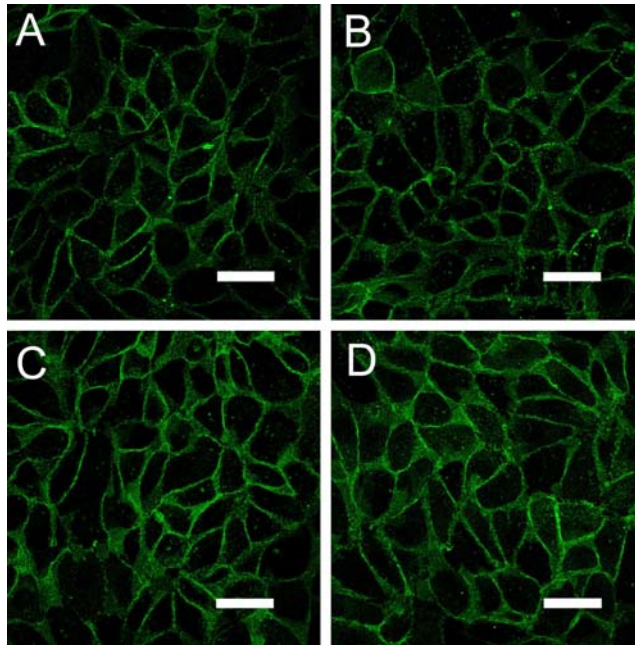


Figura AN19. Imatges de microscòpia confocal on s'observa la unió a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK de: protoxina- ϵ -GFP (A), mutant 1 (B), mutant 2 (C) i mutant 3 (D). Les barres corresponen a 40 μ m.

E.2. Distribució dels mutants de la toxina- ϵ administrats intravenosament (i.v) a ratolí.

Per tal d'estudiar la distribució dels mutants i els seus efectes a nivell renal, es van injectar ratolins amb: mutant 1 (Etx-I51C/A114C), mutant 2 (Etx-V56C/F118C) i mutant 3 (Etx- H106P). Aquests es van injectar a ratolí un cop activats amb tripsina.

Tant el mutant 1 com el mutant 2 provoquen la mort de l'animal en el mateix temps que ho fa la toxina- ϵ salvatge (wt). Ambdós mutants produeixen un edema generalitzat a ratolí i s'acumulen majoritàriament als ronyons, on es distribueixen pels túbuls renals. Els mutants presenten unió a la part luminal dels túbuls proximals (unió inespecífica) i també a túbuls distals i col·lectors (unió específica) on s'observen nuclis picnòtics indicant la seva mort cel·lular (imatge no mostrada). Aquests resultats coincideixen amb els descrits en estudis previs realitzats amb la toxina- ϵ wt injectada a ratolins (Tamai *et al.*, 2003; Soler-Jover *et al.*, 2004).

El mutant 3 (Etx- H106P) es comporta com la protoxina- ϵ , sense provocar la mort de l'animal ni cap efecte citotòxic, encara que també presenta unió a túbuls proximals de manera inespecífica i unió específica a túbuls distals (sense produir la mort de les cèl·lules d'aquests). Curiosament, la unió als túbuls proximals en el mutant 3 és lleugerament superior que a la resta dels mutants (Figura AN20).

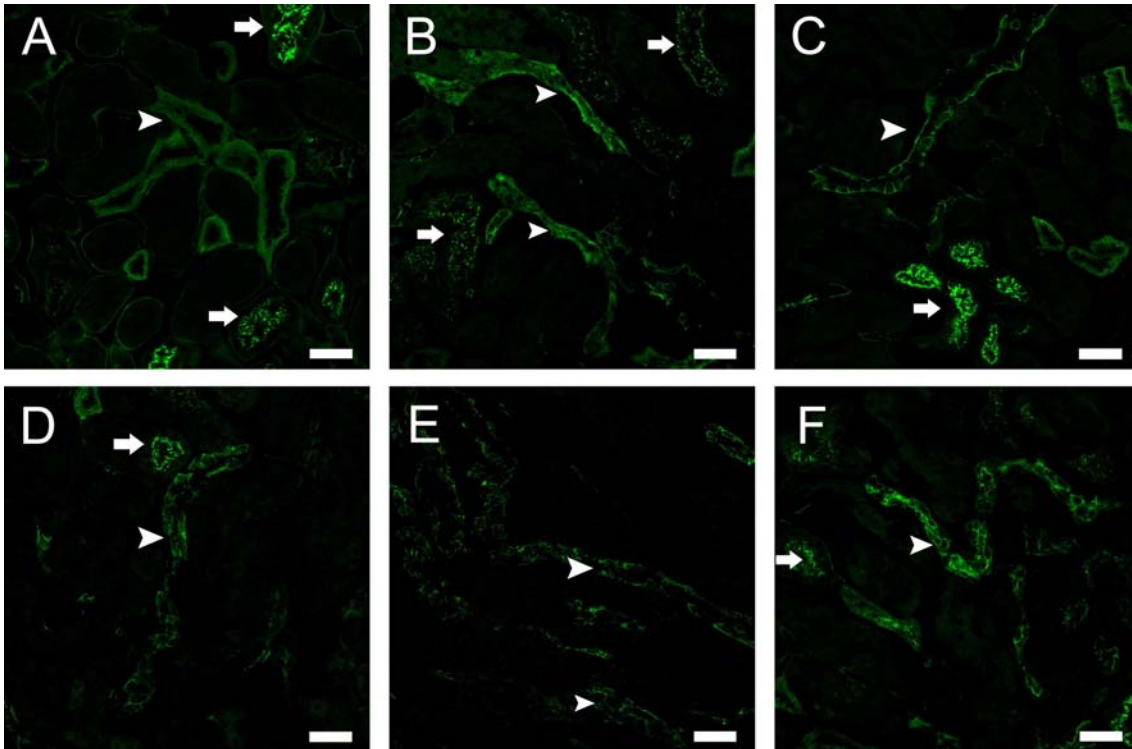


Figura AN20. Imatges de microscòpia confocal de tall de ronyó de ratolí injectats amb 50 µg de protoxina-ε-GFP (A), toxina-ε-GFP (B), mutant 1 (D i E), mutant 2 (F) i mutant 3 (C). En tots els casos hi ha un marcatge puntejat inespecífic, als túbuls proximals (fletxes), i un marcatge específic als túbuls distals i col·lectors (puntes). La imatge E correspon a la part medul·lar del ronyó de ratolí i la resta d'imatges a la part cortical. S'observa com hi ha més unió als túbuls proximals en el cas de les injeccions amb protoxina-ε-GFP i mutant 3, respecte als casos de les injeccions amb toxina-ε-GFP, mutant 1 i mutant 2. Les barres corresponen a 40 µm.

F. Estudis de cross-linking i immunoprecipitacions a cèl·lules MDCK.

La línia cel·lular MDCK ha estat un dels principals models per a l'estudi de la toxina-ε. Tant la toxina-ε com la protoxina-ε s'uneixen a la seva membrana plasmàtica però únicament la toxina-ε té l'activitat citotòxica i provoca la mort cel·lular. La toxina forma un complex heptamèric d'uns 155 kDa mentre que la protoxina-ε no és capaç de formar-lo (Miyata *et al.*, 2001), de manera que s'ha relacionat directament la capacitat de formar heptàmers amb l'activitat citotòxica.

Així doncs, amb la idea d'aïllar i d'identificar el receptor per a la toxina-ε, hem tractat cèl·lules MDCK amb toxina-ε o protoxina-ε amb diversos cross-linkers per tal d'unir covalentment els possibles complexos de toxina-ε (heptàmer)-receptor i de protoxina-ε (monòmer)-receptor. Per aquests experiments hem utilitzat protoxina-ε, protoxina-ε-GFP i 6xHis-protoxina-ε, i les respectives toxines activades.

F.1. Incubacions de les cèl·lules MDCK amb protoxina-ε i toxina-ε amb els diferents cross-linkers.

Per tal d'intentar purificar el receptor de la toxina-ε vàrem realitzar incubacions amb la protoxina-ε, protoxina-ε-GFP o 6xHis-protoxina-ε (i les corresponents toxines activades) sobre cultius cel·lulars confluents de cèl·lules MDCK i utilitzant cross-linkers.

Els cross-linkers DMS i DSS són molt similars i tenen pràcticament la mateixa llargada de braç, la diferència entre ells és que el DSS no és soluble en aigua. El cross-linker DTSSP és soluble en aigua (al igual que el DMS) però enmig del seu braç té un pont disulfur que es pot hidrolitzar mitjançant un agent reductor (veure apartat 15 de materials i mètodes).

La figura AN21 mostra diferents tractaments amb diversos cross-linkers (DMS, DSS i DTSSP) en les cèl·lules MDCK. Vàrem seguir dues aproximacions experimentals després d'incubar amb la protoxina-ε (o toxina-ε): unes mostres es van rentar (R) i les altres no (NR), trobant-se doncs, en aquest darrer cas, la protoxina-ε en excés. En ambdós casos es va incubar posteriorment amb el cross-linker, tal i com està explicat en l'apartat de materials i mètodes.

En la figura AN21 es pot observar que en els tres casos (utilitzant el cross-linker DMS, DSS o DTSSP) es detecta una banda d'uns 200 kDa a l'incubar amb toxina-ε (activa), coincident amb una possible oligomerització de la toxina-ε a la membrana plasmàtica (cap de fletxa vermell). Aquests resultats, coincideixen amb els estudis realitzats pel grup del Dr. Popoff que va demostrar que la intoxicació de les cèl·lules MDCK amb la toxina-ε correlacionava amb la formació d'un complex en la membrana plasmàtica de les cèl·lules, d'uns 155 kDa, que formaria un porus i produiria un desequilibri iònic amb la posterior mort cel·lular (Petit *et al.*, 1997).

En les incubacions amb protoxina-ε apareix una banda a uns 60 kDa (assenyalada en groc a la figura AN21) en el cas del DMS i del DSS, encara que en aquest darrer és una banda molt més dèbil. Aquesta banda podria correspondre a un homodímer de protoxina-ε o a un heterodímer corresponent a la unió de la protoxina-ε amb el seu receptor. En aquest cas, el receptor tindria un pes molt similar al de la pròpia protoxina-ε, d'uns 30 kDa, fet que coincidiria novament amb els estudis realitzats pel grup del Dr. Popoff en què mitjançant columnes d'afinitat amb la toxina-ε van aïllar una proteïna

d'uns 37 kDa, postulada com el seu receptor, de la membrana de les cèl·lules MDCK (Petit *et al.*, 1997).

En el cas del DTSSP aquesta banda no s'observa donat que el cross-linker s'ha hidrolitzat amb el tractament amb agents reductors, demostrant que es un complex de proteïnes unides pel cross-linker.

Una banda de pes similar, d'uns 66 kDa, s'observa en el carril de la toxina-ε i podria correspondre a un homodímer de toxina-ε o a un heterodímer de toxina-ε amb el seu receptor (cap de fletxa blau en els gels de DMS i DSS). S'observa també una banda a uns 30 kDa en tots els casos que correspon a monòmers de protoxina-ε (cap de fletxa verd), que també és detectable en el cas de la toxina. Aquests monòmers de toxina s'observen amb claretat en el cas de tractar amb DMS.

Com a control es van incubar les cèl·lules MDCK amb protoxina-ε inactivada per calor, (Figura AN21, 1). En aquest cas no apareix cap banda d'unió específica, però en el cas del DMS s'observa la banda corresponent al monòmer de protoxina-ε (que també s'observa amb els altres cross-linkers però amb menys intensitat). No es varen observar diferències en el fet de rentar o no les cèl·lules després de la incubació amb la protoxina-ε, únicament les cèl·lules rentades presentaven un patró de bandes més net però menys intens.

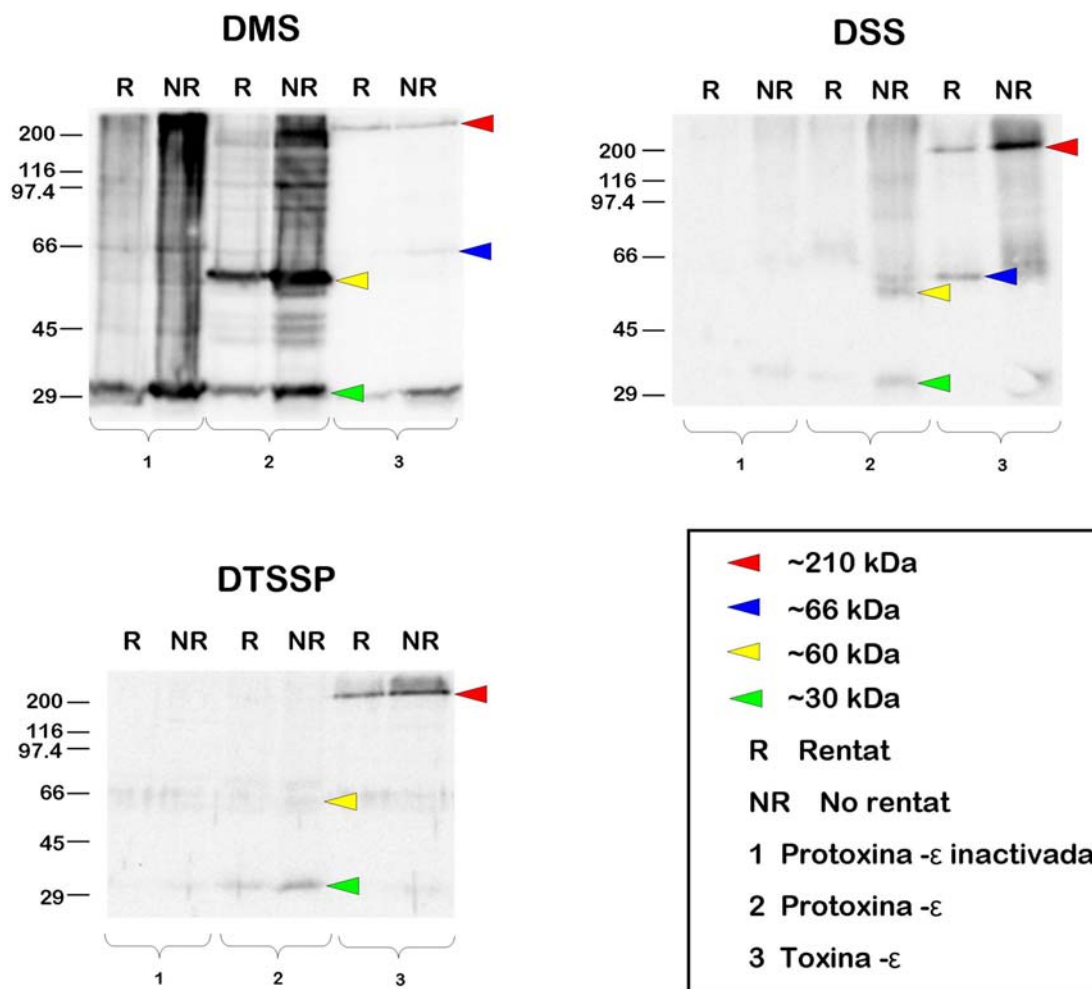


Figura AN21. Imatges de Western blot revelats amb anti-prototoxina-ε on es mostra el resultat del tractament dels cross-linkers DMS, DSS i DTSSP a les cèl·lules MDCK. S'observen les diferents bandes corresponents a oligòmers de toxina-ε (marcat en vermell), homodímers de toxina-ε (marcat en blau), possibles heterodímers de protoxina-ε amb el receptor (marcat en groc) i el monòmer de protoxina-ε (marcat en verd). Els diferents carrils corresponen a experiments amb : protoxina-ε inactivada per calor (1), protoxina-ε (2) i toxina-ε (3), ja estigui rentat (R) o no (NR) després de la incubació. Els pesos moleculars en kDa s'indiquen a l'esquerra de cada gel.

Així doncs, es detecta una banda d'uns 60 kDa que podria correspondre a un homodímer de protoxina-ε o a un heterodímer de protoxina-ε (complex de protoxina-ε i el seu receptor).

Els cross-linkers més adients són el DMS i el DSS, encara que amb el DMS s'obté una banda més intensa del possible complex protoxina-ε-receptor. Per descartar la possibilitat de que la banda correspongués a l'homodímer, vam fer els mateixos experiments amb protoxina-ε-GFP, ja que si així fos, obtindriem una banda d'uns 120 kDa (60 kDa de cada protoxina-ε-GFP). En canvi, si la banda correspongués a un

heterodímer (protoxina- ϵ -GFP més el receptor al voltant dels 30 kDa), obtindriem una banda d'aproximadament 90 kDa.

F.2. Incubació de les cèl·lules MDCK amb protoxina- ϵ -GFP i cross-linker DMS.

Es van incubar les cèl·lules MDCK amb protoxina- ϵ -GFP per veure si la banda que es troba al voltant dels 60 kDa correspon a un homodímer de protoxina- ϵ o a un heterodímer de protoxina- ϵ unit a alguna proteïna d'uns 30 kDa.

Vàrem utilitzar el cross-linker DMS. Com a control es van incubar cèl·lules amb protoxina- ϵ inactivada per calor i d'altres amb GFP sola. No s'observen diferències en les bandes en el fet de rentar o no abans d'incubar amb el cross-linker en cap dels casos.

En la imatge següent (Figura AN22) s'observa les bandes que corresponen a la protoxina- ϵ amb un pes al voltant dels 30 kDa (cap de fletxa verda) i les bandes del proposat complex al voltant dels 60 kDa (cap de fletxa groga). En el cas de la protoxina- ϵ -GFP s'observa una banda una mica inferior dels 60 kD corresponent a la protoxina- ϵ -GFP (cap de fletxa blava) i una banda al voltant dels 95 kDa que podria correspondre a la protoxina- ϵ -GFP unida al seu receptor (cap de fletxa vermella).

Per tant, amb aquest experiment podem assumir que la protoxina- ϵ s'està unint al seu receptor i aquest té un pes d'uns 35 kDa, coincidint amb els resultats abans esmentats que va obtenir el grup del Dr. Popoff amb membranes de cèl·lules MDCK.

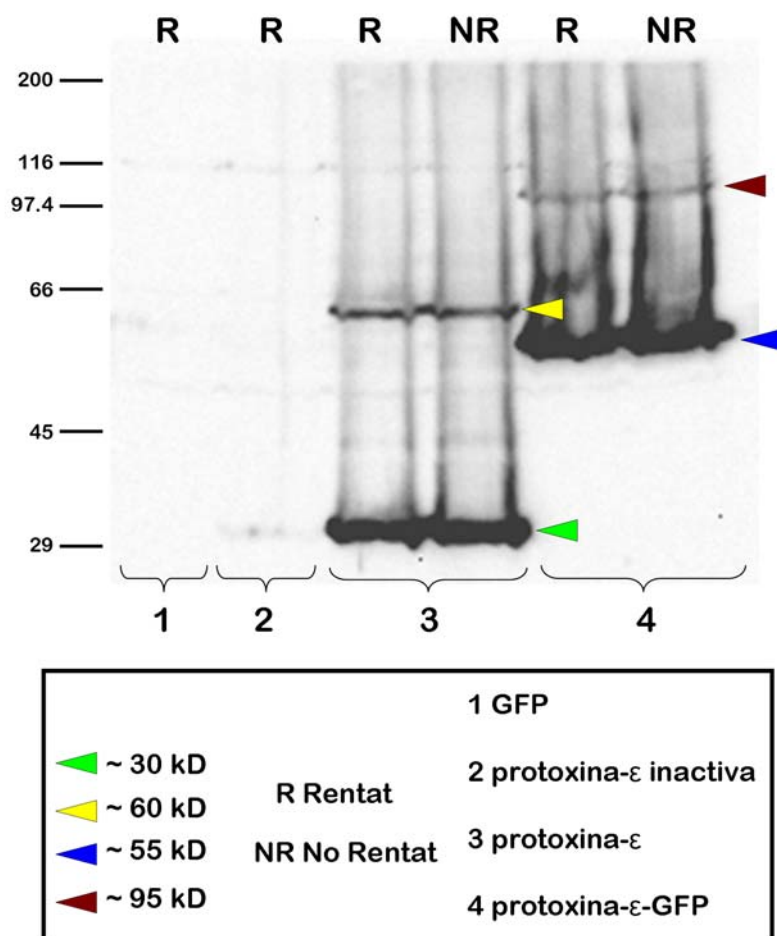


Figura AN22. Imatge de Western blot revelat amb anti-protóxina- ϵ on es mostra les bandes obtingudes al tractar les cèl·lules MDCK amb protóxina- ϵ o protóxina- ϵ -GFP i el cross-linker DMS. S'observen les diferents bandes corresponents a monòmers de protóxina- ϵ (marcat en verd) o monòmers de protóxina- ϵ -GFP (marcat en blau). També s'observen les bandes corresponents a l'heterodímer de protóxina- ϵ amb el seu receptor (marcat en groc) i les de la protóxina- ϵ -GFP amb el seu receptor (marcat en vermell). Es mostren els diferents tractaments en presència de GFP (1), protóxina- ϵ inactivada per calor (2), protóxina- ϵ (3) i protóxina- ϵ -GFP (4), ja estigui rentat (R) o no (NR) després de la incubació amb la protóxina- ϵ o protóxina- ϵ -GFP en cada cas. Els pesos moleculars en kDa s'indiquen a l'esquerra del gel.

F.3. Incubació de les cèl·lules MDCK amb protóxina- ϵ i anàlisi per gels SDS-PAGE bidimensionals.

Per tal de caracteritzar millor la banda corresponent al complex de protóxina- ϵ i el possible receptor vàrem preparar gels bidimensionals després d'incubar les cèl·lules amb protóxina- ϵ i el cross-linker DMS.

Es van fer dues electroforesis bidimensionals en paral·lel. Un gel es va tenyir amb plata i l'altre es va transferir per realitzar el Western blot contra la toxina- ϵ . Es va detectar la

marca de dos pesos moleculars diferents (com succeïa en els gels d'una sola dimensió), però en aquest cas es van trobar diverses formes (diferents punts isoelèctrics) de cada un dels dos pesos moleculars.

Del gel tenyit amb plata (Figura AN23, A) es varen retallar diversos fragments corresponents als punts positius del Western blot revelat contra la protoxina- ϵ (Figura AN23, B). Els punts estan marcats amb diferents colors, on el color vermell correspon a la protoxina- ϵ , i la resta de colors a les diferents formes del complex de protoxina- ϵ amb el possible receptor. Els fragments que es varen obtenir del gel van ser seqüenciats al servei de proteòmica dels serveis científicotècnics de la UB al Parc Científic de Barcelona (PCB).

La seqüenciació dels diferents fragments va revelar una proteïna desconeguda en cada cas, sense la detecció de la protoxina- ϵ .

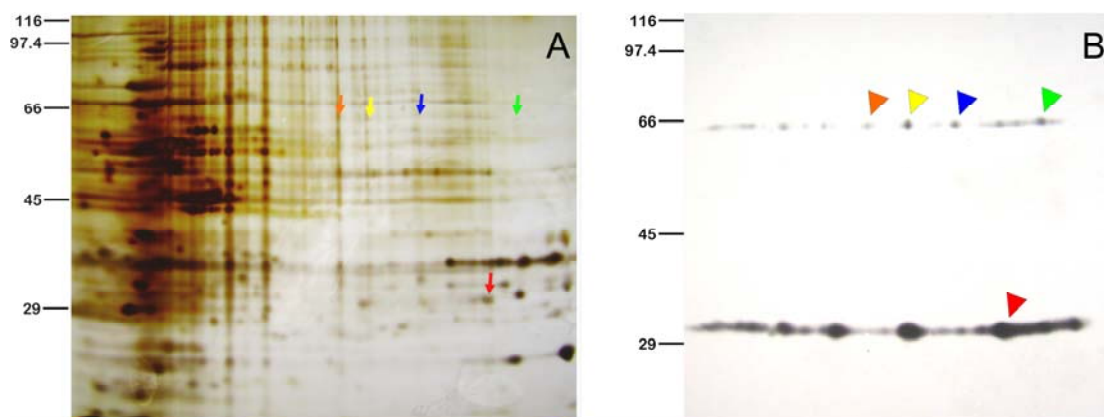


Figura AN23. La imatge A correspon al gel bidimensional tenyit amb plata on s'indiquen els diferents punts seleccionats. La imatge B correspon al Western blot contra la toxina- ϵ del mateix gel on s'observen les diferents isoformes de protoxina- ϵ . S'observa el monòmer de protoxina- ϵ al voltant de 30 kDa (marcada en color vermell) i 4 formes del complex de protoxina- ϵ amb el seu receptor al voltant dels 60 kDa (colors verd, blau, groc i taronja). Els pesos moleculars en kDa s'indiquen a l'esquerra de cada gel.

F.4. Incubacions de les cèl·lules MDCK amb protoxina- ϵ o toxina- ϵ amb el cross-linker DMS i separació de les seves bandes en un gel d'acrilamida de 20 x 16 cm.

En veure que el millor mètode fet fins ara per obtenir la banda de pes molecular corresponent al complex de protoxina- ϵ amb el seu receptor era incubar les cèl·lules amb el cross-linker DMS i després analitzar tot l'homogenat en un gel d'acrilamida per fer la posterior detecció mitjançant un Western blot. Es va reproduir el mateix

experiment però aquest cop en un gel de dimensions més gran, de 20 x 16 cm, per tal de separar millor les bandes i poder retallar les d'interès i seqüenciar-les.

La següent imatge correspon a incubacions amb protoxina- ϵ i el posterior tractament amb el cross-linker DMS on s'observa la tinció amb plata a l'esquerra i el Western blot contra la protoxina- ϵ a la dreta (Figura AN24).

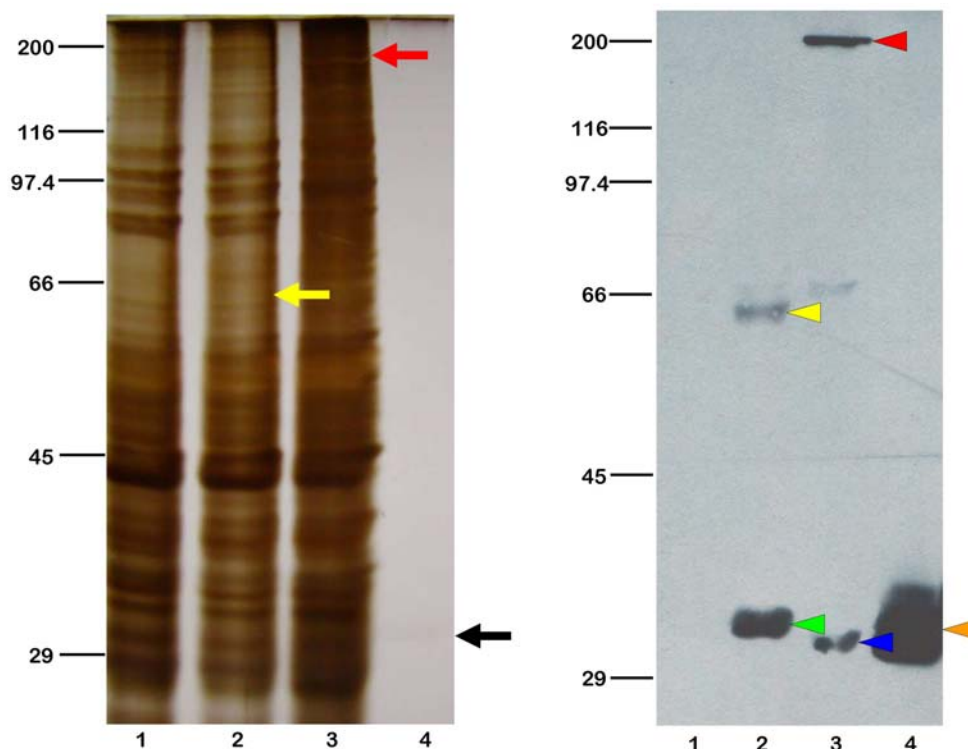


Figura AN24. Imatge on es mostra la tinció en plata (gel de l'esquerra) i el Western blot contra la protoxina- ϵ (gel de la dreta) dels tractaments de cèl·lules MDCK amb : protoxina- ϵ i DMS (carril 2), amb toxina- ϵ i DMS (carril 3), protoxina- ϵ sola com a control positiu (carril 4) i cèl·lules MDCK amb DMS com a control negatiu (carril 1). En el Western blot s'observa el monòmer de protoxina- ϵ (cap de fletxa verd), el complex de protoxina- ϵ amb el seu receptor (cap de fletxa groc), el monòmer de toxina- ϵ (cap de fletxa blau), l'oligòmer de toxina- ϵ (cap de fletxa vermell) i la protoxina- ϵ sola (cap de fletxa taronja). En la tinció en plata s'observa amb fletxes les bandes retallades que es van seqüenciar. S'assenyala l'oligòmer de toxina- ϵ (fletxa vermella), el complex de protoxina- ϵ amb el receptor (fletxa groga) i la protoxina- ϵ com a control positiu (fletxa negra). Els pesos moleculars en kDa s'indiquen a l'esquerra del gel.

Com a control positiu es va retallar la banda corresponent a la protoxina- ϵ (carril 4, fletxa negra), i, tal com era d'esperar, la seqüenciació va revelar la presència del precursor de la toxina- ϵ amb una puntuació elevada (puntuació: 882). Puntuacions per sobre de 67 són significatives (Pappin *et al.*, 1993).

La seqüenciació de la banda retallada del carril 3 corresponent a l'oligomer de toxina-ε, que podria estar unit al seu receptor, també va revelar la presència de la toxina-ε amb una puntuació de 86, però la resta de proteïnes identificades van ser irrellevants per al nostre estudi.

La seqüenciació de la banda del carril 2, que correspon al complex de la protoxina-ε amb el receptor, no s'hi va detectar la protoxina-ε. Sí que s'hi van detectar moltes proteïnes com per exemple la caseïna alfa S1, o d'altres que no es van poder identificar o que no arribaven a puntuacions significatives (imatge no mostrada).

F.5. Incubacions de les cèl·lules MDCK amb 6xHis-protoxina-ε o 6xHis-toxina-ε amb el cross-linker DMS i separació de les seves bandes en un gel d'acrilamida de 20 x 16 cm.

Es va provar de fer immunoprecipitacions amb proteïna G-sefarosa tal i com està explicat en l'apartat 15 de materials i mètodes utilitzant anticossos tant contra la toxina-ε com contra la GFP, després d'haver incubat les cèl·lules amb protoxina-ε-GFP o amb toxina-ε-GFP i d'haver incubat amb el cross-linker DMS.

No obstant, no es va poder immunoprecipitar en cap cas la protoxina-ε-GFP unida al seu receptor, ja que la major part del receptor es troba en una fracció insoluble (imatge no mostrada).

Per tal d'intentar solubilitzar el receptor de la toxina-ε, vam fer incubacions tant amb 6xHis-protoxina-ε com amb 6xHis-toxina-ε sobre cèl·lules MDCK i les vam tractar amb tampó de solubilització (veure apartat solucions de materials i mètodes). El sobrenedant resultant es va incubar amb boles acomplexades amb cobalt i després de 3 rentats es va afegir tampó de càrrega i es van fer dues electroforesis en paral·lel. Un gel es va tenyir amb plata i l'altre es va transferir a membranes de nitrocel·lulosa per realitzar el Western blot contra la toxina-ε. Amb aquest mètode es va detectar una banda d'un pes molecular al voltant de 200 kDa (Figura AN25, 3), que es va retallar i es va portar a seqüenciar al servei de proteòmica dels serveis científicotècnics de la Facultat de Medicina de la UB.

En la banda retallada es va detectar la toxina-ε i l'anexina 2 amb valors de puntuació similars (al voltant de 80), i amb valors una mica més baixos (al voltant de 70) la podocalixina. També es van detectar altres proteïnes que no eren d'interès (queratina

tipus I i II, actina citoplasmàtica, tripsina aniònica, desmogleïna-1 i serina/treonina fosfatasa 1).

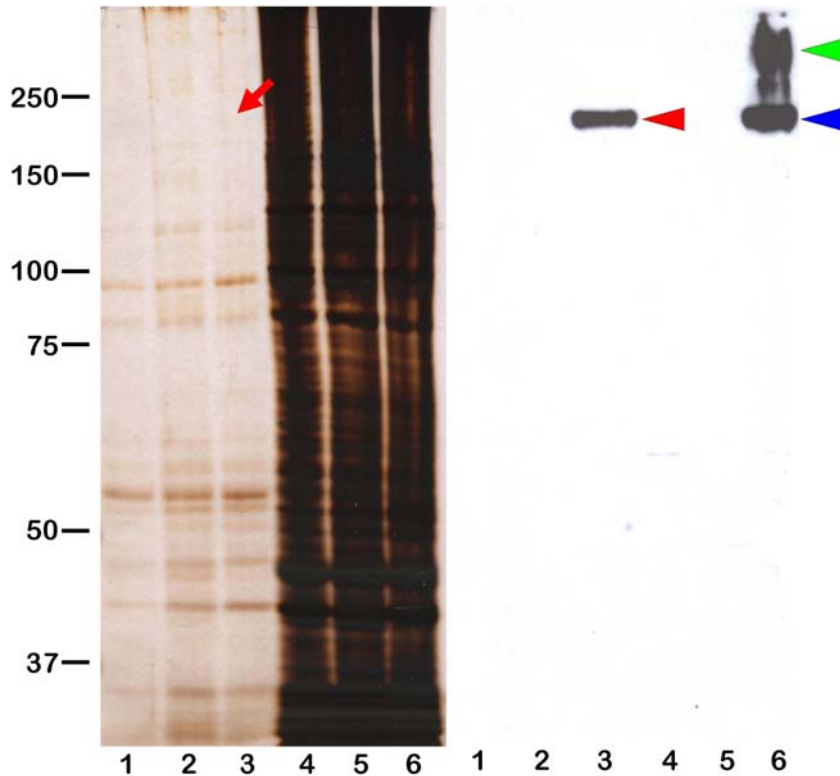


Figura AN25. Imatge on es mostra la tinció amb plata (gel de l'esquerra) i el Western blot contra la toxina- ϵ (gel de la dreta) dels tractaments de cèl·lules MDCK amb: GFP i DMS com a control negatiu (carril 1 i 4), 6xHis-prototoxina- ϵ i DMS (carril 2 i 5) i amb 6xHis-toxina- ϵ i DMS (carril 3 i 6). Els carrils 1-3 corresponen a la fracció solubilitzada de les cèl·lules MDCK, i els carrils 4-6 corresponen a la fracció insoluble de les mateixes cèl·lules. En el Western blot s'observa l'oligòmer de 6xHis-toxina- ϵ amb el seu possible receptor tant en la fracció solubilitzada (cap de fletxa vermell), com en la fracció insoluble (cap de fletxa blau). S'observa un complex d'alt pes molecular en la fracció insoluble (cap de fletxa verd). La fletxa vermella de la tinció amb plata correspon a la banda retallada i seqüenciada de l'oligòmer de toxina- ϵ amb el receptor. Els pesos moleculars en kDa s'indiquen a l'esquerra del gel.

DISCUSSION

A. Generació d'eines moleculars per a l'estudi de la toxina-ε.

Tradicionalment, els estudis sobre els efectes de la toxina-ε s'han fet amb extractes proteics de cultius bacterians de *C. perfringens* els quals produeixen un gran nombre de toxines diferents, reduint per tant el grau de puresa de la toxina-ε obtinguda, a banda dels inconvenients que suposa treballar amb bacteris anaeròbis.

Donat que l'obtenció de proteïnes recombinants facilita la producció ràpida i efectiva de proteïnes, al nostre laboratori hem clonat i expressat a *E. coli* tant la toxina-ε com la protoxina-ε. A més, hem dissenyat diferents proteïnes de fusió amb la GFP i la toxina-ε amb l'objectiu de visualitzar directament la toxina i la protoxina amb microscòpia de fluorescència, tant en experiments *in vivo* com *in vitro*.

Les diferents proteïnes de fusió produïdes i caracteritzades al laboratori varen ser: protoxina-ε-GFP, protoxina-ε, GST-protoxina-ε-GFP, GST-protoxina-ε, toxina-ε-GFP, toxina-ε, GST-toxina-ε-GFP, GST-toxina-ε, 6xHis-protoxina-ε i 6xHis-toxina-ε.

Totes elles han resultat ser bones eines per estudiar l'acció de la toxina-ε, tal i com van mostrar els assaigs de citotoxicitat sobre les cèl·lules MDCK, una línia de cèl·lules epitelials renals de túbul distal de ronyó (Gaush *et al.*, 1966) que és la més sensible que es coneix per a la toxina-ε (Lindsay, 1996; Petit *et al.*, 1997). Val a dir, però, que la tripsina, a banda de tenir un lloc d'hidròlisi a l'extrem carboxiterminal de la protoxina-ε (permetent la seva activació a toxina-ε), també té un lloc d'hidròlisi entre la GST i la protoxina. Així doncs, no va ser possible obtenir una construcció de GST-toxina-ε o GST-toxina-ε-GFP.

D'altra banda, hem generat anticossos policlonals contra la toxina-ε que han resultat ser d'una elevada sensibilitat, ja que són capaços de detectar fins a 1 ng de protoxina-ε pura. Val a dir, que existeix un kit comercial amb anticossos monoclonals per detectar la toxina-ε (Bio-X Epsilon Toxin Elisa Kit), però únicament és útil per fer assajos d'ELISA, i no de dot blot, Western blot o immunofluorescència. Els nostres anticossos, en canvi, són útils per a tots els assajos.

B. Caracterització de la unió de la toxina-ε.

B.1. Determinació de l'afinitat de la unió de la toxina-ε a cèl·lules MDCK.

Estudis previs realitzats per Nagahama i Sakurai l'any 1992 havien demostrat que la toxina marcada radioactivament s'unia a homogenats de cervell de rata i fraccions de membranes sinaptosomals mitjançant un sol lloc d'unió. Per als homogenats de cervell, la constant d'afinitat (K_d) i el nombre màxim de receptors ocupats (B_{max}) va ser de 2.5 nM i 9 pmol/mg, respectivament, i per a les fraccions sinaptosomals va ser de 3.3 nM i 25.5 pmol/mg.

Tot i ser el sistema renal una diana per a la toxina-ε, fins al moment no hi havia dades sobre l'afinitat i quantitat dels possibles receptors de la toxina-ε en models renals.

