



Programa de Doctorat de Neurobiologia  
Bienni 1999-2001

**Caracterització de la distribució i efectes de la  
toxina épsilon de *Clostridium perfringens* en els  
sistemes renal i nerviós.**

Tesi doctoral

**Àlex Soler Jover**

Directors de tesi:

Dr. Joan Blasi Cabús

Dra. Mireia Martín Satué

L'Hospitalet de Llobregat, 7 de novembre de 2005



Al meu pare



## **AGRAÏMENTS**



Vull donar les gràcies al Dr. Joan Blasi, en primer lloc per donar-me la meua primera oportunitat professional en el món de la recerca, però sobretot per tots aquests anys en què realment m'has ensenyat com es fa ciència. Tu sempre dius que jo sóc més d'idees i que em costa fer el treball més rutinari, i probablement tinguis raó, per la qual cosa encara té més valor que m'hagis recolzat tots aquests anys en els moments bons i sobretot en els dolents. Moltes gràcies, Joan!

A tu Mireia, què et puc dir? Aquesta tesi és tan teua com meua. He disfrutat molt treballant al teu costat, i et vull agrair totes les hores que m'has dedicat, des del primer experiment que vam dissenyar i realitzar junts fins a la darrera dièresi que m'has hagut de corregir. I també et vull donar les gràcies per ser-hi sempre que t'he necessitat.

Als Drs. Carles Solsona i Jordi Marsal pels nombrosos i valuosos consells que m'heu donat al llarg d'aquests anys. I a més, Carles, moltes gràcies per ajudar-me en els feixucs tràmits burocràtics.

A tu, Inma, moltíssimes gràcies per tot. Sense tu no hagués pogut tirar endavant aquesta tesi. A més de la quantitat de feina que has invertit en ella et vull agrair tots els bons moments que hem passat al laboratori.

A tota la gent amb qui he coincidit en aquests anys (que són una pila...) i que ja no són al laboratori: Gemma (moltes gràcies per acompanyar-me en les meves primeres passes a la poïata, amb tu vaig aprendre molt), Eulàlia, Francesc, Santi, Ashraf (oh, señor...), Piedad (gràcies pels infinits

talls), Esteve, Jordi, David, Ana, Sol, Teresa, Neus (companya de toxines) i Artur. Sempre recordaré aquests anys que hem passat junts.

A la gent del lab: Benja (gràcies per tots els partits anti-estrès que has organitzat), Adriana (moltes gràcies per tots els "gelecitos" i "cositas" que m'has ajudat a fer al laboratori, que són moltes), Laura, Xènia i Marc (gràcies per la vostra alegria), i als que acaben d'arribar, Artur, Jonatan (sort amb la epsilon!) i Rubén, m'agradarà conèixer-us més.

A la Rosi, la Marga, la Berta, l'Esther, la Marta i la resta de "nenes" i "nens" del 4141, per la vostra ajuda, sempre amb un somriure, quan he necessitat alguna cosa.

Al Dr. Joan Serratosa i el seu grup, per la seva ajuda i per totes les hores invertides en els experiments amb cultius glials.

Als Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona (no Benja, tú no, los otros), moltes gràcies per la vostra gran ajuda.

Al llarg d'una tesi és molta la gent que t'ajuda en algun moment o altre i que la memòria no reté (i la meva encara menys). A tots vosaltres, moltes gràcies.

Als amics de la facultat i als amics del "cole", moltes gràcies per tots els bons moments que m'heu fet passar durant aquests anys, i per estar amb mi també en els moments dolents. La vostra amistat m'ha ajudat molt.



A tota la família de la Laia, moltes gràcies per fer-me sentir un més de vosaltres.

Al meu pare i la meva mare, que m'han fet costat en totes les decisions difícils que he prè a la vida, com el dia que els vaig dir que volia deixar una "prometedora" carrera d'Empresarials per dedicar-me a la Biologia. Aquell dia el meu pare em va dir que almenys guanyés un nobel. Bueno, Papá, un nobel no es, pero ojalá hubieras estado aquí para ver como por fin tienes otro Dr. Soler en la familia.

A la Carmen i als meus germans, germanes, cunyats, cunyades, nebots i nebodes, gràcies per la vostra alegria en tot moment.

I finalment, a tu, Laia, no només et vull agrair tot el què has fet per ajudar-me en aquesta tesi, sinó que a més li estaré eternament agraït a la meva tesi per haver fet que ens poguéssim trobar, el dia que vas entrar al laboratori per canviar de dalt a baix la meva vida i fer-me immensament feliç.



# Índex

<b>ABREVIATURES</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>19</b>
1. Estructura de la molècula de protoxina- $\epsilon$ i toxina- $\epsilon$ .	23
2. Efectes in vivo de la toxina- $\epsilon$ .	26
2.1. Via d'entrada i efectes intestinals de la toxina- $\epsilon$ .	26
2.2. Efectes sistèmics de la toxina- $\epsilon$ .	27
2.3. Efectes neurològics de la toxina- $\epsilon$ .	30
3. Estudis en cultius cel·lulars.	32
3.1. Estudis en cèl·lules MDCK.	33
4. Diagnòstic i prevenció de l'enterotoxèmia en bestiar.	35
<b>OBJECTIUS</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>41</b>
1. Composició de les solucions.	43
2. Origen dels anticossos utilitzats.	45
3. Obtenció de proteïnes recombinants.	45
4. Transformació de bacteris.	48
5. Expressió de proteïnes recombinants.	49

---

6. Obtenció i manteniment de les diferents línies o cultius cel·lulars.	50
7. Estudis de citotoxicitat.	52
8. Assaig de viabilitat cel·lular MTT.	52
9. Assaig de citotoxicitat amb iodur de propidi (IP).	53
10. Immunofluorescència en cèl·lules i teixits.	53
11. Immunocitoquímica per microscopia electrònica.	55
12. Assaig d'unió de protoxina- $\epsilon$ -GFP i toxina- $\epsilon$ -GFP sobre cèl·lules MDCK vives.	56
13. Assaig d'unió de protoxina- $\epsilon$ -GFP i toxina- $\epsilon$ -GFP sobre cèl·lules fixades.	56
14. Injecció intravenosa de les toxines recombinants en rata i ratolí.	57
15. Obtenció i processat dels òrgans de rata i ratolí per a l'obtenció de talls histològics.	58
16. Incubacions de protoxina- $\epsilon$ -GFP sobre talls histològics de criostat.	59
17. Assaig de permeabilitat cel·lular en un model in vitro de Barrera Hemato-Encefàlica bovina amb cèl·lules BBEC.	59
18. Obtenció de sinaptosomes de rata i ratolí.	60
19. Assaig de secreció de glutamat en sinaptosomes aïllats.	62

---

<b>RESULTATS</b>	<b>65</b>
<b>1. Obtenció de diferents formes recombinants de toxina-<math>\epsilon</math> fusionades o no a la proteïna verda fluorescent (GFP).</b>	<b>67</b>
<b>2. Efecte de la toxina-<math>\epsilon</math> a cèl·lules MDCK i als túbuls renals in vivo.</b>	<b>75</b>
2.1 Abstract	79
2.2 Introduction	81
2.3 Materials and methods	84
2.4 Results	91
2.5 Discussion	104
<b>3. Efectes de la toxina-<math>\epsilon</math> sobre el Sistema Nerviós.</b>	<b>109</b>
3.1 Unió de la toxina- $\epsilon$ a cervell de diferents espècies.	111
3.2 Distribució i efectes de la toxina- $\epsilon$ administrada intravenosament (i.v.) a rata i ratolí.	115
3.3 Efecte de la toxina- $\epsilon$ sobre cultius neuroglials mixtes d'astroglia i microglia.	120
3.4 Efecte de la toxina- $\epsilon$ sobre cultius cel·lulars endotelials.	126
3.5 Efecte de la toxina- $\epsilon$ sobre sinaptosomes aïllats de rata i ratolí.	130
<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>135</b>
<b>1. Obtenció i validació de les eines moleculars.</b>	<b>137</b>
<b>2. Unió i efectes de la toxina-<math>\epsilon</math> a la línia cel·lular MDCK.</b>	<b>139</b>
<b>3. Distribució i efectes de la toxina-<math>\epsilon</math> a ronyó.</b>	<b>142</b>
<b>4. Distribució i efectes de la toxina-<math>\epsilon</math> al Sistema Nerviós Central.</b>	<b>146</b>
<b>5. Consideracions finals.</b>	<b>153</b>

<b>CONCLUSIONS</b>	<b>155</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>159</b>

## **ABREVIATURES**





---

<b>aa</b>	Amino-àcid
<b>AMPC</b>	Monofosfat d'Adenosina cíclic
<b>BBEC</b>	<i>Bovine Brain Endothelial Cells</i> , cèl·lules d'endoteli cerebral boví
<b>BHE</b>	Barrera Hemato-Encefàlica
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albumina bovina sèrica
<b>cDNA</b>	DNA complementari
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleïc
<b>DRM</b>	<i>Detergen-Resistant Membranes</i> , dominis de membrana resistents a detergent
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i> , sèrum boví fetal
<b>GDH</b>	Glutació Deshidrogenasa
<b>GFAP</b>	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> , proteïna àcida fibril·lar glial
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i> , proteïna verda fluorescent
<b>GST</b>	Glutació-S-Transferasa
<b>H/E</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>HUVEC</b>	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> , cèl·lules d'endoteli de vena umbilical humanes
<b>i.v.</b>	Intravenós
<b>IP</b>	Iodur de propidi
<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopiranoside
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>MBP</b>	<i>Myelin Basic Protein</i> , proteïna bàsica de la mielina
<b>MDCK</b>	<i>Madi-Darby Canine Kidney</i>
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>NCS</b>	<i>Neonatal Calf Serum</i> , sèrum boví neonatal
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Bufered Saline</i> , tampó de fosfat salí
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacció en cadena de la polimerasa

<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PI</b>	Punt Isoelèctric
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluoride
<b>RIA</b>	Radio Immuno Assaig
<b>SDS-PAGE</b>	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , electroforesi en gel d'acrilamida en presència de SDS
<b>SS</b>	Sinaptosoma
<b><math>\beta</math>-PFT</b>	<i>Beta Pore-Forming Toxins</i> , família beta de toxines formadores de porus

## **INTRODUCCIÓ**



La toxina épsilon (toxina- $\epsilon$ ) de *Clostridium perfringens* és la toxina clostridial més potent després de les neurotoxines tetànica i botulínica. Provoca enterocolitis a cabres i enterotoxèmia a ovelles, vaques i ocasionalment a d'altres espècies, causant greus pèrdues econòmiques.

L'enterotoxèmia produïda per la toxina- $\epsilon$  també es coneix com a mort sobtada, malaltia per sobrealimentació i també com a malaltia del ronyó esponjós (*pulpy kidney disease*), sent aquest darrer nom degut a l'aspecte malmès que presenten els ronyons de les ovelles afectades.

El gènere *Clostridium* comprèn bacteris anaeròbics formadors d'espores, essent la majoria d'espècies Gram-positives. L'espóra, en ser més ample en diàmetre que la cèl·lula en sí, causa el seu inflament donant lloc a la forma de fus a la qual es refereix el nom del gènere *Clostridium* (del grec *closter*, que significa fus) (Hatheway, 1989).

L'espècie *Clostridium perfringens* és el més important agent causant de malalties entèriques de tipus clostridial al bestiar, sent capaç de produir fins a 17 toxines diferents. L'espècie es classifica en diferents soques basant-se en quina de les quatre exotoxines més importants ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  i  $\iota$ ) produeix. Els efectes i el ventall d'hostes afectats també varia d'una soca a l'altre (Taula I-1). En concret, la toxina- $\epsilon$  és produïda pels tipus B i D de *C. perfringens*.

Soca	Toxina	Malaltia
A	$\alpha$	Mionecrosi, enverinament, enteritis necròtica en aus i porcs, enterotoxèmia a vaques i ovelles; possible colitis equina, gastroenteritis hemorràgica canina.
B	$\alpha, \beta, \epsilon$	Disenteria a bens, enteritis crònica a ovelles adultes, enteritis hemorràgica a vedells i aus, <b>enterotoxèmia hemorràgica a ovelles adultes.</b>
C	$\alpha, \beta$	Enteritis necròtica a humans; enteritis necròtica en aus; enterotoxèmia necròtica o hemorràgica a porcs, bens, vedells, cabres i aus neonatals; enterotoxèmia aguda a ovelles adultes.
D	$\alpha, \epsilon$	<b>Enterotoxèmia a ovelles (pulpy kidney) i cabres, enterocolitis a cabres, possible enterotoxèmia a vaques adultes.</b>
E	$\iota$	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 I-1. Les diferents soques de *C. perfringens*, les toxines que produeixen i les malalties associades. En negreta les malalties atribuïbles a la toxina- $\epsilon$ .**

Aquests bacteris són presents de manera habitual al tracte digestiu de les espècies hostes. De fet, la detecció de petites quantitats de toxina- $\epsilon$  a mostres de budells d'aquests animals es consideren inòcues.