En el present treball hem dissenyat i validat un assaig d'ELISA d'alta sensibilitat i reproductibilitat per a estudis d'unió i afinitat de la toxina-ε, que hem aplicat per l'estudi de la unió de la toxina-ε a la línia cel·lular MDCK. Els resultats van revelar que hi havia un sol tipus d'unió i que aquesta era saturable en aquesta línia cel·lular. A més, es va observar la mateixa afinitat tant per la protoxina-ε com per la toxina-ε, reforçant la hipòtesi de la seva unió al mateix receptor (Buxton, 1976). En ambdós casos la K_d va ser al voltant de 4 nM, i la B_{max} d'uns 70 pmol/mg per a la protoxina-ε-GFP i d'uns 200 pmol/mg per a la toxina-ε-GFP. Si comparem aquests resultats amb els obtinguts amb d'altres toxines clostridials, està descrit que la constant d'afinitat de la toxina tetànica a teixit nerviós és elevada i està al voltant d'1.2 nM (Rogers i Snyder, 1981), aquest resultat no és molt diferent al nostre, corroborant que la unió de la toxina-ε també és d'afinitat elevada.

Així mateix, els nostres resultats de K_d estan en consonància amb els trobats per Nagahama i Sakurai l'any 1992 sobre homogenats de cervell i fraccions sinaptosomals. Les cèl·lules MDCK, però, tenen una major densitat de receptors en comparació amb les fraccions sinaptosomals i els homogenats de cervell, tal com es representa en els valors de B_{max} . En el cas de les cèl·lules MDCK aquest valor és vuit cops superior al trobat a les fraccions sinaptosomals per als estudis de toxina-ε.

A més, els nostres estudis mostren una B_{max} tres cops més elevada per la toxina-ε-GFP que per la protoxina-ε-GFP, fet que podria estar relacionat amb l'oligomerització de la toxina-ε-GFP a la membrana plasmàtica de la cèl·lula.

A la vista d'aquests resultats podríem especular, doncs, que per cada receptor, la protoxina- ϵ -GFP s'uniria a la membrana plasmàtica formant dímers, mentre que la toxina- ϵ -GFP formaria heptàmers (Petit *et al.*, 1997; Miyata *et al.*, 2002) o hexàmers, detectant, així, un nombre de molècules de toxina- ϵ -GFP tres cops superior al de protoxina- ϵ -GFP. Evidentment, aquesta proposta és especulativa i es requereix un estudi més acurat per arribar a aquesta conclusió.

B.2. Caracterització de la unió de toxina- ϵ a cèl·lules MDCK.

La toxina- ϵ s'uneix a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK on oligomeritza i s'inserta formant un porus que provoca la mort de la cèl·lula (Petit *et al.*, 1997). Actualment no s'ha pogut identificar el receptor al qual podria unir-se i/o desenvolupar la seva activitat biològica. En realitat, tampoc es segur, però, si existeix un receptor a la membrana d'aquestes cèl·lules implicat en aquest procés, o si al igual que succeeix amb moltes toxines citolítiques, la toxina- ϵ podria interaccionar directament amb les cadenes hidrocarbonades i insertant-se sense la necessitat d'un receptor específic i formar un porus en les membranes lipídiques (Nelson *et al.*, 2000). De fet, incubacions de la toxina- ϵ a membranes lipídiques artificials van revelar que aquesta era capaç de formar-hi porus sense la necessitat d'interaccionar amb cap receptor proteic en concret (Petit *et al.*, 2001). No obstant, degut a l'especificitat que presenta aquesta toxina sobre certs tipus cel·lulars, la majoria d'autors, si no tots, estan d'acord en l'existència d'un receptor a la membrana cel·lular de les cèl·lules diana.

En aquest treball hem conduït una sèrie d'experiments per conèixer la natura d'aquesta unió. Per extreure els glúcids vàrem fer servir una glucosidasa genèrica, coneguda com N-glicosidasa F, que hidrolitza els N-glicans, essent aquests els més abundants en el món dels mamífers. Per extreure els O-glicans vàrem fer servir un tractament de β -eliminació amb NaOH. I per extreure els lípids vàrem fer servir una bateria de detergents.

Tal com demostren els nostres experiments, podem concloure que la unió de la toxina- ϵ a les cèl·lules MDCK depèn d'un arbre glucídic, concretament un O-glicà. La unió de la toxina- ϵ no es va veure alterada amb els tractaments de N-glicosidasa F, suggerint que els N-glicans no estarien involucrats en la unió de la toxina- ϵ . En canvi, sí que es va

quantificar una reducció del 95% en la unió de la toxina- ϵ després de la β -eliminació, tal com demostren els experiments d'ELISA.

Amb la idea d'identificar els glúcids implicats en la unió de la toxina- ϵ vàrem coincubar les cèl·lules MDCK fixades amb la toxina- ϵ -GFP juntament amb una bateria de carbohidrats en excès: D(-)fructosa, D(+)glucosa, D(-)manitol, D(-)sorbitol, àcid siàlic, galactosa, lactosa, sucrosa, N-acetilglactosamina i sacarosa. No vàrem observar cap tipus de reducció en la unió de la toxina a la membrana plasmàtica de les cèl·lules (no mostrat). Pel que fa a l'àcid siàlic, aquesta observació estaria en contradicció amb la de Nagahama i Sakurai (Nagahama i Sakurai, 1992), que van trobar que la unió de la toxina era sensible al tractament amb neuraminidasa (que extreu l'àcid siàlic) però en fraccions sinaptosomals.

Per altra banda, també vàrem fer estudis de competició utilitzant un carbohidrat amb més complexitat, anomenat Galacto-N-biose (T-antigen), de composició: β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc, que és el més abundant en els O-glicans (Ju *et al.*, 2002). No vam observar cap canvi en la unió de la toxina- ϵ a les cèl·lules MDCK (no mostrat). Probablement, l'arbre glucídic involucrat en la unió de la toxina tingui una composició més complexa, ja que el T-antigen és un de les components més senzills d'O-glicans, essent el principal precursor per a la formació d'aquests. Segurament per aquest fet, la toxina s'uneixi a estructures concretes d'alguns òrgans i també ho faci selectivament a poques línies cel·lulars i no a la gran majoria, ja que es deu unir a un complex glucídic específic i present a determinades estructures.

Per altra banda, també podem concloure que un ambient lipídic (o la integritat de la membrana plasmàtica) és important en permetre la unió de la toxina- ϵ , ja que tot i que tractaments a concentracions baixes de detergent fan augmentar la unió de la toxina a la membrana plasmàtica, els tractaments a concentracions elevades la fan disminuir totalment. Amb els nostres resultats podem afirmar, que el possible receptor de la toxina- ϵ estaria emmascarat, ja que tractaments a concentracions més baixes de colat de sodi i CHAPS a 4°C fan augmentar en el doble, la unió de la toxina- ϵ a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK, tal com demostren els experiments d'ELISA. En canvi, no vam observar cap alteració en la constant d'afinitat, suggerint únicament el desemmascarament dels receptors, deixant-los així, més exposats a la toxina- ϵ . A més, es postula que el possible receptor de la toxina- ϵ es localitzaria en els dominis de la membrana resistents a detergents, DRMs (Miyata *et al.*, 2002; Soler-Jover *et al.*, 2004).

Així mateix, els nostres tractaments amb colat de sodi a TA mostren un patró puntejat en la unió de la toxina- ϵ a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK, reforçant aquesta idea.

B.3. Caracterització de la unió de la toxina- ϵ a sistema renal.

Se sap que la toxina- ϵ injectada i.v a ratolins s'acumula als ronyons i es distribueix pels túbuls distals i col·lectors, on produeix la mort de les seves cèl·lules epitelials revelada per l'observació dels seus nuclis picnòtics (Tamai *et al.*, 2003; Soler-Jover *et al.*, 2004).

Hem confirmat, mitjançant incubacions de la toxina- ϵ sobre seccions de ronyó i bufeta de ratolí i d'altres espècies (vaca, xai, cabra i humana), que la unió de la toxina es dona principalment a les cèl·lules de la part luminal dels túbuls distals i col·lectors i en menor grau a la part basolateral de les cèl·lules d'ambdós túbuls, coincidint amb un patró d'unió similar al de la toxina- ϵ injectada. Les unions de la toxina- ϵ als túbuls distals i col·lectors de ronyó de cabra i ovella és més elevada que a la resta d'espècies, això podria explicar per què les cabres i ovelles són els hostes més habituals (o espècies més sensibles) per a la toxina- ϵ , ja que podrien presentar més quantitat de receptors. A més, incubacions de la toxina- ϵ amb seccions de bufeta, urèter i uretra de ratolí i d'altres espècies (vaca, xai i cabra), van mostrar unió de la toxina a l'epiteli de revestiment en cada cas, i compartiria, juntament amb els túbuls distals i col·lectors del ronyó, una composició similar que permetria la unió de la toxina- ϵ . Aquests resultats demostren que el possible receptor per a la toxina- ϵ a sistema renal es troba a diferents espècies.

Per estudiar la natura de la unió de la toxina- ϵ en l'àmbit renal, vàrem dur a terme els mateixos tractaments (Pronasa E, detergents, N-glicosidasa F i β -eliminació) que en les cèl·lules MDCK, però amb seccions de bufeta i ronyó de ratolí i d'altres espècies.

Amb els nostres resultats podem concloure que la unió de la toxina- ϵ a sistema renal és dependent de proteïnes, ja que després dels tractaments amb Pronasa E vàrem veure una reducció de la unió de la toxina- ϵ . A més, l'ambient lipídic estria implicat en la unió de la toxina- ϵ , ja que tractaments amb detergents redueixen completament la unió de la toxina- ϵ , excepte en el cas del colat de sodi que té una CMC elevada (detergent suau) i on es va veure un augment en la seva unió. Sembla ser, doncs, que els lípids tindrien un paper important en permetre aquest emmascarament parcial del possible receptor al ronyó. Per altra banda, tal i com demostren els experiments de β -eliminació, la unió de

la toxina-ε al sistema renal és dependent de glúcids, concretament d'O-glicans. Val a dir, que en el cas de les bufetes de cabra, ovella i vaca, es va veure una reducció significativa després de cinc dies de tractament, suggerint que en aquestes espècies hi podria haver una major densitat de receptors en la bufeta que en els túbuls distals i col·lectors del ronyó o simplement podria ser degut a la disposició cel·lular del l'uroteli, que li dona la característica de ser impermeable i més resistent a agents externs (Junqueira i Carneiro, *Histología básica 5ª edición.*, 2000).

Tots aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en cèl·lules MDCK, on els tractaments amb colat de sodi van mostrar un increment d'aproximadament el doble, en la unió de la toxina a la membrana plasmàtica. I els tractaments de β-eliminació van reduir al voltant del 95% la unió de la toxina. Així doncs, amb els nostres estudis, podem hipotetitzar que tant en cèl·lules MDCK com en el sistema renal en general, aquest ambient glucídic podria ser algun O-glicà que estaria unit a una proteïna (que *in vivo* produiria els efectes biològics de la toxina-ε), ja sigui de manera directa o indirecta.

B.4. Unió de la toxina-ε a sistema nerviós.

El grup del Dr. Okabe defensava la hipòtesi de que la neurotoxicitat de la toxina-ε venia donada per una acció directa sobre el sistema glutamatèrgic, provocant una secreció excessiva de glutamat, que conduiria a la mort neuronal per excitotoxicitat (Miyamoto *et al.*, 1998 i 2000). A més, s'ha descrit que la toxina-ε té un lloc d'unió específica a les membranes de sinaptosomes aïllats de cervell de rata (Nagahama i Sakurai, 1992). Vam voler estudiar aquesta unió i la capacitat de la toxina-ε per provocar la secreció de glutamat.

Vam intentar demostrar aquest efecte incubant la toxina en fraccions sinaptosomals aïllades de rata i ratolí. Els sinaptosomes, un cop aïllats, mantenen durant unes hores les propietats bioquímiques i metabòliques, i es pot estimular la fusió de vesícules sinàptiques mitjançant la despolarització de la membrana amb KCl, que provoca l'obertura de canals iònics dependents de voltatge, i per tant, l'entrada d'ions Ca^{2+} . El glutamat alliberat es pot mesurar en un fluorímetre, gràcies a la reacció de la glutamat deshidrogenasa (GDH). Segons la hipòtesi excitotòxica, la toxina formaria porus a les membranes dels sinaptosomes amb la consegüent entrada de Ca^{2+} , i per tant, la secreció de glutamat. Els resultats obtinguts al laboratori van mostrar que la toxina no era capaç

de provocar l'alliberació de glutamat pels sinaptosomes, tot i que aquests eren funcionals. Això ens va fer pensar que la toxina possiblement tampoc s'estava unint directament als sinaptosomes sino que potser ho feia a alguna estructura que es trobaria dins la mateixa fracció a l'hora d'aïllar els sinaptosomes; de fet, està descrita la copurificació de restes de mielina considerades com a contaminants a les fraccions sinaptosomals (Takamori *et al.*, 2006).

Per estudiar això vam fixar aquests sinaptosomes sobre cobreobjectes de vidre tractats amb polilisina i vam realitzar incubacions amb la protoxina- ϵ -GFP juntament amb anticossos contra proteïnes sinàptiques com SNAP-25, VAMP-2 i syntaxina-1, però no vam trobar colocalització. En canvi, sí que vam trobar colocalització en utilitzar anticossos contra la proteïna bàsica de la mielina (MBP), confirmant que la toxina s'estava unint a fragments de mielina recircularitzada presents a la preparació.

Per tal de determinar si aquesta unió era característica de la mielina aïllada i també tenia lloc en el teixit nerviós, vàrem dur a terme les mateixes incubacions en seccions de cervell de ratolí. Vam detectar unió de la toxina- ϵ als tractes mielítics del cervell, coincidint amb els resultats anteriors. Aquesta unió es va veure incrementada després d'un pretractament amb el detergent colat de sodi, segurament a causa d'una millor exposició del receptor de la toxina- ϵ , coincidint amb els resultats obtinguts a sistema renal i comentats anteriorment.

A més, incubacions amb seccions de cervell d'ovella i vaca van revelar que la toxina també s'unia a estructures mielíniques. A més, en aquestes espècies també ho fa a l'endoteli de la microvasculatura del cervell, mentre que a ratolí únicament reconeix estructures mielíniques. Això podria estar relacionat amb que l'ovella i la vaca són els hostes naturals, on s'hi trobaria una major densitat del receptor de la toxina- ϵ a la microvaculatura del cervell. També però, podria ser a causa que l'endoteli en el cas del ratolí fos més sensible als processos de manipulació i fixació.

La toxina- ϵ també reconeix la mielina del SNP. Curiosament, també reconeix la zona dels nodes de Ranvier, probablement, a causa que la toxina estaria reconeixent una proteïna específica d'aquesta zona. També podria ser que en els nodes de Ranvier el possible receptor estigués més ben exposat i per aquest motiu es detecta més que no pas en la coberta externa de la mielina, ja que la mielina té un alt component lipídic, al voltant del 70% (Tzakos *et al.*, 2005), i podria estar emmascarant el receptor.

Per estudiar la natura de la unió de la toxina- ϵ en l'àmbit del sistema nerviós vam dur a terme els mateixos tractaments (Pronasa E, detergents, N-glicosidasa F i β -eliminació) que havíem fet anteriorment amb el sistema renal.

Amb els nostres resultats podem concloure que la toxina- ϵ s'uneix a una proteïna de la mielina, que es troba tant al SNC com del SNP, ja que es mostra una reducció en la unió de la toxina- ϵ després del tractament amb Pronasa E. Aquests resultats estan en consonància amb els resultats de Nagahama i Sakurai l'any 1992, on van demostrar que la toxina- ϵ a homogenats de cervell de rata i fraccions sinaptosomals també era sensible a Pronasa E. També estan en consonància amb els nostres resultats trobats a sistema renal on es produeix una reducció de la unió de la toxina- ϵ als túbuls distals i col·lectors després del tractament amb Pronasa E. Val a dir, que la concentració de Pronasa E requerida en el sistema nerviós és més alta que la requerida en el sistema renal per veure uns efectes similars en la reducció de la marca de la toxina. Això podria explicar-se a causa d'una major densitat de receptor per a la toxina- ϵ en la mielina, o bé, que a la mielina el receptor està més emmascarat que al sistema renal. Aquest emmascarament podria donar-se per lípids, ja que la mielina té un alt component lipídic. Això no seria estrany, ja que tant a sistema renal com a nerviós s'observa un augment en la marca de la toxina- ϵ després de tractar amb colat de sodi.

Així mateix, els tractaments amb detergents no van mostrar cap modificació en la unió de la toxina- ϵ a tractes mielínics grans. Sí que es va observar però, canvis en la unió a tractes mielínics més petits, on després de tractar amb colat de sodi s'hi va notar un augment en la marca de la toxina- ϵ , revelant que el receptor de la toxina- ϵ a estructures mielíniques estaria protegit per una molècula de natura lipídica, coincidint amb els resultats obtinguts a sistema renal.

Per altra banda, els glúcids (O-glicans) també estarien involucrats en la unió de la toxina- ϵ en les estructures mielíniques, tal i com succeeix en el sistema renal. Amb aquests experiments, però, no podem saber si el tipus d'O-glicà seria el mateix en ambdós sistemes.

B.5. Valoració general de la unió de la toxina- ϵ a sistema renal i nerviós.

Amb els resultats obtinguts a sistema renal i nerviós, podem concloure que la unió de la toxina- ϵ podria ser del tipus lectina, que estaria reconeixent un arbre glucídic específic.

Això ha estat descrit per altres toxines com és el cas de la lectina produïda pel fong paràsit *Laetiporus sulphureus* (LSL), també classificada com a proteïna β -formadora de porus, amb una estructura tridimensional similar a l'aerolisina d'*Aeromonas hydrophila* i a la pròpia toxina- ϵ . Aquesta toxina té un domini N-terminal que actua com a lectina i un domini C-terminal que actua com a formador de porus (Mancheño *et al.*, 2005).

L'efecte biològic de la toxina es produeix a l'endoteli vascular i en el sistema renal (tant en cèl·lules MDCK com a túbuls distals i col·lectors de ronyó), on hi trobem unió de la toxina- ϵ .

Nosaltres proposem dues hipòtesis per explicar l'efecte biològic de la toxina a nivell cel·lular:

Hipòtesi directa: La toxina- ϵ s'estaria unint a una proteïna O-glicosilada gràcies a la qual oligomeritzaria i s'inseriria a la membrana plasmàtica, on duria a terme el seu efecte biològic.

Hipòtesi indirecta: Hi hauria dues molècules implicades en la unió i acció de la toxina- ϵ .

Una primera proteïna (receptor) amb una composició O-glucídica determinada, que permetria que la toxina- ϵ s'hi unís i oligomeritzés independentment de temperatura. Aquesta proteïna és la que detectariem en els nostres experiments d'ELISA.

Únicament, però, a 37°C l'oligòmer format s'insertaria a la membrana de la cèl·lula produint possiblement un canvi de conformació d'aquest receptor i permetria el contacte d'aquest complex amb una segona proteïna de membrana (coreceptor), que podria estar localitzada a la cara citosòlica. El contacte amb el coreceptor acabaria d'insertar l'oligòmer i es formaria un porus que portaria al desenvolupament de l'efecte biològic.

Aquestes hipòtesis es resumeixen en la figura següent (Figura D1) en forma d'esquema.

D'altra banda, la toxina- ϵ també reconeix estructures mielíniques, tot i que en aquest cas no s'ha relacionat amb cap efecte biològic. A arrel dels resultats obtinguts, proposem que la protoxina- ϵ -GFP és una bona eina per a la identificació directa d'estructures mielíniques, amb el valor afegit que en forma de protoxina- ϵ no presenta toxicitat.

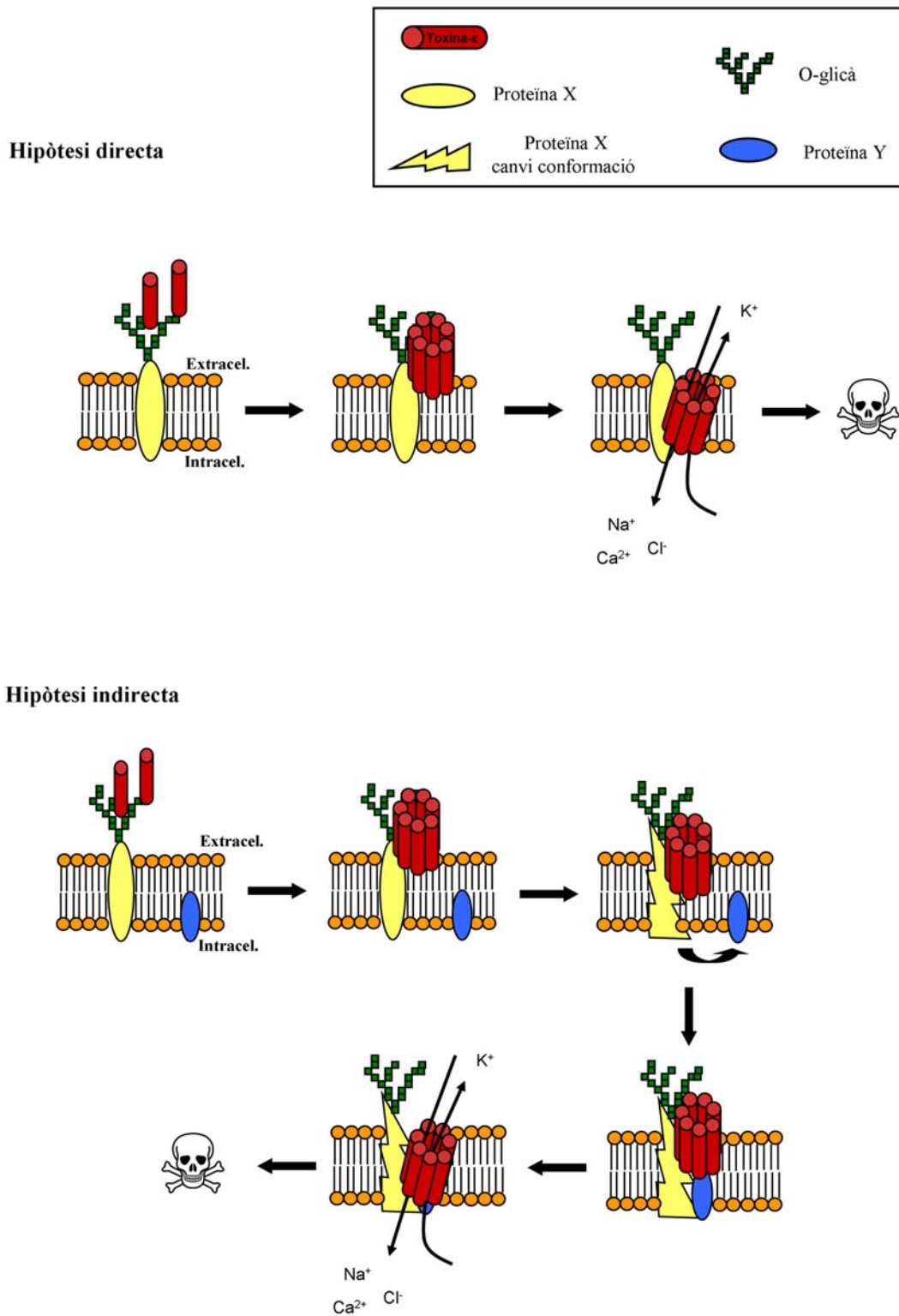


Figura D1. Hipòtesi directa i indirecta sobre l'acció de la toxina-ε en cèl·lules MDCK. La hipòtesi directa la toxina oligomeritza en unir-se al seu receptor (proteïna X) on també s'insereix i provoca el desequilibri iònic que condueix a la mort cel·lular. En la hipòtesi indirecta, la toxina oligomeritza i es preinsereix a la membrana, això provoca un canvi de conformació en el seu receptor (proteïna X amb canvi de conformació). Aquest receptor que té associat l'oligòmer de toxina viatja per la membrana fins trobar el coreceptor (proteïna Y) que permet la inserció completa de l'oligòmer provocant el desequilibri iònic amb la posterior mort cel·lular.

Per una banda, vam pensar que el receptor tant a sistema renal com a nerviós podria ser el mateix (o si més no, presentar alguna homologia). Per tant, vam buscar a la bibliografia estructures que es trobessin en tots els òrgans. Malauradament, quasi no hi ha estructures compartides en aquests dos tipus de teixits, i d'entre els pocs candidats, vam trobar una molècula anomenada Myelin and lymphocyte-associated protein, MAL o VIP17, també coneguda com (MAL/VIP17). Aquesta molècula és un proteolípid que es troba unit a l'aquaporina 2 (AQ2) en les cèl·lules dels túbuls col·lectors del ronyó (Kamsteeg *et al.*, 2007). Té una distribució molt reduïda, a banda de trobar-se al ronyó (túbuls distals i col·lectors), també es troba a la medul·la espinal (mielina), cervell (mielina), estómac i el cec de l'intestí gròs (Kim *et al.*, 1995; Magyar *et al.*, 1997). Estudis posteriors van demostrar que MAL copurifica amb certs glicoesfingolípid dels DRMs, indicant una associació propera o fins i tot alguna possible interacció funcional entre el MAL i aquests (Frank, 1999). Aquesta informació està en consonància amb el que se sap fins ara sobre el possible receptor de la toxina-ε, malgrat que la MAL és un proteolípid i el receptor de la toxina es postula que podria ser una proteïna O-glicosilada. De fet, immunodeteccions dobles de l'anticòs contra la MAL amb la protoxina-ε-GFP no van mostrar colocalització, únicament en el cas dels túbuls distals es va trobar la marca de la toxina molt propera a la de la MAL (imatges no mostrades). Per tant, no hem trobat evidència directa de que MAL estigui involucrat en la unió de la toxina.

B.6. Unió de la toxina-ε a altres òrgans.

Vam voler estendre l'estudi de la unió de la toxina-ε a altres òrgans.

La toxina-ε també reconeix l'epiteli de revestiment dels conductes excretors de glàndules salivals de ratolí. També vam observar unió de la toxina-ε a seccions de timus de ratolí, on presentava un patró reticular i es localitzava a la part medul·lar i corticomedul·lar, tal i com ho demostren les incubacions amb diverses lectines.

Si bé hi ha una colocalització parcial de la marca del timus amb algun marcador de macròfags com l'anti-CD68 (Kim *et al.*, 2010), i la marca de la toxina es troba molt a prop, inclús embolcallada pel marcador anti-Iba-1, encara no hem identificat l'estructura al timus a la que s'uneix la toxina. El marcatge de la toxina en el timus segueix un patró reticular, la qual cosa ens va fer pensar en la distribució de les cèl·lules reticulars

d'aquest òrgan. Això no ha pogut ser confirmat i la unió de la toxina- ϵ al timus encara està en estudi.

Podem dir que aquesta unió depèn de proteïnes, ja que s'observa una reducció en la unió de la toxina- ϵ després del tractament amb Pronasa E. D'altra banda, els tractaments amb detergents no van mostrar cap tipus d'alteració en la seva unió. Això explicaria per què al timus la unió de la toxina- ϵ no dependria de lípids (els lípids no emmascararien el possible receptor), si no que dependria més d'una natura proteica. Val a dir, que la concentració de Pronasa E requerida en el timus és molt més baixa que la requerida a sistema nerviós i renal per veure uns mateixos efectes en la reducció de la unió de la toxina, per tant, juntament amb les conclusions anteriors podem assumir que en el timus el possible receptor estaria més ben exposat, i estaria principalment format per una estructura proteica. Encara està en estudi la implicació dels sucres en la unió de la toxina al timus.

C. Cross-linking i immunoprecipitacions en cèl·lules MDCK.

Vam pensar que una bona aproximació per trobar el receptor de la toxina- ϵ seria fent servir el model de cèl·lules MDCK, el més sensible a la toxina- ϵ (que vindria a ser una representació fisiològica del que succeeix en el ronyó). Vàrem utilitzar mètodes de cross-linking per fixar la toxina- ϵ al seu receptor i poder captar posteriorment el complex.

Es va detectar un complex d'alt pes molecular, d'uns 200 kDa, al tractar les cèl·lules MDCK amb toxina i cross-linker, mentre que amb la protoxina- ϵ es forma un complex en forma de banda electroforètica d'uns 60 kDa. Aquesta banda podria correspondre o bé a un homodímer de protoxina- ϵ o bé a un heterodímer de protoxina- ϵ amb el seu receptor, on el receptor tindria un pes similar al de la protoxina- ϵ , d'uns 30 kDa.

Les incubacions amb protoxina- ϵ -GFP van evidenciar una banda al voltant dels 95 kDa, que podria correspondre a un heterodímer format per la protoxina- ϵ -GFP (de 65 kDa) més una proteïna d'uns 30 kDa. No tenim, però, cap resultat que demostrï de manera directa l'existència de l'heterodímer. Tot i que, aquests resultats coincidirien amb un estudi previ on el grup del Dr. Popoff va detectar una proteïna al voltant de 37 kDa aïllada mitjançant tècniques de purificació amb columnes d'afinitat (Petit *et al.*, 1997).

C.1. Identificació i seqüenciació de la banda on es localitza el receptor de la toxina-ε.

Amb la idea de recuperar la banda on estaria localitzat l'heterodímer del receptor amb la toxina-ε, o el receptor amb la protoxina-ε, hem dut a terme diverses aproximacions experimentals sobre les cèl·lules MDCK: utilització de cross-linkers (DMS, DSS, DTSSP i ANB-NOS), immunoprecipitacions i anàlisi amb gels d'acrilamida (d'una i dues dimensions).

Pel que fa als gels bidimensionals i les immunoprecipitacions amb proteïna G-sefarosa, no vàrem obtenir cap resultat positiu, degut a la baixa solubilitat del receptor. Això no era d'estranyar ja que aquest es troba majoritàriament en els DRMs, els quals són dominis resistents a detergents (Miyata *et al.*, 2002).

Per altra banda, vam fer una tècnica que consistia en incubar les cèl·lules MDCK amb GST-protoxina-ε i un dels cross-linkers que era fotoactivable (ANB-NOS). Posteriorment es va purificar la mostra incubant-la amb boles magnètiques recobertes amb glutatió. Aquest mètode tampoc va donar cap resultat aclaridor. Els tractaments amb la resta de cross-linkers sí que van evidenciar una banda que correspondria a l'heterodímer, i concretament, el cross-linker que millor va permetre la seva visualització va ser el DMS amb la posterior separació de proteïnes en els clàssics gels d'acrilamida. Així doncs, vàrem retallar les bandes d'interès i les vàrem enviar al servei de proteòmica dels serveis científicotècnics de la UB al Parc Científic de Barcelona. Amb aquest mètode no es va detectar la protoxina-ε en la banda corresponent al possible heterodímer. Sí que es va detectar, però, la toxina-ε en la banda del complex d'alt pes molecular. Els resultats obtinguts de la seqüenciació on detectaven la toxina-ε no van revelar, però, cap proteïna d'interès a la que hi pogués estar unida.

Finalment, vam desenvolupar una tècnica més fina on s'incuben les cèl·lules MDCK amb 6xHis-toxina-ε o 6xHis-protoxina-ε, i posteriorment es tracta amb el cross-linker DMS. Aquesta construcció (6xHis-toxina-ε) la vam produir amb la idea de poder utilitzar detergents i urea (altament desnaturitzant a concentracions elevades) per solubilitzar al màxim les proteïnes que es troben als DRMs (on es localitzaria el complex de toxina-ε i receptor). Podem detectar la toxina-ε en condicions desnaturitzants (8M urea) ja que la cua d'histidines no perd la seva habilitat per unir-se a metalls (boles de cobalt).

Els resultats demostren que el receptor es pot solubilitzar amb aquestes condicions, ja que es detecta una banda d'alt pes molecular en el sobrenedant després de tractar amb detergents i urea (al voltant de 200 kDa). En canvi, no es detecta cap banda en el sobrenedant després de tractar únicament amb detergent sense urea.

La banda detectada es va seqüenciar i vam identificar dues proteïnes candidates: la podocalixina i l'anexina A2.

- La podocalixina és una sialoglicoproteïna que conté glúcids del tipus N-glicà i O-glicà (Dekan *et al.*, 1991). La podocalixina es troba sobre tot a la part luminal de les cèl·lules epitelials del glomèrul i els podòcits, on tindria una funció anti-adherent, mantenint l'estructura del glomèrul (Seiler *et al.*, 1977; Kerjaschki *et al.*, 1986). També es troba a les neurones durant el seu desenvolupament, i estaria implicada en el creixement de la neurona així com en la formació de l'arbre dendrític i la fasciculació axonal (Vitureira *et al.*, 2010). També es troba a la part luminal de les cèl·lules endotelials (Horvat *et al.*, 1986). Per aquestes implicacions en el sistema renal, nerviós i en l'endoteli, a banda, de la seva composició O-glucídica, creiem que és un bon candidat a estudiar.
- D'altra banda l'anexina A2 també és un bon candidat a estudiar, ja que és una glicoproteïna amb un pes molecular d'uns 36 kDa (i això coincideix amb els nostres resultats i els del Dr. Popoff on es postula que el receptor de la toxina hauria de tenir un pes similar). L'anexina A2 es membre de la família de les proteïnes d'unió a fosfolípids i actines dependents de calci, i estan implicades en nombroses funcions a nivell intracel·lular (Gerke i Moss, 2002). A més, l'anexina A2 s'expressa tant a SNC (Eberhard *et al.*, 1994; Naciff *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2004) com a SNP; on es localitza a les regions paranodals i a les insisures de Schmidt-Lanterman (Hayashi *et al.*, 2007), coincidint amb els nostres resultats de *teasing* de nervi ciàtic de ratolí incubat amb la toxina on vam veure unió a aquestes mateixes regions.

C.2. Conclusions obtingudes dels tractaments amb cross-linkers, i especulacions sobre els possibles receptors de la toxina-ε.

Els tractaments amb urea 8M i Tritó X-100 a l'1% permeten solubilitzar aproximadament la meitat dels receptors on s'uneix la toxina-ε (imatge no mostrada).

Aquestes concentracions tan elevades d'urea, desnaturalitzen les proteïnes i fa que sigui impossible d'immunoprecipitar-les amb els anticossos disponibles.

La producció de la toxina- ϵ amb una cua de 6 histidines a la part aminoterminal (6xHis-toxina- ϵ) va permetre unir la toxina al seu receptor, i captar posteriorment el complex toxina-receptor mitjançant boles recobertes de cobalt.

Tal com s'ha dit més amunt, la seqüenciació del complex (>200 kDa) va revelar la presència de podocalixina i anexina A2 que podrien estar relacionades, directament o indirectament, amb la unió de la toxina- ϵ al seu receptor. Així doncs, aquestes proteïnes podrien prendre joc en les nostres hipòtesis directa i indirecta explicades anteriorment.

D. Caracterització dels diferents mutants de la toxina- ϵ . Estudi de la distribució de la toxina- ϵ i els seus diferents mutants *in vivo*.

El nostre laboratori està interessat en trobar alguna mutació de la toxina- ϵ que no presenti citotoxicitat però que tingui la capacitat de travessar la BHE. Estan descrits dos mutants de la toxina- ϵ (mutant 1 i mutant 2) que no són citotòxics, tot i que es poden tornar tòxics al tractar-los amb un agent reductor (Pelish i McClain, 2009). Hi ha també un altre mutant (mutant 3) que ha perdut completament la seva activitat tòxica (Oyston *et al.*, 1998).

Així doncs, al laboratori vàrem produir aquests mutants de la toxina- ϵ però com a proteïnes de fusió amb la GFP. Els estudis d'unió (tant mitjançant injeccions i.v com incubacions) demostren que tots els mutants, ja estiguin activats o no amb tripsina, reconeixen les mateixes estructures que la protoxina- ϵ -GFP i la toxina- ϵ -GFP. Respecte als estudis de citotoxicitat a les cèl·lules MDCK, només el mutant 1, després de ser activat amb tripsina i DTT, presenta una toxicitat igual a la de la toxina- ϵ -GFP salvatge (wt). La resta de mutants no presenten citotoxicitat. Aquests resultats no concorden exactament amb els resultats de Pelish i McClain que mostren que tant el mutant 1 com el 2 presenten toxicitat després de ser activats amb tripsina i DTT, tot i que encara en desconeixem les causes. El mutant 3 és una toxina- ϵ -GFP inactiva i no és citotòxic, coincidint així amb el que ja estava descrit pel mutant no fusionat amb GFP (Oyston *et al.*, 1998).

D.1. Distribució i efectes de la toxina-ε-GFP i dels diferents mutants a ronyó.

El ronyó és l'òrgan on més toxina-ε s'acumula després de la seva injecció i.v. A més, en casos naturals d'enterotoxèmia a ovelles, és també un dels òrgans més afectats (*pulpy kidney disease*).

Resultats obtinguts al nostre laboratori després d'injectar i.v la toxina-ε-GFP a rata i ratolí van revelar marca fluorescent en els túbuls proximals i en els distals, amb algunes diferències. Mentre que els túbuls proximals presentaven gran quantitat de fluorescència a la part apical, els distals presentaven molta menys fluorescència, i aquesta s'acumulava de manera uniforme al voltant de tota la membrana plasmàtica de les cèl·lules epitelials. Així mateix, la toxina-ε-GFP provocava la mort de cèl·lules epitelials dels túbuls distals, manifestada en un principi per l'aparició de nuclis picnòtics, i posteriorment per la completa desorganització d'aquests túbuls, mentre que aquests efectes no es donaven a l'injectar la protoxina-ε. A més, aquesta marca als túbuls distals era desplaçada amb la coinjecció en excés de protoxina-ε no marcada, mentre que la marca observada als proximals restava intacta (Soler-Jover *et al.*, 2004), suggerint que només la unió a túbuls distals és específica. Això es va acabar de demostrar injectant la GFP sola que s'acumulava als túbuls proximals però no n'apareixia en absolut als distals.

Encara no se sap quina és la via d'arribada de la toxina als túbuls renals. De fet, hi hauria dues vies d'arribada no excloents de la toxina als túbuls distals.

Una primera via d'arribada podria fer-se a través del filtrat glomerular. Una certa quantitat de toxina arribaria als túbuls proximals, on seria reabsorbida juntament amb la resta de proteïnes que hi arribessin. Una petita part, però, podria escapar cap als túbuls distals on trobaria els seus llocs d'unió específics provocant així la citotoxicitat.

Una segona via d'arribada de la toxina als túbuls distals seria mitjançant la circulació sistèmica a través dels capil·lars que nodreixen les seves cèl·lules. A més, també s'ha vist que hi ha acumulació de toxina als capil·lars renals (Soler-Jover *et al.*, 2004).

Estudis comparatius entre les injeccions i.v de toxina-ε i les incubacions sobre teixit reforcen la hipòtesi de la combinació de totes dues vies d'arribada, ja que la toxina-ε injectada presenta marcatge en els túbuls distals però aquesta marca es dona principalment en els vasos i en la zona basolateral de les cèl·lules epitelials dels túbuls distals (indicant que la toxina-ε tindria accés a través dels vasos i un primer contacte

amb aquesta part basolateral on produiria els seus efectes citotòxics). Una quantitat molt menor es detecta a la zona apical de les cèl·lules epitelials (això podria ser causat o bé per una petita part de la toxina- ϵ que s'ha escapat del filtrat glomerular i ha arribat als túbuls distals, o bé a causa d'alteracions en les unions intercel·lulars de les cèl·lules epitelials dels túbuls distals per on podria passar la toxina- ϵ i tenir accés així a la part apical).

En canvi, les incubacions amb la toxina- ϵ mostren unió a la part luminal dels túbuls distals que correspondria a la part apical de les cèl·lules epitelials i també en menor grau a la part basolateral. Això podria explicar-se ja que a la part apical dels túbuls distals sí que hi hauria receptor (i en gran quantitat) però això no es detectaria així en les injeccions i.v, a causa de la molt poca quantitat de toxina- ϵ que arribaria als túbuls distals després de fer-se el filtrat glomerular (la major part quedaria retinguda als túbuls proximals i vasos). Possiblement, per aquest motiu, no es detecta als túbuls distals tanta fluorescència després de ser injectada com amb les incubacions. Així doncs, sembla ser que el receptor per a la toxina- ϵ es troba tant en la part apical com en la basolateral.

Pel que fa als mutants, hem observat que el patró d'unió i efecte tant a túbuls distals com a proximals, és molt similar al de la toxina- ϵ -GFP o protoxina- ϵ -GFP salvatges (wt). En tots els casos s'observa un marcatge puntejat a la part apical de les cèl·lules epitelials dels túbuls proximals i un marcatge uniforme al voltant de tota la membrana plasmàtica de les cèl·lules epitelials dels túbuls distals. Assumim doncs, que l'única marca específica és als túbuls distals, tal i com passa en el cas de la toxina- ϵ -GFP o protoxina- ϵ -GFP (wt).

Curiosament, els animals injectats amb els mutants 1 i el 2 van morir en els mateixos temps que els injectats amb toxina- ϵ -GFP (wt). També van presentar un edema generalitzat i uns ronyons hemorràgics amb la mort de les cèl·lules epitelials dels túbuls distals evidenciada per la detecció dels núclis picnòtics en aquesta zona. Aquests mutants, però, no havien estat activats amb agents reductors (com el DTT), la qual cosa es contradiu amb els resultats obtinguts en les proves de citotoxicitat en les cèl·lules MDCK, ja que els mutants injectats varen ser activats amb tripsina però no varen ser tractats amb DTT, per tant, no haurien de presentar toxicitat en l'animal (tal i com no la mostren en les cèl·lules MDCK). A més, la mort de l'animal també es produeix fins i tot a l'injectar el mutant 2, on en el cas dels tractaments sobre les cèl·lules MDCK no mostrava citotoxicitat, ni tan sols després de tractar-lo amb DTT.

És possible que el plasma del ratolí contingui algun agent reductor (com podria ser l'àcid úric) que inclús a poca concentració fos suficient com per produir la hidròlisi dels ponts disulfur en la molècula dels mutants 1 i 2, activant-los com si es tractessin de toxina- ϵ -GFP (wt).

El mutant 3 no va produir la mort de l'animal i es va comportar com la protoxina- ϵ -GFP, sense produir edema ni hemorràgia renal.

Val a dir, que la marca als túbuls proximals és més intensa en els casos de les injeccions amb protoxina- ϵ -GFP i mutant 3 que no pas en els casos de toxina- ϵ -GFP, mutant 1 i mutant 2. Això pot estar relacionat amb la capacitat de la toxina- ϵ -GFP (wt), mutant 1 i mutant 2 per travessar la BHE, penetrant així una part al parènquima del cervell i detectant-se menys quantitat als ronyons. En canvi, la protoxina- ϵ -GFP i el mutant 3 no tenen la capacitat de travessar la BHE i no produeixen la mort de l'animal. Aquestes no penetrarien al parènquima del cervell, romanent sempre en circulació i unint-se més inespecíficament a l'epiteli dels túbuls proximals.

No passaria el mateix en les cèl·lules epitelials del túbuls distals ja que la unió, en aquest cas, és específica i saturable. Encara que hi hagi més quantitat de toxina en circulació arriba un punt que no s'hi pot unir més quantitat al seu receptor específic, i possiblement per això la intensitat d'unió de la toxina- ϵ -GFP (wt) i els mutants 1 i 2 són similars.

D.2. Distribució i efectes de la toxina- ϵ i els diferents mutants a sistema nerviós.

Una de les primeres raons de la mort dels animals s'atribueix als efectes neurològics causats per la toxina- ϵ (Finnie *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 1998). L'efecte de la toxina- ϵ vindria donat per la seva capacitat de creuar la BHE accedint així al teixit nerviós (Finnie *et al.*, 1999). La toxina- ϵ és capaç de produir edema vascular sever a nivell cerebral, a més de produir danys cel·lulars concrets com l'inflament dels peus perivasculars dels astròcits, lesions en l'àmbit de l'endoteli vascular cerebral, o també mort neuronal (Finnie, 1984b).

Estudis previs on es va fer una anàlisi bioquímica de la sang d'ovelles que patien enterotoxèmia no van revelar cap canvi en els nivells de fosfats, sodi, potassi i clor comparant amb la sang d'ovelles que no patien aquesta intoxicació (Gardner., 1973a).

Es descarta, doncs, que la mort neuronal pogués venir donada per un desequilibri osmòtic en la sang, relacionat amb la disfunció i posterior mort de les cèl·lules epitelials dels túbuls distals dels ronyons. Així doncs, la mort neuronal s'ha atribuït a l'excitotoxicitat provocada per l'alliberació de glutamat o dopamina (a dosis més altes de toxina) dels terminals nerviosos (Miyamoto *et al.*, 1998).

S'ha descrit que els efectes al cervell depenen de la dosi de toxina- ϵ injectada. Així, dosis altes serien capaces de provocar danys al mateix endoteli, causant un greu edema vasogènic responsable directe de la ràpida mort de l'animal. En canvi, dosis baixes serien les responsables d'un menor dany de l'endoteli que comportaria una sèrie de canvis més lents que acabarien, mitjançant el procés excitotòxic, amb mort neuronal en determinades zones del cervell i amb una mort molt més tardana de l'animal (Finnie, 2004).

En aquest treball ens hem centrat principalment en la distribució de la toxina- ϵ durant una intoxicació aguda. Es va injectar a ratolins grans dosis de protoxina- ϵ -GFP i toxina- ϵ -GFP. Els animals no van mostrar els episodis de convulsions esperats a causa de l'activitat excitotòxica de la toxina; això podria ser per la prèvia administració de ketamina (un antagonista dels receptors de glutamat NMDA) utilitzat en el protocol d'anestèsia (Miyamoto *et al.*, 1998 i 2000).

En l'àmbit del cervell es va veure que en els animals coinjectats amb BSA i toxina- ϵ -GFP, la BSA creuava l'endoteli i quedava retinguda a la regió perivascular. A més, la toxina- ϵ -GFP era capaç d'unir-se a l'endoteli i també de travessar-lo, i no tan sols es trobava a les mateixes regions perivasculars que la BSA, sino que anava més enllà, endinsant-se al parènquima del cervell. Principalment, a zones del cerebel i peduncles cerebelars, on s'hi han descrit canvis histopatològics per a la toxina- ϵ (Finnie, 1984a; Uzal *et al.*, 2002 i 2003). D'altra banda, coinjeccions de toxina- ϵ -GFP amb protoxina- ϵ en excés, va evitar la unió i distribució de la toxina- ϵ -GFP i va confirmar que les dues proteïnes competeixen pel mateix receptor en l'endoteli vascular. A més, no es va detectar fluorescència en les injeccions amb GFP sola o en combinació amb BSA (Soler-Jover *et al.*, 2007), indicant que la GFP no té la capacitat d'unir-se a l'endoteli ni de travessar la BHE.

Encara no se sap ben bé sobre quins tipus de cèl·lules està actuant la toxina- ϵ en el sistema nerviós. Injeccions i.v amb toxina- ϵ -GFP mostren tres tipus de marcatge

diferent. Per una banda, hi ha un marcatge de les cèl·lules endotelials, per altra banda hi ha un marcatge perivascular (marcatge d'un tipus de cèl·lula que forma part de la BHE amb un patró similar als pericits). Per últim, hi ha un marcatge puntejat al parènquima del cervell (patró similar a cèl·lules glials).

El marcatge perivascular ens va fer pensar que la toxina- ϵ podria tenir un primer efecte d'entrada en algun tipus cel·lular que formés part de la BHE (com podrien ser els pericits) ja fos produint la mort d'aquestes cèl·lules o una debilitació de la unió d'aquestes.

Estudis amb diferents marcadors d'aquestes cèl·lules: α -SMA (per cèl·lules musculars llises i pericits) i NG2 (marcador de superfície dels pericits) no van revelar colocalització amb la toxina- ϵ -GFP en aquestes cèl·lules, malgrat en el cas de α -SMA hi havia una marca molt propera. Sí que vam observar, però, que la toxina no s'extravasava en les zones on hi havia la marca per l' α -SMA. A més, sempre que s'ha detectat toxina- ϵ -GFP fora del vas, mai s'ha detectat α -SMA, indicant que les zones del vas que presenten marcatge per α -SMA poden tenir una composició que evita la sortida de la toxina- ϵ .

De fet, les artèries cerebrals grans es divideixen en arterioles de diàmetre més petit a mesura que penetren al cervell i aquestes estan formades per: cèl·lules endotelials, cèl·lules musculars llises i peus astrocitàris. Aquestes encara es poden ramificar més i ser de diàmetre més petit formant els capil·lars, on la composició varia i passa a ser: endoteli, pericit i peu astrocitari (Iadecola, 2004). La toxina- ϵ estaria afectant únicament els capil·lars, sense tenir un efecte evident en els vasos sanguinis més grans.

Amb els resultats observats fins ara, no podem assegurar que la toxina no té cap efecte sobre els pericits, ja que els estudis de fluorescència amb l' α -SMA no marquen el pericit sencer. Per tant, podria ser que la toxina estigués marcant el soma del pericit o alguna part on no es localitzés l'actina de múscul llis (present dintre del pericit), per això no veiem colocalització amb la toxina.

Per altra banda, estudis previs del nostre laboratori demostren que la toxina- ϵ -GFP injectada seguia un patró de distribució similar als observats per les cèl·lules glials, on diferents marcadors per aquests van demostrar una alta colocalització en certes zones indicant que, al menys, part de la toxina- ϵ -GFP s'unia a aquest tipus de cèl·lules. No s'ha vist cap canvi morfològic evident en aquestes cèl·lules, probablement pels curts

temps d'exposició a la toxina, però sí que s'ha vist que la toxina-ε és capaç de provocar mort cel·lular (encara que aquesta citotoxicitat no fos massa elevada) sobre cultius primaris d'astròglia i micròglia (amb un grau de citotoxicitat més elevat a micròglia) (Soler-Jover *et al.*, 2007). Aquest resultat va ser interessant, ja que s'ha descrit que poques cèl·lules són sensibles a la toxina, reduint-se principalment a les cèl·lules MDCK o els macròfags peritoneals de conill d'índies (Buxton, 1978c).

La toxicitat microglial, és un punt connector amb el sistema immunitari, on entraria en joc el marcatge de patró reticular trobat en les incubacions realitzades sobre talls de timus de ratolí. Encara desconeixem, però, la estructura a la que s'hi uneix, probablement correspon a algun tipus de cèl·lula relacionada amb el sistema de defensa, ja sigui macròfag, cèl·lula dendrítica o timòcit en algun grau de maduració determinat.

S'ha descrit que la micròglia pot ser la responsable de processos d'excitotoxicitat, augmentant els nivells de glutamat extracel·lular per inhibició de la seva recaptació pels astròcits, a través de la interleuquina-1β secretada per la micròglia activada (Takahashi *et al.*, 2003). Per tant, una activació de la micròglia per part de la toxina podria estar relacionada amb la mort neuronal descrita als animals intoxicats amb dosis baixes de toxina-ε. També existeix la possibilitat de que la toxina-ε, un cop dins del teixit nerviós, pugui arribar a entrar en contacte amb els terminals nerviosos i provocar l'alliberació del neurotransmissor de manera directa. De fet, això és el que suggereixen els experiments de Nagahama i Sakurai l'any 1992, que van observar unió específica de la toxina-ε a preparacions de sinaptosomes aïllats de cervell de rata. Fins i tot, van descriure que aquesta unió seria a través d'una sialoglicoproteïna.

Nosaltres hem demostrat que la toxina-ε no s'uneix a la membrana dels sinaptosomes i tampoc provoca la secreció de glutamat del seu interior. Sí que hem observat, però, unió de la toxina-ε a fraccions mielíniques recircularitzades presents a la preparació de fraccions sinaptosomals. D'altra banda, mitjançant tractaments *in vitro* amb proteases i β-eliminació hem trobat que el receptor de la toxina té una natura glicoproteica tant a ronyó com a la mielina. Aquests resultats doncs, estan parcialment en concordança amb els proposats per Nagahama i Sakurai l'any 1992 comentats anteriorment.

Per tal d'estudiar la toxina-ε *in vivo* en l'àmbit del sistema nerviós, al laboratori hem treballat amb dosis altes de toxina-ε que provocarien danys greus i la mort ràpida de l'animal. En aquest cas, la toxina-ε és capaç d'entrar al teixit nerviós i unir-se a cèl·lules

glials, però la mort esdevé massa ràpida com per poder veure efectes en l'àmbit neuronal (Soler-Jover *et al.*, 2007). En canvi, aquest pas de la toxina-ε a través de la BHE tindria molta importància en casos d'intoxicació subaguda, on serien els danys neuronals els que provocarien la mort molt més tardana de l'animal.

Per tant, podem defensar que la toxina-ε a dosis baixes tindria una unió i efecte sobre la micròglia i/o astròglia provocant un augment en la concentració extracel·lular de glutamat amb la posterior mort neuronal, i no pas per efecte directe sobre les poblacions neuronals, encara que estudis a dosis baixes estan en procés al nostre laboratori per demostrar aquesta via d'acció.

Fent referència a l'estudi de la BHE en relació amb les diferents mutacions generades, tant el mutant 1 com el mutant 2 injectats i.v a ratolí es comporten igual que la toxina-ε (wt), unint-se a les cèl·lules endotelials, produint un edema a la microvasculatura del cervell, travessant la BHE i provocant, finalment, la mort neuronal amb la conseqüent mort de l'animal. El mutant 3 únicament s'uneix a les cèl·lules endotelials, sense provocar cap dels altres efectes; es comporta com la protoxina-ε-GFP (wt).

En l'àmbit renal hem vist que provoquen els efectes citotòxics en les cèl·lules epitelials dels túbuls distals tal i com ho fa la toxina-ε (wt). Així doncs, una possibilitat és que les toxines mutades un cop injectades s'activessin d'alguna manera (segurament trencant els ponts disulfur que són els responsables d'inhibir la toxicitat), produint així, els mateixos efectes que la toxina-ε nativa.

Encara està en procés la generació de mutacions que puguin fer perdre la capacitat tòxica però no la invassiva de la toxina-ε. Un cop obtinguda aquesta toxina mutada estem interessats en utilitzar-la com a vehicle transportador a través de la BHE de substàncies o fàrmacs, relacionats amb la cura de malalties neurològiques, que per si mateixos no tindrien la capacitat de travessar-la.

D'altra banda, tot i que s'han destinat molts esforços en la fabricació de vacunes i mètodes de diagnòstic i s'han realitzat molts estudis que han ajudat considerablement a entendre la seva estructura i el seu mecanisme d'acció a nivell molecular, encara falta molt per descobrir, entre d'altres saber quin és el receptor i l'efecte que pugui tenir la toxina en humans.

E. Consideracions finals.

La toxina-ε produeix un edema generalitzat a gran part dels òrgans i teixits del cos, uns efectes citotòxics molt greus a ronyó i també efectes al sistema nerviós, amb contraccions i espasmes que finalment desencadenen la mort de l'animal. Actualment hi ha vacunes com a mètode preventiu de la malaltia. S'han descrit possibles causes del seu efecte citotòxic en cèl·lules renals, però encara no es coneix el seu mecanisme d'acció letal, ni quin és el seu receptor en els teixits diana, ni tampoc les primeres etapes que aboquen a l'efecte citotòxic.

Per tal de caracteritzar la unió de la toxina-ε hem fet incubacions d'aquesta amb diferents teixits i òrgans i hem vist que, pel que fa a sistema nerviós central i perifèric, reconeix principalment estructures mielíniques. A sistema renal reconeix cèl·lules epitelials dels túbuls distals i col·lectors del ronyó, així com l'uroteli. Encara desconeixem el receptor de la toxina-ε però els nostres estudis apunten que un arbre glucídic tipus O-glicà estaria relacionat amb la seva unió. Aquest arbre glucídic podria formar part d'una proteïna de membrana on la toxina s'uniria i desenvoluparia el seu efecte biològic (acció directa) o podria ser que formés part d'una proteïna que actuaria a mode d'antena receptora i que després tindria contacte amb una altra proteïna, que inclús podria estar a la cara citosòlica. Aquesta darrera proteïna seria la responsable de l'efecte biològic de la toxina (acció indirecta) permetent la inserció final de l'oligòmer de toxina i la formació del porus a la membrana plasmàtica.

La toxina-ε s'uneix a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK on forma oligòmers i provoca la mort de les cèl·lules. Mitjançant un assaig d'ELISA que hem dissenyat al nostre laboratori hem vist que només hi ha un tipus d'unió per a la toxina-ε a les cèl·lules MDCK, que és saturable i d'alta afinitat.

Per altra banda, també hem observat que la toxina-ε és capaç de travessar la BHE i arribar així al parènquima del cervell, on desenvoluparia un efecte citotòxic. En relació amb això, al nostre laboratori estem interessats en trobar alguna mutació de la toxina-ε on estigui anul·lada la seva capacitat tòxica però no la invasiva, permetent així, fer-la servir com a vehicle per introduir al sistema nerviós central possibles fàrmacs o molècules fusionades amb la toxina-ε que per sí soles no tenen la capacitat de travessar la BHE, i així poder estudiar l'efecte d'aquests fàrmacs per a possibles tractaments de malalties neurològiques. Fins al moment, però, els mutants que hem estudiat porten

Discussió

associada la pèrdua de capacitat tòxica amb la de travessar l'endoteli de la microvasculatura cerebral.

De tota manera, la futura identificació del receptor per a la toxina- ϵ , la formació dels oligòmers i el mecanisme d'inserció a la membrana són, sense dubte, els grans reptes que ajudaran a caracteritzar el mecanisme d'acció de la toxina- ϵ de *Clostridium perfringens*.

CONCLUSIONS

1. Les formes recombinants de **protoxina-ε i toxina-ε** obtingudes com a **proteïna de fusió** amb la GFP, la GST i la 6xHis són **eines útils** per a l'estudi *in vitro* i *in vivo* de la unió de la toxina-ε, ja que es comporten de manera equivalent a la protoxina-ε i toxina-ε natives.

2. La **unió específica** de la toxina-ε a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK és sensible a β-eliminació però no a N-glicosidasa F indicant que la unió depèn al menys d'un **component O-glucídic**.

3. Hi ha **un sol tipus d'unió** de la toxina-ε a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK, i aquesta unió és **saturable i d'alta afinitat**.

4. En el sistema renal, la toxina-ε **incubada** s'uneix específicament a les cèl·lules epitelials dels **túbuls distals, col·lectors i a l'uroteli** de ratolí i d'altres espècies inclosa la humana. També s'uneix a les **fibres mielíniques** del sistema nerviós central i perifèric de ratolí i d'altres espècies inclosa la humana. A més, en els cervells de les espècies hoste la toxina-ε s'uneix a les **cèl·lules endotelials** de la microvasculatura. La unió de la toxina-ε en ambdós sistemes depèn al menys d'un component O-glicoproteic i de la integritat de la membrana cel·lular.

5. La toxina-ε sola o com a proteïna de fusió amb la GFP **injectada intravenosament** a ratolí s'uneix específicament a les cèl·lules epitelials dels **túbuls distals i col·lectors** del ronyó provocant la mort d'aquestes cèl·lules, i s'acumula inespecíficament als túbuls proximals.

6. La toxina-ε sola o com a proteïna de fusió amb la GFP **injectada intravenosament** a ratolí és capaç de **travessar la BHE** i arribar al parènquima del cervell.

Conclusions

7. Els mutants Etx-I51C/A114C, Etx-V56C/F118C i Etx-H106P activats amb tripsina es comporten igual que la protoxina-ε nativa sense produir citotoxicitat en cultius de cèl·lules MDCK. El mutant **Etx-I51C/A114C tractat amb DTT esdevé actiu** com la toxina-ε nativa produint els seus mateixos efectes citotòxics en les cèl·lules MDCK.

8. Els mutants **Etx-I51C/A114C i Etx-V56C/F118C activats amb tripsina i injectats intravenosament a ratolí produeixen la seva mort** i els mateixos efectes a nivell del sistema renal i nerviós igual que ho fa la toxina-ε nativa. El mutant Etx-H106P activat amb tripsina i injectat intravenosament a ratolí no produeix la mort de l'animal i tampoc provoca cap efecte a nivell sistèmic.

BIBLIOGRAFIA

- Adamson RH, Ly JC, et al.** Clostridium perfringens epsilon-toxin increases permeability of single perfused microvessels of rat mesentery. *Infection and Immunity* **73**: 4879-4887, 2005
- Barth, H., Pfeifer, G, et al.** Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 10670-10676, 2001
- Barker, et al.** The alimentary system. **In: K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer, Editors (4th Edit.), Pathology of Domestic Animals 2, Academic Press, San Diego** 241–244, 1993
- Bentancor AB, Fermepin MR, Bentancor LD, et al.** Detection of the etx gene (epsilon-toxin inducer) in plasmids of high molecular weight in Clostridium perfringens type D. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **24**: 373-377, 1999
- Bernath S.** Solid-phase radioimmunoassays for quantitative antibody determination of Clostridium perfringens type D epsilon toxin. *Applied Microbiology* **30**: 499-502, 1975
- Bernath S.** Solid-phase radioimmunoassays for quantitative antibody determination of bacterial exotoxins. Measurement of Clostridium perfringens type D epsilon antitoxin. *Developments in Biological Standardization* **32**: 77-83, 1976
- Bhown, A.S., Habeeb, A.F.** Structural studies on epsilon prototoxin of *Clostridium perfringens* type D. Localisation of the site of tryptic scission necessary for activation to epsilon toxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **78**: 889-896, 1977
- Biochemica Information.** First Edition. Compiled and Edited by Joseph Keesey, Ph.D. Published by Boehringer Mannheim Biochemicals P.O.Box 50816 Indianapolis, IN 46250, 1987
- Bokori-Brown, et al.** Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS Journal* . Accepted article; doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08140.x.
- Bradford.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-gye binding *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254, 1976

Bibliografia

Buxton D. Use of horseradish peroxidase to study the antagonism of *Clostridium welchii* (*Cl. perfringens*) Type D epsilon toxin in mice by the formalinized epsilon prototoxin. *Journal of Comparative Pathology* **86**: 67-72, 1976

Buxton D, Morgan KT. Studies of lesions produced in the brains of colostrum deprived lambs by *Clostridium welchii* (*Cl. perfringens*) type D toxin. *Journal of Comparative Pathology* **86**: 435-447, 1976

Buxton D. The use of an immunoperoxidase technique to investigate by light and electron microscopy the sites of binding of *Clostridium welchii* type-D epsilon toxin in mice. *Journal of Medical Microbiology* **11**: 289-292, 1978a

Buxton D. Further studies on the mode of action of *Clostridium welchii* type-D epsilon toxin. *Journal of Medical Microbiology* **11**: 293-298, 1978b

Buxton D. In-vitro effects of *Clostridium welchii* type-D epsilon toxin on guinea-pig, mouse, rabbit and sheep cells. *Journal of Medical Microbiology* **11**: 299-302, 1978c

Chassin C, Bens M, et al. 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**: 927-937, 2007

Cole AR, Gibert M, Popoff M, et al. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**: 797-798, 2004

de la Rosa, et al. Vaccination schedules to raise antibody concentrations against epsilon-toxin of *Clostridium perfringens* in ewes and their triplet lambs. *Journal of Animal Science* **75**: 2328-2334, 1997

Desantis S, Ventriglia G, Zubani D, et al. Histochemical analysis of glycoconjugates in the domestic cat testis. *Histology and Histopathology* **21**: 11-22, 2006

Dekan, et al. Sulfate contributes to the negative charge of podocalyxin, the major sialoglycoprotein of the glomerular filtration slits. *PNAS* **88**: 5398-5402, 1991

Dorca-Arévalo, et al. Binding of ϵ -toxin from *Clostridium perfringens* in the nervous system. *Veterinary Microbiology* **131**: 14-25, 2008

Eberhard, et al. Alterations of annexin expression in pathological neuronal and glial reactions. Immunohistochemical localization of annexins I, II (p36 and p11 subunits),

IV, and VI in the human hippocampus. *The American Journal of Pathology* **145**: 640-649, 1994

Ebert, et al. Development and prevalidation of two different ELISA systems for the potency testing of Clostridium perfringens beta and epsilon-toxoid containing veterinary vaccines. *Immunology and Medical Microbiology* **24**: 299-311, 1999

El Idrissi AH, Ward GE. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Clostridium perfringens enterotoxemias. *Veterinary Microbiology* **31**: 389-396, 1992

Elizondo AM, Mercado EC, et al. Effect of tannins on the in vitro growth of Clostridium perfringens. *Veterinary Microbiology* (en impressió), 2010

Farr AG, Anderson SK. Epithelial heterogeneity in the murine thymus: fucose-specific lectins bind medullary epithelial cells. *Journal of Immunology* **134**: 2971-2977, 1985

Fernandez Miyakawa, et al. In vitro effects of Clostridium perfringens type D epsilon toxin on water and ion transport in ovine and caprine intestine. *Anaerobe* **9**: 145-149, 2003a

Fernandez Miyakawa, et al. The early effects of Clostridium perfringens type D Epsilon toxin in ligated intestinal loops of goats and sheep. *Veterinary research communications* **27**: 231-241, 2003b

Fernandez-Miyakawa ME, Jost BH, Billington SJ, Uzal FA. Lethal effects of Clostridium perfringens epsilon toxin are potentiated by alpha and perfringolysin-O toxins in a mouse model. *Veterinary Microbiology* **127**: 379-385, 2008

Fernandez Miyakawa ME, Zabal O, Silberstein C. Clostridium perfringens epsilon toxin is cytotoxic for human renal tubular epithelial cells. *Human and Experimental Toxicology* **30(4)**: 275-282, 2010

Finnie JW. Histopathological changes in the brain of mice given Clostridium perfringens type D epsilon toxin. *Journal of Comparative Pathology* **94**: 363-370, 1984a

Finnie JW. Ultrastructural changes in the brain of mice given Clostridium perfringens type D epsilon toxin. *Journal of Comparative Pathology* **94**: 445-452, 1984b

Bibliografia

- Finnie JW, Blumbergs PC, Manavis J.** Neuronal damage produced in rat brains by Clostridium perfringens type D epsilon toxin. *Journal of Comparative Pathology* **120**: 415-420, 1999
- Finnie JW.** Pathogenesis of brain damage produced in sheep by Clostridium perfringens type D epsilon toxin: a review. *Australian Veterinary Journal* **81**, 2003
- Finnie JW.** Neurological disorders produced by Clostridium perfringens type D epsilon toxin. *Anaerobe* **10**: 145-150, 2004
- Finnie JW, et al.** Aquaporin-4 in acute cerebral edema produced by Clostridium perfringens type D epsilon toxin. *Veterinary Pathology* **45**: 307-309, 2008
- Fivaz, et al.** Not as simple as just punching a hole. *Toxicon* **39**: 1637-1645, 2001
- Frank, M., N. Schaeren-Wiemers, et al.** Developmental expression pattern of the myelin proteolipid MAL indicates different functions of MAL for immature Schwann cells and in a late step of CNS myelinogenesis. *Journal of Neurochemistry* **73**: 587-97, 1999
- Gardner DE.** Pathology of Clostridium welchii type D enterotoxaemia. Biochemical and haematological alterations in lambs. *J Comp Pathol* **83**: 499-507, 1973a
- Gardner DE.** Pathology of Clostridium welchii type D enterotoxaemia. II. Structural and ultrastructural alterations in the tissues of lambs and mice. *J Comp Pathol* **83**: 509-524, 1973b
- Gaush, et al.** Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **122**: 931-935, 1966
- Gerke i Moss.** Annexins: From Structure to Function. *Physiol Rev* **82**: 331-371, 2002
- Ghabriel MN, Zhu C, Reilly PL, et al.** Toxin-induced vasogenic cerebral oedema in a rat model. *Acta Neurochirurgica - Supplement* **76**: 231-236, 2000
- Giesemann, T., Jank, T, et al.** Cholesterol-dependent pore formation of Clostridium difficile toxin A. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 10808-10815, 2006
- Gkiourtzidis K, Frey J, Bourtzi-Hatzopoulou E, et al.** PCR detection and prevalence of alpha-, beta-, beta 2-, epsilon-, iota- and enterotoxin genes in Clostridium perfringens isolated from lambs with clostridial dysentery. *Veterinary Microbiology* **82**: 39-43, 2001

- Gleeson-White i Bullen.** *Clostridium welchii* epsilon toxin in the intestinal contents of man. *Lancet* **268**: 384-385, 1955
- Goldstein J, Morris WE, et al.** Clostridium perfringens epsilon toxin increases the small intestinal permeability in mice and rats. *PLoS One* **4**: e7065, 2009
- Gould DH.** The development of the early brain lesions induced by the toxin of Clostridium perfringens type D in mice and lambs. Ph.D. thesis, University of California Davis, 1972
- Habeeb AF, Lee CL, Atassi MZ.** Conformational studies on modified proteins and peptides. VII. Conformation of epsilon-prototoxin and epsilon-toxin from Clostridium perfringens. Conformational changes associated with toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* **322**: 245-250, 1973
- Hanai T, et al.** Light microscopic lectin histochemistry in aging mouse kidney: Study of compositional changes in glycoconjugates. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **42**: 897-906, 1994
- Hatheway CL.** Bacterial Sources of Clostridial Neurotoxins. A Lance Simpson, ed. *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*. Academic Press, Inc. 1-19, 1989
- Hayashi, et al.** Localization of annexin II in the paranodal regions and Schmidt-Lanterman incisures in the peripheral nervous system. *Glia* **55**: 1044-1052, 2007
- Horvat, et al.** Endothelial cell membranes contain podocalyxin the major sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells. *The Journal of Cell Biology* **102**: 484-491, 1986
- Hunter SE, Clarke IN, Kelly DC, et al.** Cloning and nucleotide sequencing of the Clostridium perfringens epsilon-toxin gene and its expression in Escherichia coli. *Infection & Immunity* **60**: 102-110, 1992
- Iadecola C.** Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature reviews, Neuroscience* **5**: 347-360, 2004
- Ivie, et al.** Gene-trap mutagenesis identifies mammalian genes contributing to intoxication by Clostridium perfringens epsilon-toxin. *PLoS One* **6**: 3,e17787. 2011
- Jin F, Matsushita O, et al.** Purification, characterization, and primary structure of Clostridium perfringens lambda-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of Staphylococcus aureus. *Infection and Immunity* **61**: 3958-3965, 1996

Bibliografía

Johnson S. Antibody responses to clostridial infection in humans. *Clinical Infectious Diseases* **25**: 173-177, 1997

Ju T, Brewer K, et al. Cloning and Expression of Human Core 1 β 1,3-Galactosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 178-186, 2002

Junqueira & Carneiro. Histología básica. Texto y atlas ISBN: 84-458-0979-2, 5^a edición española. Editorial MASSON, S.A. 2000

Just, I., Selzer, J, et al. Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature* **375**: 500-503, 1995

Kadra B, Guillou JP, Popoff M, et al. Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic Clostridium perfringens strains by classical methods and by polymerase chain reaction (PCR). *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **24**: 259-266, 1999

Kamsteeg EJ, et al. MAL decreases the internalization of the aquaporin-2 water channel. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **104**: 16696-16701, 2007

Kelly, C.P., and LaMont, J.T. Clostridium difficile more difficult than ever. *The New England Journal of Medicine* **359**: 1932-1940, 2008

Kerjaschki, et al. Identification of a major sialoprotein in the glycocalyx of human visceral glomerular epithelial cells. *The Journal of Clinical Investigation* **78**: 1149-1149, 1986

Khon i Warrack. Recovery of Clostridium welchii type D from man. *Lancet* **268**: 385, 1955

Kim, T., K. Fiedler, et al. Cloning and characterization of MVP17: a developmentally regulated myelin protein in oligodendrocytes. *Journal of Neuroscencei Research* **42**: 413-422, 1995

Kim, et al. Selective depletion of eosinophils on neutrophils in mice impacts the efficiency of apoptotic cell clearance in the thymus. *PloS One* 6;5(7):e11439

Knapp O, Maier E, Benz R, Geny B, Popoff MR. Identification of the channel-forming domain of Clostridium perfringens Epsilon-toxin (ETX). *Biochimica et Biophysica Acta* **1788**: 2584-2593, 2009

- Laitinen L, et al.** Changes in glycosylation pattern during embryonic development of mouse kidney as revealed with lectin conjugates. *35*: 55-65, 1987
- Layana, et al.** Evaluation of different fluids for detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in sheep with experimental enterotoxemia. *Anaerobe* **12**: 204-206, 2006
- Lee, G.J.** Changes in composition and pH of digesta along the gastrointestinal tract of sheep in relation to scouring induced by wheat engorgement. *Australian Journal of Agricultural Research* **28**: 1075-1082, 1977
- Lewis, et al.** Identification of Small Molecule Inhibitors of *Clostridium perfringens* ϵ -Toxin Cytotoxicity Using a Cell-Based High-Throughput Screen. *Toxins (Basel)* **2**(7):1825-1847, 2010
- Lindsay CD.** Assessment of aspects of the toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin using the MDCK cell line. *Human & Experimental Toxicology* **15**: 904-908, 1996
- Liu JW, Porter AG, Wee BY, Thanabalu T.** New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-kilodalton mosquitocidal toxins. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2174-2176, 1996
- Lobato, et al.** Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants. *Vaccine* **28** (38): 6125-7. 2010
- Lonchamp, et al.** *Clostridium perfringens* epsilon toxin targets granule cells in the mouse cerebellum and stimulates glutamate release. *PLoS One* **5** (9), 2011
- Losada-Eaton DM, Uzal FA, Fernández Miyakawa ME.** *Clostridium perfringens* epsilon toxin is absorbed from different intestinal segments of mice. *Toxicon* **51**: 1207-1213, 2008
- Losada-Eaton DM, et al.** *Clostridium perfringens* epsilon toxin inhibits the gastrointestinal transit in mice. *Research in Veterinary Science*, 2010
- Magyar J. P, et al.** Myelin and lymphocyte protein (MAL/MVP17/VIP17) and plasmolipin are members of an extended gene family. *Gene* **189**: 269-275, 1997
- Majno G, et al.** Studies on inflammation. Fate of intramural vascular deposits induced by histamine. *The American Journal of Pathology* **47**: 1045-1077, 1965

Mancheño JM, Tateno H, Goldstein IJ, Martínez-Ripoll M, Hermoso JA. Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 17251-17259, 2005

Mathur, et al. Functional and structural characterization of soluble recombinant epsilon toxin of *Clostridium perfringens* D, causative agent of enterotoxaemia. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**(4): 877-84. 2010

McClain MS, Cover TL. Functional analysis of neutralizing antibodies against *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. *Infection and Immunity* **75**: 1785-1793, 2006

Minami J, Katayama S, Matsushita O, et al. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiology & Immunology* **41**: 527-535, 1997

Miyamoto O, Minami J, Toyoshima T, et al. Neurotoxicity of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin for the rat hippocampus via the glutamatergic system. *Infection & Immunity* **66**: 2501-2508, 1998

Miyamoto O, Sumitani K, Nakamura T, et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. *FEMS Microbiology Letters* **189**: 109-113, 2000

Miyata S, Matsushita O, Minami J, et al. Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the synaptosomal membrane. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 13778-13783, 2001

Miyata S, Minami J, Tamai E, et al. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin forms a heptameric pore within the detergent-insoluble microdomains of Madin-Darby canine kidney cells and rat synaptosomes. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 39463-39468, 2002

Morgan KT, Kelly BG, Buxton D Vascular leakage produced in the brains of mice by *Clostridium wchii* type D toxin. *Journal of Comparative Pathology* **85**: 461-466, 1975

Naciff, et al. Differential expression of annexins I-VI in the rat dorsal root ganglia and spinal cord. *J Comp Neurol* **368**: 356-370, 1996

Nagahama M, Takahashi T, Sakurai J. Effect of prior treatment with *Clostridium perfringens* epsilon toxin inactivated by various agents on lethal, pressor and contractile activities of the toxin. *FEMS Microbiology Letters* **60**: 59-62, 1990

- Nagahama M, Sakurai J.** Distribution of labeled *Clostridium perfringens* epsilon toxin in mice. *Toxicon* **29**: 211-217, 1991a
- Nagahama M, Kobayashi K, Ochi S, et al.** Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiology Letters* **68**: 41-44, 1991b
- Nagahama M, Sakurai J.** High-affinity binding of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin to rat brain. *Infection & Immunity* **60**: 1237-1240, 1992
- Nagahama M, Sakurai J.** Effect of drugs acting on the central nervous system on the lethality in mice of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *Toxicon* **31**: 427-435, 1993
- Nagahama M, Hara H, et al.** Oligomerization of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin is dependent upon membrane fluidity in liposomes. *Biochemistry* **45**: 296-302, 2006
- Nelson KL, Buckley JT.** Channel formation by the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein binding toxin aerolysin is not promoted by lipid rafts. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 19839-19843, 2000
- Niilo L, Bainborough AR.** A survey of *Clostridium perfringens* enterotoxin antibody in human and animal sera in western Canada. *Canadian Journal of Microbiology* **26**: 1162-1164, 1980
- Odaka C.** Localization of mesenchymal cells in adult mouse thymus: their abnormal distribution in mice with disorganization of thymic medullary epithelium. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **57**: 373-382, 2009
- Ono K, Katsuyama T, Hotchi M.** Histochemical application of mild alkaline hydrolysis for selective elimination of O-glycosidically linked glycoproteins. *Stain technology* **58**: 309-312, 1983
- Oyston PC, Payne DW, Havard HL, Williamson ED, Titball RW.** Production of a non-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin which induces protective immunity in mice. *Microbiology* **144**: 333-341, 1998
- Paessens LC, García-Vallejo JJ, Fernandes RJ, van Kooyk Y.** The glycosylation of thymic microenvironments. A microscopic study using plant lectins. *Immunology letters* **110**: 65-73, 2007