Però en determinades condicions en què es donen canvis d'alimentació, com per exemple quan se substitueix la llet pel pinso o després d'una ingesta gran i rica en midó, es crea a l'intestí un entorn òptim per a què aquests bacteris anaeròbics proliferin i produeixin grans quantitats de toxina- $\epsilon$ . Aquesta és capaç d'augmentar la permeabilitat de la mucosa intestinal, facilitant la seva pròpia absorció, i arribar a la circulació sanguínea. La malaltia és una toxèmia pura, sense invasió bacteriana dels teixits, i no és transmissible. Té greus efectes a nivell sistèmic i nerviós que acaben amb la mort ràpida de l'animal.

Com hem dit abans, l'enterotoxèmia també es coneix com a *pulpy kidney disease*, o malaltia del ronyó esponjós, per l'aspecte que presenten els ronyons de les ovelles afectades. Aquestes lesions són degudes a la ràpida autolisi post-mortem que pateixen els teixits danyats per la toxina.

Els efectes devastadors de l'enterotoxèmia han fet que molts dels estudis de la toxina- $\epsilon$  s'hagin centrat fonamentalment en la detecció de la toxina, el diagnòstic de l'enterotoxèmia i en la producció de vacunes eficaces. Actualment, el bestiar és vacunat regularment, però tot i així encara es donen casos d'enterotoxèmia de manera habitual.

La resta d'estudis han volgut avançar en el coneixement de la toxina tant a nivell estructural com funcional.

## 1. Estructura de la molècula de protoxina- $\epsilon$ i toxina- $\epsilon$ .

El gen que codifica per la toxina- $\epsilon$  es troba localitzat en un plasmidi d'alt pes molecular (Betancor et al., 1999), i se sintetitza en forma de protoxina inactiva que requereix de dos talls proteolítics, un a cada extrem, per activar-se (Fig. I-1).

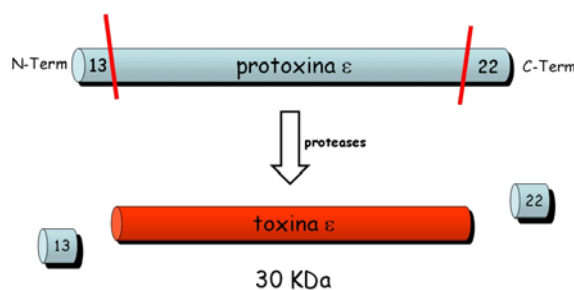


Figura I-1. Activació de la protoxina- $\epsilon$ .

Aquests talls poden ser fets tant per proteases del mateix tracte intestinal de l'hoste (tripsina i quimiotripsina) com per l'activitat metal·loproteasa de la toxina  $\lambda$ , secretada pels propis bacteris (Minami et al., 1997).

En la hidròlisi s'alliberen un petit pèptid de 13 aa a l'extrem N-terminal (Haabeb et al., 1973; Bhowan et al., 1977) i un altre de 22 aa a l'extrem carboxílic, que seria el tall realment essencial per a l'activació de la protoxina. El tall que es dona a N-terminal potenciaria la toxicitat de la molècula (Minami et al., 1997).

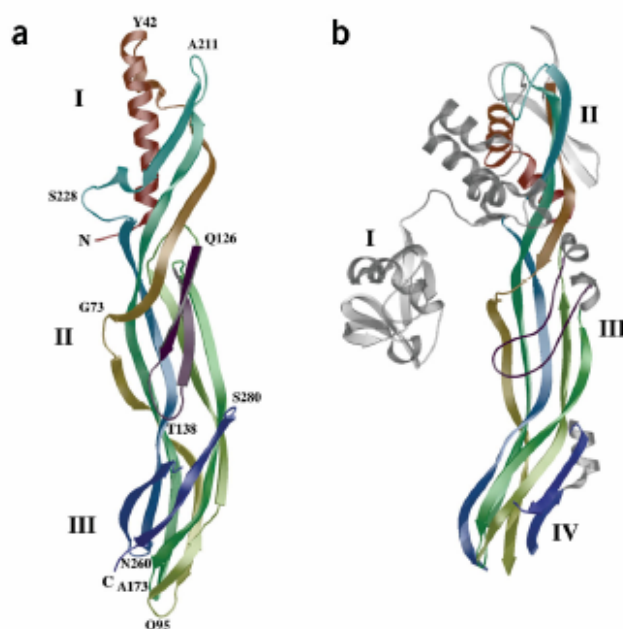
Estudis bioquímics han permès identificar residus essencials per a l'activitat de la toxina, com són l'únic triptòfan que conté la molècula (Sakurai i Nagahama, 1985a i b), un residu de tirosina (Nagahama et al., 1990), alguns residus de lisina (Sakurai i Nagahama, 1986), un d'histidina i alguns grups carboxil (Sakurai i Nagahama, 1987a i b).

El 1992 es van publicar les seqüències dels gens de la toxina- $\epsilon$  de les soques B (Hunter et al., 1992) i D (Havard et al., 1992) de *C. perfringens*. Entre ells hi ha dos nucleòtids de diferència i només un canvi d'aminoàcid que no provoca canvis substancials ni en l'estructura ni en la funció de la molècula.

La toxina- $\epsilon$  presenta un cert grau d'homologia de seqüència amb les toxines mosquitocides de *Bacillus sphaericus* Mtx-3 i Mtx-2 (24% i 21%, respectivament), i molt menor amb la citotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (Minami et al., 1997).

La recent obtenció de l'estructura tridimensional de la protoxina (Fig. I-2a) ha demostrat que té molta homologia estructural (no de seqüència) amb l'aerolisina d'*Aeromonas hydrophyla* (Fig. I-2b)





**Figura I-2. Estructures tridimensionals de la protoxina- $\epsilon$  (a) i de l'aerolisina (b). La toxina- $\epsilon$  mostra homologia estructural amb el lòbul llarg de l'aerolisina. Les molècules es mostren colorejades des de vermell a l'extrem N-terminal fins a blau al C-terminal. En gris es mostren les zones de l'aerolisina que no mostren homologia amb la toxina- $\epsilon$ . En color porpra les probables zones d'inserció a membrana (Cole et al., 2004)**

El mecanisme d'acció de totes aquestes toxines 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), i per això s'han agrupat en la família  $\beta$  de toxines formadores de porus ( $\beta$ -PFT).

També la toxina- $\epsilon$  té aquesta capacitat, 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 (veure apartat 3.1 d'aquesta

introducció), i per això també se l'ha classificat dins de la família  $\beta$ -PFT (Cole et al., 2004).

## **2. Efectes *in vivo* de la toxina- $\epsilon$ .**

### **2.1. Via d'entrada i efectes intestinals de la toxina- $\epsilon$ .**

Els *C. perfringens* entren a l'organisme per via oral. Els bovins ingereixen quantitats contínues d'aquests bacteris, però els processos fermentatius i els moviments peristàltics del tracte digestiu eviten la seva proliferació. És només quan es donen els canvis en l'alimentació abans esmentats, que adquireixen avantatge respecte la resta de flora intestinal, i poden proliferar i produir toxina en grans quantitats. La toxina és capaç de permeabilitzar la mucosa intestinal i arribar a la circulació sanguínea donant lloc a greus efectes sistèmics (revisat per Finnie, 2004).

Però ja a nivell intestinal té efectes, apart del ja comentat de permeabilitzar la mucosa. Els estudis fets en cabres i en ovelles han mostrat interessants diferències entre ambdues espècies.

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).

Quan s'injecta toxina intravenosa en cabres, els efectes que provoca són equivalents als efectes sistèmics en ovella (Uzal et al., 1998a). Per tant, les cabres no són resistents a aquests efectes, sinó que semblaria que el què

està passant és que la toxina no és capaç d'arribar a la sang en quantitats suficients.

A més, s'ha vist que la toxina és capaç de danyar les cèl·lules epitelials de la mucosa del budell gruixut, tant a cabres com a ovelles. Però aquestes lesions només s'observen als casos d'enterotoxèmia natural de cabres, i no pas al de l'ovelles. Així doncs a ovelles la toxina seria absorvida a nivell del budell prim, sense arribar al gruixut, mentre que a cabres passaria ràpidament al budell gruixut, sense ser pràcticament absorvida (Uzal et al., 1999a).

La clau d'aquesta diferència podria ser un trànsit entre el budell prim i el gruixut més ràpid a cabres que a ovelles. S'ha vist que la toxina provoca l'acumulació de líquid a nivell del budell prim en totes dues espècies, però de manera més ràpida a cabra, fet que faria augmentar la velocitat del trànsit intestinal en aquesta espècie (Fernández et al., 2003). Aquest pas més ràpid significaria una estada més curta de la toxina a nivell del budell prim, donant lloc a una disminució de la quantitat de toxina absorvida, és a dir, estaria arribant menys toxina a la circulació sanguínea. Per contra, al budell gruixut aniria a parar més toxina, provocant els efectes intestinals ja mencionats.

## **2.2. Efectes sistèmics de la toxina-ε.**

La majoria de casos d'ovelles afectades d'enterotoxèmia són de tipus agut. La toxina provoca la mort sobtada, però si l'animal viu temps suficient, presenta símptomes clínics com pal·lidesa, retracció del cap, opistonus i convulsions. En casos crònics, on els temps de supervivència

són molt més llargs, es donen altres símptomes com desorientació, ceguesa o incapacitat de menjar (revisat per Songer, 1996).

Aquest símptomes semblen ser d'origen neurològic, però els efectes sistèmics de la toxina, un cop arriba a la circulació sanguínea, són múltiples a diferents òrgans i teixits.

El coneixement d'aquests efectes ha avançat gràcies a l'estudi dels casos clínics en el bestiar, però també al fet de que la majoria de símptomes són reproduïbles en animals d'experimentació com rates i ratolins.

Els animals afectats presenten hiperglucèmia i glicosúria, i a nivell del sistema vascular, un dels efectes més clars és el greu edema generalitzat que s'observa a pulmons, cervell i altres òrgans. La toxina és capaç d'augmentar la permeabilitat vascular (Buxton, 1978b; Nagahama i Sakurai, 1991), i fins i tot de permeabilitzar la Barrera Hemato-Encefàlica (BHE) (Gardner, 1973; 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).

La toxina- $\epsilon$  provoca un augment de la pressió sanguínea sense afectar el ritme cardíac ni l'electrocardiograma, és a dir, sense actuar a nivell cardíac (Sakurai et al., 1983). A més, provoca un augment dels nivells de cAMP en sang, que podrien ser responsables del també descrit augment de la glucèmia, ja que el cAMP pot estimular la glucogenolisi a nivell hepàtic (Buxton, 1978b; Worthington et al., 1979).

Els estudis amb toxina i protoxina marcades radioactivament i injectades intravenosament en ratolí, han demostrat que s'acumulen majoritàriament a ronyó i cervell, tot i que també se'n troba a altres òrgans com el cor, els pulmons, el fetge i l'estòmac (Nagahama i Sakurai, 1991) o a la cavitat nasal (Tamai et al., 2003).

Curiosament, de tots aquests òrgans, només la unió a cervell és desplaçable amb toxina freda, suggerint un lloc d'unió específica a cervell (Nagahama i Sakurai, 1991).

Amb tècniques d'immunohistoquímica s'ha pogut observar amb més detall la unió de la protoxina a diferents òrgans i teixits. Pel que fa a cervell, s'acumula a la part luminal de l'endoteli vascular de molts vasos sanguinis de diferents regions. A ronyó, es localitza a la part luminal de les nanses de Henle i túbuls contornejats distals, i petites quantitats als capil·lars. També s'ha trobat marcatge en menor quantitat en algunes venes dels pulmons, als capil·lars del cor i als sinusoids hepàtics. No se n'ha trobat ni a budell, ni a múscul esquelètic, ni a múscul llis (Buxton, 1978a). Sí s'ha vist, però, un efecte indirecte sobre fibres musculars, ja que la toxina és capaç de provocar la contracció de l'ili aïllat de rata, probablement actuant a nivell dels terminals colinèrgics, augmentant la permeabilitat per ions  $\text{Na}^+$  (Sakurai et al., 1989). Segons els autors, l'acetilcolina alliberada per aquests terminals provocaria l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  als músculs, donant lloc a la contracció. De manera similar, la toxina- $\epsilon$  provoca la contracció de l'artèria aorta de rata, però en aquest cas estarien implicats els terminals adrenèrgics (Nagahama et al., 1993).

Com hem dit, el ronyó és el principal òrgan diana de la toxina (almenys pel que fa a quantitat de toxina que s'hi acumula) i, a més, en ovelles mortes per enterotoxèmia s'observa una degeneració post-mortem molt ràpida d'aquest òrgan (Fig. 1-3). Tot i això, han estat relativament pocs els estudis sobre els efectes de la toxina en aquest òrgan. El més destacable és molt recent i en ell es mostra l'efecte citotòxic de la toxina sobre determinats tipus cel·lulars de la nefrona, i es proposa que l'acumulació

de toxina al ronyó seria una mena de defensa de l'organisme contra la toxina, retardant els seus efectes neurològics (Tamai et al, 2003).

Els estudis sobre els efectes a nivell del sistema nerviós han estat més nombrosos.



**Figura I-3. Aspecte que presenten els ronyons d'un be afectat d'enterotoxèmia (*pulpy kidney*).**

### **2.3. Efectes neurològics de la toxina-ε.**

Sembla ser que els efectes al cervell depenen de la dosi de toxina aplicada. Si la dosi és alta provoca la mort sobtada, els efectes al cervell són microscòpics i derivats d'un edema vasogènic sever i generalitzat. Si per contra la dosi és més baixa, o els animals són parcialment immunitzats contra la toxina-ε, l'animal triga molt més a morir, i les lesions al cervell són macroscòpiques, evolucionant des d'un edema vasogènic inicial fins a focus de malàcia (estovament anormal de l'estructura) amb simetria bilateral focal, amb predilecció per la substància blanca (Finnie, 1984a; revisat per Finnie, 2003). Aquesta malàcia seria la responsable dels símptomes més tardans.

Pel que fa a les lesions microscòpiques, s'ha vist que la toxina provoca un augment de volum dels astròcits, a nivell dels seus peus perivasculars, probablement degut a 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, sinó que hi ha una sensibilitat regional diferencial, que també varia segons l'espècie. A ratolí, per exemple, el cerebel seria la zona més afectada, mentre que a rata no s'hi veuen efectes importants (Finnie, 1984a).

La toxina també és capaç de provocar dany neuronal. Quan s'incuben rodanxes de cervell de rata amb toxina- $\epsilon$  s'estimula l'alliberament de glutamat als terminals nerviosos de les capes CA1 i CA3 de l'hipocamp, provocant la mort per excitotoxicitat (hiperestimulació provocada per l'excès de neurotransmissor) de les neurones piramidals d'aquestes zones (Miyamoto et al., 1998; Miyamoto et al., 2000). A dosis més altes, s'ha vist que també pot provocar l'alliberament de dopamina al cervell de ratolí (Nagahama i Sakurai, 1993).

La qüestió és: Aquests efectes a nivell cel·lular es donen per acció directa de la toxina sobre les cèl·lules, o són un efecte indirecte de l'edema provocat a nivell vascular? És a dir, la toxina travessa l'endoteli vascular, entrant al teixit nerviós, o el seu efecte final és a nivell vascular? La resposta no és clara.

Els efectes nocius de la toxina poden ser evitats per l'administració prèvia de protoxina inactivada amb formol, suggerint que la protoxina i la toxina competeixen *in vivo* pels mateixos llocs d'unió (Buxton, 1976). Cal destacar que aquesta protecció per part de la protoxina és transitòria, ja que només és efectiva si la toxina s'administra pocs minuts després que la protoxina. Es creu que això pot ser degut a que la protoxina és

internalitzada per les cèl·lules diana, permetent la unió posterior de la toxina (Nagahama i Sakurai, 1991).

Estudis *in vitro* han demostrat que la toxina-ε és capaç d'unir-se específicament a homogenats de cervell de rata, i concretament a una fracció enriquida en sinaptosomes. S'ha postulat que aquesta unió seria a un receptor de naturalesa proteica, probablement una sialoglicoproteïna (Nagahama i Sakurai, 1992). *In vivo*, però, no s'ha pogut localitzar la toxina més enllà de l'endoteli dels vasos del cervell.

Altres estudis desenvolupats en cultius cel·lulars també apunten a l'existència d'un receptor proteic per la toxina-ε (veure apartat següent).

### **3. Estudis en cultius cel·lulars.**

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 morien per efecte de la toxina, mentre que la resta de cèl·lules analitzades, incloent-hi d'altres cèl·lules de la línia blanca de conillet d'índies, o macròfags peritoneals d'altres espècies, es van mostrar resistents. (Buxton, 1978c).

Més endavant, Payne i col·laboradors van crivellar diferents línies cel·lulars i d'entre totes, només la línia Madine Darney Canine Kidney (MDCK) es va mostrar sensible, sent l'efecte sobre les cèl·lules depenent de temperatura (Payne et al., 1994).



Darrerament s'ha trobat una altra línia cel·lular, la G-402, humana d'origen renal, sensible als efectes de la toxina, si bé en un grau molt menor que la MDCK (Shortt et al., 2000).

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., 1999c).

Les cèl·lules MDCK, per tant, han estat el model cel·lular preferencial per l'estudi de la toxina-ε, donant lloc a importants treballs en el coneixement de la seva estructura i funció.

### **3.1. Estudis en cèl·lules MDCK.**

Tant la toxina com la protoxina són capaces d'unir-se a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK, i ho fan amb més afinitat a la banda apical de la cèl·lula. En canvi, només la toxina és citotòxica, i provoca una sèrie de canvis morfològics als cultius de cèl·lules MDCK, que es caracteritzen per inflamament i deformació de la cèl·lula, acabant amb mort per lisi cel·lular. La toxina no entra dins la cèl·lula sinó que roman a la membrana durant tot el procés (Petit et al., 1997).

La unió a la membrana cel·lular és desplaçable tant per toxina com per protoxina, suggerint l'existència de llocs d'unió específica comuns.

Estudis amb toxina iodada han mostrat que la toxina forma, a la fracció de membrana cel·lular, uns complexos amb una mobilitat electroforètica en gels d'acrilamida d'aproximadament 155 kDa, mentre que la protoxina no és capaç de formar-los. Aquests complexos es formen amb més

estabilitat si la incubació es fa a 37°C que no si es fa a 4°C (Petit et al., 1997).

Teòricament, aquest complex podria estar format per la unió de la toxina a un receptor proteic de la membrana, o per diferents monòmers de la mateixa toxina, o per una combinació de les dues coses. Si abans d'afegir la toxina s'incuben les membranes amb proteinasa K, el complex disminueix de tamany, suggerint l'existència d'almenys un component proteic diferent de la toxina-ε. Estudis posteriors van demostrar que aquest complex era en realitat un heptàmer de molècules de toxina (Miyata et al., 2001), que permeabilitza la cèl·lula al pas d'ions i molècules grans, obrint un porus amb un diàmetre d'almenys 2 nm (Petit et al., 1997). Així, la toxina provocaria una sortida ràpida d'ions K<sup>+</sup>, una entrada una mica més lenta d'ions Cl<sup>-</sup> i Na<sup>+</sup>, i finalment una entrada lenta d'ions Ca<sup>2+</sup>, que desestabilitzarien la cèl·lula (Petit et al., 2001).

La intoxicació acaba amb grans canvis morfològics que precedeixen a la mort cel·lular. No queda clar si aquest canvis afecten al citoesquelet d'actina o no, ja que un estudi va mostrar l'afectació tant d'aquest (que es retreia i quedava marginalitzat) com dels microtúbuls i filaments intermedis (Donelli et al., 2003), mentre que altres estudis mostren com tant l'actina, com l'E-cadherina com l'α-Catenina romanen intactes durant tot el procés d'intoxicació (Petit et al., 1997 i 2003).

S'ha vist que la toxina-ε també és capaç de formar porus en membranes artificials, independentment del tipus de lípid utilitzat. Això sembla contradir la idea del receptor proteic, però en realitat es creu que el receptor proteic estaria ajudant a la toxina a arribar al entorn lipídic adequat per a la formació del porus (Petit et al., 2001).

Una de les característiques de la intoxicació de cèl·lules MDCK amb toxina-ε és que la supervivència cel·lular mai no baixa de valors al voltant del 30%, suggerint l'existència d'una subpoblació de cèl·lules MDCK resistents a la toxina. De fet, s'ha aconseguit aïllar una població de cèl·lules resistents, tant a MDCK com a G-402, mitjançant l'exposició a dosis creixents de toxina (Beal et al., 2003). L'estudi dels patrons d'expressió proteica en aquestes cèl·lules resistents va proposar una sèrie de proteïnes d'entre 32 i 36 kDa com a possibles candidats a receptor de la toxina-ε, ja que o bé deixaven d'expressar-se, o bé canviaven el seu punt isoelèctric (PI).

Un altre estudi amb columnes d'afinitat amb toxina-ε va aïllar una proteïna d'uns 37 kDa a la membrana de les cèl·lules MDCK (Petit et al., 1997).

De moment, però, cap d'aquest candidats s'ha confirmat com a receptor per a la toxina-ε.

Finalment, s'ha demostrat que la unió de la toxina i la protoxina a la membrana cel·lular de les MDCK, així com a la membrana de sinaptosomes de rata, es dona a nivell dels dominis de membrana resistents a detergent (DRM), sent en aquests on es dona tot el procés de heptamerització i inserció a membrana (Miyata et al., 2002).

#### ***4. Diagnòstic i prevenció de l'enterotoxèmia en bestiar.***

L'enterotoxèmia és molt ràpida en els seus efectes, i la majoria de vegades mortal. 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.

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 fan. 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) (Sojka et al., 1989; Nagahama et al., 1991; Uzal et al., 1997), i finalment tècniques de detecció dels bacteris mitjançant PCR (Uzal et al., 1996; Kadra et al., 1999; Gkioutzidis et al., 2001). Evidentment també es treballa per millorar els mètodes de vacunació. Pel què fa a la vacunació contra els efectes de la toxina- $\epsilon$ , clàssicament s'ha fet amb la injecció de toxoid (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 a protegir els animals (Percival et al., 1990).

Actualment, però, la pràctica més comú a les explotacions animals continua sent la vacunació amb toxoid concentrat o amb cultius inactivats de diferents soques de *C. perfringens*.

**OBJECTIUS**



La toxina- $\epsilon$  de *Clostridium perfringens* és la tercera toxina clostridial més potent després de les toxines tetànica i botulínica. Causa grans pèrdues econòmiques a les explotacions animals. El seu estudi, per tant, sempre ha anat molt encaminat a la recerca de noves vacunes per lluitar-hi, tot i que darrerament s'ha avançat considerablement en el coneixement a nivell molecular de la seva estructura i del seu mecanisme d'acció. Malgrat això, encara falta molt per descobrir en aquest camp, sense deixar de banda que es coneix ben poc sobre l'efecte que pugui tenir en humans. Finalment, els estudis que s'han fet tradicionalment sobre aquesta toxina- $\epsilon$ , han emprat toxina nativa purificada directament de *C. perfringens*.

Per tot això, ens vam plantejar com a objectiu general **l'estudi del mecanisme d'acció de la toxina- $\epsilon$  de *Clostridium perfringens* mitjançant proteïnes recombinants de fusió amb la Green Fluorescent Protein (GFP).**

Per tal de dur a terme aquest objectiu, ens vam marcar una sèrie d'objectius parcials:

En primer lloc necessitàvem les eines moleculars per realitzar la resta de l'estudi. Per tant, el nostre primer objectiu va ser aconseguir el **clonatge, l'expressió a *E. coli* i la purificació de formes recombinants de la toxina  $\epsilon$  fusionada amb GFP** (Capítol 1 de Resultats).

La línia cel·lular MDCK és una de les poques i, sense dubte, la més sensible a la toxina- $\epsilon$ . S'ha utilitzat àmpliament per estudiar la seva citotoxicitat. Les formes fusionades amb la GFP ens oferien una potent eina per a l'estudi de la unió de la toxina a les cèl·lules MDCK, ja fos sobre cèl·lules vives com sobre cèl·lules fixades. Així, ens vam plantejar com a següent objectiu la

**caracterització de la unió i efecte de la toxina-ε en cultius cel·lulars de MDCK** (Capítol 2 de Resultats).

Els hosts habituals de la toxina-ε són animals de granja com xais, cabres i vaques. Tot i així, la rata i el ratolí també hi són molt sensibles, cosa que els fa models idonis per estudiar la toxina-ε al laboratori. És per això que les vam fer servir per dur a terme el nostre darrer objectiu, la **caracterització de l'efecte i la distribució de la toxina ε en un model animal** (Capítols 2 i 3 de Resultats).

Aquest darrer objectiu és molt ampli i inclou tant estudis *in vitro*, amb incubacions de talls histològics de diferents òrgans animals per posar de manifest possibles llocs d'unió específics de la toxina-ε, com estudis *in vivo* mitjançant l'injecció intravenosa de les proteïnes recombinants en ratolí per estudiar l'efecte i poder visualitzar la seva distribució a l'organisme. Tant en un cas com en l'altre, les nostres prioritats van ser **el cervell i el ronyó**, òrgans als quals s'hi donen els efectes més greus.



## **MATERIALS I MÈTODES**



## 1. Composició de les solucions.

### Tampó de fixació-1:

PBS 100 mM  
Paraformaldehid 2%  
Glutaraldehid 2,5%

### Tampó de fixació-2:

PBS 100 mM  
OsO<sub>4</sub> 1,0%

### Tampó de bloqueig-1:

Gelatina 0,2%  
FBS 10%  
en PBS

### Tampó de bloqueig-2:

BSA 1%  
en PBS

### Tampó de bloqueig-3:

Gelatina 0,2%  
FBS 10%  
Tritó 0,2%  
en PBS

### Tampó d'el·lució:

Tris/HCl 10 mM pH 8.0  
CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM

### Tampó d'incubació-1:

Hepes/NaOH 20 mM, pH 7.4  
NaCl 140 mM  
NaHCO<sub>3</sub> 5 mM  
MgCl<sub>2</sub> 1 mM  
Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM  
Glucosa 10 mM

### Tampó d'incubació-2:

Gelatina 0,2%  
FBS 1%  
Tritó 0,2%  
en PBS

### Tampó de lisi:

Tritó X-100 1%  
Phenylmethylsulfonylfluoride  
(PMSF) 0,1 mg/ml  
Aprotinina 10 µg/µl  
Leupeptina 10 µg/µl  
en PBS

Gradients de ficoll:

5%, 9% i 12% de Ficoll en  
320 mM de sucrosa, 5mM  
Hepes/NaOH pH 7.4

Tampó de sodi:

Hepes/NaOH 20 mM, pH 7.4  
Glucosa 10 mM  
KCl 5 mM  
NaCl 140 mM  
NaHCO<sub>3</sub> 5 mM  
MgCl<sub>2</sub> 1 mM  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 mM

Solució d'isopropanol-HCl

Isopropanol 45%  
HCl 1,85%  
Tritó X-100 5%  
H<sub>2</sub>O miliQ

TAE:

Tris / HCl 8 mM pH 8.0  
Àcid acètic glacial 4 mM  
EDTA 0,2 mM

Medi Luria-Bertani (LB):

Triptona 10%  
Extracte de llevat 5%  
NaCl 10%  
pH 7.0

LB agar:

Medi LB  
15 g/ L Bacto agar.