Bibliografia

Payne DW, Williamson ED, Havard H, et al. Evaluation of a new cytotoxicity assay for *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *FEMS Microbiology Letters* **116**: 161-167, 1994

Pappin et al. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current biology* **3**: 327-332, 1993

Pelish TM, McClain MS. Dominant-negative inhibitors of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 29446-29453, 2009

Percival DA, Shuttleworth AD, Williamson ED, et al. Anti-idiotypic antibody-induced protection against *Clostridium perfringens* type D. *Infection & Immunity* **58**: 2487-2492, 1990

Petit L, Gibert M, Gillet D, et al. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. *Journal of Bacteriology* **179**: 6480-6487, 1997

Petit L, Maier E, Gibert M, et al. *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**: 15736-15740, 2001

Petit L, Gibert M, et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin rapidly decreases membrane barrier permeability of polarized MDCK cells. *Cellular Microbiology* **5**: 155-164, 2003

Popoff MR. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS Journal*. "Accepted Article; doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08145.x", 2011

Radostis OM, et al. *Veterinary Medicine*. 9th ed. London: WB Saunders; p773-7. 2000

Rogers i Snyder. High affinity binding of tetanus toxin to mammalian brain membranes. *The Journal of biological Chemistry*. **256**: 2402-2407, 1981

Schaeren-Wiemers, N., C. Schaefer, et al. Identification of new oligodendrocyte- and myelin-specific genes by a differential screening approach. *Journal of Neurochemistry* **65**: 10-22, 1995

Schiavo G, Benfenati F, et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* **359**: 832-835, 1992

- Sakurai J, Nagahama M, Fujii Y.** Effect of Clostridium perfringens epsilon toxin on the cardiovascular system of rats. *Infection & Immunity* **42**: 1183-1186, 1983
- Sakurai J, Nagahama M.** Tryptophan content of Clostridium perfringens epsilon toxin. *Infection & Immunity* **47**: 260-263, 1985a
- Sakurai J, Nagahama M.** Role of one tryptophan residue in the lethal activity of Clostridium perfringens epsilon toxin. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **128**: 760-766, 1985b
- Sakurai J, Nagahama M.** Amino groups in Clostridium perfringens epsilon prototoxin and epsilon toxin. *Microbial Pathogenesis* **1**: 417-423, 1986
- Sakurai J, Nagahama M.** Carboxyl groups in Clostridium perfringens epsilon toxin. *Microbial Pathogenesis* **3**: 469-474, 1987a
- Sakurai J, Nagahama M.** The inactivation of Clostridium perfringens epsilon toxin by treatment with tetranitromethane and N-acetylimidazole. *Toxicon* **25**: 279-284, 1987b
- Sakurai J, Nagahama M.** Histidine residues in Clostridium perfringens epsilon toxin. *FEMS Microbiol Lett* **41**: 317-423, 1987c
- Seiler, et al.** Pathogenesis of polycation-induced alterations ("fusion") of glomerular epithelium. *Lab. Invest.* **36**: 48-61, 1977
- Shimamoto S, Tamai E, et al.** Changes in ganglioside content affect the binding of Clostridium perfringens epsilon-toxin to detergent-resistant membranes of Madin-Darby canine kidney cells. *Microbiology and Immunology* **49**: 245-253, 2005
- Shortt SJ, Titball RW, Lindsay CD.** An assessment of the in vitro toxicology of Clostridium perfringens type D epsilon-toxin in human and animal cells. *Human & Experimental Toxicology* **19**: 108-116, 2000
- Sojka MG, White VJ, Thorns CJ, et al.** The detection of Clostridium perfringens epsilon antitoxin in rabbit serum by monoclonal antibody based competition ELISA. *Journal of Biological Standardization* **17**: 117-124, 1989
- Soler-Jover, et al.** Effect of epsilon toxin-GFP on MDCK cells and renal tubules in vivo. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **52**: 931-942, 2004
- Soler-Jover, et al.** Distribution of Clostridium perfringens epsilon toxin in the brains of acutely intoxicated mice and its effect upon glial cells. *Toxicon* **50**: 530-540, 2007

Bibliografia

Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* **9**: 216-234, 1996

Souza, et al. Molecular cloning and expression of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D and tests of animal immunization. *Genet Mol Res* **9**(1): 266-76. 2010

Stubbings, DP. *Clostridium perfringens* enterotoxaemia in 2 young horses. *Vet Rec* p127:431. 1990

Takahashi JL, Giuliani F, Power C, et al. Interleukin-1beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Annals of Neurology* **53**: 588-595, 2003

Takamori S, et al. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**: 831-846, 2006

Tamai E, Ishida T, Miyata S, et al. Accumulation of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the mouse kidney and its possible biological significance. *Infection & Immunity* **71**: 5371-5375, 2003

Thanabalu T, Porter AG. A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa. *Gene* **170**: 85-89, 1996

Titball, R. W. *Clostridium perfringens* vaccines. *Vaccine* **27 Suppl 4**: D44-7. 2009

Tzakos, et al. Structure and Function of the Myelin Proteins: Current Status and Perspectives in Relation to Multiple Sclerosis. *Current Medical Chemistry* **12**: 1569-1587, 2005

Uzal FA, Plumb JJ, Blackall LL, O'Boyle D, Kelly WR. Detection by polymerase chain reaction of *Clostridium perfringens* producing epsilon toxin in faeces and in gastrointestinal contents of goats. *Letters in Applied Microbiology* **23**: 13-17, 1996

Uzal FA, Nielsen K, Kelly WR. Detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA. *Veterinary Microbiology* **57**: 223-231, 1997

Uzal FA, Kelly WR. Experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in goats. *Veterinary Pathology* **35**: 132-140, 1998a

Uzal FA, Kelly WR. Protection of goats against experimental enterotoxaemia by vaccination with *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. *Veterinary Record* **142**: 722-725, 1998b

- Uzal FA, Ghoddusi M, Kelly WR, et al.** Comparison of the effects of *Clostridium perfringens* type D culture supernates in ligated intestinal loops of goats and sheep. *Journal of comparative Pathology* **121**: 127-138, 1999a
- Uzal FA, Rolfe BE, Smith NJ, et al.** Resistance of ovine, caprine and bovine endothelial cells to *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in vitro. *Veterinary Research Communications* **23**: 275-284, 1999b
- Uzal FA, Kelly WR, Morris WE, Assis RA.** Effects of intravenous injection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in calves. *Journal of Comparative Pathology* **126**: 71-75, 2002
- Uzal FA.** Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Anaerobe* **10**: 135-143, 2003
- Varki et al.** Essentials of glycobiology. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. ISBN-10:0-87969-559-5. Capítols 3,7 i 8. Consortium of glycobiology editors, La Jolla, California, 1999
- Vitureira, et al.** Podocalyxin is a novel polysialylated neural adhesion protein with multiple roles in neural development and synapse formation. *PloS One* **5**: e12003, 2010
- Weddell W, Worthington RW.** An enzyme labelled immunosorbent assay for measuring *Clostridium perfringens* epsilon toxin in gut contents. *New Zealand Veterinary Journal* **33**: 36-37, 1985
- Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun TT.** Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *The Journal of Cell Biology* **95**: 580-588, 1982
- Worthington RW, Bertschinger HJ, Mulders MS.** Catecholamine and cyclic nucleotide response of sheep to the injection of *Clostridium welchii* type D epsilon toxin. *Journal of Medical Microbiology* **12**: 497-501, 1979
- Zacchetti D, Peränen J, Murata M, Fiedler K, Simons K.** VIP17/MAL, a proteolipid in apical transport vesicles. *FEBS letters* **377**: 465-469, 1995
- Zhao, et al.** Specific localization of the annexin II heterotetramer in brain lipid raft fractions and its changes in spatial learning. *Journal of Neurochemistry* **90**: 609-620, 2004

Bibliografia

Zhu C, Ghabriel MN, Blumbergs PC, et al. Clostridium perfringens prototoxin-induced alteration of endothelial barrier antigen (EBA) immunoreactivity at the blood-brain barrier (BBB). *Experimental Neurology* **169**: 72-82, 2001

PUBLICACIONES

Distribution of *Clostridium perfringens* epsilon toxin in the brains of acutely intoxicated mice and its effect upon glial cells.

Distribution of *Clostridium perfringens* epsilon toxin in the brains of acutely intoxicated mice and its effect upon glial cells

Alex Soler-Jover^a, Jonatan Dorca^a, Michel R. Popoff^b,
Maryse Gibert^b, Josep Saura^c, Josep Maria Tusell^c,
Joan Serratosa^c, Juan Blasi^a, Mireia Martín-Satué^{a,*}

^aLaboratori de Neurobiologia Cel·lular i Molecular, Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona-IDIBELL, Spain

^bCNR Anaérobies, Institut Pasteur, Paris, France

^cDepartament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona, Spain

Received 29 March 2007; received in revised form 24 April 2007; accepted 25 April 2007

Available online 22 May 2007

Abstract

Epsilon toxin (ϵ -toxin), produced by *Clostridium perfringens* types B and D, causes fatal enterotoxaemia in livestock. The disease is principally manifested as severe and often fatal neurological disturbance. Oedema of several organs, including the brain, is also a clinical sign related to microvascular damage.

Recombinant ϵ -toxin–green fluorescence protein (ϵ -toxin–GFP) and ϵ -prototoxin–GFP have already been characterised as useful tools to track their distribution in intravenously injected mice, by means of direct fluorescence microscopy detection. The results shown here, using an acutely intoxicated mouse model, strongly suggest that ϵ -toxin–GFP, but not ϵ -prototoxin–GFP, not only causes oedema but is also able to cross the blood–brain barrier and accumulate in brain tissue. In some brain areas, ϵ -toxin–GFP is found bound to glial cells, both astrocytes and microglia. Moreover, cytotoxicity assays, performed with mixed glial primary cultures, demonstrate the cytotoxic effect of ϵ -toxin upon both astrocytes and microglial cells.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Clostridium perfringens*; Epsilon toxin; Blood–brain barrier; Astrocyte; Microglia

1. Introduction

Epsilon toxin (ϵ -toxin) is one of the most potent clostridial toxins. It is produced by *Clostridium perfringens* types B and D and causes fatal enterotoxaemia in sheep, goats and, occasionally,

calves and other animals, resulting in heavy economic losses (Payne and Oyston, 1997). *C. perfringens* can be found in the intestine of most animals, and small amounts of ϵ -toxin in the gut of healthy animals are considered harmless. Clinical disease occurs when the microbial balance in the gut is disrupted, often as a consequence of changes in diet, and large amounts of this toxin are produced. ϵ -Toxin is synthesised and secreted as an inactive prototoxin of 311 amino acids (32.7 kDa) that is

*Corresponding author. Tel.: +34 93 4024279;
fax: +34 93 4035810.

E-mail address: martinsatue@ub.edu (M. Martín-Satué).

converted to the fully active toxin by proteolytic cleavage of N- and C-terminal peptides of 14 and 23 residues, respectively (Bhown and Haberb, 1977; Minami et al., 1997). This proteolytic activation is achieved in the intestinal lumen of infected animals by the actions of trypsin and chymotrypsin. It is accepted that ϵ -toxin compromises the intestinal barrier and enters the gut vasculature from which it is distributed systemically, causing widespread vascular endothelial damage and oedema.

Circulating ϵ -toxin accumulates preferentially in the kidneys and in the brain. Several studies support the existence of an ϵ -toxin receptor in the brain, where toxin binding and its effects are completely counteracted by prototoxin (Buxton, 1978a, b; Nagahama and Sakurai, 1991). In contrast, only a minute amount of ϵ -toxin is displaceable in the kidneys, where we reported a specific binding component to distal tubules (Soler-Jover et al., 2004). In fact, the most ϵ -toxin-sensitive cell line to date is the Madin–Darby canine kidney (MDCK) cell line of epithelial origin from the distal convoluted tubule (Payne et al., 1994). MDCK cells exposed to ϵ -toxin undergo both cell cycle alterations and morphological changes (Petit et al., 1997; Borrmann et al., 2001; Donelli et al., 2003). Cytotoxic effects are correlated with the formation of a membrane complex of ~155 kDa, which causes a decrease in epithelial membrane barrier permeability, without entry of the toxin into the cytosol (Petit et al., 2001, 2003). Those previous functional studies, together with the recent elucidation of the ϵ -toxin crystal structure, permitted its classification in the β -pore-forming-toxin family, showing marked structural similarities with the *Aeromonas hydrophila* aerolysin (Cole et al., 2004). Although toxicology studies have been performed with several cell cultures *in vitro*, at present, besides MDCK cells, only guinea-pig peritoneal macrophages and G-402 cells from human kidney origin have been identified, to our knowledge, as ϵ -toxin-sensitive cells (Buxton, 1978a, b; Shortt et al., 2000).

Different animal species have been used as models to elucidate several aspects of ϵ -toxin toxicity, mice being broadly used. Finnie (2004) nicely and exhaustively compiled neurological disorders produced by ϵ -toxin in both natural hosts and experimental animal models. As pointed out above, circulating ϵ -toxin specifically binds to renal epithelial distal tubule cells and to cerebral endothelia, where it may exert a direct effect by

permeabilising the blood–brain barrier (BBB). Perivascular cerebral oedema has been described in various species, including sheep (Buxton, 1978a, b; Uzal et al., 2004), calves (Uzal et al., 2002), rats (Finnie et al., 1999; Ghabriel et al., 2000) and mice (Morgan et al., 1975; Finnie, 1984; Finnie and Hajduk, 1992), and several reports have pointed to the alteration of BBB properties after injection of ϵ -toxin in animal models (Worthington and Mulders, 1975; Ghabriel et al., 2000; Finnie, 2004).

The work reported here shows ϵ -toxin–GFP brain distribution in an acutely intoxicated mice model. Direct fluorescence tracking of the toxin demonstrated the toxin's ability to bind to cerebral blood vessels inducing severe perivascular oedema, to cross the BBB and to accumulate in the brain parenchyma where binding to glial cells is also occasionally detected. For the first time, a cytotoxic effect of ϵ -toxin upon glial cells is also shown.

2. Materials and methods

2.1. cDNA constructs, protein expression and purification

Based on a previously described plasmid containing the cDNA for the ϵ -prototoxin (Soler-Jover et al., 2004), we generated an expression vector to produce a recombinant fusion protein consisting of glutathione *S*-transferase (GST)–EGFP– ϵ -prototoxin. The cloned *ϵ -prototoxin* cDNA encodes for the protein from the amino acid K46 to the end of the molecule. The resulting ϵ -prototoxin has the N-terminal peptide already eliminated, but it remains inactive. Once the recombinant protein is produced, and the GST is eliminated by thrombin cleavage, ϵ -toxin can be activated by trypsin, which eliminates the C-terminal residues (Fig. 1). Consequently, with the use of a sole expression vector we can obtain the two recombinant proteins: EGFP– ϵ -prototoxin and EGFP– ϵ -toxin (here named ϵ -prototoxin–GFP and ϵ -toxin–GFP, respectively).

Finally, the expression vectors encoding either ϵ -prototoxin or EGFP– ϵ -prototoxin were transformed into a RosettaTM(DE3)pLysS *Escherichia coli* strain for optimum protein expression.

The expression of ϵ -prototoxin and ϵ -prototoxin–GFP recombinant proteins was induced overnight (O/N) at room temperature (RT) in 250 ml LB medium cultures containing 0.4 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside. Cells were pelleted and resuspended in ice cold PBS containing 1% Triton

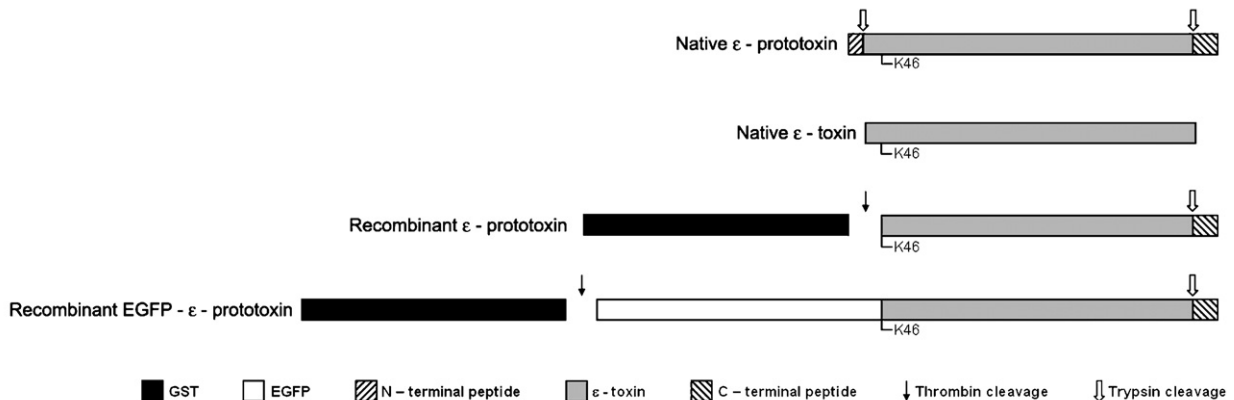


Fig. 1. Schematic drawing of native and recombinant ϵ -prototoxin and ϵ -toxin. ϵ -Prototoxin is converted to the fully active toxin by proteolytic cleavage of N- and C-terminal ends. Trypsin cleavage sites are indicated with white arrows. Recombinant ϵ -prototoxin proteins were generated as fusion proteins with the GST (from pGEX-4T-1 vector), with or without GFP, and lacking the N-terminal peptide (ϵ -prototoxin starting at the amino acid K46). Once expressed and purified, the recombinant proteins were incubated with thrombin to remove the GST (black arrows) and the resulting ϵ -prototoxin or GFP- ϵ -prototoxin was used for the experiments. Trypsin incubations were performed on these proteins to generate active ϵ -toxin or GFP- ϵ -toxin.

X-100, 0.1 mg/ml phenylmethyl-sulphonylfluoride, 10 μ g/ml aprotinin and 10 μ g/ml leupeptin, and were sonicated and then centrifuged at 15,000*g* for 20 min. The resulting supernatant was incubated with 0.5 ml of previously PBS-equilibrated glutathione Sepharose 4B beads (Amersham GE Healthcare Europe GmbH, Spain) for 1 h at 4 °C. Finally, recombinant proteins were eluted by thrombin cleavage in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, with 150 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂, according to the manufacturer's instructions.

ϵ -Toxin and ϵ -toxin-GFP were obtained by trypsin proteolysis of ϵ -prototoxin and ϵ -prototoxin-GFP, respectively, using trypsin beads (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), according to the manufacturer's instructions.

2.2. *In vivo* studies in a murine model

Male OF1 Swiss mice weighing 20 g were anaesthetised with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) administered intraperitoneally. ϵ -Toxin-GFP and ϵ -prototoxin-GFP were prepared in PBS with 1% BSA and injected intravenously into the tail vein. Injection doses were 2.5 μ g/g per mouse. All animals injected with ϵ -toxin-GFP died between 5 and 8 min after injection. Animals injected with either ϵ -prototoxin-GFP or GFP alone were killed after 7 min. In some experiments, mice were co-injected with ϵ -toxin-GFP or ϵ -prototoxin-GFP together with 200 μ g BSA-Alexa 647. In other cases, mice were injected with 1.65 μ g/g

ϵ -prototoxin simultaneously with 2.5 μ g/g ϵ -prototoxin-GFP or ϵ -toxin-GFP (10:1 molar ratio). Finally, some animals were co-injected with ϵ -toxin together with GFP.

Brains were extracted, fixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 12 h, immersed in 30% sucrose, frozen in isobutanol and cut into 10 μ m slices in a cryostat. Some slices were immediately mounted on slides using Immuno Fluore Mounting Medium (ICN Biomedicals; Costa Mesa, CA), and observed under a Leica TCS 4D confocal microscope (Serveis Científico-Tècnics, UB-IDIBELL). Alternatively, other slices were processed for immunofluorescence experiments. In these cases, non-specific binding was blocked by incubating the slices in PBS containing 10% normal goat serum (NGS) and 0.2% gelatin 1 h at RT. Either primary anti-GFAP polyclonal antibody-recognising astrocytes (1/500) or biotin-labelled tomato lectin reacting with microglia (1/50) was added and incubated O/N at 4 °C in the same buffer containing 1% NGS. Secondary goat anti-rabbit antibody labelled with Alexa 546 (1/500) or Streptavidin Alexa 546 (1/1000) was incubated for 1 h before the final washing and mounting of the slides.

All animal experiments were carried out in accordance with the Guidelines of the European Union Council (86/609/EU), following Spanish regulations (BOE 67/8509-12, 1988) for the use of laboratory animals, and were approved by the Ethics and Scientific Committees of the Hospital Clínic, Barcelona, and the University of Barcelona.

2.3. Glial cell cultures

Mixed glial cultures were prepared from 1- or 2-day-old neonatal C57BL/6 mice (Charles River, Lyon, France). The cerebral cortices were dissected, carefully stripped of their meninges and digested with 0.25% trypsin for 25 min at 37 °C. Trypsinisation was stopped by adding an equal volume of culture medium [Dulbecco's modified Eagle medium-F-12 nutrient mixture, 10% foetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.5 µg/ml amphotericin B (Fungizone[®])] to which 0.02% deoxyribonuclease I was added. The solution was pelleted (5 min, 200g), resuspended in culture medium and brought to a single-cell suspension by repeated pipetting followed by passage through a 105 µm pore mesh. Cells were seeded at a density of 250,000 cells/ml (= 62,500 cells/cm²) and cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The medium was replaced every 5–7 days. Cultures reached confluency after 7–10 days *in vitro* and were used between the 12th and 15th days *in vitro*. At this point, they typically consisted of 75% type-I astrocytes and 25% microglia.

In all the cases, the medium was changed to 0.5% FBS 24 h prior to treatments.

2.4. Cell viability studies

Relative cell viability and cytotoxic measurements were assessed by MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] reduction. One hour before the end of the treatments, MTT was added and, after one more hour of incubation, cells were lysed and read at 550 nm.

Glial cell viability in cultures was also routinely estimated using propidium iodide (PI) fluorescent staining. At each point after toxin treatment, cells were washed with standard Locke's solution before and after incubation with 4.6 µg/ml PI for 5 min, and then examined under a fluorescence microscope (Olympus IX70). PI-positive dead cells showed red nuclei. Images of 2–4 microscopic fields in each well were obtained with a digital camera (ColorView 12) using a 20 × objective. Three wells per experimental condition were processed and each experimental condition was repeated at least four times.

In some cases, cells were then fixed with 4% paraformaldehyde and processed as described next.

2.5. Lectin staining and immunofluorescence in cell cultures

To identify cells killed by the ϵ -toxin in mixed glial cultures, immunofluorescence was performed using specific markers for each glial cell type. Rabbit anti-GFAP polyclonal antibody and biotin-labelled tomato lectin were used to identify astroglial and microglial cells, respectively. Cells grown on culture plates were fixed and permeated, and non-specific staining was blocked by incubating the cells with 5% NGS in PBS with 1% BSA for 20 min at RT. Cells were incubated O/N at 4 °C with either rabbit anti-GFAP polyclonal antibody (1/100) or tomato lectin (1/400). After rinsing with PBS, cells were incubated for 1 h at RT with fluorescent secondary antibodies: goat anti-rabbit Alexa 488 (1/1000) for the rabbit anti-GFAP polyclonal antibody, and FITC-streptavidin (1/400) for tomato lectin. Microscopy images were obtained with an Olympus IX70 microscope (Japan) and a digital camera (CC-12, Soft Imaging System GmbH, Germany).

3. Results

3.1. ϵ -Toxin–GFP permeabilises brain capillary endothelia and crosses the blood–brain barrier after intravenous injection in mice

Mice injected with ϵ -toxin–GFP died between 5 and 8 min after injection. Mice injected either with ϵ -prototoxin–GFP or GFP alone were killed 7 min after injection.

Direct fluorescence microscopy observation of cryostat slices from brains revealed accumulation of both ϵ -prototoxin–GFP (Fig. 2A) and ϵ -toxin–GFP (Fig. 2B) on the luminal surface of the vascular endothelium of many blood vessels in all brain areas. In the case of ϵ -toxin–GFP, fluorescence was also detected in the brain parenchyma surrounding some blood vessels (Fig. 2B), suggesting that ϵ -toxin, but not ϵ -prototoxin, is able to cross the BBB.

Fluorescence labelling in brain endothelia diminished drastically when an excess amount of ϵ -prototoxin was injected simultaneously with ϵ -prototoxin–GFP (Fig. 2C) or with ϵ -toxin–GFP (data not shown). This indicates the specificity of the toxin binding to brain endothelia.

No fluorescence was detected in the brains of animals injected with GFP alone or in combination

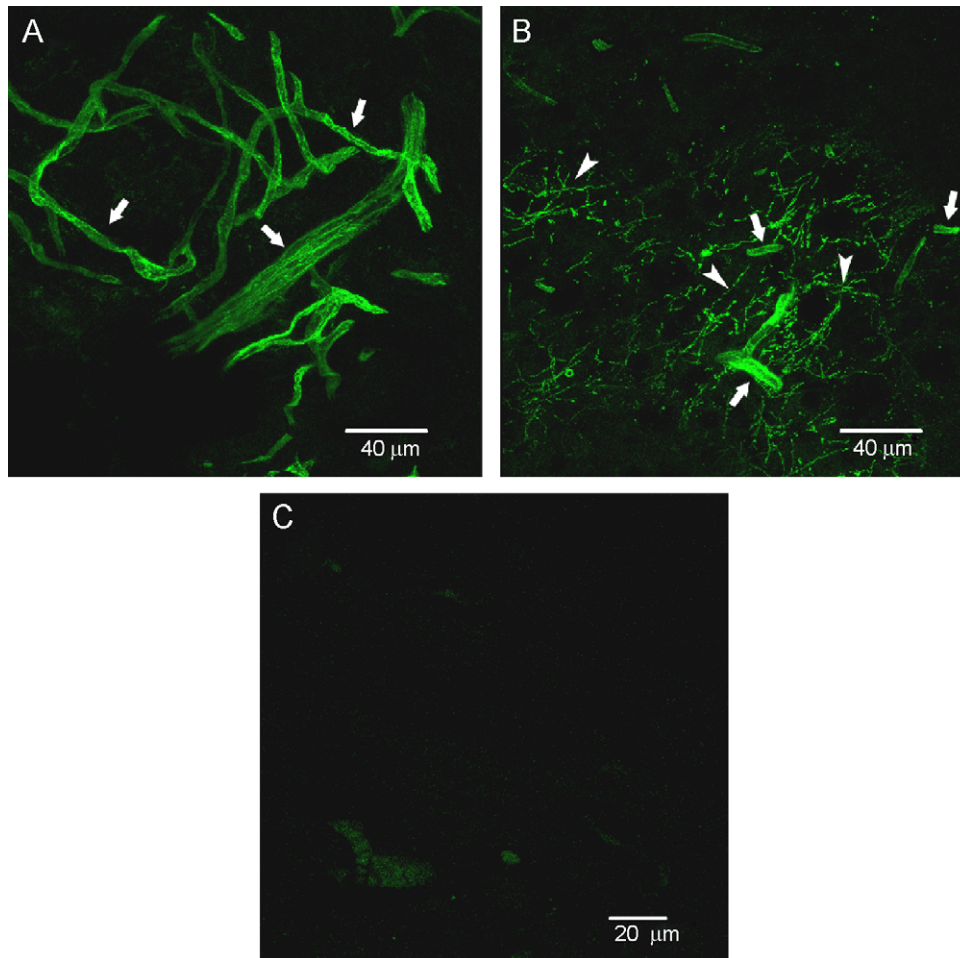


Fig. 2. Localisation of ϵ -prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP in brain after i.v. injection in mice. Mice were i.v. injected with ϵ -prototoxin-GFP or ϵ -toxin-GFP and their brains were processed for cryostat sectioning and examined under a fluorescence confocal microscope. ϵ -Prototoxin-GFP was detected on the luminal surface of the vascular endothelium (arrows) in all brain areas examined (A), while ϵ -toxin-GFP was detected on vascular endothelia (B, arrows) and also outside the vessels, scattered throughout the brain tissue (B, arrowheads). Co-injection of ϵ -prototoxin-GFP with an excess of ϵ -prototoxin drastically diminished brain fluorescence (C). Scale bars correspond to 40 μ m in (A) and (B) and to 20 μ m in (C).

with ϵ -toxin or ϵ -prototoxin (supplementary data Fig. S1).

To check the integrity of the BBB in the presence of ϵ -toxin and ϵ -prototoxin, we performed experiments in which BSA labelled with Alexa-647 was co-injected with the same doses of toxin or prototoxin indicated above. In ϵ -prototoxin-GFP-injected animals, green fluorescence was associated with endothelia, as seen above, and all the red fluorescence, corresponding to BSA, was detected inside the blood vessels (Fig. 3A, C, E). In the case of ϵ -toxin-GFP-injected animals, we detected both green and red fluorescence in the brain parenchyma surrounding blood vessels (Fig. 3B, D, F). However,

while BSA accumulated perivascularly, confined to the vessels' vicinity and surrounded by the astrocyte's perivascular end-feet, ϵ -toxin-GFP entered deep into the brain parenchyma (Fig. 3B, D, F and supplementary data Fig. 2S).

These results indicate that ϵ -toxin-GFP permeabilises the BBB but is also able to cross it and accumulate in the brain parenchyma.

To better define the pattern of ϵ -toxin accumulation outside the blood vessels, we performed immunofluorescence using antibodies against GFP in order to increase the fluorescence intensity and evidence the presence of GFP even at low amounts. With these experiments, we found fluorescence

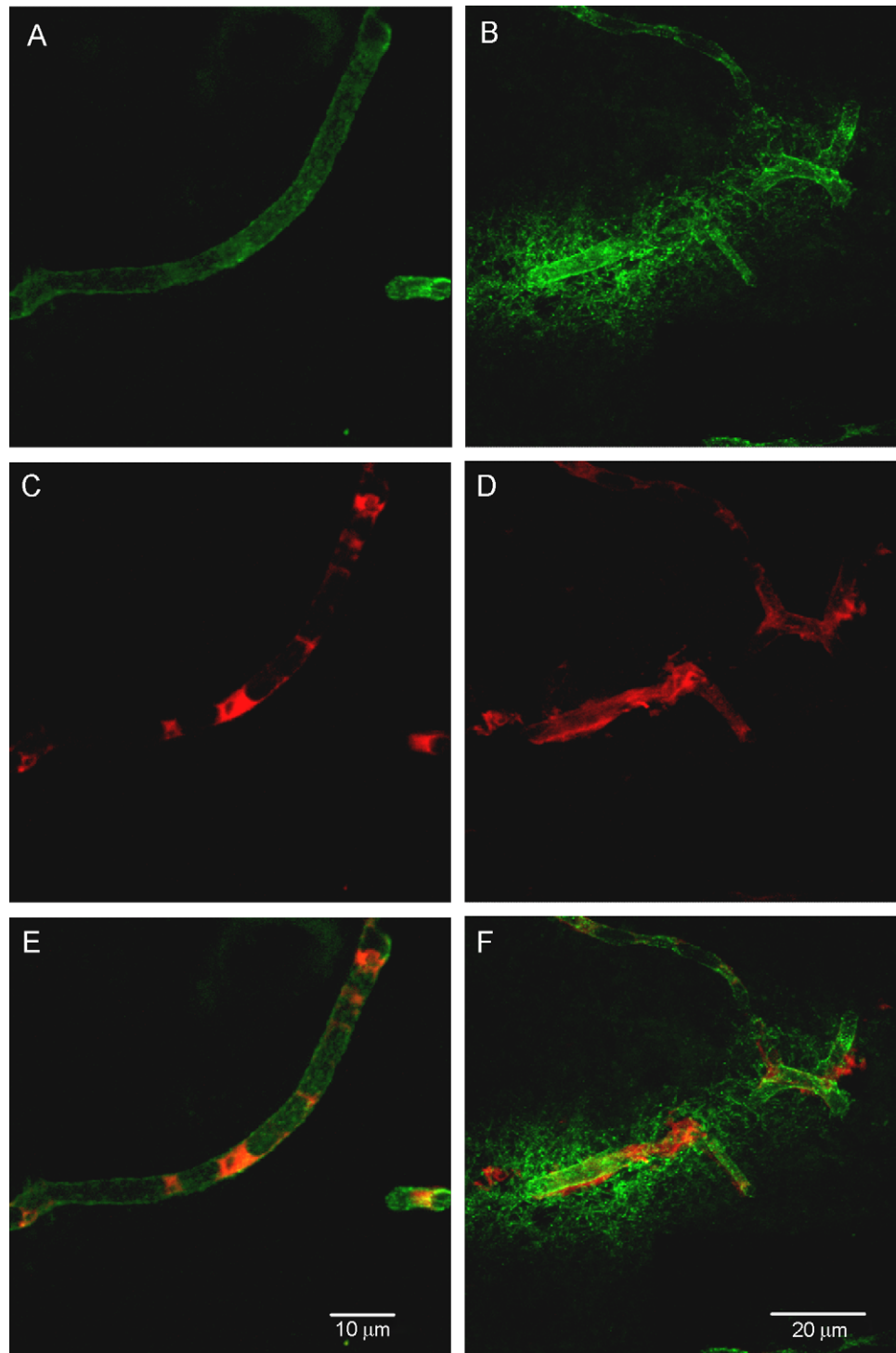


Fig. 3. Localisation of Alexa 546-labelled BSA in blood vessels after ϵ -prototoxin-GFP or ϵ -toxin-GFP i.v. injection in mice. Mice were i.v. injected with ϵ -prototoxin-GFP (left column) or ϵ -toxin-GFP (right column) in combination with Alexa 546-labelled BSA, and brains were processed for cryostat sectioning and examined under a fluorescence confocal microscope. Green fluorescence corresponds to ϵ -prototoxin-GFP (A, E) or ϵ -toxin-GFP (B, F) and red fluorescence corresponds to BSA (C–F). Notice that while in ϵ -prototoxin-GFP-injected mice BSA remained confined to the blood vessel's lumen (C, E), in the case of ϵ -toxin-GFP-injected animals it leaked out of the vessels (D, F), although at a close distance from the blood vessels. Scale bars correspond to 10 μ m in the left-hand images and to 20 μ m in the right-hand ones.

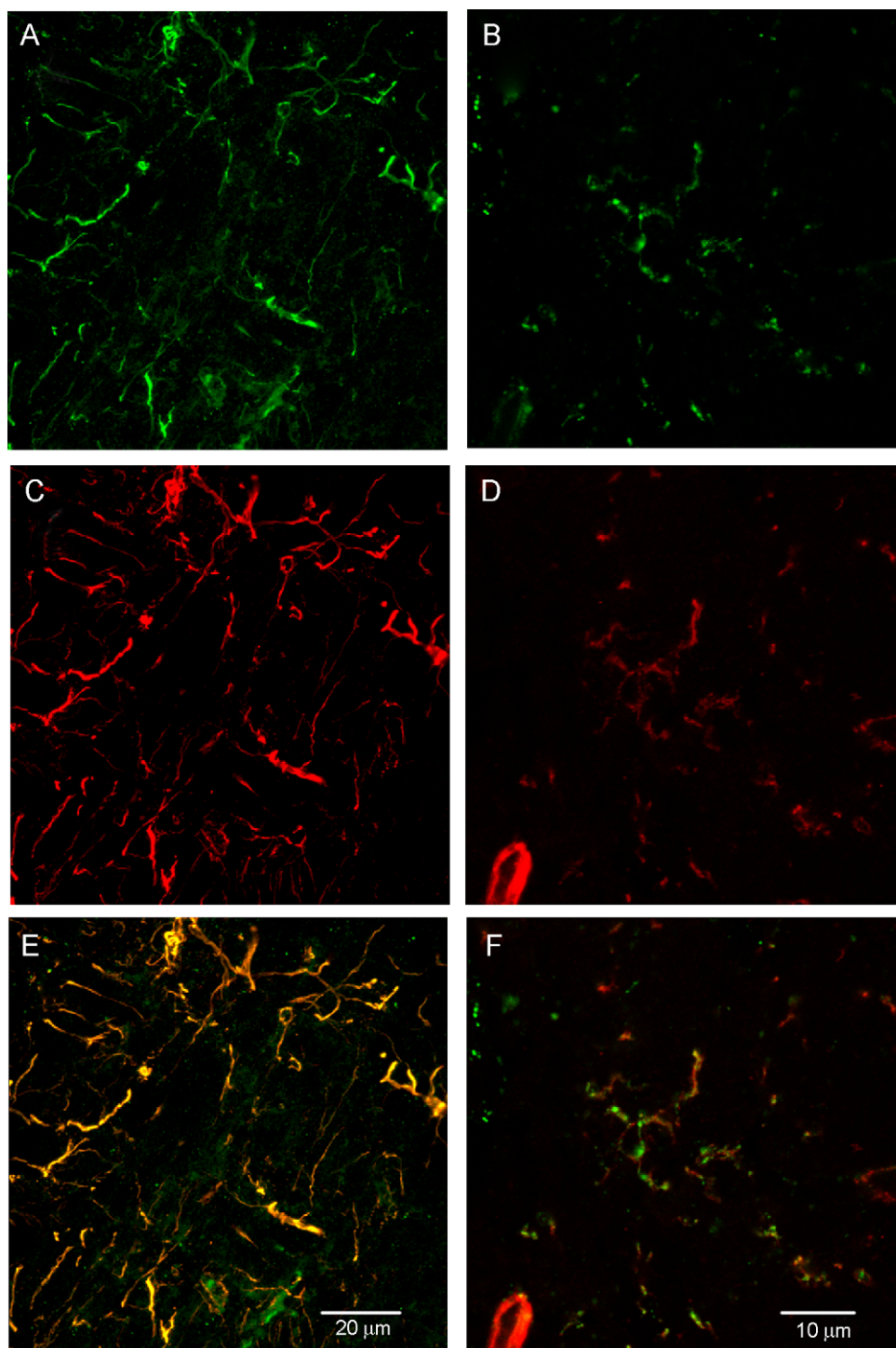


Fig. 4. Localisation of ϵ -toxin-GFP on glial brain cells after i.v. injection in mice. Double immunofluorescence was performed on mice brain sections after ϵ -toxin-GFP i.v. injection using anti-GFP antibody (A, B) in combination with anti-GFAP for astroglia (C) or biotin-conjugated tomato lectin for microglia (D). Overlay images demonstrate co-localisation in both cases (E, F). Scale bars correspond to 20 μ m in the left-hand images and to 10 μ m in the right-hand ones.

associated with glial-shaped morphology. To determine whether these glial-shaped structures actually corresponded to any glial cells, we performed double labelling experiments using anti-GFAP antibodies for astrocytes, and, for microglial cells, tomato lectin together with the anti-GFP antibody (Fig. 4).

Among all the astrocytes marked in red with anti-GFAP antibodies, some of them also showed GFP accumulation (Fig. 4A, C, E). Similarly, some cells labelled with tomato lectin also showed anti-GFP fluorescence (Fig. 4B, D, F).

These results indicated that both astroglia and microglia are able to bind ϵ -toxin–GFP *in vivo*.

3.2. ϵ -Toxin causes cell death in primary glial cell cultures

To investigate the effect of ϵ -toxin on astroglial and microglial cells, we used mixed glial primary cell cultures. MTT cell death assays were performed by exposing the cells to either 250 nM ϵ -prototoxin or increasing concentrations of ϵ -toxin (5, 50 and 250 nM), for different periods of time (1, 2, 4, 8, 12 or 24 h).

No significant cytotoxicity was detected either for ϵ -prototoxin or for 5 nM ϵ -toxin, but a marked cytotoxic effect appeared for both 50 and 250 nM ϵ -toxin. For the highest dose, this effect appeared in the first hour of incubation, reached a maximum of about 13% at 8 h and remained unmodified after 12 or 24 h of incubation (Fig. 5).

The experiment was done three times and triplicates of each condition were done for each experiment.

3.3. ϵ -Toxin kills both astrocytes and microglial cells

In order to identify the cell type that was being killed by ϵ -toxin in these mixed glial cultures, we performed immunofluorescence experiments combined with PI dead cell nuclei labelling. After exposing the cells to either ϵ -prototoxin (50 nM) or ϵ -toxin (50 or 250 nM) for 4 h, dead cells were selectively labelled with PI. After fixing the cells, we performed immunofluorescence studies using anti-GFAP antibodies for astrocyte staining and tomato lectin for microglial cells. As shown in Fig. 6, PI was accumulated on both cell types, at the two ϵ -toxin concentrations assayed, indicating that ϵ -toxin is cytotoxic for both cell types in mixed glial cultures, although a subtle preference was detected for

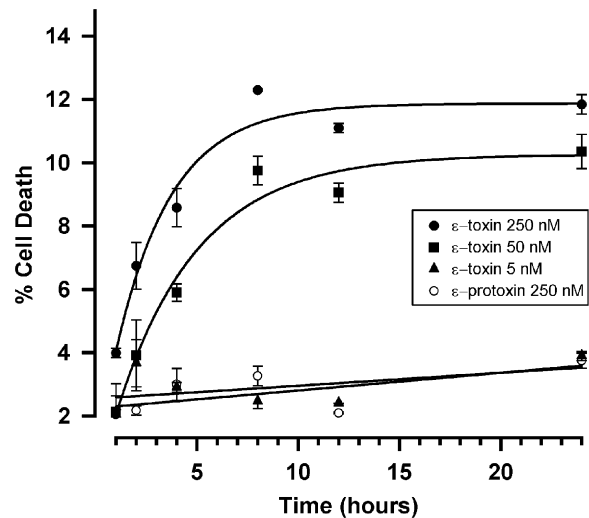


Fig. 5. Cytotoxic effect of ϵ -toxin on glial cells. MTT cell death assays were performed on mixed glial primary cell cultures by exposing the cells to 250 nM ϵ -prototoxin (open circles), ϵ -toxin at 5 nM (black triangles), 50 nM (black squares) or 250 nM (black circles) for different periods of time (1, 2, 4, 8, 12 and 24 h). Results are expressed as the mean and standard error of percentages of cell death in each experimental condition. This graph corresponds to one out of three representative experiments.

microglial cells. Moreover, no significant PI accumulation was detected when cells were incubated with ϵ -prototoxin.

4. Discussion

Pathogenesis of brain damage by *C. perfringens* ϵ -toxin depends on the amount of circulating toxin. In sheep, large doses of toxin produce severe and generalised vasogenic oedema and an acute or peracute clinical course to death. In contrast, with lower doses or in partially immune animals, focal necrosis, often bilaterally symmetrical, occurs (Uzal et al., 2002; Finnie, 2003). Perivascular cerebral oedema and BBB alterations have also been described in other species.

We have devised a fluorescent recombinant tool that allowed us not only to investigate ϵ -toxin effects, but also to determine ϵ -toxin distribution in an acutely intoxicated mice model. It was already known that intravenously injected ϵ -toxin preferentially accumulated in kidneys (Nagahama and Sakurai, 1991), where we identified a specific, displaceable binding component to distal tubules, which caused severe kidney alterations (Soler-Jover et al., 2004). Specific binding to vascular endothelia,

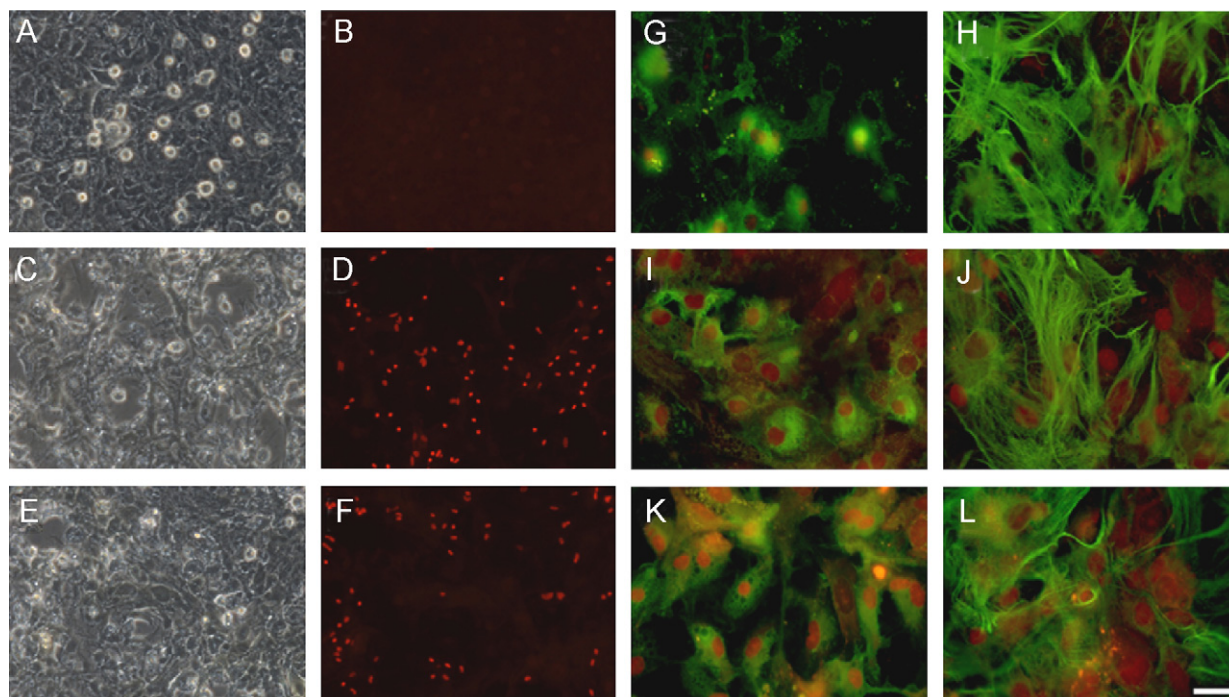


Fig. 6. Identification of the cell type killed by ϵ -toxin in mixed glial primary cell cultures. Mixed glial cell cultures were exposed to 50 nM ϵ -prototoxin (A, B, G, H), 50 nM ϵ -toxin (C, D, I, J) or 250 nM ϵ -toxin (E, F, K, L) for 4 h. Propidium iodide (PI) was then added for 5 min to stain dead cell nuclei (B, D, F, G–L). To identify the cell type that was being killed by ϵ -toxin, tomato-lectin staining of microglial cells (G, I, K) and immunofluorescence against GFAP for astrocytes (H, J, L) were performed. Cells from both cell types showed PI nuclei accumulation in the presence of ϵ -toxin. The scale bar corresponds to 20 μ m in (G–L) images.

mainly in the brain, was also reported by means of direct fluorescence detection (Soler-Jover et al., 2004). In the present work, we have focused on ϵ -toxin distribution in the brain of mice acutely intoxicated with the toxin. High doses of ϵ -toxin–GFP or ϵ -prototoxin–GFP were used to track these compounds in mice brains after intravenous injection. Animals died 5–8 min after injections of ϵ -toxin–GFP, showing the lethal efficiency of this toxin construct in mice. However, the animals did not show the convulsive episodes expected from the proposed excitotoxic activity of the toxin (Miyamoto et al., 1998, 2000). This might be due to the previous administration of ketamine to the animals, an antagonist of NMDA glutamate receptors, in keeping with the anaesthetic protocol (Miyamoto et al., 1998). As a result, the neuronal death reported in rats injected with sublethal doses of ϵ -toxin (Miyamoto et al., 1998; Finnie et al., 1999) was not evident in the brains of mice injected with high doses of ϵ -toxin–GFP compared with the control animals injected with ϵ -prototoxin–GFP (data not shown). However, we cannot rule out

differentiated behaviour among species. Nevertheless, intravenous injection of either ϵ -toxin–GFP or ϵ -prototoxin–GFP, along with fluorescence-labelled BSA, confirmed proteinaceous oedema induced by ϵ -toxin. ϵ -Prototoxin–GFP-injected mice showed green fluorescence—that is, ϵ -prototoxin–GFP binding—on the luminal surface of vascular endothelial cells, with BSA confined to the blood vessel lumen. On the contrary, in ϵ -toxin–GFP-injected animals, BSA crossed the endothelial layer and accumulated perivascularly, a well-defined histopathological event of oedema. ϵ -Toxin–GFP was also able to pass through the endothelium and, interestingly, was distributed far beyond the boundaries within which BSA was confined. Astrocytic perivascular end-feet clearly limited the BSA extravasation but they did not limit ϵ -toxin–GFP distribution in the brain parenchyma. Oedema was diffuse, although ϵ -toxin–GFP spreading into the brain tissue occurred preferentially in the midbrain, the cerebellum and cerebellar peduncles, areas in which histopathological changes were described following ϵ -toxin intoxication (Finnie, 1984; Uzal

et al., 2002, 2004). Co-injection of ϵ -toxin–GFP with a 10 molar excess amount of ϵ -prototoxin prevented ϵ -toxin–GFP binding and distribution, confirming that both proteins compete for the same binding sites at the vascular endothelia. Moreover, no green fluorescence was detected when GFP was injected alone or in combination with non-labelled ϵ -toxin, demonstrating that GFP *per se* does not have any binding capability in the brain. This diffuse, vasogenic cerebral oedema causes fatal effects in the brain and it has been pointed out as the primary effect of ϵ -toxin in the brain of animals intoxicated with large doses of ϵ -toxin (Finnie et al., 1999). However, the entrance and distribution of ϵ -toxin in brain tissue reported here might contribute to our understanding of some of the classic neurological signs associated with ϵ -toxin poisoning, such as convulsions, that could be induced by direct interaction of ϵ -toxin with brain cells.

In order to increase fluorescence microscopy sensitivity, we incubated some slices with an anti-GFP antibody to allow us to visualise otherwise undetectable amounts of ϵ -toxin–GFP. The immunofluorescence approach revealed a pattern of fluorescence resembling a glial shape. When performing double labelling with different anti-glial cell markers, some astrocytes and microglial cells in which both labels co-existed were detected, indicating that at least part of the ϵ -toxin–GFP was bound to those cell types. We propose that astrocytes and microglial cells are target cells for ϵ -toxin, although we cannot rule out ϵ -toxin–GFP binding to structures other than these, since not all of the green fluorescence label we detected was double labelled with the anti-glial antibodies we assayed. An earlier report using electron microscopy to analyse changes in the brains of mice given ϵ -toxin has already pointed to astrocytes as ϵ -toxin target cells, describing perivascular end-feet swelling (Finnie, 1984). *In vivo* binding results shown here add valuable information to these previous ultrastructural findings.

To study ϵ -toxin effects on glial cells further, we took advantage of mixed primary glial cell cultures that have been demonstrated to be a good model in which to reproduce *in vivo*-occurring events (Saura et al., 2003). Biochemical and morphological studies performed on these cultures revealed that glial cells, both astrocytes and microglial cells, are sensitive to ϵ -toxin, a relevant finding since there are only a few cell types so far known to be sensitive to ϵ -toxin. Interestingly, peritoneal macrophages from guinea pigs were also found to be sensitive to the toxin (Buxton, 1978a, b), a fact that, together with the microglial toxicity shown here, would

point to a possible connection between ϵ -toxin poisoning and the immune system. In spite of the relatively low cytotoxic activity of ϵ -toxin on astroglial and microglial cells, its possible relevance in the intoxication pathway cannot be ignored, especially at sublethal doses and at longer time exposures. Experiments with lower ϵ -toxin–GFP doses are in progress to ascertain the role of glial cells in the central nervous system intoxication pathway in animals sub-acutely intoxicated with ϵ -toxin.

In summary, this work provides direct evidence of ϵ -toxin and ϵ -prototoxin-specific binding to brain vascular endothelial cells after intravenous injection in mice. Moreover, ϵ -toxin crossed the BBB, reaching the brain parenchyma and binding, at least, to astrocytes and microglial cells, which were found to be sensitive to ϵ -toxin.

Ethical statement

All animal experiments were carried out in accordance with the Guidelines of the European Union Council (86/609/EU), following Spanish regulations (BOE 67/8509-12, 1988) for the use of laboratory animals, and were approved by the Ethics and Scientific Committees of the Hospital Clínic, Barcelona, and the University of Barcelona.

Acknowledgements

We are grateful to Serveis Científicotècnics of the University of Barcelona (Bellvitge Campus) for their confocal microscopy assistance. We would also like to thank Inmaculada Gómez de Aranda and Benjamín Torrejón for their excellent technical assistance and Michael Maudsley of Serveis Lingüístics (University of Barcelona) and Gloria Gannaway for their careful reading of the manuscript and linguistic help. J.D. is a recipient of a predoctoral fellowship from IDIBELL.

This work has been supported by Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (BFU2005-02202) and by grants PI050658 and PI040778 from de Instituto Carlos III of the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain.

Appendix A. Supplementary materials

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.toxicon.2007.04.025](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.04.025).

References

- Bhown, A.S., Habeeb, A.F., 1977. Structural studies on epsilon prototoxin of *Clostridium perfringens* type D. Localisation of the site of tryptic scission necessary for activation to epsilon toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 889–896.
- Borrmann, E., Günther, H., Köhler, H., 2001. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on MDCK cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 31, 85–92.
- Buxton, D., 1978a. Pulpy kidney disease and its diagnosis by histological examination. *Vet. Rec.* 102, 241.
- Buxton, D., 1978b. In-vitro effects of *Clostridium welchii* type-D epsilon toxin on guinea-pig, mouse, rabbit and sheep cells. *J. Med. Microbiol.* 11, 299–302.
- 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. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (8), 797–798.
- Donelli, G., Fiiorentini, C., Matarrese, P., Falzano, L., Cardines, R., Mastrantonio, P., Payne, D.E., Titball, R.W., 2003. Evidence for cytoskeletal changes secondary to plasma membrane functional alterations in the in vitro cell response to *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 145–156.
- Finnie, J.W., 1984. Ultrastructural changes in the brain of mice given *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *J. Comp. Pathol.* 94, 445–452.
- Finnie, J.W., 2003. Pathogenesis of brain damage produced in sheep by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin: a review. *Aust. Vet. J.* 81 (4), 219–221.
- Finnie, J.W., 2004. Neurological disorders produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Anaerobe* 10, 145–150.
- Finnie, J.W., Hajduk, P., 1992. An immunohistochemical study of plasma albumin extravasation in the brain of mice after the administration of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Aust. Vet. J.* 69, 261–262.
- Finnie, J.W., Blumbergs, P.C., Manavis, J., 1999. Neuronal damage produced in rat brains by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *J. Comp. Pathol.* 120, 415–420.
- Ghabriel, M.N., Zhu, C., Reilly, P.L., Blumbergs, P.C., Manavis, J., Finnie, J.W., 2000. Toxin-induced vasogenic cerebral oedema in a rat model. *Acta Neurochir.* 76, 231–236.
- 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. *Microbiol. Immunol.* 41 (7), 527–535.
- Miyamoto, O., Minami, J., Toyoshima, T., Nakamura, T., Masada, T., Nagao, S., Negi, T., Itano, T., Okabe, A., 1998. Neurotoxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin for the rat hippocampus via glutamatergic system. *Infect. Immun.* 66 (6), 2501–2508.
- Miyamoto, O., Sumitani, K., Nakamura, T., Yamagami, S., Miyata, S., Itano, T., Negi, T., Okabe, A., 2000. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 109–113.
- Morgan, K.T., Kelly, B.G., Buxton, D., 1975. Vascular leakage produced in the brains of mice by *Clostridium welchii* type D toxin. *J. Comp. Pathol.* 85, 461–466.
- Nagahama, M., Sakurai, J., 1991. Distribution of labeled *Clostridium perfringens* epsilon toxin in mice. *Toxicon* 29 (2), 211–217.
- Payne, D., Oyston, P., 1997. The *Clostridium perfringens* ϵ -toxin. In: Rood, J.I. (Ed.), *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*. Academic Press, San Diego, pp. 439–447.
- Payne, D.W., Williamson, E.D., Havard, H., Modi, N., Brown, J., 1994. Evaluation of a new cytotoxicity assay for *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 116, 161–167.
- 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. *J. Bacteriol.* 179, 6480–6487.
- 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. *J. Biol. Chem.* 276 (19), 15736–15740.
- Petit, L., Maier, E., Gibert, M., Popoff, M.R., Benz, R., 2003. *Clostridium perfringens* epsilon toxin rapidly decreases membrane barrier permeability of polarised MDCK cells. *Cell Microbiol.* 5, 155–164.
- Saura, J., Tusell, J.M., Serratos, J., 2003. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinisation. *Glia* 44, 183–189.
- Shortt, S.J., Titball, R.W., Lindsay, C.D., 2000. An assessment of the in vitro toxicology of *Clostridium perfringens* type D ϵ -toxin in human and animal cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 19, 108–116.
- Soler-Jover, A., Blasi, J., Gómez de Aranda, I., Navarro, P., Gibert, M., Popoff, M.R., Martín-Satué, M., 2004. Effect of epsilon toxin-GFP on MDCK cells and renal tubules in vivo. *J. Histochem. Cytochem.* 52 (7), 931–942.
- Uzal, F.A., Kelly, W.R., Morris, W.E., Assis, R.A., 2002. Effects of intravenous injection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in calves. *J. Comp. Pathol.* 126, 71–75.
- Uzal, F.A., Kelly, W.R., Morris, W.E., Bermudez, J., Baisón, M., 2004. The pathology of peracute experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16, 403–411.
- Worthington, R.W., Mulders, M.S., 1975. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on the blood brain barrier of mice. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 42, 25–27.

Binding of epsilon-toxin from *Clostridium perfringens* in the nervous system.



Binding of ϵ -toxin from *Clostridium perfringens* in the nervous system

Jonatan Dorca-Arévalo^a, Alex Soler-Jover^{a,1}, Maryse Gibert^b,
Michel R. Popoff^b, Mireia Martín-Satué^a, Juan Blasi^{a,*}

^aLaboratori de Neurobiologia Cel·lular i Molecular, Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona-IDIBELL, c/Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain

^bCNR Anaérobies, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex, France

Received 9 January 2008; received in revised form 18 February 2008; accepted 20 February 2008

Abstract

Epsilon-toxin (ϵ -toxin), produced by *Clostridium perfringens* type D, is the main agent responsible for enterotoxaemia in livestock. Neurological disorders are a characteristic of the onset of toxin poisoning. ϵ -Toxin accumulates specifically in the central nervous system, where it produces a glutamatergic-mediated excitotoxic effect. However, no detailed study of putative binding structures in the nervous tissue has been carried out to date. Here we attempt to identify specific acceptor moieties and cell targets for ϵ -toxin, not only in the mouse nervous system but also in the brains of sheep and cattle. An ϵ -toxin-GFP fusion protein was produced and used to incubate brain sections, which were then analyzed by confocal microscopy. The results clearly show specific binding of ϵ -toxin to myelin structures. ϵ -Prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP, the inactive and active forms of the toxin, respectively, showed identical results. By means of pronase E treatment, we found that the binding was mainly associated to a protein component of the myelin. Myelinated peripheral nerve fibres were also stained by ϵ -toxin. Moreover, the binding to myelin was not only restricted to rodents, but was also found in humans, sheep and cattle. Curiously, in the brains of both sheep and cattle, the toxin strongly stained the vascular endothelium, a result that may explain the differences in potency and effect between species. Although the binding of ϵ -toxin to myelin does not directly explain its neurotoxic effect, this feature opens up a new line of enquiry into its mechanism of toxicity and establishes the usefulness of this toxin for the study of the mammalian nervous system.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: ϵ -Toxin; *Clostridium perfringens*; Myelin; Glutamate release

1. Introduction

Epsilon-toxin (ϵ -toxin), a protein synthesized by the B and D strains of the anaerobic bacteria *Clostridium perfringens*, causes fatal enterotoxaemia in livestock, characterized by acute neurological signs

* Corresponding author. Tel.: +34 934024279; fax: +34 934035810.

E-mail address: blasi@ub.edu (J. Blasi).

¹ Present address: Department of Medicine, University of California, San Diego, 9500 Gilman Drive 0838, La Jolla, CA 92093-0838, United States.

and sudden death (Finnie, 2004). The toxin is produced as a non-toxic precursor molecule that is activated upon proteolytic cleavage of amino and carboxy terminal peptides (Minami et al., 1997). Although non-active, the prototoxin molecule presumably binds to the same surface cell receptors as the full active molecule and can prevent its binding and further toxicity. The active toxin produces diffuse vasogenic oedema in organs such as the lungs, kidneys and brain and causes neurological disorders such as opisthotonus, convulsions and agonal struggling, leading rapidly to death (Finnie, 2004; Smedley et al., 2004).

Mice have been widely used to study the effect of ϵ -toxin and provide a useful model for laboratory controlled intoxication studies (Finnie, 1984a,b; Fernandez-Miyakawa et al., 2007a,b, 2008). After i.v. or i.p. injections into mice the toxin accumulates in several organs, above all in the kidneys and in the nervous system: the binding to the nervous system is specific and saturable (Nagahama and Sakurai, 1991). In mice, as in sheep and other naturally sensitive species, the toxin has the capacity to cross the blood brain barrier (BBB) and enter the brain parenchyma (Soler-Jover et al., 2007). However, there is little information about the final location of the toxin in the brain once it crosses the BBB. Previous results have shown the binding of ϵ -toxin to a synaptosomal fraction (Nagahama and Sakurai, 1992) and glial cells (Soler-Jover et al., 2007), suggesting possible targets. Based on the variety of symptoms and on the distribution of the toxin, we decided to examine the toxin's potential targets by studying its binding to the nervous system in mice. We then extended the study to include sheep, one of ϵ -toxin's principal natural targets.

2. Materials and methods

2.1. Expression of the recombinant protein ϵ -prototoxin-GFP

ϵ -Prototoxin and ϵ -prototoxin-GFP were produced and purified as previously described (Soler-Jover et al., 2007). Briefly, the expression of either ϵ -prototoxin or ϵ -prototoxin-GFP was induced overnight with 0.4 mM isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at room

temperature (RT), in 250 ml LB medium cultures. Cells were pelleted and resuspended in ice cold phosphate buffer (PB) 20 mM pH 7.5 with NaCl 250 mM, sonicated and centrifuged at $15,000 \times g$ for 20 min. The resultant supernatant was incubated with 0.7 ml of Glutathione SepharoseTM 4B beads (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) for 1 h at 4 °C. Finally, the recombinant proteins were eluted by thrombin cleavage in 20 mM PB pH 7.5 containing 250 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂.

When required, ϵ -prototoxin and ϵ -prototoxin-GFP were fully activated to ϵ -toxin and ϵ -toxin-GFP, respectively, by incubation with trypsin-coated agarose beads for 30 min at RT (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain), following the manufacturer's instructions.

2.2. Mouse and rat synaptosomes

Animals were housed under conventional conditions in climatized rooms with free access to standard pelleted food and tap water. All animal experiments were carried out in accordance with EU guidelines (86/609/EU), and Spanish regulations (BOE 67/8509-12, 1988) for the use of laboratory animals, and approved by the Ethics and Scientific Committee at the University of Barcelona. Sheep and bovine brain samples were obtained from the Mercabarna slaughterhouse in Barcelona. Human peripheral nerve fibres from *cauda equina* were obtained from spinal cord samples from the Brain Bank of the Institute of Neuropathology, following the guidelines of the local Ethics Committee.

For each experiment, 3 brains from male OF1 Swiss mice weighing 20 g, or one brain from a Sprague–Dawley rat, were extracted and homogenized in sucrose 320 mM with 10 up-and-down strokes at 600 rpm in a motor driven glass homogenizer with a teflon piston (B. Braun Biotech International). The brain homogenates were centrifuged at $3000 \times g$ in a Beckman J2-HS centrifuge for 2 min at 4 °C and the supernatants were centrifuged again at $14,500 \times g$ for 12 min at 4 °C. The pellet (P2) was resuspended in 4 ml of sucrose 320 mM, loaded on a discontinuous Ficoll gradient (4 ml of Ficoll at 12%, 1 ml at 9% and 4 ml at 5%) and centrifuged at 22,500 rpm in a SW41TI Beckman rotor for 35 min at 4 °C. The synaptosomal enriched fractions were

collected at the two interfaces, between 5% and 9%, and 9% and 12% of Ficoll concentration.

After protein content quantification (Bradford, 1976), the synaptosomal fraction was distributed in aliquots of 0.5 mg, centrifuged at $20,800 \times g$ for 12 min at 4 °C and kept on ice until used. Under these conditions, synaptosomes can be kept for several hours without losing their capacity to release glutamate.

2.3. ϵ -Prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP incubations on synaptosomal fractions

Mouse or rat synaptosomal fractions were attached to polylysinated cover slips to analyze the binding of ϵ -prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP to isolated nerve terminals and their possible colocalization with a neuronal marker.

After fixation of the synaptosomes in 4% paraformaldehyde and three washes with PBS, the non-specific binding was blocked by incubating the cover slips in PBS containing 0.2% gelatin and 20% of normal goat serum (NGS) for 1 h at RT. The cover slips were then incubated with 500 nM ϵ -prototoxin-GFP or ϵ -toxin-GFP in PBS containing 0.2% gelatin and 1% NGS for 1 h at RT.

For the immunofluorescent analysis, synaptosomes bound to cover slips were blocked for 1 h as previously described and incubated overnight at 4 °C with antibodies against synaptic proteins, SNAP-25 (rabbit serum 1:100 dilution; Binz et al., 1994) VAMP-2 (1:300 dilution, monoclonal antibody, clone 69.1, Synaptic Systems), against the myelin basic protein (MBP, 1:300 dilution, monoclonal antibody, Chemicon MAB387) or against neurofilament 200 kDa (1:100 dilution, monoclonal antibody, clone RT97, Chemicon). After three washes with PBS, the cover slips were incubated with the appropriate secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488 or 546. After three washes with PBS, the cover slips were mounted with the Aqueous Mounting Medium (GEL/MOUNT™, Biomedica corp.) and further examined under a Leica TCS 4D confocal microscope (Serveis Científico-Tècnics, UB-IDIBELL). In the double fluorescence experiments the ϵ -prototoxin-GFP was added together with the corresponding secondary antibody and the samples were processed as described above.

2.4. ϵ -Prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP incubations on slices

To study the morphological binding of ϵ -prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP to the nervous system, mouse, sheep and cow brains and mouse vagus nerve samples were fixed immediately after extraction by immersion in 4% paraformaldehyde in PB (100 mM, pH 7.2) for 12 h. Samples were cryoprotected by immersion in 30% sucrose and snap frozen in precooled isobutanol. Cryostat sections of 10 μ m were obtained, mounted onto poly-L-lysine coated glass slides and stored at –20 °C until used for ϵ -prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP incubations.

The non-specific binding was blocked by incubating the sections in PBS containing 0.2% gelatin and 20% NGS for 1 h at RT. Sections were then incubated with 300 nM of ϵ -prototoxin-GFP or ϵ -toxin-GFP in PBS containing 0.2% gelatin and 1% NGS for 1 h at RT. After 3 washes with PBS, the samples were stained with TO-PRO-3 (1:1000 dilution, Molecular Probes, Invitrogen) for 7 min, washed again and fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, rinsed and mounted with an Aqueous Mounting Medium (GEL/MOUNT™, Biomedica corp.) and further examined under a Leica TCS 4D confocal microscope (Serveis Científico-Tècnics, UB-IDIBELL). In double fluorescence experiments the sections were incubated for 1 h at RT with PBS containing 0.2% gelatin and 20% NGS followed by the primary antibody overnight at 4 °C. After washing three times with PBS, ϵ -prototoxin-GFP was added to the sections together with the corresponding secondary antibody and processed as stated above.

In the special case of mouse peripheral nerves, the mouse sciatic nerve was dissected and teased to obtain isolated nerve fibres. Fibres were incubated with ϵ -prototoxin-GFP or ϵ -toxin-GFP as previously described in slices. Isolated nerve fibres from human *cauda equina* (spinal cord horse's tail) were obtained from the Institute of Neuropathology, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL.

The specificity of the binding was verified by co-incubating the sections with native ϵ -prototoxin or ϵ -toxin together with ϵ -prototoxin-GFP or ϵ -toxin-GFP, respectively, in a 20:1 molar ratio.

Similar experiments were performed with brain samples from sheep and cattle. In this case, samples

were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 12 h and processed as described for mouse brain in order to obtain cryostat slices and to perform the ϵ -prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP incubations.

2.5. Treatment with pronase E, N-glycosidase F and detergents

In a series of experiments, tissue sections were incubated with pronase E, N-glycosidase F or detergents to assess the nature of the ϵ -prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP binding.

To determine whether a protein was directly involved in the binding of ϵ -toxin, tissue sections were incubated with different concentrations of pronase E in PBS 0.1 M (from 0.1 to 1 mg/ml) at 37 °C for different times (5, 15, 30 and 60 min).

To verify the possible participation of N-glycidic residues in the binding of ϵ -toxin, N-glycosidase F was used to hydrolyze N-glycan chains from glycoproteins. Sections were incubated with 10 U/ml of N-glycosidase F overnight at 37 °C in 20 mM PB, pH 8 with 10 mM EDTA.

To assess the sensitivity of ϵ -prototoxin-GFP to detergents, the sections were incubated with Triton X-100, Nonidet p-40 or CHAPS at 0.5% or 2% in 20 mM PB pH 8 with 10 mM EDTA for 1 h at 4 °C.

After the treatments, the sections were washed three times with PBS at RT and incubated with ϵ -prototoxin-GFP as described above. In the case of detergent incubations, the first two PBS washes were done at 4 °C. Depending on the treatment, controls were performed by omitting pronase E, N-glycosidase F or detergents in the incubation buffer.

3. Results

3.1. Glutamate release from brain synaptosomes

Isolated nerve terminal preparations (synaptosomes) have been widely used to analyze the effect of numerous substances, including excitatory and inhibitory neurotoxins, on neurotransmitter release. Synaptosomes were isolated from rat or mouse brains and a specific fluorometric assay was performed to detect “on line” glutamate release (Nicholls and Sihra, 1986), to study the possible excitatory effect of

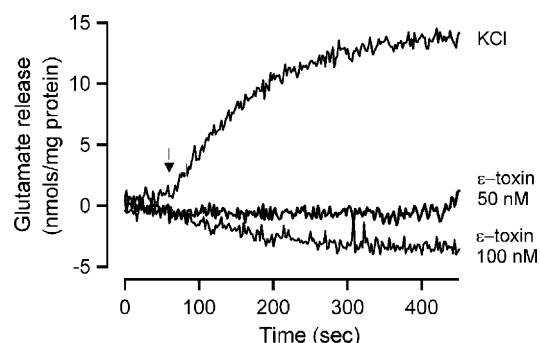


Fig. 1. Glutamate release from mouse brain synaptosomes. Glutamate release from mouse brain synaptosomes was measured on line by a spectrofluorimetric method (see Section 2). After reaching a stable base line, synaptosomes were challenged (arrow) with chemical depolarization (KCl 50 mM final concentration) or with ϵ -toxin at different concentrations (50 or 100 nM). At the end of each measurement, a known standard concentration of sodium glutamate (10 nmol) was added to the reaction cuvette to quantify the amount of glutamate released from synaptosomes.

ϵ -toxin on glutamate release directly from nerve terminals. No glutamate release from rat or mouse brain synaptosomes could be detected when different concentrations of ϵ -toxin were added immediately before the neurotransmitter release assay, in contrast to the calcium-dependent release of glutamate induced by chemical depolarization (Fig. 1). ϵ -Toxin did not interfere with the fluorometric assay by itself or with the potassium stimulated glutamate secretion, even after 1 h of preincubation with the active ϵ -toxin before the glutamate release was tested. The decrease in fluorescence in the presence of the toxin but in the absence of glutamate in the extracellular medium (a symptom of non-stimulation) is due to the slow reoxidation of NADH by the small fraction of damaged mitochondria present in the incubation media (Nicholls and Sihra, 1986). These results indicate that ϵ -toxin does not directly promote glutamate release from nerve terminals.

3.2. Binding of ϵ -toxin to the mouse brain synaptosomal fraction

The absence of ϵ -toxin-dependent direct neurotransmitter release prompted us to check the putative binding of ϵ -toxin to the brain synaptosomal fraction. In this case, the fusion protein ϵ -prototoxin coupled to GFP was used to directly visualize its binding to a

mouse brain synaptosomal preparation immobilized on glass cover slips. Confocal images of the synaptosomal preparation incubated with the ϵ -prototoxin-GFP showed specifically stained small round structures (Fig. 2A, D and G). Similar results were obtained when synaptosomes were incubated with ϵ -toxin for 1 h at RT followed by a specific anti- ϵ -toxin rabbit serum and Alexa Fluor 546 coupled goat anti-rabbit secondary antibody (not shown). In order to

confirm the binding of ϵ -prototoxin-GFP to isolated nerve terminals, antibodies against synaptic proteins were used as synaptosomal markers and co-incubated with the ϵ -prototoxin-GFP to perform double fluorescence staining assays. Surprisingly, no colocalization was observed when any of the antibodies against synaptic proteins (SNAP-25, synaptobrevin/VAMP2, Fig. 2B and E, respectively) were used to stain isolated nerve terminals. In a few cases, when synaptic

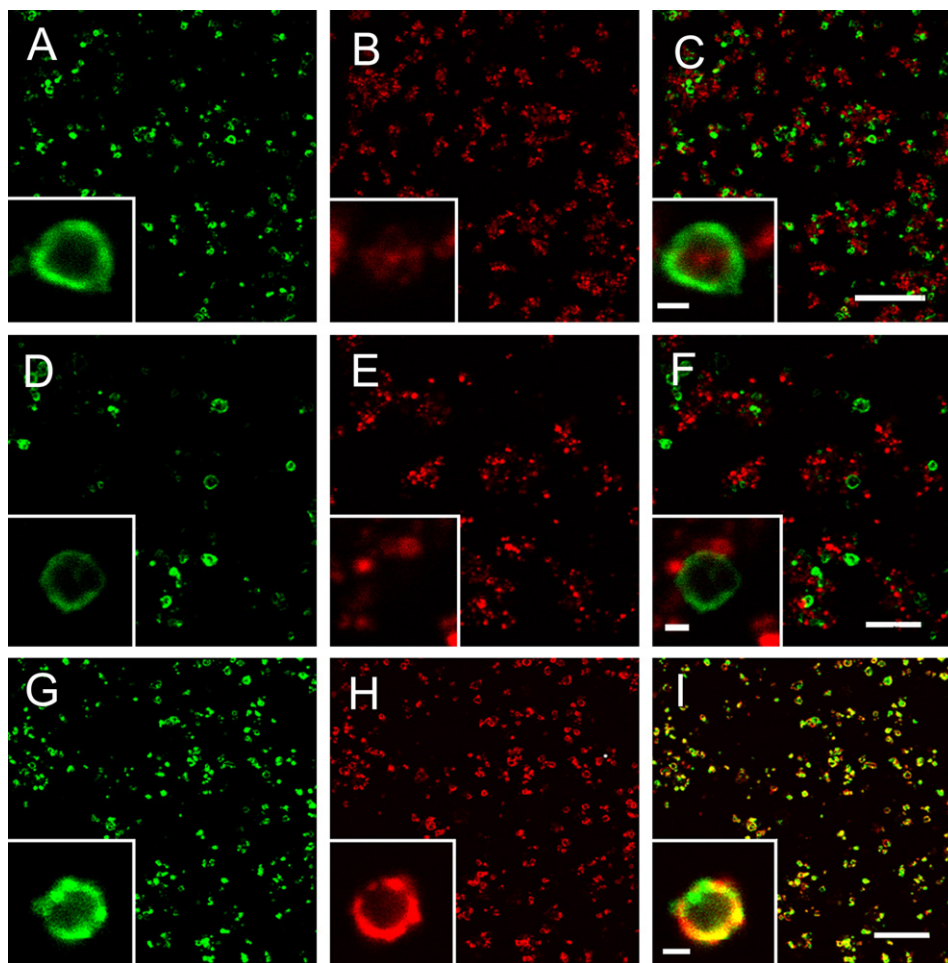


Fig. 2. Colocalization of ϵ -prototoxin-GFP with myelin in a mouse brain synaptosomal fraction. Synaptosomal fraction from mouse brains were fixed on glass cover slips and incubated with ϵ -prototoxin-GFP (green in A, C, D, F, G and I) after preincubation with antibody against SNAP-25 (B and C) antibody against synaptobrevin/VAMP2 (E and F) or antibody against Myelin Basic Protein (H and I). The polyclonal antibody against SNAP-25 and the monoclonal antibodies against synaptobrevin/VAMP2 and Myelin Basic Protein (MBP) were revealed with Alexa Fluor 546 coupled goat anti-rabbit or goat anti-mouse secondary antibodies, respectively (in red). C, F and I are merged images of ϵ -prototoxin-GFP with the respective markers. Insets show detailed colocalization (I) or non-colocalization (C and F) of ϵ -prototoxin-GFP with MBP or SNAP-25 and synaptobrevin/VAMP2, respectively. Note the SNAP-25 staining pattern surrounded by ϵ -prototoxin-GFP in the inset of C. Bars in C and I represent 20 μ m. Bar in F represents 10 μ m. Bars in the figure-insets represent 1 μ m.

membrane proteins such as SNAP25 were used as synaptic markers, some stained structures appeared surrounded by ϵ -toxin-GFP staining (inset Fig. 2C). This particular pattern was not observed when synaptobrevin/VAMP 2 staining was used as a synaptic vesicle marker (inset Fig. 2F). However, a complete colocalization was evident when anti-myelin basic protein (MBP) antibody was used together with ϵ -prototoxin-GFP (Fig. 2G–I). These results strongly

suggest that ϵ -toxin binds to myelinic structures present as debris in the synaptosomal preparations together with the isolated nerve terminals.