## **2. Origen dels anticossos utilitzats.**

**Anti-toxina- $\epsilon$ :** sèrum policlonal cedit pel laboratori del Dr. M. Popoff, Institut Pasteur, Paris.

**Anti-GFP:** monoclonal, SIGMA G6539

**Anti-GFAP:** policlonal, DAKO Z0334

**Anti-MBP:** monoclonal, Chemicon MAB387

**Anti-VAMP2:** monoclonal, SYSY 104 211

**Anti-sintaxina HPC-I :** monoclonal, SIGMA S0664

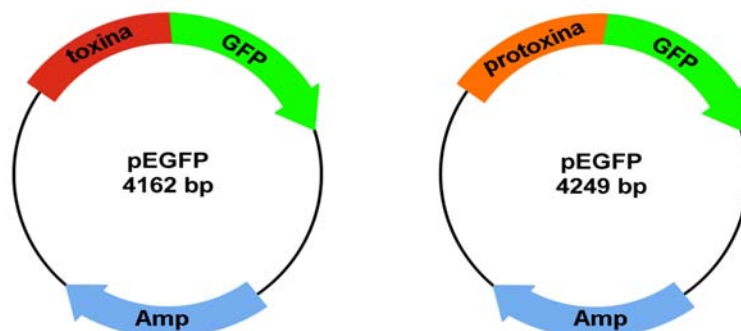
**Anti-SNAP25:** policlonal, sèrum obtingut a partir d'SNAP25 recombinant (Binz et al., 1994)

**Anti-RT 97:** monoclonal, Chemicon MAB5262

**Anticossos secundaris:** anticossos contra immunoglobulines de ratolí i de conill conjugats amb els fluorocroms Alexa 488 (verd) o Alexa 546 (vermell) de la casa Molecular Probes.

## **3. Obtenció de proteïnes recombinants.**

El laboratori del Dr. Michel Popoff ens va cedir 2 plàsmids derivats del pEGFP (Clontech) on hi havia clonades 2 formes recombinants de la toxina- $\epsilon$ : toxina- $\epsilon$ -GFP i protoxina- $\epsilon$ -GFP (Fig. M-1).



**Figura M-1. Esquema dels plàsmids facilitats pel Dr. Popoff amb les proteïnes de fusió toxina- $\epsilon$ -GFP i protoxina- $\epsilon$ -GFP.**

Els vam fer servir per amplificar diferents cDNA de les proteïnes de fusió i clonar-los al plàsmid d'expressió pGEX-4-T (Amersham Biosciences). Aquest vector inclou la seqüència que codifica per la part de la proteïna Glutatió-S-Transferasa (GST) amb afinitat pel glutatió. Si es clona un gen en pauta de lectura amb la GST s'obté una proteïna de fusió que es pot purificar fàcilment en columnes d'afinitat de glutatió. A més, el pGEX-4-T incorpora entre la GST i la proteïna clonada la seqüència de reconeixement per l'enzim trombina, per hidrolitzar la molècula i eluir la proteïna d'interès.

Per fer el clonatge, basant-nos en les seqüències nucleotídiques de la protoxina- $\epsilon$  (Genbank accession number: M95206) i del vector pEGFP (Genbank accession number: U76561), vam dissenyar els encebadors específics que ens permetrien amplificar per PCR les formes recombinants de la toxina- $\epsilon$  mostrades a la taula M-1.

Als extrems dels encebadors es van afegir els nucleòtids corresponents a les seqüències de tall dels enzims de restricció adients per digerir el vector

p-GEX-4-T i clonar-hi el cDNA en pauta de lectura amb la GST. Aquests enzims també són indicats a la taula M-1.

<b>Proteïna recombinant</b>	<b>Encebadors</b>	<b>Enzims restricció</b>
protoxina-ε	D: 5'CGCGAATTCGCTTCTTATGATAATGTAGATA <sup>3'</sup> I: 5'AAATCACTCTTATTACTGTATCCGATAAA <sup>3'</sup>	5': Eco RI 3': Sal I
toxina-ε	D: 5'CGCGAATTCGCTTCTTATGATAATGTAGATA <sup>3'</sup> I: 5'GCCCTTGCTCACCATGGTGCGA <sup>3'</sup>	5': Eco RI 3': Sal I
protoxina-ε-GFP	D: 5'CGCGAATTCGCTTCTTATGATAATGTAGATA <sup>3'</sup> I: 5'TAGCGACCGGCGCTCAGTTGGAAT <sup>3'</sup>	5': Eco RI 3': Not I
toxina-ε-GFP	D: 5'CGCGAATTCGCTTCT TATGATAATGTAGATA <sup>3'</sup> I: 5'TAGCGACCGGCGCTCAGTTGGAAT <sup>3'</sup>	5': Eco RI 3': Not I
GFP	D: 5'CGCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC <sup>3'</sup> I: 5'GCGAATTCCTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG <sup>3'</sup>	5': Bam HI 3': Eco RI

**Taula M-1. Proteïnes recombinants amb les corresponents parelles d'encebadors (Directe i Invers) i els enzims de restricció emprats per clonar-les al vector pGEX-4-T.**

L'amplificació per PCR es va fer segons un programa de 40 cicles de 30 seg a 94°C (desnaturalització), 1 min a 53°C (hibridació) i 2 min a 72°C (elongació). Finalment es va fer un pas adicional d'elongació de 10 min a 72°C.

El producte de la PCR es va fer córrer en una electroforesi en gel d'agarosa de l'1% per comprovar-ne la mida. Les bandes correctes es van

retallar i el cDNA va ser eluït de l'agarosa mitjançant el kit de purificació de DNA Bioclean (Biotools).

L'eluït va ser digerit durant 3 hores amb el parell d'enzims de restricció corresponent (taula M-1), i en el tampó recomanat per la casa comercial. El mateix es va fer amb el DNA del vector pGEX-4-T. Per evitar l'autolligació, el vector va ser defosforilat mitjançant la incubació durant 1 hora a 37°C amb fosfatasa alcalina (*calif intestinal Alkaline Phosphatase*, Promega) en el tampó administrat per la mateixa casa comercial.

La lligació del vector amb l'insert es va fer incubant-los en una proporció vector:insert de 1:3, en presència de l'enzim T4 DNA Lligasa (Fermentas) i en el tampó del propi enzim, a 12°C i durant tota la nit.

El producte resultant es va transformar en bacteris competents de la soca XL-1 Blue d'*E. coli*, com es descriu en l'apartat següent. Les colònies obtingudes es van fer créixer en tubs de 3 ml de medi LB i es va obtenir el seu DNA plasmídic amb el kit de mini-preps de Biotools. Un cop identificades les colònies positives, se'n van fer stocks glicerïnats per a la seva congelació a -80°C.

A més, es van transformar bacteris de la soca BL21(DE3)pLys amb DNA plasmídic d'aquestes colònies positives, amb l'objectiu d'optimitzar les condicions d'expressió de proteïna recombinant.

#### **4. Transformació de bacteris.**

Per cada transformació es va fer servir una alíquota de 200 µl de bacteris competents de la soca d'interés, preparats al laboratori pel mètode del CaCl<sub>2</sub>. S'hi va afegir el plàsmid a transformar (ja fos producte d'una



l·ligació o d'una mini-prep) i es va deixar reposar en gel durant 30 min. Passat aquest temps es va fer un shock tèrmic portant la barreja a 42°C i mantenint-la a aquesta temperatura durant 45 seg. Es va tornar immediatament al gel, s'hi van afegir 800 µl de medi LB, i es va fer créixer a 37°C en agitació durant 1 hora. Finalment, es van sembrar de 50 µl a 200 µl del cultiu en una placa de medi LB agar amb una concentració d'ampicilina de 50 µg/ml i es van incubar tota la nit a 37°C.

### **5. Expressió de proteïnes recombinants.**

Per a l'obtenció i purificació de les proteïnes recombinants, es van inocular 3 ml dels corresponents cultius bacterians crescuts durant la nit en 250 ml de medi LB amb 50 µg/ml d'ampicilina i es van fer créixer a 37°C fins que la seva densitat òptica llegida a 600 nm en un espectofotòmetre (Shimadzu UV-150-02) va estar entre 0,6 i 0,9. Llavors es va induir l'expressió de la proteïna recombinant amb Isopropyl β-D-thiogalactopiranoside (IPTG) 0,4 mM, durant tota la nit i a temperatura ambient (TA). Els cultius obtinguts es van centrifugar a 5800 x g durant 20 min en una centrífuga Beckman model J2-HS (rotor JA-14), i el pellet de bacteris resultant es va resuspendre en tampó de lisi i va ser congelat a -20°C un mínim de 2 hores. Després de descongelar la mostra, es va sonicar i centrifugar a 15000 x g. El sobrenedant resultant es va incubar en boles de glutathione-sepharose 4B (Amarsham Pharmacia Biotech) prèviament equilibrades amb PBS, durant 1 h a 4°C per aïllar i purificar la proteïna recombinant. Després de 3 rentats amb tampó d'el·lució es va incubar la glutatió-agarosa amb 4 U/ml de trombina humana (Sigma Aldrich T 6884) en el

mateix tampó durant tota la nit a 4°C. Aquest tractament allibera la proteïna recombinant de les boles d'agarosa, deixant-hi retinguda la GST. En el cas de la protoxina-ε-GFP, la trombina talla algunes de les molècules en llocs addicionals (de manera inespecífica) donant lloc a una barreja de protoxina-ε-GFP, toxina-ε i GFP lliures. Per tant, es va fer una darrera purificació en columna d'intercanvi aniònic per aconseguir una fracció pura de protoxina-ε-GFP.

## **6. Obtenció i manteniment de les diferents línies o cultius cel·lulars.**

- Cèl·lules Madine Darney Canine Kidney (MDCK): Provenents de túbuls distals de ronyó de gos, obtinguda de la ATCC (CCL-34).
- Cèl·lules endotelials HUVEC i 1G11: Cedides pel grup del Dr. Francesc Viñals, del departament de Ciències Fisiològiques II, de la Universitat de Barcelona.
- Cèl·lules endotelials H5V i cultius endotelials primaris BBEC: Obtingudes de Advancell *In Vitro* Cell Technologies, s.l., Parc Científic de Barcelona.
- Cultius mixtes d'astroglia i microglia: Els experiments amb cultius primaris d'astroglia i microglia van ser fets en col·laboració amb el grup del Dr. Joan Serratosa del Departament de Farmacologia i Toxicologia de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB, CSIC-IDIBAPS). Els cultius es van obtenir segons el mètode descrit per Giulian i Baker (1986).

Tots els cultius cel·lulars es van fer créixer i mantenir en un incubador RS Biotech model Galaxy S a 37°C en una atmosfera humida amb una concentració de CO<sub>2</sub> del 5%. Els medis de creixement emprats van ser:

**Cèl·lules MDCK:**

Medi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) amb 4,5 mg/ml de glucosa, 110 mg/l de piruvat de sodi, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml d'estreptomicina i suplementat amb Sèrum Boví Fetal (FBS) al 10%.

**Cèl·lules 1G11 i HUVEC:**

DMEM amb 20% FBS, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de sulfat d'estreptomicina, 150 µg/ml de suplement de creixement endotelial (Becton–Dickinson), 100 µg/ml d'heparina (Sigma), 1% d'aminoàcids no essencials i 2 mM de piruvat de sodi.

**Cèl·lules H5V:**

DMEM amb 1g/l de glucosa, 10% de FBS, 1% de Penicilina/ Estreptomicina, 1% de L-Glutamat i 10% d'HEPES.

**Cèl·lules BBEC:**

DMEM 1g/l de glucosa amb 10% sèrum boví neonatal (NCS), 10% HS, 1% de glutamina i 0,5% de gentamicina.

**Cultius astroglia-microglia:**

DMEM-HAM'S F12 amb 10% FBS.

## **7. Estudis de citotoxicitat.**

Les citotoxicitats de la protoxina- $\epsilon$ , la toxina- $\epsilon$ , la protoxina- $\epsilon$ -GFP i la toxina- $\epsilon$ -GFP es van analitzar sobre cèl·lules MDCK. Per fer-ho, es van incubar les cèl·lules a diferents concentracions de toxina (0, 5, 50, 100 i 500 nM) durant 1 h a 37°C, i posteriorment es va comprovar la viabilitat dels cultius amb l'assaig de MTT, com es descriu a l'apartat següent.