3.3. Binding of ϵ -toxin to myelin in central nervous system

To confirm the binding of ϵ -toxin to myelinic structures, mouse brain slices were obtained and

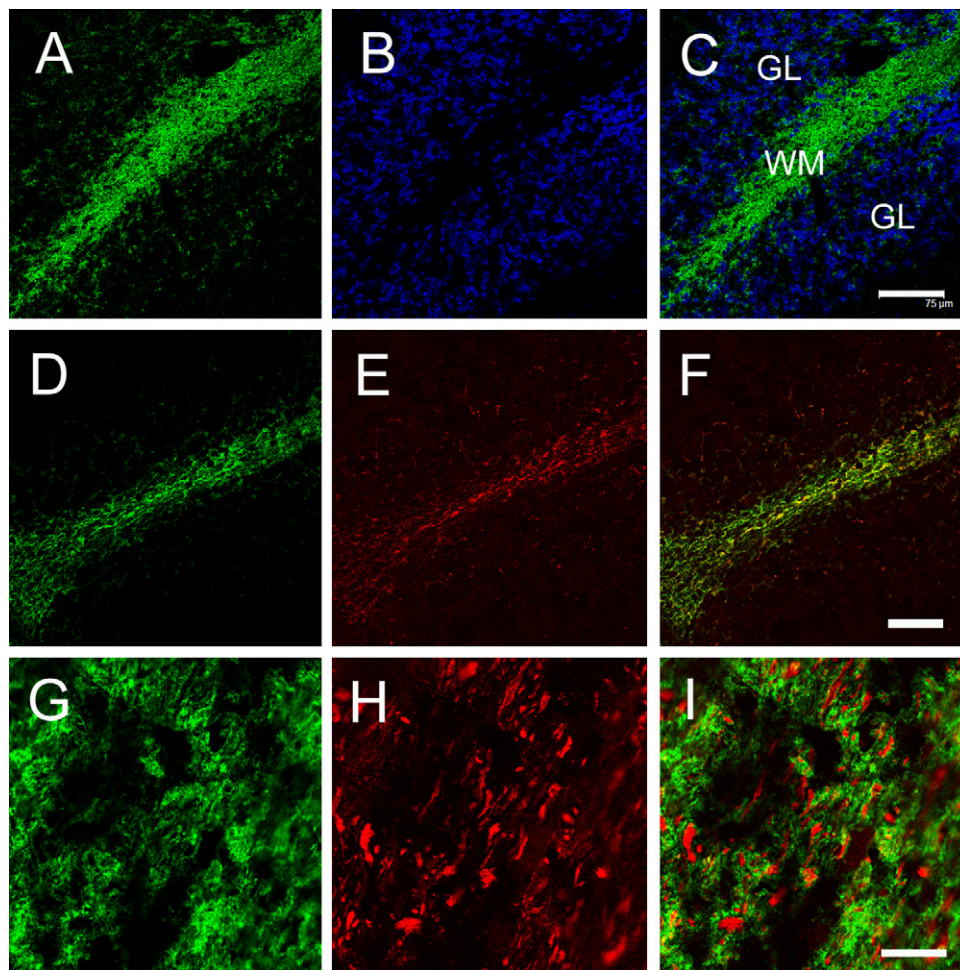


Fig. 3. Binding of ϵ -toxin to myelinic structures in mouse brain. Sections from mouse cerebellum were incubated with ϵ -toxin-GFP (A and C). The sections were counterstained with the nuclear marker TO-PRO-3 for convenient cerebellar layer identification (B and C). C is a merged image of TO-PRO-3 labelling with ϵ -prototoxin-GFP. To demonstrate the colocalization of ϵ -prototoxin-GFP staining with myelinic components, sections from mouse cerebellum were stained with ϵ -prototoxin-GFP (D, F, G and I) together with MBP (E and F) or neurofilament (RT97, H and I) monoclonal antibodies. Primary antibodies were detected with Alexa Fluor 546 coupled goat anti-mouse secondary antibodies (in red). Note the colocalization pattern of ϵ -prototoxin-GFP staining with the MBP antibody (F). Also note that the RT97 stained structures on the cerebellar white matter, which basically correspond to neuronal axons, are surrounded by the ϵ -prototoxin-GFP staining (I). F and I are merged images of ϵ -prototoxin-GFP staining with the respective antibodies. GL: granular layer; WM: white matter. Scale bars: C, 75 μ m; F, 50 μ m and I, 15 μ m.

cerebellar sections were incubated with ϵ -toxin-GFP (Fig. 3A and C). ϵ -Toxin-GFP visibly stained myelinic structures in the mouse cerebellum. Moreover, no differences between the ϵ -prototoxin and the activated form were observed (not shown). This binding to myelinic structures was specific, since excess amounts of ϵ -prototoxin (non-GFP coupled) prevented the staining of cerebellar slices by either the ϵ -prototoxin-GFP or the full activated ϵ -toxin-GFP (data not shown). Moreover, cerebellar slices were incubated with ϵ -prototoxin followed by a specific anti- ϵ -prototoxin serum to detect the non-labelled toxin bound to the sections. After incubation with the Alexa Fluor 488 coupled goat anti-rabbit secondary antibody, the staining pattern was similar to those found with ϵ -prototoxin-GFP or ϵ -toxin-GFP (not shown).

Additionally, no staining was found when sections were incubated with GFP alone (not shown). A counterstaining with the nuclear marker TO-PRO-3 was used (Fig. 3B and C) to clearly differentiate the cerebellar granular layer from the white matter.

As in the experiments on synaptosomes described above, neuronal and myelin markers were used to fully demonstrate the binding of ϵ -toxin to myelinic structures. Cerebellar sections were incubated with ϵ -prototoxin-GFP (Fig. 3D and G) together with anti-MBP or anti-neurofilament (Fig. 3E and H respectively). As expected, neither the neuronal marker (anti-neurofilament RT97 antibody) nor synaptic markers (anti-SNAP25 antibody) colocalized with the ϵ -prototoxin-GFP staining (Fig. 3I and not shown). The neurofilament staining of the cerebellar white

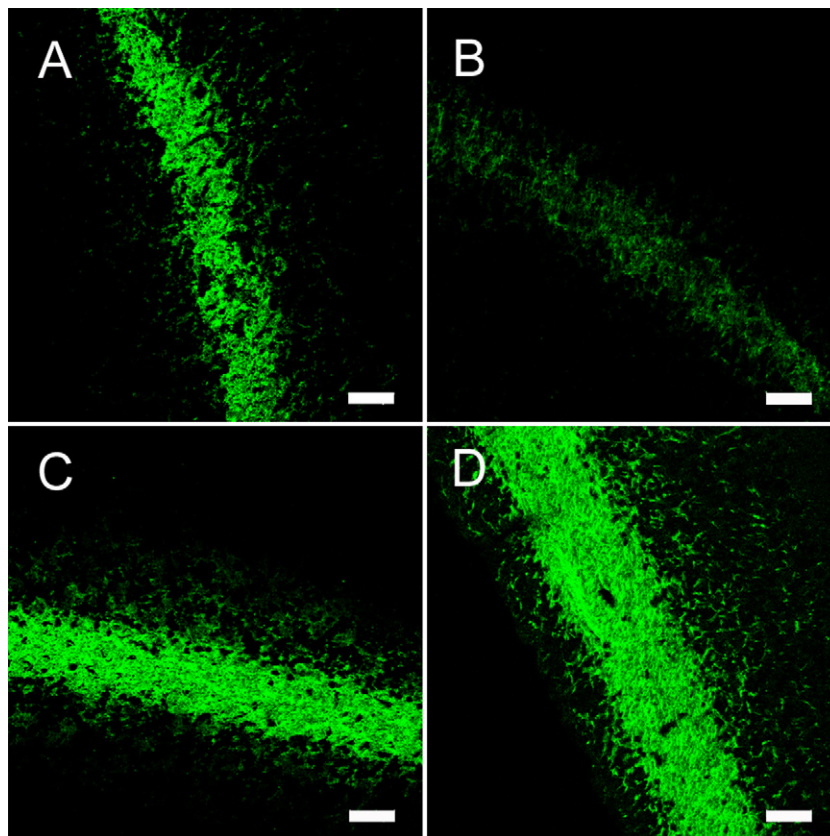


Fig. 4. Effect of pronase E, N-glycosidase F and Triton X-100 on the ϵ -prototoxin-GFP binding to myelin. Sections from mouse cerebellum were incubated directly with ϵ -prototoxin-GFP as a control (A), or after treatment of the sections with pronase E (1 mg/ml at 37 °C for 30 min, B), N-glycosidase F (10 U O/N at 37 °C, C) or 2% Triton X-100 (1 h at 4 °C, D). Note the reduced labelling of myelin by ϵ -prototoxin-GFP after the pronase E treatment (B). Bars represent 40 μ m.

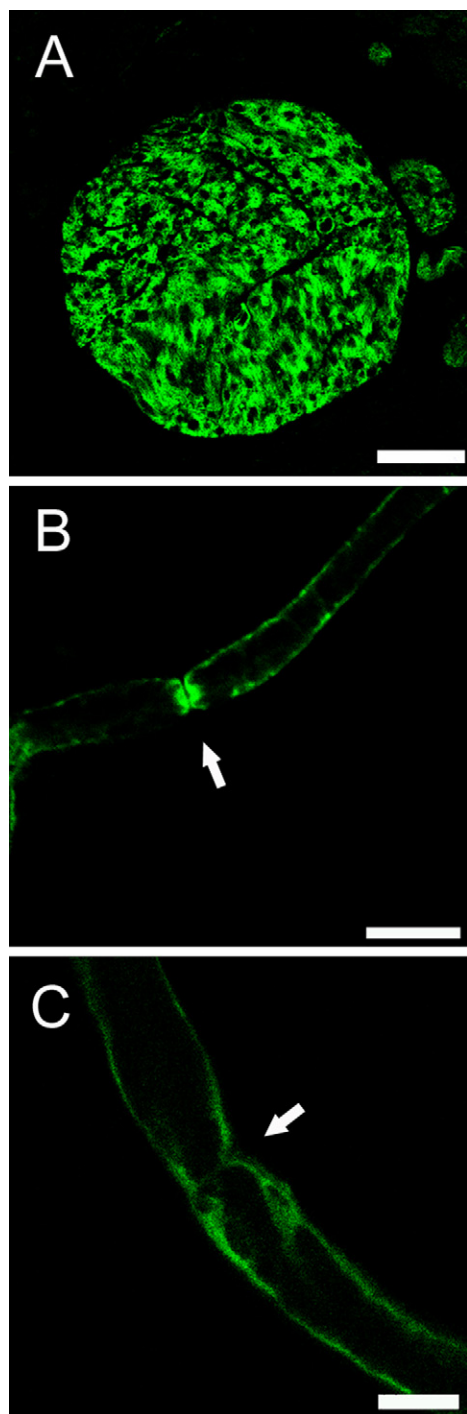


Fig. 5. Binding of ϵ -toxin to peripheral nerve fibres. (A) Cross-section of mouse left vagus nerve incubated with ϵ -prototoxin-GFP. (B) Teased fibre from mouse sciatic nerve incubated with ϵ -proto-

toxin-GFP. (C) Teased nerve fibre from human *cauda equina* incubated with ϵ -prototoxin-GFP. Note the staining of ϵ -prototoxin-GFP to isolated nerve fibres, mainly at the Ranvier nodes (arrows). Scale bars: A, 40 μ m; B and C, 15 μ m.

matter revealed RT97 stained structures, possibly corresponding to neuronal axons, surrounded by ϵ -prototoxin-GFP positive structures corresponding to myelinic sheaths (Fig. 3I). Conversely, anti-MBP antibody labelling fully colocalized with the ϵ -prototoxin-GFP staining (Fig. 3F). After confirming the specific binding of ϵ -prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP to myelinic structures, a series of experiments were performed to further characterize the nature of this interaction (Fig. 4). To identify a possible protein component in the ϵ -prototoxin-GFP binding to myelin, brain slices were previously incubated with pronase E in order to enzymatically remove a possible protein receptor component for the toxin. In this case, the binding of ϵ -prototoxin-GFP to cerebellar slices was clearly decreased (Fig. 4B) compared to the control non-treated cerebellar slices (Fig. 4A). Treatment with N-glycosidase F, to remove N-glycidic moieties on myelin, did not modify the binding pattern (Fig. 4C), indicating that the binding of ϵ -prototoxin-GFP to myelin was independent of a glycidic environment. Curiously, detergent pre-treatments of cerebellar slices did not show any evident decrease in ϵ -prototoxin-GFP binding under these experimental conditions (Triton X-100 and CHAPS, Fig. 4D and not shown, respectively). Moreover, the label was even more intense after detergent treatments, suggesting that the detergents used (Triton X-100, CHAPS) unmasked previously inaccessible binding sites to the toxin.

3.4. Binding of ϵ -toxin to myelinated peripheral nerve fibres

To check the possible binding of the toxin to myelin in the peripheral nervous system, sections from mouse vagus nerve were incubated with ϵ -prototoxin-GFP in order to localize and identify myelinic nerve fibres (Fig. 5A). Furthermore, isolated myelinic nerve fibres were obtained by teasing mouse sciatic nerve and incubated with ϵ -prototoxin-GFP. Isolated fibres showed a clear surface staining, more accentuated

toxin-GFP. (C) Teased nerve fibre from human *cauda equina* incubated with ϵ -prototoxin-GFP. Note the staining of ϵ -prototoxin-GFP to isolated nerve fibres, mainly at the Ranvier nodes (arrows). Scale bars: A, 40 μ m; B and C, 15 μ m.

at the Ranvier nodes (Fig. 5B). Similar results were obtained incubating the nerve fibres with ϵ -toxin-GFP (not shown). To further examine the possibility that ϵ -toxin could bind to the myelinic structures in other species, isolated nerve fibres from the human spinal cord *cauda equina* were incubated under the same conditions as described above for mice. A similar binding pattern was obtained (Fig. 5C), suggesting that the binding of ϵ -toxin to myelin may be a common attribute among mammalian species.

To investigate this possibility, frozen sections of the striatum and cerebellum from the brains of lambs and cattle, two animal species that are specially sensitive to ϵ -toxin, were obtained and processed in order to analyze the possible binding of ϵ -prototoxin-GFP to myelinic

structures. As expected, ϵ -prototoxin-GFP stained myelin in both lamb and cow brains (Fig. 6A, B and D) though with different levels of intensity, suggesting differences in the affinity of ϵ -prototoxin-GFP to the different myelin species. Curiously, in addition to myelin staining, ϵ -prototoxin-GFP labelled endothelial cells from blood brain microvessels in both lamb and cow brains with high intensity and specificity (Fig. 6A–D); this does not occur in rodent species.

4. Discussion

Some of the neurological disorders produced by ϵ -toxin in experimental and naturally poisoned animals

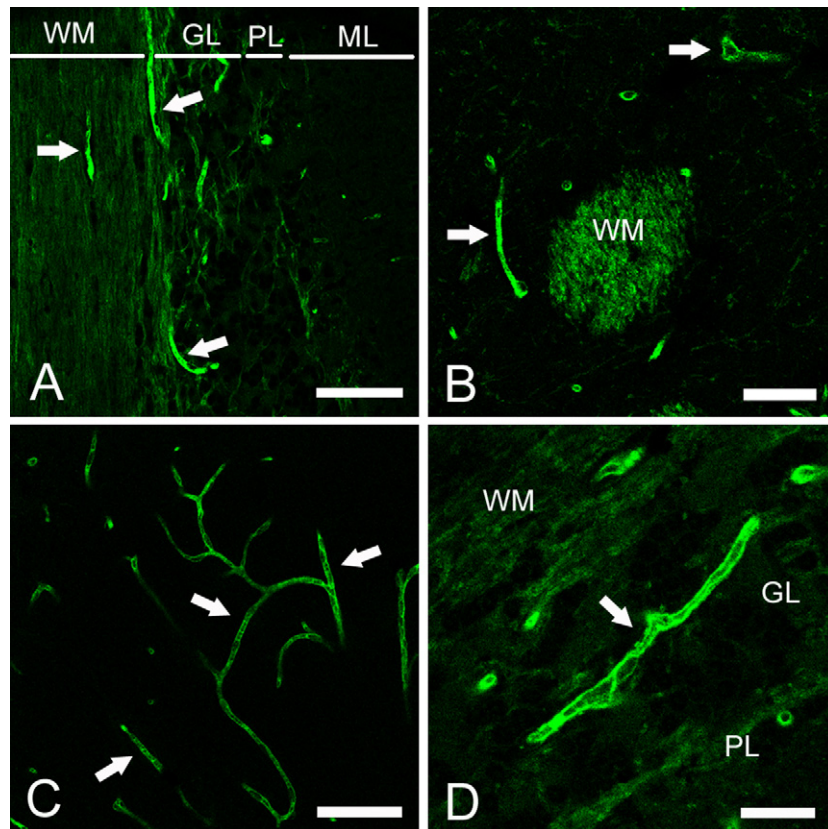


Fig. 6. Binding of ϵ -toxin to sheep and bovine nervous system. Sections from sheep (A, B and C) and bovine (D) brains were incubated with ϵ -prototoxin-GFP. (A) Cerebellar section showing the binding of ϵ -prototoxin-GFP to the white matter (WM) and blood vessels (arrows). (B) Detail of a section from sheep striatum showing the binding of ϵ -prototoxin-GFP to myelin structures (WM) and blood vessels (arrows). (C) Blood vessels (arrows) from the molecular layer of the sheep cerebellum stained with the ϵ -prototoxin-GFP. (D) A section of the bovine cerebellum showing the binding of ϵ -prototoxin-GFP to myelin structures (WM) and blood vessels (arrow). WM: white matter; GL: granular layer; PL: Purkinje cell layer and ML: molecular layer. Scale bars: A and C, 75 μ m; B, 40 μ m; D, 25 μ m.

are due to the “massive” secretion of glutamate from glutamatergic nerve terminals, triggering an excitotoxic episode characterized by convulsions (seizures) and neuronal cell death. This effect is an established characteristic of ϵ -toxin, observed in laboratory animals when lethal and sublethal doses of the toxin were injected (Miyamoto et al., 1998, 2000). The massive glutamate release may be achieved by a direct effect of the toxin on nerve terminals, acting as a stimulatory toxin, or by acting on neuronal soma or glial cells. Previous results showing the binding of ϵ -toxin to a rat brain synaptosomal fraction (Nagahama and Sakurai, 1992) strongly suggested a direct action of ϵ -toxin on nerve terminals, probably via the formation of a pore in the plasma membrane as a consequence of its oligomerization (Miyata et al., 2001, 2002). By using a well-established fluorometric assay to detect the glutamate release from brain synaptosomes “on line” (Nicholls and Sihra, 1986) we observed that the toxin does not act directly on nerve terminals, suggesting that its capacity to elicit glutamate release may act through another mechanism, either on neuronal soma or axons, or on glial or other cells present in the nervous tissue.

Taking advantage of the fusion proteins ϵ -prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP which retain the full binding activity of the native molecules, we performed a series of experiments to examine the binding of ϵ -toxin to nervous tissue. We have previously found that ϵ -toxin-GFP and ϵ -prototoxin-GFP fusion proteins are valuable tools for detecting the binding of the toxin to sensitive cells and tissues (Soler-Jover et al., 2004, 2007). These studies demonstrated that the ϵ -toxin-GFP molecules bind to particular structures and tissues, and that this binding was specific, since previous incubation with non-labelled ϵ -prototoxin prevented ϵ -prototoxin-GFP binding.

As noted above, a previous report showed the binding of ϵ -toxin to plasma membranes prepared from a synaptosomal fraction composed mainly of isolated nerve terminals (Nagahama and Sakurai, 1992). Here, combining the ϵ -prototoxin-GFP fusion protein and confocal microscopy we show that the myelin structures present in the synaptosomal preparation are the main source of ϵ -toxin binding sites. Moreover, the use of synaptic and myelinic markers confirmed the specific labelling of myelinic structures by ϵ -prototoxin-GFP. Myelin components,

considered as contaminants, have been detected in variable amounts along the different fraction obtained from brain synaptosomal and synaptic vesicle preparations (Takamori et al., 2006). In fact, the presence of myelin contamination in crude synaptosomal fraction has been one of the major problems in obtaining pure nerve terminal preparations. Further steps in synaptosomal fraction purification, such as the Ficoll gradient centrifugation used here, can remove most of the myelin contamination, but a slight presence of myelinic markers remains in the synaptosomal fraction.

In mice, myelin specifically bound ϵ -toxin in both the central and peripheral nervous systems. The binding was specific and sensitive to proteases. These results are in partial agreement with previous data on the binding of ϵ -toxin to rat brain homogenates and synaptosomal fractions, where the binding was partially sensitive to pronase E and neuraminidase but completely abolished by lipase (Nagahama and Sakurai, 1992). The differences between that report and ours, regarding the glycidic component of ϵ -toxin receptor and on the effect of detergent treatments, may be due to the different experimental approaches used. Pronase E treatment did not completely abolish the binding of ϵ -prototoxin-GFP to myelinic structures. This may be due to an incomplete action of the enzyme in the preparations used here or to the presence of two binding sites, one a protein binding site and the other with a main glucidic or lipidic moiety.

The binding of the ϵ -toxin to myelin might not correspond to a natural target of the toxin in its toxic pathway. In fact, the binding and effect of injected ϵ -toxin has not been correlated either with myelin-containing structures or with its synthesizing cells (Finnie, 2004; Soler-Jover et al., 2007). Moreover, these results do not directly identify myelin as the main or a potential biological target of ϵ -toxin, but they evidence the toxin's specific binding to a neural structure and suggest potential applications of the toxin as a specific marker in the study of the nervous system, in particular in myelinic structures. Indeed, the toxin and its GFP forms may be useful tools to identify, quantify and analyze myelinic structures. This potential use of the ϵ -toxin-GFP in myelin binding and detection may, however, be limited by its capacity to bind to myelin from different species. The

binding is clear in myelin from mice and rat origin and in myelin from human peripheral nerves, but it is slightly diminished in cow and sheep brains.

The binding of ϵ -toxin to brain endothelial microvasculature also varies according to the species studied. Although previous evidence demonstrated the effect of ϵ -toxin on endothelial permeabilization and blood brain barrier translocation in mice (Finnie, 2004; Soler-Jover et al., 2007), the binding to mouse brain endothelia could barely be detected by direct incubation. This characteristic of ϵ -toxin contrasts with the *in vivo* binding of the toxin to brain blood vessels upon its injection in mice (Soler-Jover et al., 2007). Thus, although the effect and the binding to brain endothelia are required for the toxin's neurological effects in mice, its binding probably requires intact endothelia, which, in mice, may be sensitive to the fixation and/or further manipulation for fluorescence observation. This is not the case in the rest of species studied here, which in fact are the ϵ -toxin's natural targets; in these cases the binding to the brain microvasculature was evident.

Finally, it would be reasonable to suggest a double binding capacity of ϵ -toxin in nervous system: one to the endothelium, where it performs at least part of its noxious function (endothelial permeabilization and oedema) and the other to one or more myelin components with an as yet undefined function.

5. Conclusions

ϵ -Toxin binds specifically to myelin in both the central and peripheral nerve systems. The binding is mediated, at least in part, by a protein component of myelin. This characteristic of the toxin is not limited to mouse or rat myelin, the animal models used here, but is also evident in ovine, bovine and human myelin, though with different levels of intensity. In both ovine and bovine brains, at least, the toxin binds strongly to vascular endothelia. The functional importance of the ϵ -toxin feature to bind myelin is still unknown. The identification of the myelin component that binds to ϵ -toxin is currently under study and its identification will broaden our understanding of the molecular interaction of ϵ -toxin with its cellular targets.

Acknowledgements

We are grateful to Serveis Científicotècnics of the University of Barcelona (Bellvitge Campus) for their assistance with the confocal microscopy tests. We would also like to thank Inmaculada Gómez de Aranda and Benjamín Torrejón for their excellent technical assistance, Xenia Grandes and Ezequiel Mas for their help obtaining isolated nerve fibres, Dr. Isidre Ferrer and the Brain Bank of the Institute of Neuropathology for providing the human nerve fibres and Serveis Lingüístics (University of Barcelona) for the careful reading of the manuscript and linguistic help. J.D.-A. is a recipient of a predoctoral fellowship from IDIBELL. This work has been supported by Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (BFU2005-02202).

References

- Binz, T., Blasi, J., Yamasaki, S., Baumeister, A., Link, E., Sudhof, T.C., Jahn, R., Niemann, H., 1994. Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 269, 1617–1620.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Fernandez-Miyakawa, M.E., Fisher, D.J., Poon, R., Sayeed, S., Adams, V., Rood, J.I., McClane, B.A., Uzal, F.A., 2007a. Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse intravenous injection model. *Infect. Immun.* 75, 1443–1452.
- Fernandez-Miyakawa, M.E., Sayeed, S., Fisher, D.J., Poon, R., Adams, V., Rood, J.I., McClane, B.A., Saputo, J., Uzal, F.A., 2007b. Development and application of an oral challenge mouse model for studying *Clostridium perfringens* Type D Infection. *Infect. Immun.* 75, 4282–4288.
- Fernandez-Miyakawa, M.E., Jost, B.H., Billington, S.J., Uzal, F.A., 2008. Lethal effects of *Clostridium perfringens* epsilon toxin are potentiated by alpha and perfringolysin-O toxins in a mouse model. *Vet. Microbiol.* 127, 379–385.
- Finnie, J.W., 1984a. Histopathological changes in the brain of mice given *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *J. Comp. Pathol.* 94, 363–370.
- Finnie, J.W., 1984b. Ultrastructural changes in the brain of mice given *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *J. Comp. Pathol.* 94, 445–452.
- Finnie, J.W., 2004. Neurological disorders produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Anaerobe* 10, 145–150.
- 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. *Microbiol. Immunol.* 41, 527–535.
- Miyamoto, O., Minami, J., Toyoshima, T., Nakamura, T., Masada, T., Nagao, S., Negi, T., Itano, T., Okabe, A., 1998. Neurotoxicity of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin for the rat hippocampus via the glutamatergic system. *Infect. Immun.* 66, 2501–2508.
- Miyamoto, O., Sumitani, K., Nakamura, T., Yamagami, S., Miyata, S., Itano, T., Negi, T., Okabe, A., 2000. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 109–113.
- Miyata, S., Matsushita, O., Minami, J., Katayama, S., Shimamoto, S., Okabe, A., 2001. Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the synaptosomal membrane. *J. Biol. Chem.* 276, 13778–13783.
- Miyata, S., Minami, J., Tamai, E., Matsushita, O., Shimamoto, S., Okabe, A., 2002. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin forms a heptameric pore within the detergent-insoluble microdomains of Madin-Darby canine kidney cells and rat synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 277, 39463–39468.
- Nagahama, M., Sakurai, J., 1991. Distribution of labeled *Clostridium perfringens* epsilon toxin in mice. *Toxicon.* 29, 211–217.
- Nagahama, M., Sakurai, J., 1992. High-affinity binding of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin to rat brain. *Infect. Immun.* 60, 1237–1240.
- Nicholls, D.G., Sihra, T.S., 1986. Synaptosomes possess an exocytotic pool of glutamate. *Nature* 321, 772–773.
- Smedley 3rd, J.G., Fisher, D.J., Sayeed, S., Chakrabarti, G., McClane, B.A., 2004. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152, 183–204.
- Soler-Jover, A., Blasi, J., Gomez de Aranda, I., Navarro, P., Gibert, M., Popoff, M.R., Martin-Satue, M., 2004. Effect of epsilon toxin-GFP on MDCK cells and renal tubules in vivo. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 931–942.
- Soler-Jover, A., Dorca, J., Popoff, M.R., Gibert, M., Saura, J., Tusell, J.M., Serratos, J., Blasi, J., Martin-Satue, M., 2007. Distribution of *Clostridium perfringens* epsilon toxin in the brains of acutely intoxicated mice and its effect upon glial cells. *Toxicon.* 50, 530–540.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S.A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., Jahn, R., 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127, 831–846.

**Characterization of high affinity binding of epsilon toxin from
Clostridium perfringens to the renal system.**

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary Microbiology
Manuscript Draft

Manuscript Number: VETMIC-D-11-5996R1

Title: Characterization of the high affinity binding of epsilon toxin from Clostridium perfringens to the renal system

Article Type: Research Paper

Keywords: epsilon toxin, clostridium perfringens, MDCK cell line, enterotoxaemia, pulpy kidney

Corresponding Author: Dr Juan Blasi, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of Barcelona

First Author: Jonatan Dorca-Arevalo

Order of Authors: Jonatan Dorca-Arevalo; Mireia Martin-Satue, PhD; Juan Blasi, PhD

Please find enclosed the revised version of the manuscript entitled “**Characterization of the high affinity binding of epsilon toxin from Clostridium perfringens to the renal system**” by Jonatan Dorca-Arévalo, Mireia Martín-Satué and Juan Blasi to be published in Veterinary Microbiology.

We thank the editor for considering the manuscript suitable for re-submission.

According to the editor guidelines, the manuscript has been significantly shortened in extension maintaining the meaning of the work.

The introduction has been significantly reduced more than a half from the original version.

Figures in the main body of the manuscript have been reduced from 9 to 6, and supplementary figures from 5 to 4.

The discussion has been also significantly shortened.

We think the manuscript has been improved and we really thank the editor for the helpful comments and recommendations.

We hope the manuscript in its revised form fulfills the criteria to be published in Veterinary Microbiology.

Yours sincerely,

Juan Blasi

1 **Characterization of the high affinity binding of epsilon toxin from *Clostridium***
2 ***perfringens* to the renal system**

3 Jonatan Dorca-Arévalo^{1,2}, Mireia Martín-Satué^{1,2} and Juan Blasi^{1,2}

4
5 ¹ Department of Pathology and Experimental Therapeutics. School of Medicine.
6 Campus of Bellvitge. Health Universitat de Barcelona Campus (HUBc). University of
7 Barcelona. c/ Feixa Llarga s/n 08907. L'Hospitalet de Llobregat. Spain

8 ² Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

9
10 Tel. +34 934024279

11 Fax. +34 93 4035810

12 email: blasi@ub.edu

13
14 Proofs should be sent to:

15 Juan Blasi

16 Department of Pathology and Experimental Therapeutics.

17 School of Medicine. Campus of Bellvitge.

18 University of Barcelona

19 c/ Feixa Llarga s/n

20 08907 L'Hospitalet de Llobregat

21 Spain

22 Email: blasi@ub.edu

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35 **ABSTRACT**

36 Epsilon toxin (ϵ -toxin), produced by *Clostridium perfringens* types B and D, causes
37 fatal enterotoxaemia in livestock. In the renal system, the toxin binds to target cells
38 before oligomerization, pore formation and cell death. Still, there is little information
39 about the cellular and molecular mechanism involved in the initial steps of the cytotoxic
40 action of ϵ -toxin, including the specific binding to the target sensitive cells. In the
41 present report, the binding step of ϵ -toxin to target cells in renal system of different
42 species is characterized by means of an ELISA based assay with recombinant ϵ -toxin-
43 green fluorescence protein (ϵ -toxin-GFP) and ϵ -prototoxin-GFP. In addition, different
44 treatments with Pronase E, detergents, N-glycosidase F and beta-elimination on MDCK
45 cells and renal cryosections have been performed to further characterize the ϵ -toxin
46 binding. ELISA assays revealed a single binding site with a similar dissociation
47 constant (K_d) for ϵ -toxin-GFP and ϵ -prototoxin-GFP, but a three-fold increase in B_{max}
48 levels in the case of ϵ -toxin-GFP. Double staining on kidney cryoslices with lectins and
49 ϵ -prototoxin-GFP revealed specific binding to distal and collecting tubule cells. In
50 addition, experiments on kidney and bladder cryoslices demonstrated the specific
51 binding to distal tubule of a range of mammalian renal systems. Pronase E and beta-
52 elimination treatments on kidney cryoslices and MDCK cells revealed that the binding
53 of ϵ -toxin in renal system is mediated by a O-glycoprotein. Detergent treatments
54 revealed that the integrity of the plasma membrane is required for the binding of ϵ -toxin
55 to its receptor.

56

57 **KEYWORDS**

58 Epsilon toxin, *Clostridium perfringens*, MDCK cell line, enterotoxaemia, pulpy kidney

59

60 INTRODUCTION

61 Epsilon toxin (ϵ -toxin) is the most potent clostridial toxin after botulinum and
62 tetanus neurotoxins. It is produced by the anaerobic bacteria *Clostridium perfringens*
63 types B and D and causes fatal enterotoxaemia in sheep, goats and occasionally calves
64 and other animals, resulting in heavy economic losses (Payne and Oyston 1997).

65 The toxin is produced as a non-toxic precursor molecule that is activated upon
66 proteolytic cleavage of amino and carboxy terminal peptides (Minami et al., 1997).

67 Although non-active, the prototoxin molecule binds to the same surface cell
68 receptors as the full active molecule and can prevent its binding and further toxicity
69 (Buxton, 1976; Dorca-Arevalo et al., 2008; Tamai et al., 2003).

70 The Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line, of epithelial origin from the
71 distal convoluted tubule, is the most used and sensitive “in vitro” model for ϵ -toxin
72 studies (Payne et al., 1994). Additionally, it was recently demonstrated that the
73 recombinant ϵ -toxin-green fluorescence protein (ϵ -toxin-GFP) fusion protein retained
74 the cytotoxicity of the native toxin (Soler-Jover et al., 2004; Soler-Jover et al., 2007).

75 ϵ -Toxin specifically binds to MDCK cells (Petit et al., 1997) and to the epithelium
76 of distal tubules (Soler-Jover et al., 2004; Tamai et al., 2003). Although the cytotoxic
77 mechanism for ϵ -toxin has been deciphered, the initial steps leading to toxin
78 heptamerization and pore formation are still elusive (Lindsay, 1996; Miyamoto et al.,
79 1998; Petit et al., 1997). Attempts to characterize the putative receptor for ϵ -toxin point
80 out a sialoconjugate molecule on cholesterol enriched plasma membrane region as a
81 candidate (Chassin et al., 2007; Nagahama and Sakurai, 1992; Shimamoto et al., 2005).
82 Candidates for a protein component as the putative receptor for ϵ -toxin are a 37 kDa
83 protein isolated from MDCK cell membranes (Petit et al., 1997) and the hepatitis A
84 virus cellular receptor 1 identified by gene-trap mutagenesis as one of a series of

85 proteins involved in the intoxication process of ϵ -toxin on MDCK cells (Ivie et al.),
86 although a functional evidence has not been elucidated.

87 In this paper we use ϵ -prototoxin-GFP to further characterize the ϵ -toxin binding site
88 in the renal system by using several treatments either on MDCK or mice kidney
89 cryosections with the help of fluorescent labeled lectins and confocal imaging.
90 Furthermore, an ELISA based method was developed to define the ϵ -toxin and ϵ -
91 prototoxin binding affinity constants to MDCK cells.

92

93 **MATERIALS AND METHODS**

94 **Expression of recombinant ϵ -prototoxin-GFP.**

95 ϵ -Prototoxin and ϵ -prototoxin-GFP were produced and purified as previously
96 described (Soler-Jover et al., 2007). Briefly, the expression of either ϵ -prototoxin or ϵ -
97 prototoxin-GFP was induced overnight with 1 mM isopropyl beta-D-
98 thiogalactopyranoside (IPTG) at room temperature (RT), in 250 ml LB of medium.
99 Cells were pelleted and resuspended in ice cold phosphate buffer (PB) 20 mM pH 7.5
100 with NaCl 250 mM, sonicated and centrifuged at 12,000 x g for 20 min. The resultant
101 supernatant was incubated with 0.7 ml of Glutathione SepharoseTM 4B beads
102 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) for 1 h at 4 °C. Finally, the
103 recombinant proteins were eluted by thrombin cleavage in 20 mM PB pH 7.5 containing
104 250 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂. When required, ϵ -prototoxin and ϵ -prototoxin-GFP
105 were fully activated to ϵ -toxin and ϵ -toxin-GFP, respectively, by incubation with
106 trypsin-coated agarose beads for 30 min at RT (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain),
107 following the manufacturer’s instructions.

108

109 **ϵ -Prototoxin-GFP and lectin incubations on MDCK cells, mouse kidney and**
110 **urothelium cryosections.**

111 Animals were housed under conventional conditions in climatized rooms with free
112 access to standard pelleted food and tap water. All animal experiments were carried out
113 in accordance with EU guidelines (86/609/EU), and Spanish regulations (BOE 67/8509-
114 12, 1988) for the use of laboratory animals, and approved by the Ethics and Scientific
115 Committee at the University of Barcelona. Sheep, bovine and caprine kidney and
116 bladder samples were obtained from the Mercabarna slaughterhouse in Barcelona.
117 Human kidney was obtained from the Unit of pathology from the University hospital of
118 Bellvitge, following the guidelines of the local Ethics Committee.

119 To study the binding of ϵ -prototoxin-GFP and lectins on cryosection slices, mouse
120 kidney and urothelium samples were fixed immediately after extraction by immersion in
121 4% paraformaldehyde (PFA) in PB (100 mM, pH 7.2) for 12 h. Samples were
122 cryoprotected by immersion in 30% sucrose, embedded in OCT media and snap frozen
123 in precooled isobutanol. Cryostat sections of 10 μ m were obtained, mounted onto poly-
124 lysine coated microscope slides (Superfrost Plus, Thermo scientific) and stored at -20
125 °C until used for ϵ -prototoxin-GFP and lectin incubations. Non-specific binding was
126 blocked by incubating the sections in PBS containing 1% bovine serum albumin for 30
127 min at RT. Sections were then incubated with defined biotinylated lectins (Table 1) in
128 the same buffer for 1h at RT. After three washes in PBS the cryosections were
129 incubated with 300 nM of ϵ -prototoxin-GFP and streptavidin-Alexa-546 conjugate
130 (Molecular Probes) (1:500 dilution) in PBS containing 1% bovine serum albumin
131 (BSA) for 1 h at RT. After 3 washes with PBS, the samples were stained with TO-PRO-
132 3 (1:1000 dilution, Molecular Probes, Invitrogen) for 7 min, washed again and mounted
133 with an Aqueous Mounting Medium (Fluoromount, SIGMA). MDCK cells were grown

134 on coverslips to confluence in DMEM-F12 medium supplemented with L-Glutamine,
135 15 mM HEPES and antibiotics. Cells were washed three times in PBS, and fixed with
136 4% (PFA) for 12 min at RT. After washing with PBS, cells were processed as described
137 above for renal tissue samples. Slides were examined under a Leica TCS-SL confocal
138 microscope (CCiTUB, Biology Unit of Campus of Bellvitge).

139

140 **Treatment with Pronase E, N-glycosidase F, sodium hydroxide (NaOH) and**
141 **detergents.**

142 In a series of experiments, tissue sections were incubated with Pronase E, N-
143 glycosidase F, NaOH or detergents (Triton X-100, sodium deoxycholate and sodium
144 cholate) to assess the nature of the ϵ -prototoxin-GFP binding. To determine whether a
145 protein was directly involved in the binding of ϵ -toxin, sections from mouse kidney
146 were incubated with different concentrations of Pronase E in PBS 0.1 M pH 7.4 (from
147 0.1 to 1 mg/ml) at 37 °C for different times (5, 15, 30 and 60 min).

148 N-glycosidase F was used to hydrolyze N-glycan chains from glycoconjugates to
149 verify the possible participation of N-glycidic residues in the binding of ϵ -toxin
150 (Desantis et al., 2006). Kidney sections were incubated with 100 U/ml of N-glycosidase
151 F overnight at 37 °C in 20 mM PB, pH 8 with 10 mM EDTA. To evaluate the possible
152 participation of O-glycidic residues in the binding of ϵ -toxin, beta-elimination treatment
153 with 0.055 N NaOH in water at 37 °C for different times (1, 3, 24, 48, 72 and 120 h)
154 was used. In this case sections were obtained and analyzed from mouse, cow, goat,
155 sheep and human kidneys and from mouse, cow, goat and sheep bladders.

156 To assess the sensitivity of ϵ -prototoxin-GFP to detergents, sections from mouse
157 kidney were incubated with Triton X-100, sodium deoxycholate and sodium cholate at

158 different concentrations (0.1, 0.5, 1 and 2%) in 20 mM PB pH 8 with 10 mM EDTA for
159 1 h at different temperatures (4 °C, RT or 37 °C).

160 After the treatments, the sections were washed three times with PBS at RT and
161 incubated with ϵ -prototoxin-GFP and/or lectins as described above. In the case of
162 NaOH treatment, the reaction was stopped adding 0.055 N sulfuric acid for 30 sec
163 before the PBS washes. Depending on the treatment, controls were performed by
164 omitting Pronase E, N-glycosidase F, NaOH or detergents in the incubation buffer.

165 In the case of MDCK cells, the treatments were performed in the same conditions as
166 in tissue sections.

167

168 **ELISA assay to detect the sensibility of the ϵ -prototoxin-GFP binding.**

169 MDCK cells were grown on 96-well plates (Techno Plastic Products, TPP) to
170 confluence, washed three times in PBS, and fixed with 4% PFA, washed with PBS and
171 incubated in PBS containing 3% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at RT. After
172 washing with PBS, the cells were incubated with increasing concentrations (0, 0.2, 0.4,
173 0.8, 2, 4, 8, 20, 40, 100 nM) of ϵ -prototoxin-GFP in PBS containing 1% BSA for 1 h at
174 RT. After four washes in PBS, cells were incubated with anti-GFP rabbit polyclonal
175 antibody (1:1000 dilution) in PBS containing 1% BSA for 1h RT. After four washes in
176 PBS, cells were incubated with (1:1000 dilution) anti-rabbit immunoglobulins
177 conjugated to horseradish peroxidase (DAKO, Glostrup, Denmark) in PBS containing
178 1% BSA for 1h RT. Finally, after four washes in PBS cells were developed using the
179 OPD (*o*-Phenylenediamine dihydrochloride) tablets (SIGMAFAST OPD) to detect the
180 peroxidase activity. Absorbance was measured in a spectrofotometer (ASYS) at 450
181 nm.

182 Non specific binding was determined by preincubating the cells with an excess of
183 recombinant non labeled ϵ -prototoxin (2 μ M, corresponding to a 50 times the maxim ϵ -
184 prototoxin-GFP or ϵ -toxin-GFP concentration used) for 30 min and before the
185 increasing concentrations of ϵ -prototoxin-GFP were added. Specific binding was
186 calculated by subtraction of non-specific binding from total binding. As a negative
187 control, the experiment was performed using increased concentrations of GFP instead of
188 ϵ -prototoxin-GFP.

189 Standards were performed by adding different amounts of ϵ -prototoxin-GFP (0, 0.2,
190 0.4, 0.8, 2, 4, 8, 20, 40, 100 ng) to empty wells for 1 h at RT. After washing three times
191 with PBS, wells were processed as described above but omitting the native ϵ -prototoxin
192 and ϵ -prototoxin-GFP co-incubations.

193 In some experiments ϵ -toxin-GFP was used instead of ϵ -prototoxin-GFP and non
194 labeled ϵ -toxin in excess was used to calculate the nonspecific binding.

195 The results were subjected to nonlinear regression analysis using Graph Pad Prism 3
196 software, and K_d and B_{max} were calculated.

197 To characterize the effect of NaOH and detergents on the binding of ϵ -prototoxin-
198 GFP, MDCK cells were grown on 96-well plates to confluence, washed three times in
199 PBS, and fixed with 4% PFA. To study the effect of NaOH, cells were treated with
200 0.055 N NaOH for 6 h at 37°C. The reaction was stopped by adding 0.055 N H_2SO_4 for
201 30 sec in each well. To study the effect of detergents, cells were treated with 2 and 1%
202 sodium cholate at 4 °C for 1h. In both cases, after three washes in PBS, cells were
203 processed as described above and analysed by the same software.

204 SigmaStat (version 2.0) was used for statistical analysis. Results were expressed as
205 means \pm standard deviations of at least four independent determinations. Significant

206 differences were calculated using the paired Student's *t*-test with $p < 0.01$ being
207 considered to indicate statistical significance.

208

209 **RESULTS**

210 **Binding of ϵ -toxin-GFP and ϵ -prototoxin-GFP to MDCK cells.**

211 An ELISA based assay was performed to characterize and determine the specificity
212 and constants of ϵ -prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP binding on MDCK cells.

213 Scatchard analysis of the data demonstrates that ϵ -prototoxin-GFP binds to a single
214 pool of binding sites with an equilibrium dissociation constant (K_d) of 3.8 ± 1.9 nM and
215 a maximal binding (B_{max}) of 67.3 ± 10.2 pmol/mg of protein (Fig. 1 A).

216 Although similar parameters for K_d were found for ϵ -toxin-GFP, the number of
217 binding sites (B_{max}) was significantly increased up to three-fold for ϵ -toxin-GFP
218 compared to ϵ -prototoxin-GFP (Fig. 1 B). This ELISA assay was further used to
219 characterize and quantify the binding of ϵ -prototoxin-GFP to MDCK cells after some
220 treatments (shown ahead) used to characterize the binding of ϵ -prototoxin-GFP on
221 MDCK and renal tissue.

222

223 **Characterization of ϵ -prototoxin-GFP binding sites to MDCK cells.**

224 To further characterize the nature of the interaction of ϵ -toxin and ϵ -prototoxin with
225 MDCK cells, a series of experiments were performed using ϵ -toxin-GFP and ϵ -
226 prototoxin-GFP, and different treatments as detergent incubations, N-glycosidase F
227 digestion and β -elimination.

228 Some treatments with detergents at different temperatures (4 °C, RT and 37 °C)
229 were performed on PFA fixed MDCK cells to study the effect on the ϵ -prototoxin-GFP
230 binding. A decrease in the ϵ -prototoxin-GFP binding was observed at any temperature

231 by incubating the cells with sodium deoxycholate or Triton X-100 at 2%. The binding
232 of ϵ -prototoxin-GFP after 2% of sodium cholate treatment at 4 °C was not affected
233 compared to the control (Fig. 2). Although no variations in K_d were detected on the
234 binding of ϵ -prototoxin-GFP to MDCK cells after 1% of sodium cholate treatment at 4
235 °C, a two-fold increase in B_{max} was detected under these conditions (Fig. S-1 A).
236 However, there was an important decrease in the ϵ -prototoxin-GFP binding after a
237 treatment with 2% of sodium cholate at RT and 37 °C, similarly to the other detergents
238 tested (Fig. 2).

239 β -elimination treatment for 1 h, abolish the binding of ϵ -prototoxin-GFP to the
240 plasma membrane in MDCK cells (compare Fig. 3 A with D). Consequently, the
241 binding of *Arachis hypogaea* (PNA), a lectin which recognizes O-glycans, was
242 abolished (compare Fig. 3 B with E) while the binding of *Datura stramonium* (DSA),
243 used for N-glycan detection, was increased (compare Fig. 3 C with F). Similar results
244 were obtained labeling the cells with *Canavalia ensiformis* lectin (ConA), a lectin that
245 binds N-glycans (not shown). Moreover, after N-glycosidase F treatment the binding of
246 ϵ -prototoxin-GFP and PNA did not change compared to the control (compare Fig. 3 A
247 with G, and Fig. 3 B with H, respectively) but the binding of DSA was significantly
248 reduced after the enzymatic action (compare Fig. 3 C with I).

249 The binding of ϵ -prototoxin-GFP to MDCK cells after β -elimination treatment was
250 quantified using the ELISA assay. While no variations in K_d was detected (K_d 3.3 ± 2.3
251 nM) a decrease around 95% in the B_{max} was observed (B_{max} 3.4 ± 0.62 pmol/mg of
252 protein, (Fig. S-1 B), in agreement with the images shown above (Fig. 3).

253
254
255

256 **ϵ -Prototoxin-GFP binding sites in mouse kidney and bladder.**

257 In addition to MDCK cell line, mice have been widely used to study the effect of ϵ -
258 toxin and provide a useful model for laboratory controlled intoxication studies
259 (Fernandez-Miyakawa et al., 2007a; Fernandez-Miyakawa et al., 2008; Fernandez-
260 Miyakawa et al., 2007b; Finnie, 1984a, b).

261 As in the case of the MDCK cell line, some lectins, which specifically bind different
262 kidney structures, were initially used to analyze the binding of ϵ -prototoxin-GFP to
263 renal tubules. The lectins used in this study (DSA, PNA and DBA) have shown an
264 specific distribution labeling in mouse renal tissue (Egea et al., 1989; Hanai et al., 1994;
265 Laitinen et al., 1987). DSA binds to podocytes, endothelium and with a high intensity to
266 the mesangium of the glomerulus. It also binds to proximal tubules and with a lower
267 intensity to distal tubules (Egea et al., 1989; Laitinen et al., 1987). PNA binds to
268 proximal, distal and with a higher intensity to collecting tubules while DBA only labels
269 collecting tubules (Laitinen et al., 1987).

270 Double staining with the lectins and ϵ -prototoxin-GFP of kidney cryosections
271 revealed that the ϵ -prototoxin-GFP binding was detected both in distal and collecting
272 tubules (Fig. S-2 D-F for PNA lectin and Fig. S-2 G-I for DBA lectin), and was absent
273 in the proximal tubules of the mouse kidney (Fig. S-2 A-C for DSA lectin).

274 The binding of ϵ -prototoxin-GFP to distal and collecting tubules prompted us to
275 check the putative binding to the rest of urinary system. Incubations of ϵ -prototoxin-
276 GFP on bladder cryosections revealed its binding to the urothelium (Fig. 4 A). To
277 further characterize the nature of this interaction in urinary system we performed a
278 series of experiments using Pronase E, detergents, N-glycosidase F and β -elimination as
279 in MDCK cells.

280 Slices from mouse urinary bladder (Fig. 4 A-B) and kidney (Fig. 4 C-F) were
281 previously incubated with Pronase E in order to enzymatically remove a possible
282 protein receptor component for the toxin. In this case, the binding of ϵ -prototoxin-GFP
283 to epithelial cells from the bladder (Fig. 4 B) and kidney distal tubules (Fig. 4 D and F)
284 was clearly decreased compared to the control non-treated bladder and kidney slices.

285 The effect of the detergents used on mouse kidney sections at different
286 concentrations and temperatures is summarized in table 2, where plus sign (+) indicates
287 an increase in the binding of ϵ -prototoxin-GFP, minus sign (-) indicates a decrease and
288 equal sign indicates no variation in the binding compared to non treated controls.

289 Finally, to check if any glucidic chains are involved in the binding of ϵ -prototoxin-
290 GFP, cryosections were incubated with N-glycosidase F or with NaOH (β -elimination)
291 in order to remove the N- or O- glycans respectively, as explained previously.

292 After β -elimination the binding of ϵ -prototoxin-GFP to distal tubules from the renal
293 cortex (Fig. 5, A and G) was clearly decreased (Fig. 5, D and J) compared to the control
294 non-treated. Moreover, similarly to the results obtained with MDCK cells, the binding
295 of DSA lectin to distal tubules was increased after the β -elimination (Fig. 5, B and E)
296 while the binding with PNA lectin was decreased (Fig. 5, H and K). In addition, the
297 binding of ϵ -prototoxin-GFP to the epithelial cells from the mouse bladder after β -
298 elimination treatment was also decreased compared to the control non-treated (Fig. S-3).
299 Finally, there was not change in the binding of ϵ -prototoxin-GFP to distal tubules in
300 mouse kidney sections after N-glycosidase F treatment, confirming the role of O-
301 glycan, but not N-glycan, chains in the binding of ϵ -prototoxin-GFP (Fig. S-4).

302 Similarly to the results shown for mouse kidney, the binding of ϵ -prototoxin-GFP to
303 distal tubules in cow (Fig. 6A and B), goat (Fig. 6C and D), sheep (Fig. 6E and F) and

304 human (Fig. 6G and H) kidney was decreased after β -elimination compared to the non-
305 treated control (Fig. 6).

306

307 **DISCUSSION**

308 We previously demonstrated that recombinant ϵ -prototoxin-GFP was a convenient
309 tool to study the toxin binding mechanisms since it binds to the same sites as does the
310 active toxin, but without damaging and cytotoxic effects. In this study we used the
311 recombinant ϵ -prototoxin-GFP to further analyze the nature of ϵ -toxin binding sites in
312 MDCK cells and mouse kidney cryosections. Moreover, an ELISA based method was
313 successfully developed to characterize the binding of ϵ -toxin and ϵ -prototoxin to the
314 MDCK cell line. We previously showed that ϵ -prototoxin-GFP specifically binds to
315 distal tubules in mouse renal tissue (Soler-Jover et al., 2004). In the present report we
316 show that the binding is not restricted to distal tubules but it is also detected in
317 collecting tubules and in the bladder urothelium, suggesting the presence of an ϵ -toxin
318 receptor in all these regions of the renal system. Besides, experiments on kidney
319 cryoslices confirmed the specific binding to distal tubule cells of a range of species.

320 Saturation studies in MDCK cells with ϵ -prototoxin-GFP revealed the presence of a
321 high affinity single binding site with a dissociation constant (K_d) around 4 nM and a
322 B_{max} around 67 pmol/mg.

323 The binding of ϵ -toxin-GFP to MDCK cells showed the same affinity parameter but
324 up to three-fold increase in B_{max} compared to ϵ -prototoxin-GFP. This result could be in
325 accordance with the property of ϵ -toxin to form heptamer aggregates after binding to its
326 receptor and once in the plasma membrane, a condition not shown for ϵ -prototoxin.

327 After β -elimination treatment, the K_d did not change but the B_{max} was reduced
328 around 95% compared to the control situation, in accordance with the results obtained

329 with ϵ -prototoxin-GFP and confocal microscopy supporting the involvement of a O-
330 glycoconjugate in the recognition process. The specific combination of carbohydrate/s
331 involved in ϵ -toxin binding is still under study.

332 All together, saturation studies and the enzymatic and detergent (see below)
333 treatments in MDCK cells, are in partial agreement with previous data on the binding of
334 ^{125}I - ϵ -toxin to rat brain homogenates and synaptosomal fractions, where the binding was
335 partially sensitive to Pronase E and neuraminidase and completely abolished by lipase.
336 Furthermore, ^{125}I - ϵ -toxin showed high affinity to rat brain homogenates and
337 synaptosomal membrane fractions, having single binding phases with a K_d of 2.5 and
338 3.3 nM, respectively and a B_{max} of 9 and 25 pmol/mg, respectively (Nagahama and
339 Sakurai, 1992), closer to the parameters shown here in K_d for MDCK cells and
340 suggesting the existence of a unique receptor for ϵ -toxin on different tissues, but with a
341 higher number of receptors in renal system as it is shown by increased levels in B_{max} in
342 MDCK cells.

343 To check if the plasma membrane integrity was involved in the ϵ -prototoxin-GFP
344 binding, MDCK cell and mouse kidney sections were incubated with several detergents
345 under different concentration and temperature conditions. While in most of the
346 conditions the ϵ -prototoxin-GFP binding was reduced with detergent concentrations
347 above 0.5%, the binding increased after sodium cholate treatment (at 4 °C in MDCK
348 cells and at RT and 37 °C in kidney cryosections), suggesting that, under the condition
349 used, sodium cholate unmask ϵ -toxin binding sites in the renal system. The effect of
350 detergents increasing receptor availability has been previously shown in several models
351 (Koppelman and Dufau, 1982). Basically detergents would make occluded receptors,
352 not exposed to cell surface, accessible to the ligand (Mello et al., 1980; Pilch et al.,
353 1983). Thus, data from detergent treatments suggest the importance of an adequate lipid

354 environment to preserve the capacity of MDCK cells to bind ϵ -toxin, and that a
355 detergent treatment with a high critical micellar concentration (CMC) point may
356 increase their binding capacity in comparison to other detergents with lower CMC.
357 Although the existence of an occluded intracellular pool of receptors should not be
358 discarded as binding parameters suggest (sodium cholate doubles the number of
359 available binding sites), a direct effect of sodium cholate on the ϵ -toxin receptor
360 increasing its binding capacity could be considered.

361 ϵ -Toxin binding was also studied in renal tissues from ϵ -toxin sensitive animal
362 models (cow, sheep and goat). Kidney and bladder cryosections were used for β -
363 elimination treatment, similarly to the mouse kidney and bladder cryosections shown
364 above but with longer period treatments. Besides, in bladder sections of these species
365 we also observed a significant reduction of ϵ -prototoxin-GFP binding after β -
366 elimination treatment (not shown). Moreover, the behaviour of the ϵ -toxin tested in
367 human kidney cryosections after β -elimination treatment was similar to the other
368 species, suggesting that the same receptor found in the species tested may be present in
369 the human renal system.

370

371 **CONCLUSIONS**

372 Fusion proteins ϵ -toxin-GFP and ϵ -prototoxin-GFP have been revealed as useful
373 tools to study the cellular and molecular cytotoxic mechanism of ϵ -toxin. In the present
374 report, these fusion proteins have been used to demonstrate the presence of a single high
375 affinity binding site to the MDCK cell line, the most sensitive cellular model to the
376 toxin. Morphological approaches using ϵ -prototoxin-GFP showed the presence of a O-
377 glycosilated protein as a candidate for the receptor of ϵ -toxin in the renal system of all
378 mammalian species tested. Altogether, the results help to understand the first steps in

379 the intoxication pathway of ϵ -toxin and may serve as a basis for preventive or even
380 therapeutic approaches in the treatment of ϵ -toxin intoxication, by interfering in its first
381 step of cytotoxic activity.

382

383 **ACKNOWLEDGEMENTS**

384 The authors thank Dr. Michel Popoff of the Institut Pasteur for helpful discussions
385 and Dr. August Vidal of the Pathology Anatomy of the Bellvitge hospital for providing
386 samples. We are also grateful to Biology Unit of CCiTUB of Campus de Bellvitge. This
387 work has been supported by grants SAF 2008/00732 to JB and FIS 00305 to MMS of
388 the Spanish Government.

389

390 **REFERENCES**

391 Buxton, D., 1976, Use of horseradish peroxidase to study the antagonism of *Clostridium*
392 *welchii* (*Cl. perfringens*) type D epsilon toxin in mice by the formalinized epsilon
393 prototoxin. *J Comp Pathol* 86, 67-72.

394 Chassin, C., Bens, M., de Barry, J., Courjaret, R., Bossu, J.L., Cluzeaud, F., Ben
395 Mkaddem, S., Gibert, M., Poulain, B., Popoff, M.R., Vandewalle, A., 2007, Pore-
396 forming epsilon toxin causes membrane permeabilization and rapid ATP depletion-
397 mediated cell death in renal collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 293,
398 F927-937.

399 Desantis, S., Ventriglia, G., Zubani, D., Deflorio, M., Megalofonou, P., Acone, F.,
400 Zarrilli, A., Palmieri, G., De Metrio, G., 2006, Histochemical analysis of
401 glycoconjugates in the domestic cat testis. *Histol Histopathol* 21, 11-22.

402 Dorca-Arevalo, J., Soler-Jover, A., Gibert, M., Popoff, M.R., Martin-Satue, M., Blasi,
403 J., 2008, Binding of epsilon-toxin from *Clostridium perfringens* in the nervous
404 system. *Vet Microbiol* 131, 14-25.

405 Egea, G., Goldstein, I.J., Roth, J., 1989, Light and electron microscopic detection of (3
406 Gal beta 1,4 GlcNAc beta 1) sequences in asparagine-linked oligosaccharides with
407 the *Datura stramonium* lectin. *Histochemistry* 92, 515-522.

408 Fernandez-Miyakawa, M.E., Fisher, D.J., Poon, R., Sayeed, S., Adams, V., Rood, J.I.,
409 McClane, B.A., Uzal, F.A., 2007a, Both epsilon-toxin and beta-toxin are important
410 for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse
411 intravenous injection model. *Infect Immun* 75, 1443-1452.

412 Fernandez-Miyakawa, M.E., Jost, B.H., Billington, S.J., Uzal, F.A., 2008, Lethal effects
413 of *Clostridium perfringens* epsilon toxin are potentiated by alpha and perfringolysin-
414 O toxins in a mouse model. *Vet Microbiol* 127, 379-385.

415 Fernandez-Miyakawa, M.E., Sayeed, S., Fisher, D.J., Poon, R., Adams, V., Rood, J.I.,
416 McClane, B.A., Saputo, J., Uzal, F.A., 2007b, Development and application of an
417 oral challenge mouse model for studying *Clostridium perfringens* type D infection.
418 *Infect Immun* 75, 4282-4288.

419 Finnie, J.W., 1984a, Histopathological changes in the brain of mice given *Clostridium*
420 *perfringens* type D epsilon toxin. *J Comp Pathol* 94, 363-370.

421 Finnie, J.W., 1984b, Ultrastructural changes in the brain of mice given *Clostridium*
422 *perfringens* type D epsilon toxin. *J Comp Pathol* 94, 445-452.

423 Hanai, T., Usuda, N., Morita, T., Nagata, T., 1994, Light microscopic lectin
424 histochemistry in aging mouse kidney: study of compositional changes in
425 glycoconjugates. *J Histochem Cytochem* 42, 897-906.

426 Ivie, S.E., Fennessey, C.M., Sheng, J., Rubin, D.H., McClain, M.S., Gene-trap
427 mutagenesis identifies mammalian genes contributing to intoxication by *Clostridium*
428 *perfringens* epsilon-toxin. *PLoS One* 6, e17787.

429 Koppelman, M.C., Dufau, M.L., 1982, Prolactin receptors in luteinized rat ovaries:
430 unmasking of specific binding sites with detergent treatment. *Endocrinology* 111,
431 1350-1357.

432 Laitinen, L., Virtanen, I., Saxen, L., 1987, Changes in the glycosylation pattern during
433 embryonic development of mouse kidney as revealed with lectin conjugates. *J*
434 *Histochem Cytochem* 35, 55-65.

435 Lindsay, C.D., 1996, Assessment of aspects of the toxicity of *Clostridium perfringens*
436 epsilon-toxin using the MDCK cell line. *Hum Exp Toxicol* 15, 904-908.

437 Mello, R.J., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Anderson, R.G., 1980, LDL receptors in
438 coated vesicles isolated from bovine adrenal cortex: binding sites unmasked by
439 detergent treatment. *Cell* 20, 829-837.

440 Minami, J., Katayama, S., Matsushita, O., Matsushita, C., Okabe, A., 1997, Lambda-
441 toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by
442 releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiol Immunol* 41, 527-535.

443 Miyamoto, O., Minami, J., Toyoshima, T., Nakamura, T., Masada, T., Nagao, S., Negi,
444 T., Itano, T., Okabe, A., 1998, Neurotoxicity of *Clostridium perfringens* epsilon-
445 toxin for the rat hippocampus via the glutamatergic system. *Infect Immun* 66, 2501-
446 2508.

447 Nagahama, M., Sakurai, J., 1992, High-affinity binding of *Clostridium perfringens*
448 epsilon-toxin to rat brain. *Infect Immun* 60, 1237-1240.

449 Payne, D.W., Williamson, E.D., Havard, H., Modi, N., Brown, J., 1994, Evaluation of a
450 new cytotoxicity assay for *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *FEMS*
451 *Microbiol Lett* 116, 161-167.

452 Petit, L., Gibert, M., Gillet, D., Laurent-Winter, C., Boquet, P., Popoff, M.R., 1997,
453 *Clostridium perfringens* epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large
454 membrane complex. *J Bacteriol* 179, 6480-6487.

455 Pilch, P.F., Shia, M.A., Benson, R.J., Fine, R.E., 1983, Coated vesicles participate in the
456 receptor-mediated endocytosis of insulin. *J Cell Biol* 96, 133-138.

457 Shimamoto, S., Tamai, E., Matsushita, O., Minami, J., Okabe, A., Miyata, S., 2005,
458 Changes in ganglioside content affect the binding of *Clostridium perfringens*
459 epsilon-toxin to detergent-resistant membranes of Madin-Darby canine kidney cells.
460 *Microbiol Immunol* 49, 245-253.

461 Soler-Jover, A., Blasi, J., Gomez de Aranda, I., Navarro, P., Gibert, M., Popoff, M.R.,
462 Martin-Satue, M., 2004, Effect of epsilon toxin-GFP on MDCK cells and renal
463 tubules in vivo. *J Histochem Cytochem* 52, 931-942.

464 Soler-Jover, A., Dorca, J., Popoff, M.R., Gibert, M., Saura, J., Tusell, J.M., Serratos,
465 J., Blasi, J., Martin-Satue, M., 2007, Distribution of *Clostridium perfringens* epsilon
466 toxin in the brains of acutely intoxicated mice and its effect upon glial cells.
467 *Toxicon* 50, 530-540.

468 Tamai, E., Ishida, T., Miyata, S., Matsushita, O., Suda, H., Kobayashi, S., Sonobe, H.,
469 Okabe, A., 2003, Accumulation of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the
470 mouse kidney and its possible biological significance. *Infect Immun* 71, 5371-5375.
471
472
473

474 **FIGURE CAPTIONS**

475 **Fig. 1.** Binding of ϵ -prototoxin-GFP (A) or ϵ -toxin-GFP (B) on MDCK cells. A 96-
476 well plate was used to seed the cells at confluence (0.8 to 1.8 μ g of protein/well as
477 detected by Bradford protein assay). Cells were fixed and incubated in PBS-BSA 1%
478 with increasing concentrations of ϵ -prototoxin-GFP or ϵ -toxin-GFP. To determine the
479 level of the specific binding, cells were preincubated with unlabeled ϵ -prototoxin (A) or
480 ϵ -toxin (B) for 30 min prior to the addition of the ϵ -prototoxin-GFP or ϵ -toxin-GFP
481 respectively. The dissociation constant (K_d) was 3.8 ± 1.9 nM and 5.8 ± 4.7 nM for ϵ -
482 prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP respectively. The number of binding sites (B_{max}) was
483 67.3 ± 10.2 pmol/mg and 201 ± 49 pmol/mg for ϵ -prototoxin-GFP and ϵ -toxin-GFP
484 respectively. Note a similar K_d but a significant three-fold increase in B_{max} in the ϵ -
485 toxin-GFP condition compared to ϵ -prototoxin-GFP ($p = 0.002$). The insets show the
486 Scatchard plot calculated using GraphPad Prism 3 software. B/F, bound ϵ -prototoxin-
487 GFP/free ϵ -prototoxin-GFP.

488

489 **Fig. 2.** Binding of ϵ -prototoxin-GFP on MDCK cells after detergent treatments. Cells
490 were treated at 4 °C (left column), at RT (middle column) or at 37 °C (right column)
491 with 2% Triton X-100 (D-F), 2% sodium cholate (G-I) and 2% sodium deoxycholate (J-
492 L) prior to the ϵ -prototoxin-GFP incubation. Note a complete reduction in ϵ -prototoxin-
493 GFP binding at 2% Triton X-100 and sodium deoxycholate at any condition compared
494 to the control (A-C). No modifications were observed in ϵ -prototoxin-GFP binding at
495 2% sodium cholate at 4 °C (G) but a reduced and spotted pattern and a complete
496 absence of binding of ϵ -prototoxin-GFP was observed after treatment at RT (arrow, H)
497 and 37 °C (I) respectively. Bars correspond to 40 μ m.

498

499 **Fig. 3.** Effect of β -elimination and N-glycosidase F on ϵ -prototoxin-GFP (A, D and
500 G), *Arachis hypogaea* lectin (PNA) (B, E and H) and *Datura stramonium* lectin (DSA)
501 (C, F and I) binding to MDCK cells. Cells were treated with 0.055 N NaOH for 1 h at
502 37 °C (D, E and F) or with N-glycosidase F, overnight at 37 °C (G, H and I). Some cells
503 were treated with buffer (without N-glycosidase F or NaOH) under the same conditions
504 and used as a control (A, B and C). DSA, that recognizes an N-linked glycan (Gal β 1,4
505 GlcNAc) and PNA that recognizes O-linked glycan (Gal β 1-3GalNAc, α -Gal and β -Gal)
506 were used as treatment controls. β -elimination strongly reduces the labeling of ϵ -
507 prototoxin-GFP (D) and PNA (E), but not DSA labeling, which was increased (F). N-
508 glycosidase F reduced the labeling of DSA lectin (I) but not PNA (H) and ϵ -prototoxin-
509 GFP (G) labeling. Bars represent 40 μ m.

510

511 **Fig. 4.** Effect of pronase E on the ϵ -prototoxin-GFP binding to renal system. Mouse
512 urinary bladder (A, B) and kidneys (C-F) sections were preincubated for 30 min at 37
513 °C with 0.5 mg/ml of pronase E (B, D and F) or without the enzyme mixture under the
514 same conditions (A, C and E). Labeling of urothelium (A-B), distal tubules from the
515 renal cortex (C-D) and renal medulla (E-F) by ϵ -prototoxin-GFP was reduced after
516 pronase E treatment. Bars represent 40 μ m.

517

518 **Fig. 5.** Effect of β -elimination on ϵ -prototoxin-GFP binding to mouse kidney
519 sections. Sections from mouse kidneys were treated with 0.055 N NaOH at 37 °C for 1 h
520 (D-F and J-L) or with water under the same conditions as controls (A-C and G-I).
521 Sections were incubated with ϵ -prototoxin-GFP (green in A, C, D, F, G, I, J and L) after
522 preincubation with *Datura stramonium* lectin (DSA) (B, C, E and F) or *Arachis*
523 *hypogaea* lectin (PNA) (H, I, K and L). DSA stains the proximal tubules (arrowheads)

524 and PNA stains the distal and collecting tubules (arrows). Note the reduced labeling by
525 ϵ -prototoxin-GFP (D, F, J and L) and PNA (K and L) but not the labeling by DSA (E
526 and F) which increases after β -elimination treatment. Bars represent 40 μ m.

527

528 **Fig. 6.** Effect of β -elimination on ϵ -prototoxin-GFP binding to distal and collecting
529 tubules from cow, goat, sheep and human kidneys. Sections from cow (A and B), goat
530 (C and D), sheep (E and F) and human (G and H) kidneys were treated overnight with
531 0.055 N NaOH at 37 °C (B, D, F and H) or water under the same conditions, as controls
532 (A, C, E and G). Note the ϵ -prototoxin-GFP binding to distal and collecting tubules in
533 all species (white arrows) in the control situation. The ϵ -prototoxin-GFP binding after
534 the β -elimination treatment was strongly diminished in all species. Bars represent 40 μ m.

535

536 **Fig. S-1.** Binding of ϵ -prototoxin-GFP on MDCK cells after 1% sodium cholate (A)
537 or β -elimination (B) treatments The dissociation constant (K_d) was 1.65 ± 0.81 nM and
538 3.29 ± 2.27 nM after 1% sodium cholate treatment and β -elimination treatments
539 respectively. The number of binding sites (B_{max}) was 115.8 ± 14.91 pmol/mg and $3.4 \pm$
540 0.62 pmol/mg after 1% sodium cholate treatment and β -elimination treatments
541 respectively. Note that the dissociation constant (K_d) was not significantly modified
542 after the two treatments. However, the number of binding sites was increased after 1%
543 sodium cholate ($p = 0.002$) and consistently reduced about 95% after β -elimination ($p \leq$
544 0.001). The insets show the Scatchard plot calculated using GraphPad Prism 3 software.
545 B/F, bound ϵ -prototoxin-GFP/free ϵ -prototoxin-GFP.

546

547 **Fig. S-2.** ϵ -Prototoxin-GFP labeling of distal and collecting tubules in mouse renal
548 sections. ϵ -Prototoxin-GFP binds to renal tubules (in green, A, C, D, F, G and I). *Datura*

549 *stramonium* lectin (DSA) binds to proximal tubules (in red and arrows, B and C).
550 *Arachis hypogaea* lectin (PNA) binds to distal and collecting tubules (arrows) and to
551 proximal tubules (in red and arrowhead, E and F). *Dolichos biflorus* lectin (DBA) binds
552 to collecting tubules (in red and arrow, H and I). Note the colocalization of ϵ -
553 prototoxin-GFP with PNA to distal and collecting tubules (arrows, F) and with DBA to
554 collecting tubules (arrow, I) but not with DSA in proximal tubules (C). Bars represent
555 40 μ m.

556

557 **Fig S-3.** Effect of β -elimination on ϵ -prototoxin-GFP binding to mouse bladder
558 cryosections. A mouse bladder section was treated with 0.055 N NaOH at 37 °C for 1 h
559 (B) or with water at the same conditions as control (A). Note the strong reduction of ϵ -
560 prototoxin-GFP labeling after β -elimination treatment (B) compared to the control
561 situation (A). Bars represent 40 μ m.

562

563 **Fig S-4.** Effect of N-glycosidase F on the binding of ϵ -prototoxin-GFP to distal and
564 collecting tubules. No changes in the binding of ϵ -prototoxin-GFP were observed after
565 N-glycosidase treatment, compared to the control situation (compare A and G with D
566 and J). *Datura stramonium* lectin (DSA) which binds to proximal tubules (arrows, B, C,
567 E and F) and *Arachis hypogaea* lectin (PNA) which binds to distal and collecting
568 tubules (arrows, H, I, K and L) were used as controls for N-glycosidase F activity. Bars
569 represent 40 μ m.

570

Table 1. Specifications of the lectins used in this study.

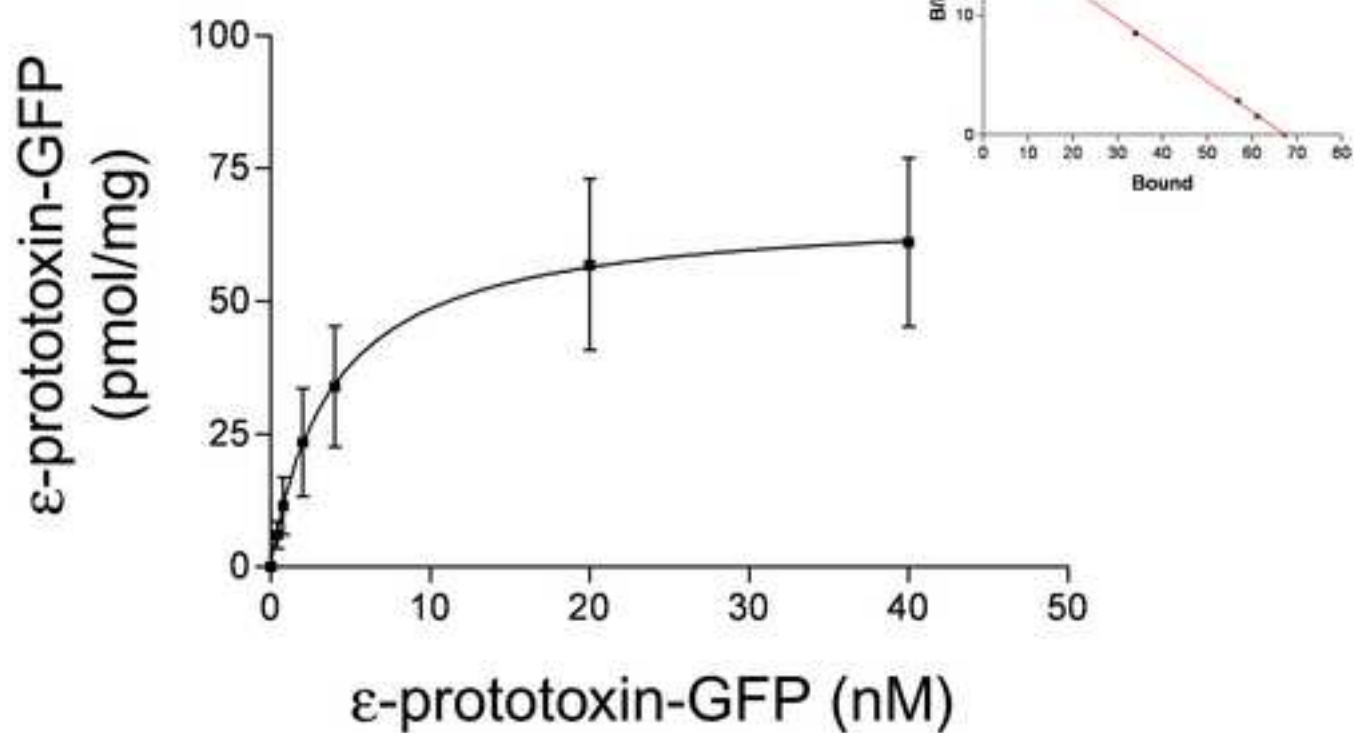
Lectin	Source	Binding specificity	Detects	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Purchased from
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i> agglutinin (Concanavalin A)	α -Man, α -Glc, α -GlcNAc	N-glycans	20	SIGMA
DSA	<i>Datura stramonium</i> agglutinin	Gal β 1-4GlcNAc	N-glycans	10	Vector lab.
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin	α -GalNAc	O-glycans	50	SIGMA
PNA	<i>Arachis hypogaea (peanut)</i> agglutinin	Gal β 1-3GalNAc, α -Gal, β -Gal	O-glycans	50	SIGMA

Table 2. Effect of different detergents on ϵ -prototoxin-GFP binding to distal and collecting tubules at different concentrations and temperatures.