Cada experiment es va repetir 4 cops i les mitjanes i desviacions estàndards van ser comparades pel test estadístic *t*-student.

El mateix assaig es va utilitzar sobre cèl·lules H5V amb concentracions de toxina- $\epsilon$  de 0, 10, 25, 50, 100, 250 i 500 nM.

Per la resta de tipus cel·lulars es va fer servir l'assaig de citotoxicitat amb iodur de propidi, descrit més endavant.

## **8. Assaig de viabilitat cel·lular MTT.**

L'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 viables.

Les cèl·lules es fan créixer fins a un 80% de confluència. Després de tractar-les amb el compost del qual es vol comprovar la citotoxicitat durant els temps desitjats, s'afegeixen 0,5 mg/ml de MTT (Sigma Aldrich M5655) i es

mantenen durant 30 minuts a 37°C. La reacció s'atura amb solució d'isopropanol-HCl en un volum equivalent al volum de medi, llisant les cèl·lules. Un cop el formazan acumulat s'ha dissolt completament, s'agafa una mostra de 100 µl per mesurar-ne l'absorvència a 550 nm en una placa de 96 pouets en un lector de plaques (SLT Instruments 340 ATC).

### **9. Assaig de citotoxicitat amb iodur de propidi (IP).**

L'assaig es basa en la capacitat que té el IP de penetrar les membranes plasmàtiques de les cèl·lules mortes i acumular-se al seu nucli. Així, després d'incubar les cèl·lules amb el producte del qual es vol comprovar la seva citotoxicitat, a les dosis i temps d'estudi, s'afegeix IP a una concentració d'1 µg/ml, i s'observa directament al microscopi invertit de fluorescència. Excitant amb llum ultraviolada els nuclis de les cèl·lules mortes es poden veure de color vermell.

### **10. Immunofluorescència en cèl·lules i teixits.**

En aquest treball hem emprat tècniques de detecció amb anticossos (immunofluorescència) tant en talls histològics de teixit obtinguts amb criostat com en mostres de cultius de cèl·lules fixades, utilitzant un protocol similar en ambdós casos.

Un cop obtinguts els talls de teixit o les cèl·lules fixades sobre cubreobjectes de vidre, es van bloquejar les unions inespecífiques amb

tampó de bloqueig-1 durant un mínim d'una hora a TA. Després es va fer la incubació amb l'anticòs primari diluït a la concentració adient per a cada anticòs (Taula M-2) en tampó d'incubació-2 durant tota la nit a 4°C. Es van fer 3 rentats amb PBS i posteriorment es van incubar amb l'anticòs secundari (Molecular Probes) anti-ratolí o anti-conill segons l'espècie d'origen de cada anticòs primari (Taula M-2), conjugat amb el fluorocrom d'interès (Alexa 488 o Alexa 546) en el mateix tampó d'incubació-2 durant 45 min a TA.

Després de 3 rentats es va fer un darrer pas de fixació amb paraformaldehyd (PFA) 4%, es van fer 2 rentats més i es va muntar la mostra amb medi Immuno Fluore (ICN Biomedicals) per a la seva observació en un microscopi de fluorescència Nikon Eclipse E800 o en un microscopi confocal LEICA TCS 4D als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona (SCT UB).

<b>Anticòs primari</b>	<b>Dilució òptima</b>	<b>Orígen</b>
Anti-toxina-ε	1:100	Conill
Anti-GFP	1:100	Ratolí
Anti-GFAP	1:100	Conill
Anti-MBP	1:300	Ratolí
Anti-VAMP2	1:300	Ratolí
Anti-sintaxina HPC-I	1:500	Ratolí
Anti-SNAP25	1:100	Conill
Anti-RT 97	1:100	Ratolí

**Taula M-2. Dilucions utilitzades i espècie d'origen dels diferents anticossos utilitzats per immunofluorescència.**

## **11. Immunocitoquímica per microscopia electrònica.**

Les cèl·lules MDCK es van fer créixer sobre Thermanox fins al 100% de confluència, es van rentar 3 cops en PBS i van ser fixades amb PFA al 2%. Posteriorment, es van bloquejar les unions inespecífiques amb tampó de bloqueig-1, durant 45 min a TA. Es van incubar les cèl·lules amb protoxina- $\epsilon$ -GFP 200 nM en el mateix tampó, durant 1 h a TA. Es van rentar 3 cops amb PBS i es va fer un segon bloqueig d'unions inespecífiques (previ a la incubació amb anticossos primaris) amb tampó de bloqueig-2.

Després de 3 rentats de PBS es van afegir els anticossos primaris (anti-toxina- $\epsilon$  o anti-GFP) a una concentració 1:100 en el mateix tampó de bloqueig, durant 1 h a TA.

Es van fer 3 rentats més i es van incubar les cèl·lules amb l'anticòs secundari conjugat amb or col·loïdal de 10 nm de diàmetre, en el mateix tampó, durant 45 min.

Després de 3 rentats de PBS es va fer una fixació primària amb tampó de fixació-1, durant 2 h a TA, seguida d'una post-fixació amb tampó de fixació-2, durant 1 h a TA.

Finalment, es van deshidratar les mostres en acetona i es van incloure en resina Spurr. Es van obtenir seccions ultrafines amb un ultramicròtom Reichert-Jung Ultracut E, es van tenyir amb acetat d'uracil i citrat de plom, i es va procedir a l'observació amb un microscopi electrònic de transmissió Hitachi H-600 AB (SCT UB).

### **12. Assaig d'unió de protoxina- $\epsilon$ -GFP i toxina- $\epsilon$ -GFP sobre cèl·lules MDCK vives.**

Les cèl·lules es van fer créixer fins a confluència en plaques de 24 pouets. El medi de cultiu es va canviar per tampó d'incubació-1 i es va mantenir durant 1 h. En el mateix tampó es va fer la incubació amb protoxina- $\epsilon$ -GFP o toxina- $\epsilon$ -GFP durant 1 h a 4°C. Passat aquest temps es van portar les cèl·lules a 37°C, i després de diferents temps (0, 10, 30 i 60 min), es van rentar les cèl·lules 3 cops en PBS i es van fixar en PFA 4% durant 20 min. Finalment, després de 2 rentats de PBS, es van observar en un microscopi invertit de fluorescència LEICA DMIRB/E (SCT UB).

### **13. Assaig d'unió de protoxina- $\epsilon$ -GFP i toxina- $\epsilon$ -GFP sobre cèl·lules fixades.**

Aquest assaig el vam realitzar sobre diferents tipus cel·lulars (MDCK, HUVEC, 1G11, H5V, BBEC i cultius d'astroglia i microglia).

Les cèl·lules es van fer créixer sobre cubreobjectes fins a confluència, es van rentar 3 cops en PBS, es van fixar durant 20 min amb PFA al 4% i es van rentar 2 cops més en PBS.

El bloqueig d'unions inespecífiques es va fer durant 1 h amb tampó de bloqueig-1. En el mateix tampó es van fer les incubacions amb protoxina- $\epsilon$ -GFP o toxina- $\epsilon$ -GFP a una concentració de 200 nM, durant 1 h, i a la temperatura d'estudi (4°C o TA).



Després de 3 rentats de PBS, les cèl·lules es van fixar un altre cop durant 10 min amb PFA al 4%.

Finalment, es van fer 2 rentats de PBS i es van muntar els cubreobjectes amb medi Immuno Fluore (ICN Biomedicals), per a la seva observació en un microscopi confocal LEICA TCS 4D (SCT UB).

En el cas de les cèl·lules MDCK es van fer els següents experiments addicionals:

- Per demostrar l'especificitat de la unió, les incubacions amb protoxina- $\epsilon$ -GFP i toxina- $\epsilon$ -GFP es van fer en excès de toxina- $\epsilon$  o protoxina- $\epsilon$  en una relació molar de 20:1.

- Per analitzar l'efecte del detergent sobre la unió, el pas de bloqueig es va fer en presència de tritó X-100 a una concentració de 0,2%. La resta de passos es va fer sense detergent, com s'ha descrit més amunt.

#### ***14. Injecció intravenosa de les toxines recombinants en rata i ratolí.***

Els animals van ser anestesiats amb 35 mg/kg de pentobarbital sòdic o amb una barreja de ketamina (100 mg/kg) i xilazina (10 mg/kg) injectats intraperitonealment.

La mostra de proteïna a injectar es va preparar en un tampó PBS amb 1% de BSA a la concentració adequada per a cada experiment. La injecció es va fer a nivell de la vena de la cua i el volum d'injecció va ser sempre

de 100 µl en el cas de ratolí i de 200 µl en el cas de la rata. Després d'esperar el temps convingut per a cada experiment, es va procedir al sacrifici de l'animal per dislocació cervical. En alguns dels casos en què la proteïna injectada va ser la toxina-ε, es va esperar que la mort de l'animal esdevingués pels efectes de la toxina.

### ***15. Obtenció i processat dels òrgans de rata i ratolí per a l'obtenció de talls histològics.***

Un cop mort l'animal es va procedir a l'extracció de tots els òrgans d'interès i es van fixar immediatament per immersió en PFA al 4%.

Després d'esperar un mínim de 24 h, els òrgans van seguir dos protocols diferents, segons si interessava fer-ne talls al criostat o al micròtom. Els primers es van incloure en una solució de sucrosa al 30% en aigua, el temps suficient per a què la sucrosa penetrés totalment al teixit, es van congelar en isobutanol i es van obtenir talls de 6 µm de gruix en un criostat Leica Jung Frigocut 2800 E. Els segons es van incloure en parafina i es van obtenir talls histològics en un micròtom Leica RM2135, que van ser muntats en portaobjectes per a la seva posterior tinció amb hematoxilina/eosina (H/E), segons el mètode convencional.

## **16. Incubacions de protoxina- $\epsilon$ -GFP sobre talls histològics de criostat.**

Aquest tipus d'assaig ens permet analitzar la unió *in vitro* de la toxina- $\epsilon$  sobre òrgans que presenten o no sensibilitat *in vivo* a la toxina.

La tècnica és molt semblant a la utilitzada per la immunofluorescència. Així, es van bloquejar les unions inespecífiques incubant els talls amb tampó de bloqueig-1 durant 1 h a TA. Es va afegir la protoxina- $\epsilon$ -GFP a una concentració 200 nM en el mateix tampó, durant 1 h a TA. Finalment, després de 3 rentats de PBS es va fer un darrer pas de fixació amb PFA al 4% durant 10 min, es va rentar 3 cops amb PBS i es van muntar els portaobjectes en medi Immuno Fluore (ICN Biomedicals) per a la seva observació en un microscopi confocal LEICA TCS 4D (SCT UB).

## **17. Assaig de permeabilitat cel·lular en un model *in vitro* de Barrera Hemato-Encefàlica bovina amb cèl·lules BBEC.**

L'assaig va ser realitzat per l'empresa Advancell *In Vitro* Cell Technologies, s.l., segons el seu protocol normalitzat de treball PNT0028.

Es basa en mesurar la quantitat d'inulina- $H^3$  capaç de travessar la monocapa de cèl·lules endotelials de cervell boví (BBEC).

Es va aplicar la inulina- $H^3$ , en presència o no de toxina- $\epsilon$  o protoxina- $\epsilon$ , sobre cèl·lules BBEC polaritzades sobre inserts o transwells de 24 mm (0,4  $\mu$ m de porus) en co-cultiu amb astròcits durant 12 dies.

La inulina- $H^3$  es va aplicar sola o combinada amb toxina- $\epsilon$  o protoxina- $\epsilon$  a dos concentracions diferents (10 nM i 100 nM), al compartiment apical del transwell i per triplicat. A cada condició experimental es van recollir mostres de 150  $\mu$ l d'ambdós compartiments i a diferents temps (30, 90 i 180 min), i es van analitzar mitjançant la detecció de radioactivitat en un comptador de centelleig. Es va avaluar la permeabilitat del cultiu a la inulina- $H^3$  mitjançant el càlcul del flux basal d'inulina (%) a cada temps, i per a cada condició es va calcular l'increment de permeabilitat respecte el control d'inulina sola.

### **18. Obtenció de sinaptosomes de rata i ratolí.**

Per a l'obtenció de sinaptosomes vam emprar 1 rata de 150 g o 3 ratolins de 20 g per experiment. Després de decapitar els animals vam extreure ràpidament el cervell i cerebel i els vam submergir en sucrosa 320 mM. Es va homogenitzar 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 3000 x g en una centrífuga Beckman J2-HS durant 2 min a 4°C. El sobrenedant es va tornar a centrifugar a la mateixa centrífuga a 14500 x g durant 12 min a 4°C. El sobrenedant es va descartar i el pellet es va resuspendre en 4 ml de sucrosa 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%, segons l'esquema següent:



**Figura M-2. Càrrega de la mostra de sinaptosomes (SS) sobre un gradient discontinu de ficoll.**

Es va centrifugar a 22500 rpm durant 35 min a 4°C en un rotor vasculant SW41 a l'ultracentrífuga Beckman L-60. Amb aquest procés apareixen dues fraccions enriquides en sinaptosomes, a les interfases entre la fase del 5% i la del 9%, i a la que queda entre la del 9% i la del 12% de ficoll. Es van recuperar i ajuntar aquestes fraccions. Després de quantificar-ne la concentració de proteïna total pel mètode de Bradford (Bradford, 1976), es van fer alíquotes de 500 µg i es van centrifugar a 20800 x g en una microcentrífuga Eppendorf 5417R durant 12 min a 4°C. El pellet resultant es pot mantenir en gel durant varies hores sense que els sinaptosomes perdin la seva capacitat d'alliberar glutamat.