DETERGENT CONCENTRATION	TRITON X-100	SODIUM CHOLATE	SODIUM DEOXYCHOLATE	Temp. °C
0.5%	+	=	=	4°C
	-	=	-	
0.5%	+	=	=	RT
	-	+	-	
0.5%	+	=	+	37°C
	-	+	-	
2%	+	=	=	4°C
	-	=	-	
2%	+	=	=	RT
	-	+	-	
2%	+	=	+	37°C
	-	+	-	

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

A



B

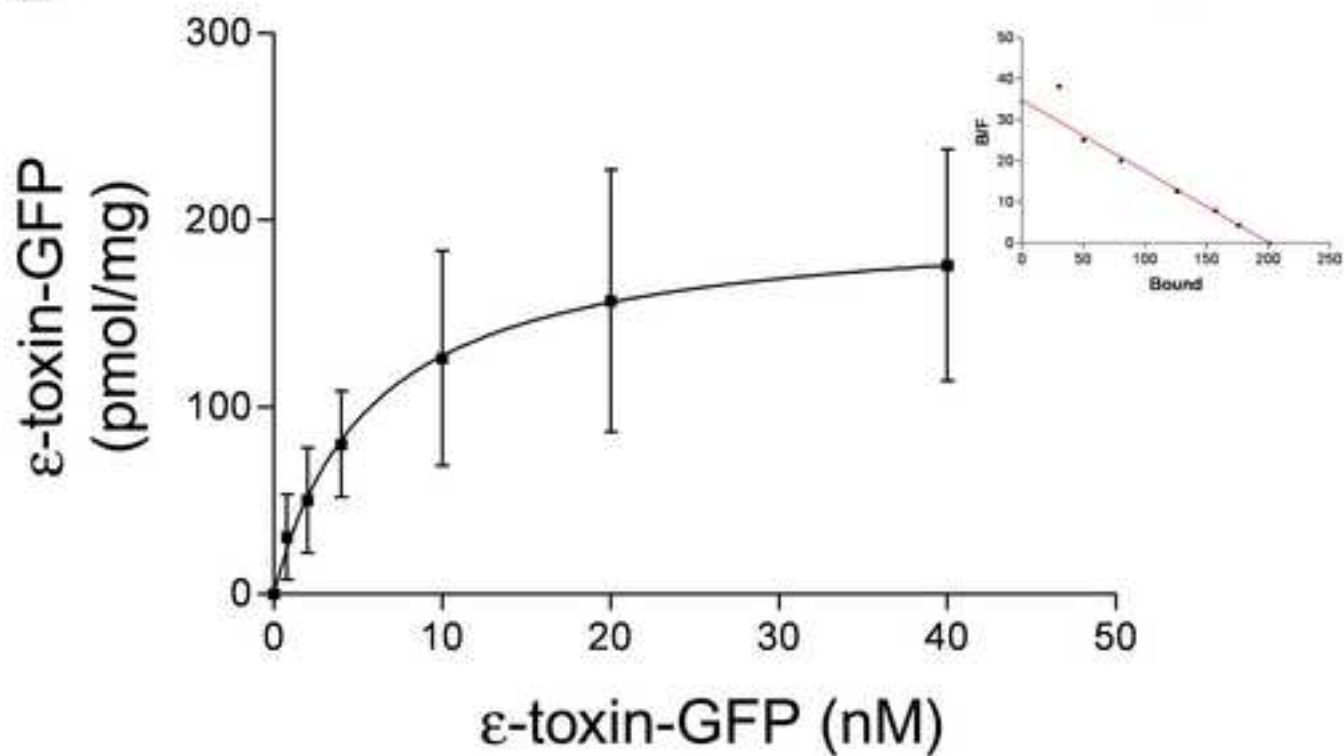


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

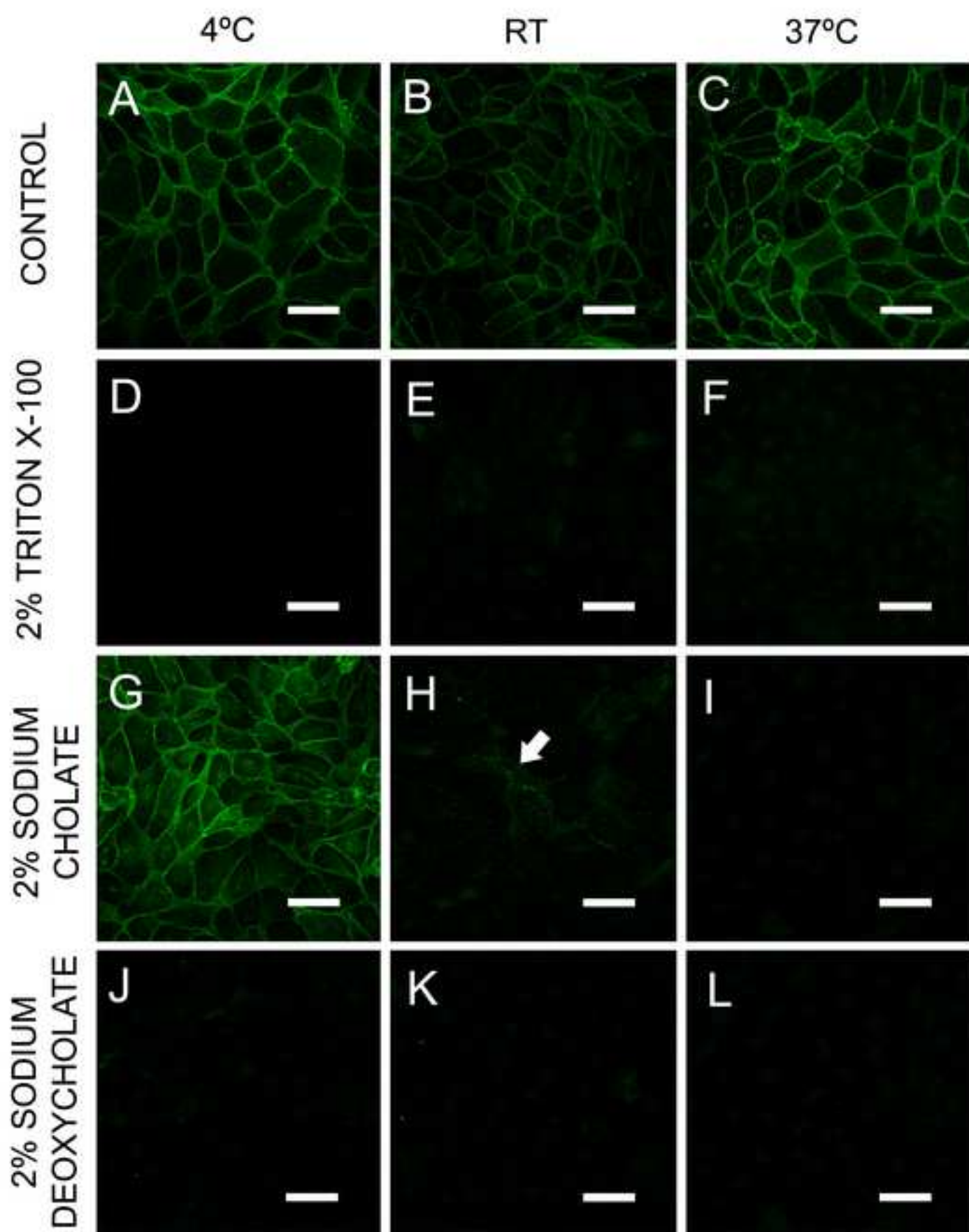


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

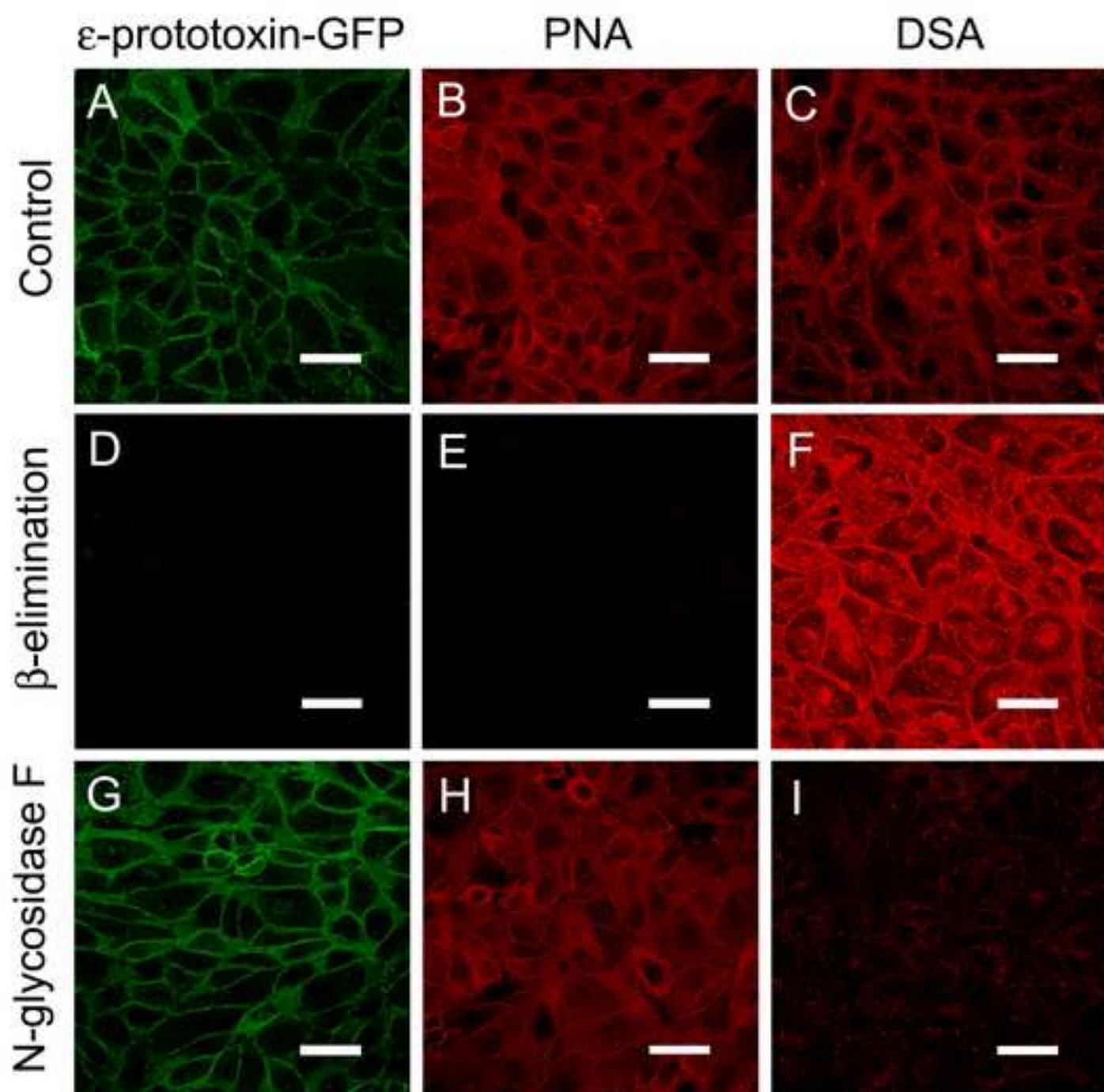


Figure 4

[Click here to download high resolution image](#)

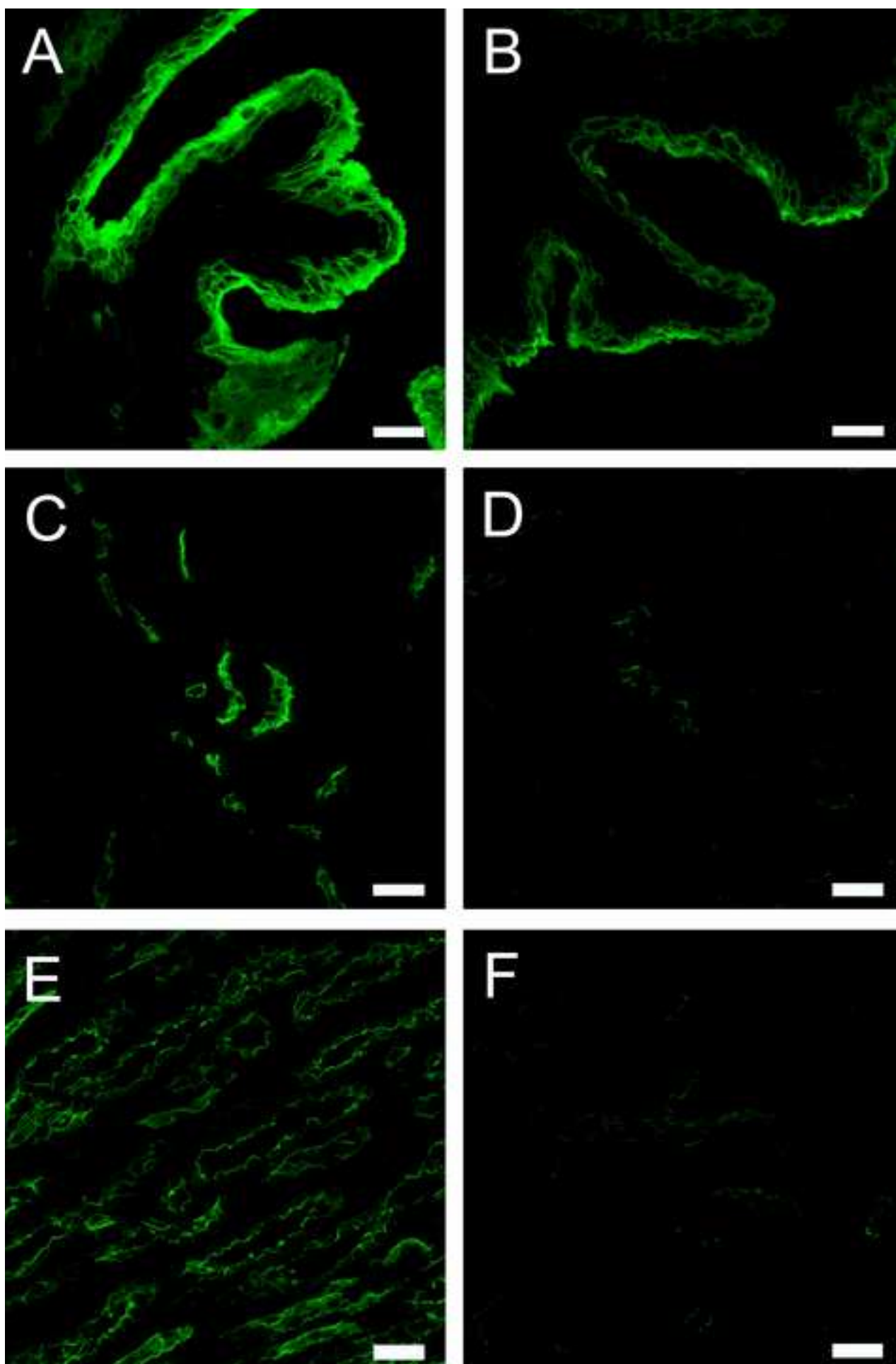


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

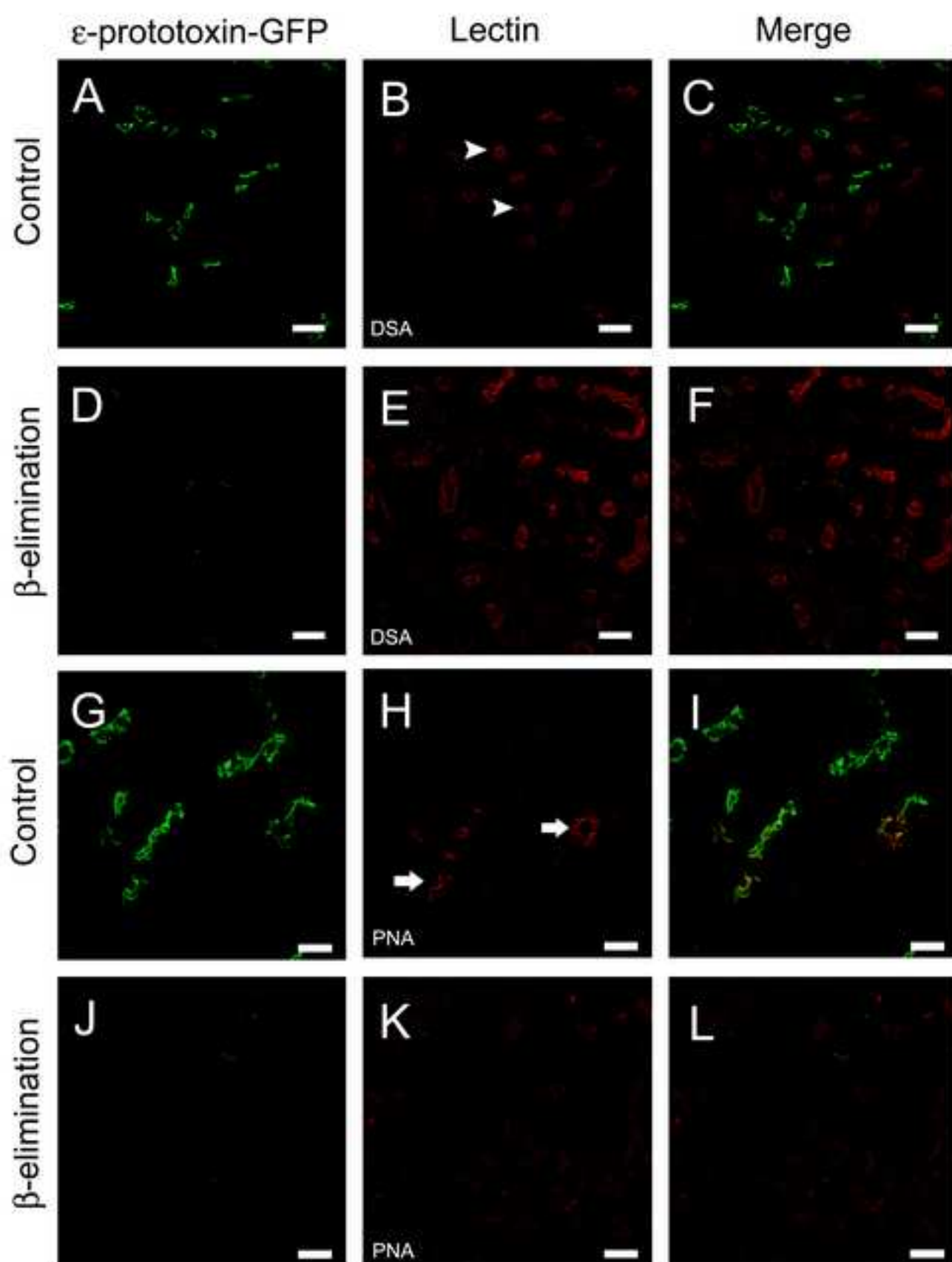
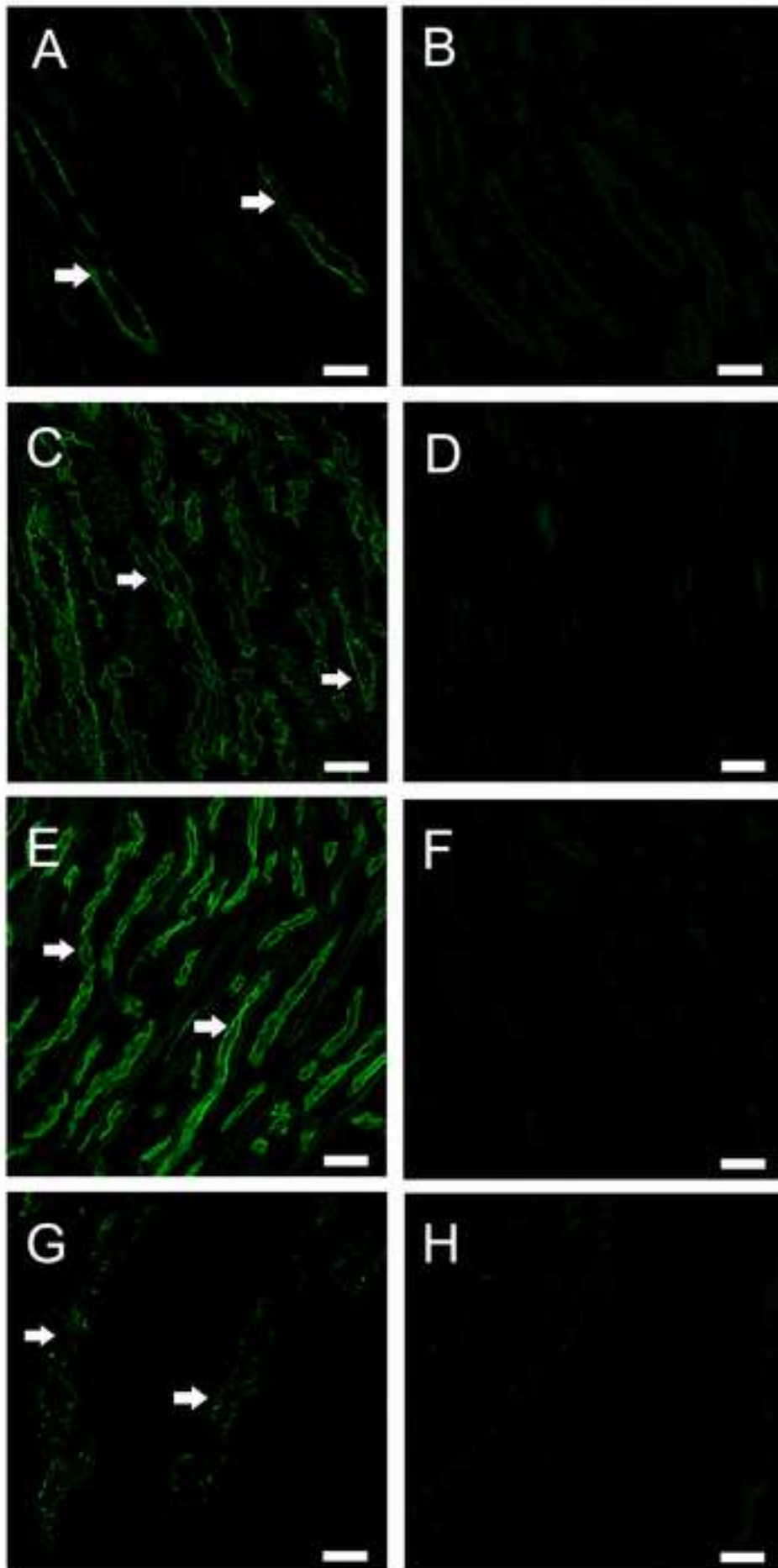
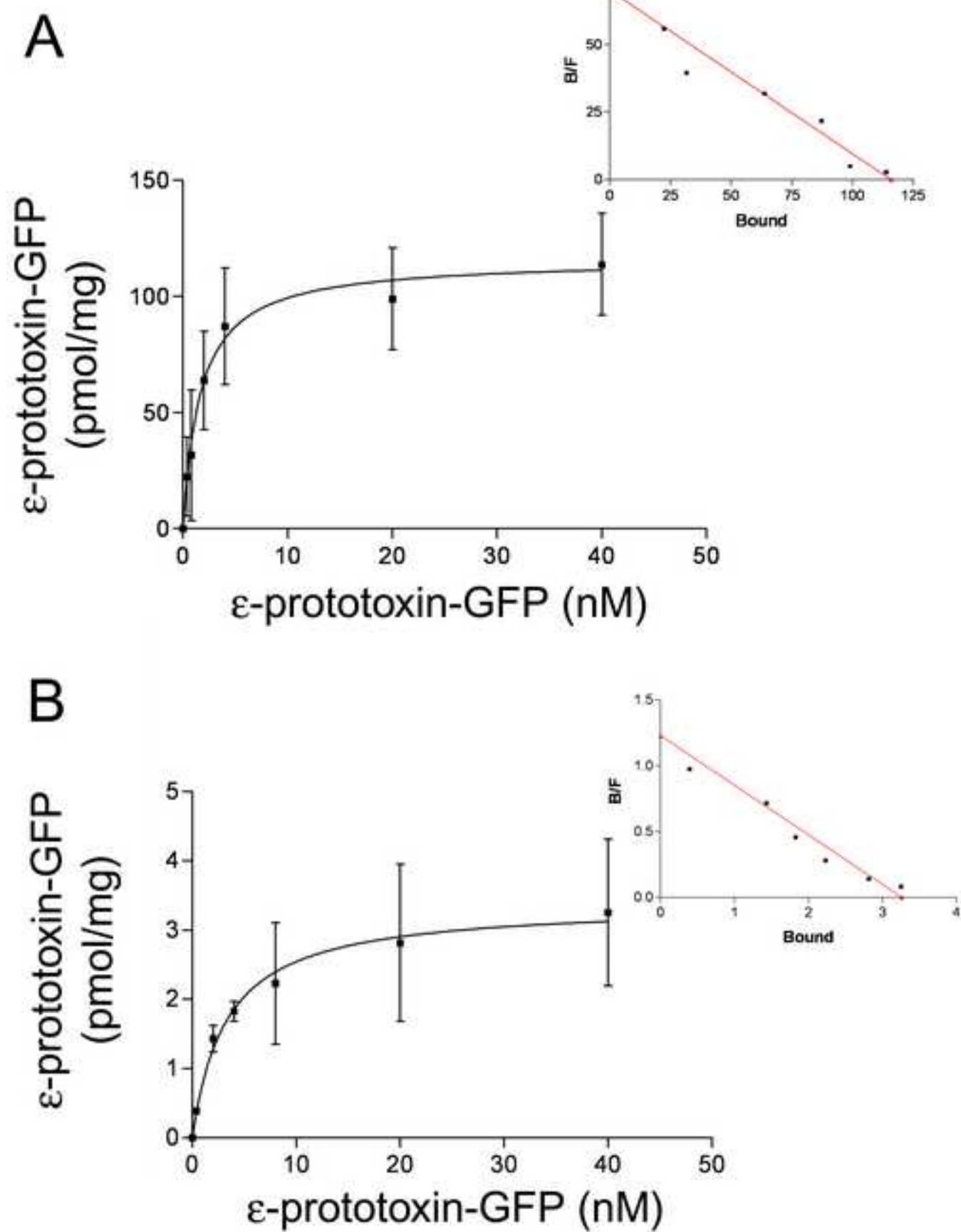
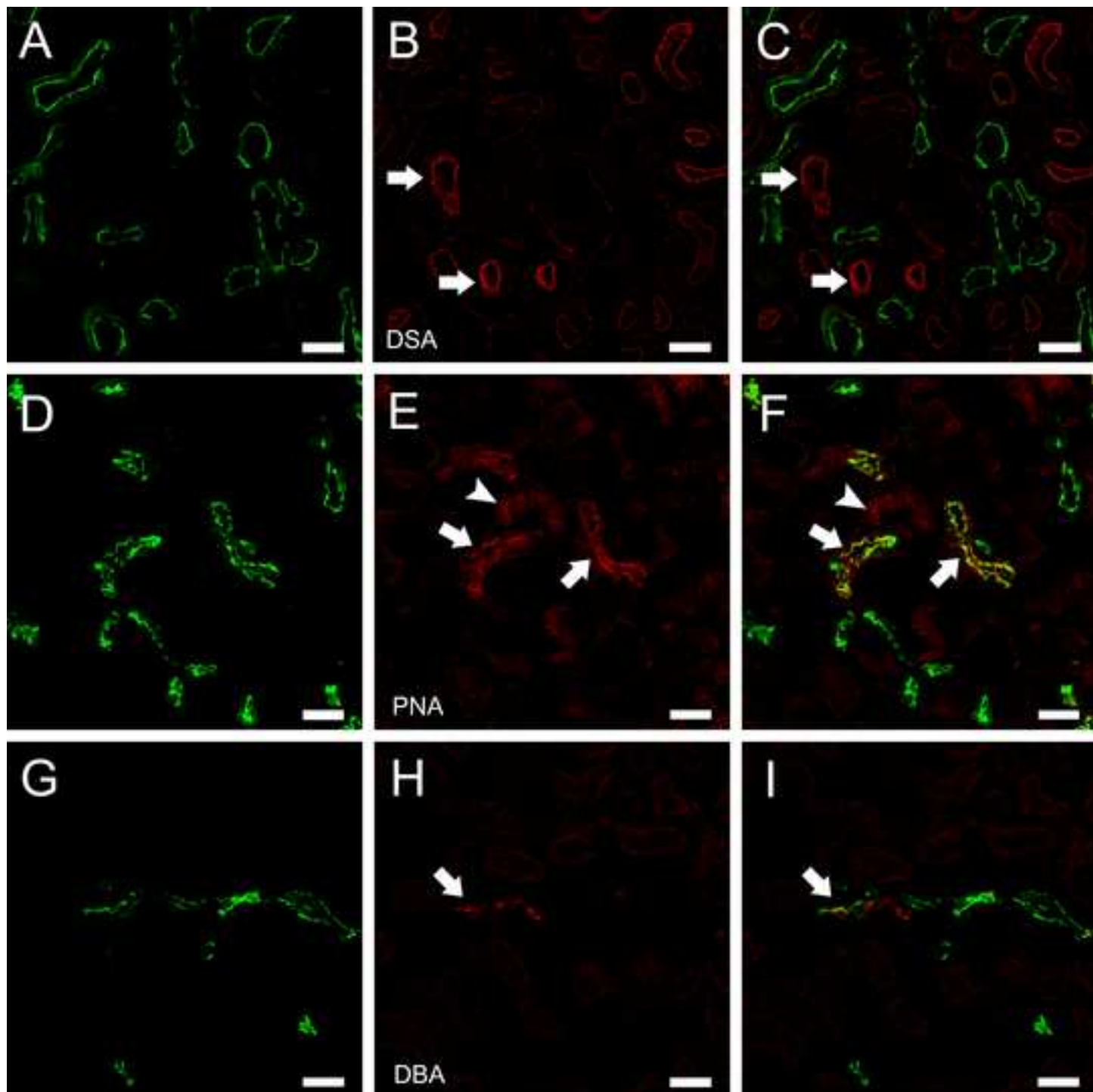
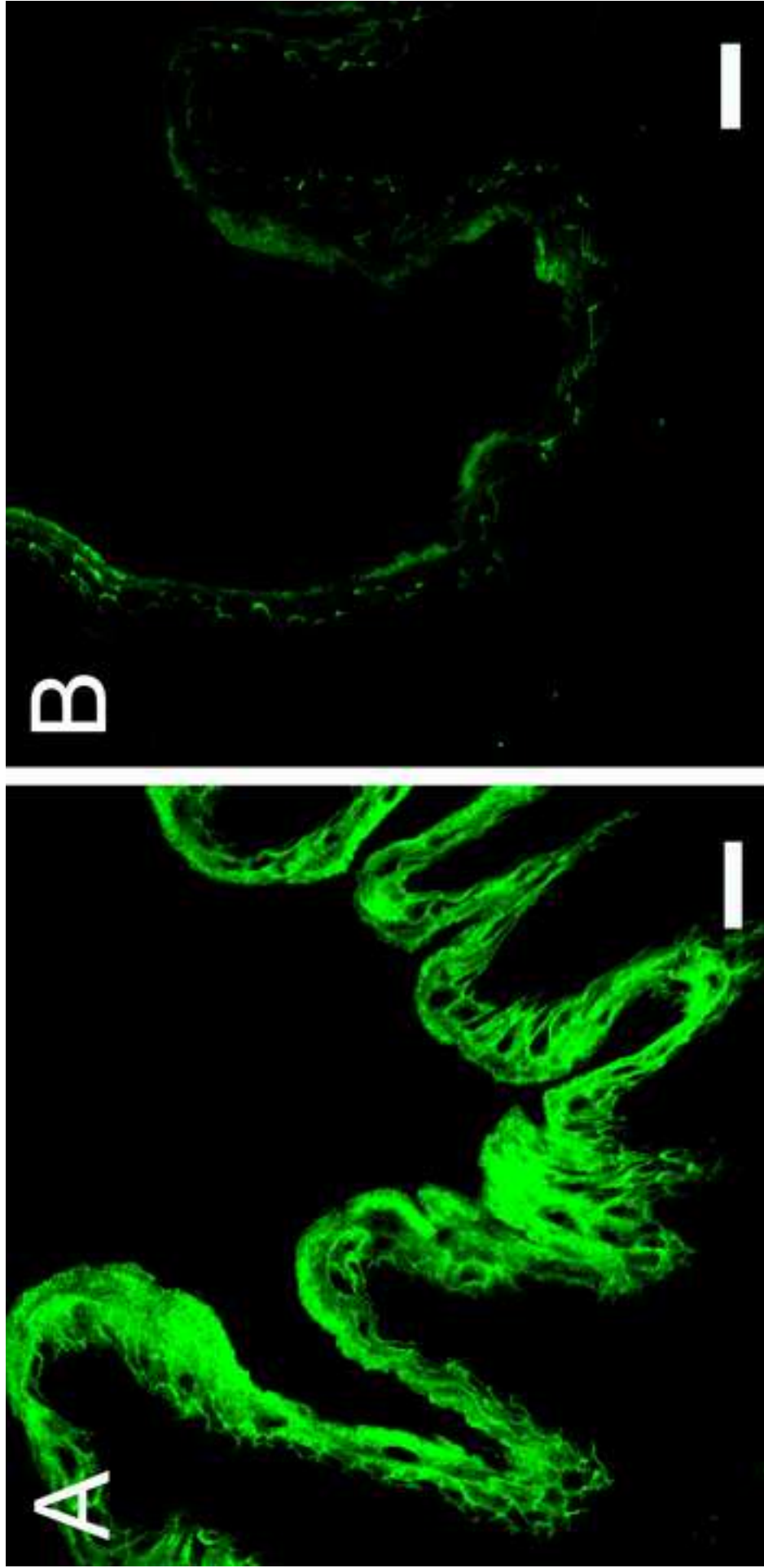


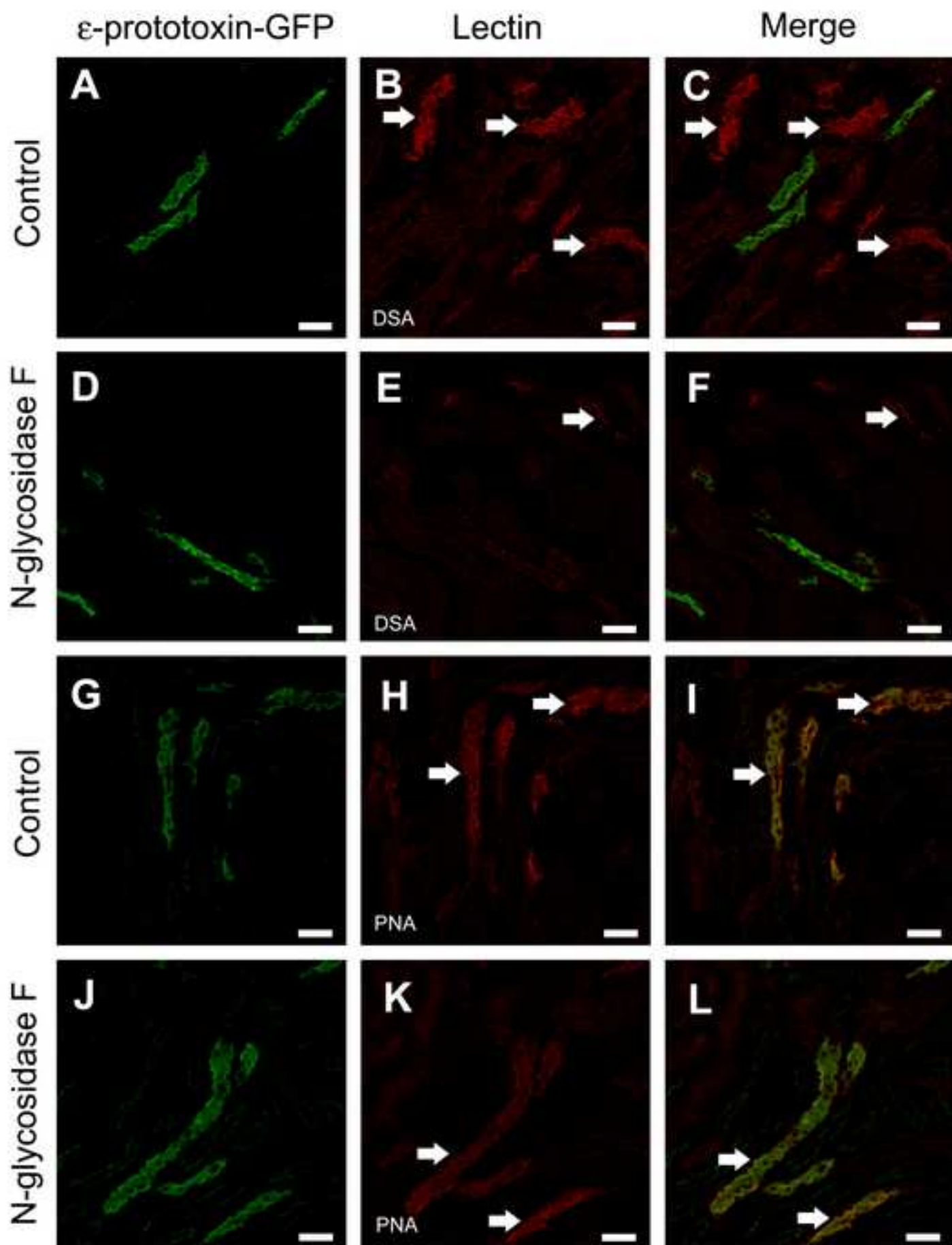
Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)











La imatge de la portada és una microfotografia d'una secció d'hipocamp de ratolí incubada amb protoxina- ϵ -GFP, mostrant unió específica a les fibres mielíniques.

La imatge de la contraportada és una composició de diferents microfotografies, on la imatge inferior dreta correspon a una secció de cervell de ratolí que ha estat injectat amb toxina- ϵ -GFP i es mostra la seva unió a l'endoteli i com travessa la BHE. La imatge inferior esquerra correspon a una secció de bufeta d'ovella incubada amb la protoxina- ϵ -GFP, mostrant unió específica a l'uroteli. La imatge superior dreta correspon a una secció de ronyó de cabra incubada amb la protoxina- ϵ -GFP i s'observa la seva unió als túbuls distals i col·lectors. I la imatge superior esquerra correspon a una secció de timus de ratolí incubada amb la protoxina- ϵ -GFP, unint-se a estructures que encara estan en estudi.