### **19. Assaig de secreció de glutamat en sinaptosomes aïllats.**

Els sinaptosomes aïllats mantenen les seves propietats sinàptiques durant unes quantes hores. Si despolaritzem la membrana en presència de  $\text{Ca}^{2+}$ , aquest entra dins el sinaptosoma i estimula la fusió de vesícules sinàptiques amb la conseqüent alliberació de glutamat. Aquesta alliberació es pot mesurar en un fluorímetre gràcies a la reacció de la glutamat deshidrogenasa (GDH), que en convertir el glutamat a  $\alpha$ -cetoglutarat redueix el  $\text{NADP}^+$  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- $\epsilon$  era capaç d'estimular la secreció de glutamat en sinaptosomes, tant de rata com de ratolí, vam agafar alíquotes de sinaptosomes de 500  $\mu\text{g}$  de proteïna cada una. Es van resuspendre en 500  $\mu\text{l}$  de tampó de sodi i es van atemperar durant 15 minuts a  $37^\circ\text{C}$ . Després es van afegir 1500  $\mu\text{l}$  de tampó de sodi a  $37^\circ\text{C}$  i es van afegir els reactius necessaris per la mesura de l'alliberació de glutamat:

NADP<sup>+</sup> 1 mM

CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM

GDH

La despolarització de la membrana dels sinaptosomes control es va fer amb KCl 50 mM, i es va mesurar l'aparició de NADPH en un espectrofluorímetre Shimadzu RF-500 IPC durant 8 minuts, abans de posar 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- $\epsilon$  era capaç de despolaritzar per sí sola la membrana dels sinaptosomes es va substituir el KCl per toxina- $\epsilon$  a una concentració final de 100 nM i es va mesurar l'aparició de NADPH de la manera descrita.





## **RESULTATS**



**1. *Obtenció de diferents formes recombinants de toxina- $\epsilon$  fusionades o no a la proteïna verda fluorescent (GFP).***

**RESULTATS**



El nostre primer objectiu va ser obtenir formes recombinants de la toxina- $\epsilon$ , en forma simple o fusionada amb la GFP. D'aquesta manera disposaríem de grans quantitats de toxina- $\epsilon$  de forma ràpida i eficaç, amb un alt grau de puresa i, a més, amb la presència de la GFP obtindríem una potent eina molecular per a l'estudi de la toxina- $\epsilon$ , ja que ens podria permetre visualitzar la molècula de manera directa en un microscopi de fluorescència.

Com hem dit abans, la toxina- $\epsilon$  se sintetitza en forma de protoxina inactiva, que requereix de l'eliminació de dos pèptids, un a cada extrem de la molècula, per esdevenir activa.

El grup del Dr. Michel Popoff, de l'Institut Pasteur de París (França), va clonar la seqüència de DNA que codifica per a la toxina activa (sense els pèptids dels extrems) en el vector d'expressió pEGFP, obtenint una proteïna de fusió amb la GFP (toxina- $\epsilon$ -GFP). Així, aquesta molècula ja se sintetitza en forma activa, i no requereix de posteriors tractaments amb tripsina.

De la mateixa manera, van clonar una forma recombinant de la protoxina- $\epsilon$ , a la qual li mancava el pèptid de l'extrem N-terminal, però conservava el de l'extrem C-terminal, essent la proteïna de fusió resultant (protoxina- $\epsilon$ -GFP) inactiva.

Vam utilitzar aquestes construccions de DNA per reamplificar i clonar diferents formes recombinants de la toxina- $\epsilon$  (toxina- $\epsilon$ , protoxina- $\epsilon$ , toxina- $\epsilon$ -GFP i protoxina- $\epsilon$ -GFP) així com la GFP sola, en un altre vector d'expressió de procariotes, el pGEX-4-T (Amersham Biosciences), per facilitar la purificació de la proteïna expressada i augmentar el grau de puresa.

Per fer-ho, vam utilitzar encebadors específics, dissenyats a partir de les seqüències nucleotídiques de la protoxina- $\epsilon$  i del vector pEGFP.

La forma GFP-protoxina- $\epsilon$  va ser obtinguda *a posteriori*, a partir dels plàsmids corresponents a la GFP i a la protoxina- $\epsilon$ . El DNA de la GFP va ser extret del seu vector i insertat en el de la protoxina, immediatament davant seu, en pauta de lectura. Així, amb aquesta construcció, podem obtenir fàcilment dues proteïnes diferents: GFP-protoxina- $\epsilon$  i GFP-toxina- $\epsilon$ , ja que aquesta darrera s'obté activant la primera amb tripsina.

La figura R-1.1 mostra les diferents construccions que vam clonar, amb els enzims de restricció que es van utilitzar per insertar-les al vector pGEX-4-T.

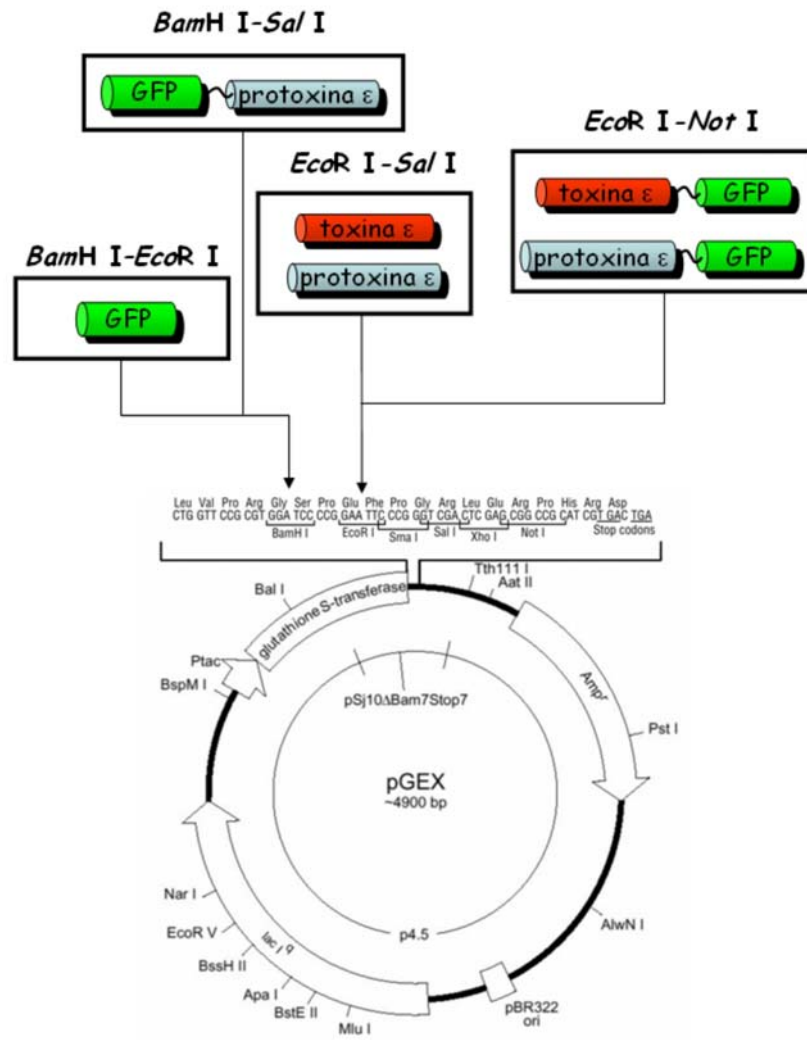


Figura R-1.1. Formes recombinants clonades al vector pGEX-4-T.

Els plàsmids van ser transformats a *E. coli*, obtenint soques que expressaven de manera estable totes les formes recombinants.

L'expressió és induïda amb IPTG, donant com a resultat una proteïna de fusió entre la GST del plàsmid pGEX-4-T i la proteïna clonada. L'afinitat de la GST pel glutatió s'aprofita per a la purificació mitjançant boles d'agarosa amb glutatió conjugat. Amb la incubació posterior amb trombina aconseguim separar la nostra proteïna de la GST, que queda retinguda a les boles d'agarosa.

La figura R-1.2 mostra la producció de totes les formes recombinants després de la seva purificació i elució amb trombina, amb tinció de Coomassie Blue (Fig. R-1.2A). Les proteïnes que contenen GFP queden de manifest al exposar-les a la llum ultraviolada en un transil·luminador (Fig. R-1.2B). Finalment, el contingut en toxina- $\epsilon$  va ser demostrat mitjançant western-blott amb anticossos específics per a la toxina- $\epsilon$  (Fig. R-1.2C).

Els pesos moleculars de totes aquestes formes recombinants coincideixen amb els esperats, 30 kDa per la toxina- $\epsilon$ , 33 kDa per la protoxina- $\epsilon$ , 59 kDa per la toxina- $\epsilon$ -GFP i per la GFP-toxina- $\epsilon$ , i 61 kDa per la protoxina- $\epsilon$ -GFP i per la GFP-protoxina- $\epsilon$ .



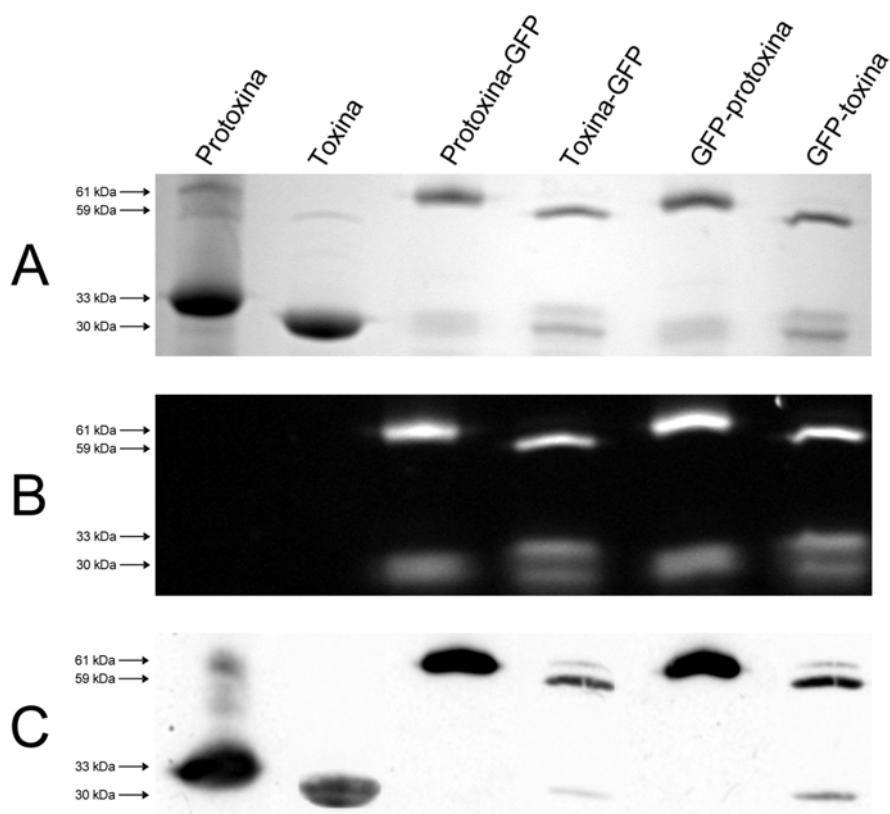


Figura R-1.2. Expressió i purificació de les diferents formes recombinants de toxina- $\epsilon$ . Després de la purificació amb boles d'agarosa-glutatió i elució amb trombina es va realitzar una SDS-PAGE amb les proteïnes obtingudes. Aquestes van mostrar el pes molecular esperat en una tinció de Coomassie blue (A). El contingut en GFP de les proteïnes de fusió es va demostrar exposant el gel a llum ultraviolada (B). La presència de toxina- $\epsilon$  en totes les proteïnes expressades es va posar de manifest amb un western blot amb anticossos contra la toxina- $\epsilon$  (C). Les fletxes assenyalen el pes molecular (kDa) de cadascuna de les formes recombinants produïdes.



***2. Efecte de la toxina- $\epsilon$  a cèl·lules MDCK i als túbuls renals in vivo.***

**RESULTATS**



Aquest capítol correspon a l'article **Effect of  $\epsilon$  toxin-GFP on MDCK cells and renal tubules in vivo**, publicat a la revista *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52(7):931-42 (2004).

En ell describim en primer lloc el procés de validació de les formes recombinants de la toxina- $\epsilon$  en comparació amb la toxina nativa de *C. perfringens*. Mitjançant tant assajos bioquímics de citotoxicitat com estudis morfològics en cèl·lules MDCK veiem que les formes recombinants toxina- $\epsilon$  i toxina- $\epsilon$ -GFP mostren propietats equivalents a la forma nativa de toxina- $\epsilon$ , mentre que les formes recombinants de protoxina- $\epsilon$  no mostren citotoxicitat significativa, essent comparables a la protoxina nativa.

Així mateix, describim, a través de tècniques microscòpiques (tant microscopia electrònica com immunofluorescència), algunes de les característiques de la unió d'aquestes molècules a la membrana de cèl·lules MDCK, com són la seva dependència de la temperatura i l'efecte dels detergents.

En un segon bloc experimental d'aquest article mostrem els resultats obtinguts en ratolí com a model d'intoxicació aguda per toxina- $\epsilon$ . Demostrem l'especificitat de la unió a túbuls distals renals, així com la greu degeneració que pateixen aquests després de la injecció de toxina- $\epsilon$ -GFP. Mostrem també la unió tant de protoxina- $\epsilon$ -GFP com de toxina- $\epsilon$ -GFP a l'endoteli capil·lar d'arreu l'organisme.

Finalment, mitjançant incubacions *in vitro* de talls histològics de ronyó amb protoxina- $\epsilon$ -GFP, hem pogut ampliar l'estudi a d'altres espècies animals, inclosa la humana, on també describim unió específica a túbuls distals.

Hem transcrit íntegrament la versió final publicada de l'article, amb l'únic canvi dels números de les figures que, per unificar el criteri amb la resta de figures del treball, hem renombrat com a R-2.1 fins a R-2.6.



**Effect of epsilon-toxin-GFP on MDCK cells and renal tubules *in vivo***

Alex Soler-Jover<sup>1</sup>, Juan Blasi<sup>1</sup>, Inma Gómez de Aranda<sup>1</sup>, Piedad Navarro<sup>1</sup>, Maryse Gibert<sup>2</sup>, Michel R. Popoff<sup>2</sup> and Mireia Martín-Satué<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica. Campus de Bellvitge. Universitat de Barcelona. Feixa Llarga s/n. E-08907 L'Hospitalet de Llobregat. Spain.

<sup>2</sup> CNR Anaérobies, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France.

**2.1 ABSTRACT**

Epsilon toxin ( $\epsilon$ -toxin), produced by *Clostridium perfringens* types B and D, causes fatal enterotoxemia, also known as pulpy kidney disease, in livestock.

Recombinant  $\epsilon$ -toxin-Green Fluorescence Protein ( $\epsilon$ -toxin-GFP) and  $\epsilon$ -prototoxin- Green Fluorescence Protein ( $\epsilon$ -prototoxin-GFP) were successfully expressed in *Escherichia coli*. MTT assays on MDCK cells confirmed that recombinant  $\epsilon$ -toxin-GFP retained the cytotoxicity of the native toxin. Direct fluorescence analysis of MDCK cells revealed a homogeneous peripheral pattern which was temperature sensitive and susceptible to detergent.

$\epsilon$ -Toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP bound to endothelia in various organs of injected mice, especially the brain. However, fluorescence mainly accumulated in kidneys. Mice injected with  $\epsilon$ -toxin-GFP showed severe kidney alteration including haemorrhagic medullae and selective degeneration of distal tubules. Moreover, experiments on kidney cryoslices demonstrated specific binding to distal tubule cells of a range of species.

In conclusion, we demonstrate with new recombinant fluorescence tools that  $\epsilon$ -toxin binds in vivo to endothelial cells and renal tubules, where it has a strong cytotoxic effect. Our binding experiments indicate that an  $\epsilon$ -toxin receptor is expressed on renal distal tubules of mammalian species including human.

Key words: Clostridial toxins, epsilon toxin, MDCK cells, renal tubules, pulpy kidney disease



## 2.2 INTRODUCTION

Epsilon toxin ( $\epsilon$ -toxin) is the most potent clostridial toxin after botulinum and tetanus neurotoxins. It is produced by *Clostridium perfringens* types B and D and causes fatal enterotoxemia 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 intestines of most animals. Bacterial numbers remain small because of peristalsis and clinical disease does not occur unless the microbial balance in the gut is disrupted. Thus, small amounts of  $\epsilon$ -toxin in the gut of healthy animals are considered innocuous. However, when the intestine is altered by sudden changes in diet or other factors, bacteria proliferate rapidly and produce large amounts of this toxin. Intestinal mucosal permeability is increased by  $\epsilon$ -toxin, thereby facilitating its absorption into circulation (reviewed by Finnie 2004). Disease is principally manifested as severe and often fatal neurological disturbance; oedema of lungs, heart, kidneys and intestine are also clinical signs related to microvascular damage (Songer 1996). This pathology is also known as pulpy kidney and overeating disease.

$\epsilon$ -toxin is encoded by the *etx* gene (Hunter et al. 1992) and synthesized and secreted as an inactive prototoxin of 311 amino acids (32.7 kDa) that is converted to the fully active toxin by proteolytic removal of a basic N-terminal peptide of 14 residues and of 23 C-terminal residues (Bhown and Habeeb 1977, Minami et al. 1997). This proteolytic activation usually occurs in the gut of infected animals by trypsin and chymotrypsin, but it can also be achieved *in vitro* by controlled enzyme digestion.

The Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line, of epithelial origin from the distal convoluted tubule, is susceptible to  $\epsilon$ -toxin (Payne et al. 1994). The cytotoxic effects are very fast and enhanced by EDTA (Lindsay 1996). Cells undergo both cell-cycle alterations (Borrmann et al. 2001) and morphological changes, including swelling and large bleb formation in a process that is independent of the actin cytoskeleton and endocytosis (Petit et al. 1997, Borrmann et al. 2001). The intoxication process correlates with the formation of a membrane complex of about 155 kDa and the efflux of intracellular  $K^+$  and the influx of  $Na^+$ ,  $Cl^-$  and  $Ca^{++}$  without entry of the toxin into the cytosol (Petit et al. 1997, Borrmann et al. 2001, Petit et al. 2001). The toxin decreases the *trans*-epithelial resistance of polarized MDCK cells without affecting intercellular junctions (Petit et al. 2003). The membrane complex is also formed in synaptosomes and corresponds to toxin heptamerization (Miyata et al. 2001). In artificial lipid membranes, epsilon toxin induces large pore formation, which seems to constitute its main cytotoxic mechanism (Petit et al. 2001). Furthermore, heptameric pore formation has recently been described within the detergent-insoluble microdomains of MDCK cells and rat synaptosomes (Miyata et al. 2002). Animal models have also been used to study  $\epsilon$ -toxin effects. Vasogenic cerebral oedema has been described in mice (Gardner 1973, Morgan et al. 1975, Finnie 1984), rats (Finnie et al. 1999, Ghabriel et al. 2000, Zhu et al. 2001) and calves (Uzal et al. 2002) injected with the toxin, and pulmonary and cardiovascular lesions have also been described elsewhere (Sakurai et al. 1983, Uzal et al. 2002). Specific receptor sites have been identified in cerebral microvasculature (Buxton 1978a, Nagahama and Sakurai 1991) and disruption of the blood brain barrier, which causes a rapid and substantial increase in vascular permeability, leads to severe, diffuse

vasogenic oedema (reviewed by Finnie 2004). Moreover, morphological kidney alterations were described on infected domestic animals (pulpy kidney) as well as in intravenously injected mice (Buxton 1978a, Tamai et al. 2003).

Here we use recombinant techniques to develop Green Fluorescence Protein-fused  $\epsilon$ -toxin and  $\epsilon$ -prototoxin that could be directly visualized under fluorescence microscope. We demonstrate that both proteins bind to the MDCK cell membrane and that only the toxin is cytotoxic, thus retaining the binding properties and cytotoxicity of the non-fluorescent proteins. We analysed the organ distribution, tissue localization and histopathology of these proteins in intravenously injected mice. Given that kidneys are, in addition to brain, critical target organs for  $\epsilon$ -toxin intoxication (pulpy kidney disease), we further analysed these organs by ligand-receptor binding assays on cryostat slices.

## 2.3 MATERIALS AND METHODS

### Expression cDNA constructs:

$\epsilon$ -toxin and  $\epsilon$ -prototoxin cDNAs were amplified from strain NCTC2062 of *Clostridium perfringens* type D by polymerase chain reaction (PCR). Primers for  $\epsilon$ -prototoxin delimited the coding sequence from K46 to the end without the STOP codon and added the restriction sites HindIII and PstI at the 5' and 3' ends respectively. Primers for  $\epsilon$ -toxin delimited the coding sequence from K46 to Y299 and added the same restriction sites as for the  $\epsilon$ -prototoxin. These two enzymes were used to clone both forms into pEGFP expression plasmid (Clontech, Palo Alto, CA), obtaining two fusion proteins with Green Fluorescent Protein (GFP):  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP.

To improve the efficiency of protein purification, these constructions were used to reamplify and clone  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP into pGEX-4T-1 expression plasmid (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) by another PCR with new primers.  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP were cloned using EcoRI and NotI restriction enzymes. Thus two new fusion proteins between Glutathione-S-Transferase (GST) and amplified products were obtained: GST- $\epsilon$ -toxin-GFP and GST- $\epsilon$ -prototoxin-GFP. These plasmids were transformed in Rosetta™ *E.coli* host strain (Novagen, Madison, WI).

### Protein expression and purification:

The expression of recombinant proteins was induced overnight at room temperature (RT), in 250 ml LB medium cultures with 0.4 mM isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG).

Cells were pelleted and resuspended in ice cold buffer containing phosphate-buffered saline (PBS), 1% Triton X-100, 0.1 mg/ml

phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 10  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, and sonicated and centrifuged at 15000 x g for 20 min. The resultant supernatant was incubated with 0.5 ml of previously PBS-equilibrated Glutathione Sepharose™ 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) beads for 1 hour at 4°C. Finally, recombinant proteins were eluted by thrombin elution in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 with 150 mM NaCl and 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , following the manufacturer's instructions. We routinely performed a further purification step and isolated  $\epsilon$ -prototoxin-GFP by anion exchange chromatography.

For MTT assay,  $\epsilon$ -prototoxin-GFP was activated by trypsin proteolysis with trypsin beads (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) following manufacturer's instructions.

Native  $\epsilon$ -toxin was purified by ion-exchange chromatography as previously described (17).

**Protein analyses:**

Samples of  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP were loaded in a 12% acrylamide-bisacrylamide gel. After SDS-PAGE, the proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA) with a semi-dry unit (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). After blocking using 5% non-fat dry milk in Tris-Buffered Saline (TBS) containing 0.1% Tween 20, membranes were incubated with 1:1000 concentration of anti- $\epsilon$ -toxin rabbit polyclonal antibody, prepared as previously described (Popoff 1987), for 1 hour at RT. After 3 washes in the same buffer the membrane was incubated with anti-rabbit immunoglobulins conjugated to horseradish peroxidase (DAKO, Glostrup, Denmark). Finally, after 5 washes the blot was developed using the enhanced chemiluminescence method (ECL).

**Cell cultures:**

MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing glucose (4.5 mg/ml), sodium pyruvate (110 mg/l), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), and maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

**MTT cell death assay:**

The assay is based on the capacity of living cells to reduce yellow tetrazolium MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) and thus generate reducing equivalents such as NADH and NADPH. The resulting intracellular purple formazan can be solubilized and quantified by spectrophotometric means, and is proportional to the number of viable cells.

MDCK cells were grown to 80% confluence. Treated cells were incubated for 30 minutes at 37°C with 5 nM, 50 nM, 100 nM and 500 nM native  $\epsilon$ -toxin,  $\epsilon$ -toxin-GFP, trypsin-activated  $\epsilon$ -prototoxin-GFP or  $\epsilon$ -prototoxin-GFP in PBS. Control cells were incubated with PBS. Thereafter, 0.5 mg/ml MTT (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was added and maintained for 30 min at 37°C. The reaction was stopped by adding an equal volume of isopropanol/1M HCl (24:1) and the cells were then lysed. Formazan was measured at 550 nm in a 96-microtiter plate. The experiment was done 4 times for each treatment, and means and standard errors were obtained and compared statistically by Student's *t*-test.

**Binding assays to living MDCK cells:**

Cells were grown to confluence on 24 wells plates. Growing medium was replaced by a buffer containing 5 mM KCl, 140 mM NaCl, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM glucose and 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4. Cells were maintained in this buffer for 1 hour, then incubated with 200 nM  $\epsilon$ -prototoxin-GFP or  $\epsilon$ -toxin-GFP in the same buffer for 1 hour at 4°C and then brought to 37°C. After the appropriate periods of time (0, 10, 30 and 60 min), cells were washed 3 times in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes, washed twice in PBS, and examined under a LEICA DMIRB/E inverted fluorescence microscope.

**Binding assays to fixed MDCK cells:**

Cells were grown on coverslips to confluence, washed 3 times in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. Nonspecific binding was blocked by incubating the cells in PBS containing 0.2% gelatin and 10% FBS for 1 hour. Incubations with 200 nM  $\epsilon$ -toxin-GFP or  $\epsilon$ -prototoxin-GFP were performed in the same buffer for 1 hour at 4°C or RT. After 3 washes in PBS, cells were fixed again with 4% paraformaldehyde for 10 minutes, then washed twice in PBS and mounted on slides using Immuno Fluore Mounting Medium (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA), followed by examination under a Leica TCS 4D confocal microscope (Serveis Científic-Tècnics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain).

To demonstrate the specificity of binding, competition experiments were carried out by co-incubating the cells with native  $\epsilon$ -toxin and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP or  $\epsilon$ -toxin-GFP in a 20:1 molar ratio. For detergent experiments, blocking was done at 4°C in the presence of 0.2% Triton X-100. The following steps were performed at RT in the absence of detergent.

**Electron microscopy:**

MDCK cells were grown on Thermanox to 100% confluence, washed 3 times in PBS and fixed with 2% paraformaldehyde. Nonspecific binding was blocked by incubating the cells in a buffer containing PBS, 0.2% gelatin and 10% FBS for 45 min. Incubations with 200 nM  $\epsilon$ -prototoxin-GFP were performed in the same buffer for 1 hour at RT. After 3 washes, another blocking step was done with PBS containing 1% BSA for 20 min. Next, cells were incubated with 1:100 dilution of anti- $\epsilon$ -toxin polyclonal antibody in the same buffer for 1 hour. After 3 washes, the secondary antibody incubation was performed with 1:25 anti-rabbit immunoglobulins conjugated with 10 nm gold beads in the same buffer for 45 minutes. After 3 washes, cells were fixed in 2% paraformaldehyde, 2.5 % glutaraldehyde in 100 mM PBS for 2 h at room temperature. Primary fixation was followed by post-fixation with 1.0 % osmium tetroxide in 100 mM PBS for 1 h. The samples were dehydrated in acetone and embedded in Spurr resin. After sectioning with a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome, ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a Hitachi H-600 AB transmission electron microscope (Serveis Científic-Tècnics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain).

***In vivo* studies in a murine model:**

Male OF1 Swiss mice weighing 20 g were anesthetized with sodium pentothal (35 mg/kg).  $\epsilon$ -Toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP were prepared in PBS with 1% BSA and injected intravenously. Tested doses of  $\epsilon$ -toxin-GFP were 7 ng/g, 14 ng/g, 70 ng/g, 750 ng/g and 2500ng/g per mouse. Animals injected with  $\epsilon$ -prototoxin-GFP and GFP alone (2.5  $\mu$ g/g each) were sacrificed after 15 min. Organs (kidneys, brain, heart, lung, liver, spleen,



testes, gut) were extracted and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 12 hours. One half of each organ was embedded in paraffin, cut and stained with haematoxylin and eosin (HE). The other half was immersed in 30% sucrose, frozen in isobutanol, cut in a cryostat to 6  $\mu\text{m}$  slices and immediately mounted on slides using Immuno Floure Mounting Medium and observed under a Leica TCS 4D confocal microscope (Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain).

Control experiments were also performed by injecting 1.65  $\mu\text{g/g}$  native  $\epsilon$ -prototoxin simultaneously with 2.5  $\mu\text{g/g}$   $\epsilon$ -prototoxin-GFP (10:1 molar ratio). Organs were processed as described above.

Experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of November 1986 (86/609/EEC) and approved by the Institutional Review Board at the University of Barcelona.

#### **$\epsilon$ -Toxin-GFP and $\epsilon$ -prototoxin-GFP incubations on kidney slices:**

Kidneys from OF1 Swiss mice were processed to obtain cryostat slices as described above. Nonspecific binding was blocked by incubating the slices in PBS containing 0.2% gelatin and 10% FBS for 1 hour. The incubation with  $\epsilon$ -toxin-GFP or  $\epsilon$ -prototoxin-GFP was performed in the same buffer at a 200 nM concentration for 1 hour at RT. After 3 PBS washes, the samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 minutes, mounted with Immuno Floure Mounting Medium (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) and examined under a Nikon Eclipse E800 fluorescence microscope.

In some experiments, blocking steps were performed in the presence of 0.2% Triton X-100.

For competition experiments slices were coincubated with native  $\epsilon$ -toxin and  $\epsilon$ -toxin-GFP or  $\epsilon$ -prototoxin-GFP in a 20:1 molar ratio.

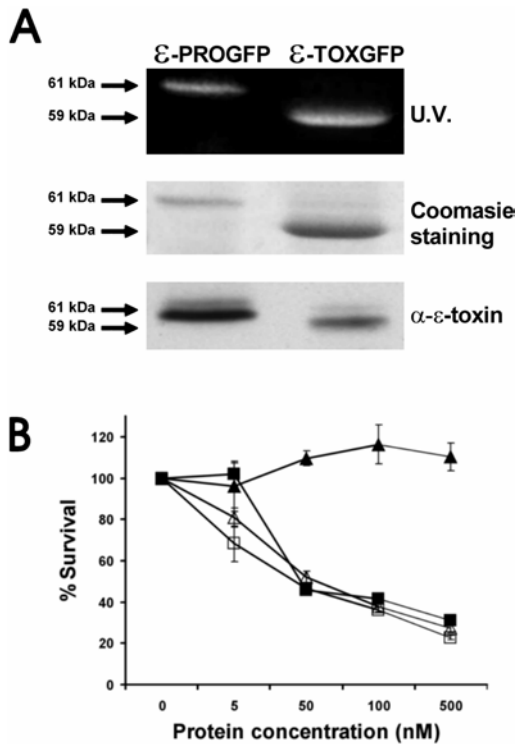
The same incubation experiments were done with kidneys from rat, sheep, cow and human. Sheep and cow samples were obtained from Mercabarna slaughterhouse in Barcelona. Slices from human healthy kidney were provided by the Servei d'Anatomia Patològica from Hospital Princeps d'Espanya, (L'Hospitalet de Llobregat, Spain). Samples were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 12 hours and processed as described for mice to obtain cryostat slices and perform overlay experiments.

## 2.4 RESULTS

### **Recombinant $\epsilon$ -toxin-GFP and $\epsilon$ -prototoxin-GFP expression and characterization:**

Recombinant  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP were cloned and successfully expressed in *Escherichia coli*. After purification and SDS-PAGE, fluorescent bands were observed in a u.v. transilluminator. These bands had the expected size for recombinant proteins, as revealed by Coomassie Blue staining. Moreover, Western immunoblotting confirmed their  $\epsilon$ -toxin content (Figure R-2.1A).

To functionally characterize  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP, we performed MTT death assays on MDCK cells (Figure R-2.1B). The cells were exposed to a range of concentrations of native and recombinant  $\epsilon$ -toxin forms (0, 5, 50, 100 or 500 nM).  $\epsilon$ -Toxin-GFP showed similar cytotoxicity to native  $\epsilon$ -toxin while no significant cytotoxic effect was found for  $\epsilon$ -prototoxin-GFP. MTT assay also confirmed that trypsin-activated  $\epsilon$ -prototoxin-GFP showed comparable cytotoxicity to  $\epsilon$ -toxin-GFP and native  $\epsilon$ -toxin.



**Figure R-2.1.** Characterization and cytotoxic effect of  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP on MDCK cells. (A) Both  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP were expressed as GST fusion protein, eluted with thrombin treatment and analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining, direct visualization on a UV transilluminator, or Western immunoblotting analysis. (B) Cytotoxic effect of  $\epsilon$ -toxin-GFP,  $\epsilon$ -prototoxin-GFP and trypsin-activated  $\epsilon$ -prototoxin-GFP was compared to that of the native  $\epsilon$ -toxin purified from *Clostridium perfringens* cultures. Cells were treated with 0, 5, 50, 100 or 500 nM concentrations of tested proteins. Following MTT death assay, cytotoxicity was calculated as a percentage of cell survival referred to time 0 cells. Both  $\epsilon$ -toxin-GFP (□)

and trypsin-activated  $\epsilon$ -prototoxin-GFP (■) showed a similar cytotoxic effect to native  $\epsilon$ -toxin (Δ), while  $\epsilon$ -prototoxin-GFP (▲) showed no cytotoxic effect.

#### Binding of $\epsilon$ -toxin-GFP and $\epsilon$ -prototoxin-GFP to living MDCK cells:

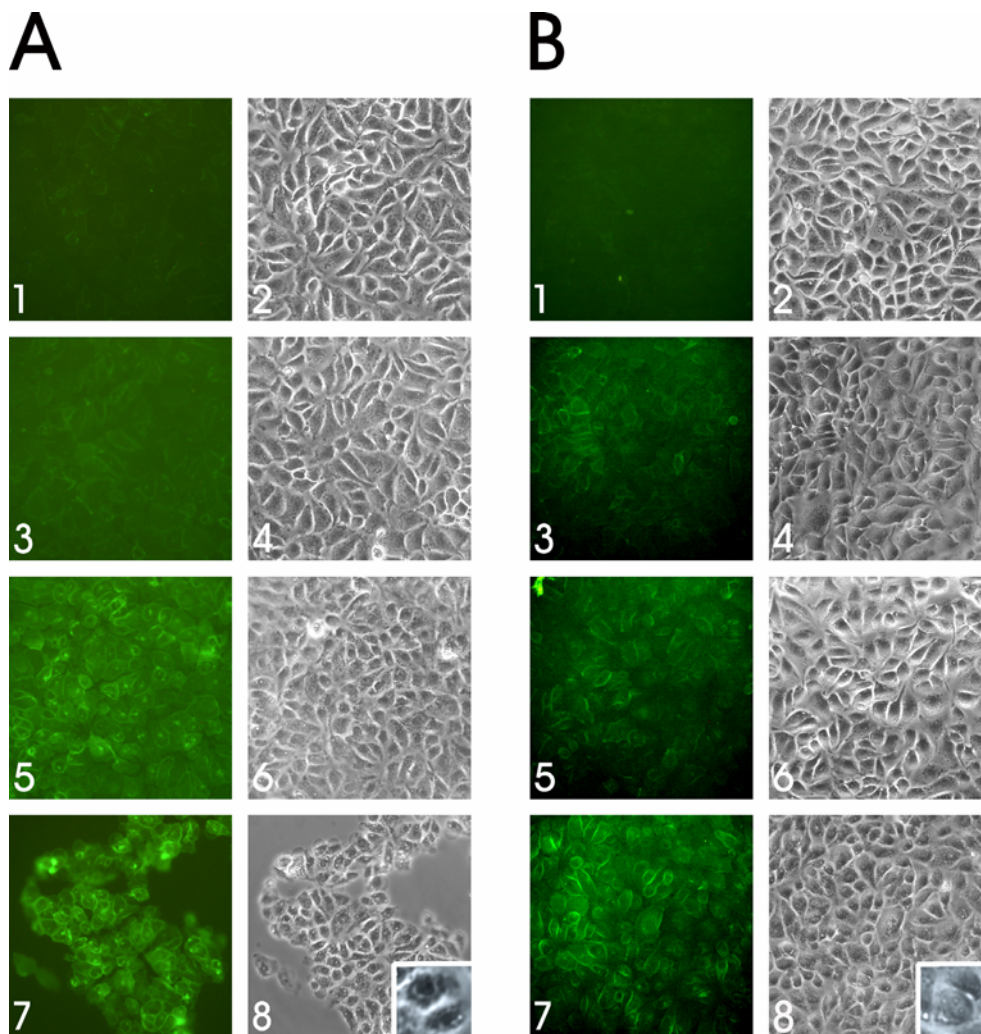
To characterize the cell binding of GFP-fusion proteins on living cells we performed time-course experiments on MDCK cells. After incubation for one hour at 4°C with  $\epsilon$ -toxin-GFP or  $\epsilon$ -prototoxin-GFP and without previous washing, cells were brought to 37°C and maintained at that temperature for various time periods (0 to 60 min) before washing and fixation with paraformaldehyde (Fig R-2.2). Panel A show results for  $\epsilon$ -toxin-GFP and panel B for  $\epsilon$ -prototoxin-GFP.

Incubation at 4°C prevented both  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP cell binding (Fig R-2.2 A1 and B1) even with longer incubation periods (data

not shown). However, 10 min incubation at 37°C caused cell binding, indicating a temperature-dependent process (Figure R-2.2 A3 and B3). Longer incubation times with  $\epsilon$ -prototoxin-GFP increased fluorescence, which was mainly localized to cell membrane and peaked at 60 min (Figure R-2.2 B5 and B7). These cells were morphologically unaltered throughout the experiment, as shown in phase contrast images (Figure R-2.2 B2, B4, B6 and B8), supporting the lack of cytotoxicity of  $\epsilon$ -prototoxin-GFP shown in figure 1B.

On the other hand, cells incubated with  $\epsilon$ -toxin-GFP underwent the morphological alterations described for MDCK cells treated with  $\epsilon$ -toxin (Hambrook et al. 1995, Petit et al. 1997, Borrmann et al. 2001): nuclear condensation, vacuolation and progressive swelling, leading to cell death (Fig R-2.2 A2, A4, A6 and A8). Dead cells finally detach from cell culture substrate (Figure R-2.2 A8). Fluorescence images revealed time-dependent binding as for  $\epsilon$ -prototoxin-GFP (Figure R-2.2 A1, A3, A5 and A7).

Moreover, no cytotoxic effect was detected when cells treated with  $\epsilon$ -toxin-GFP were washed after the 4°C incubation period and then brought to 37°C, confirming the absence of binding at 4°C (data not shown).



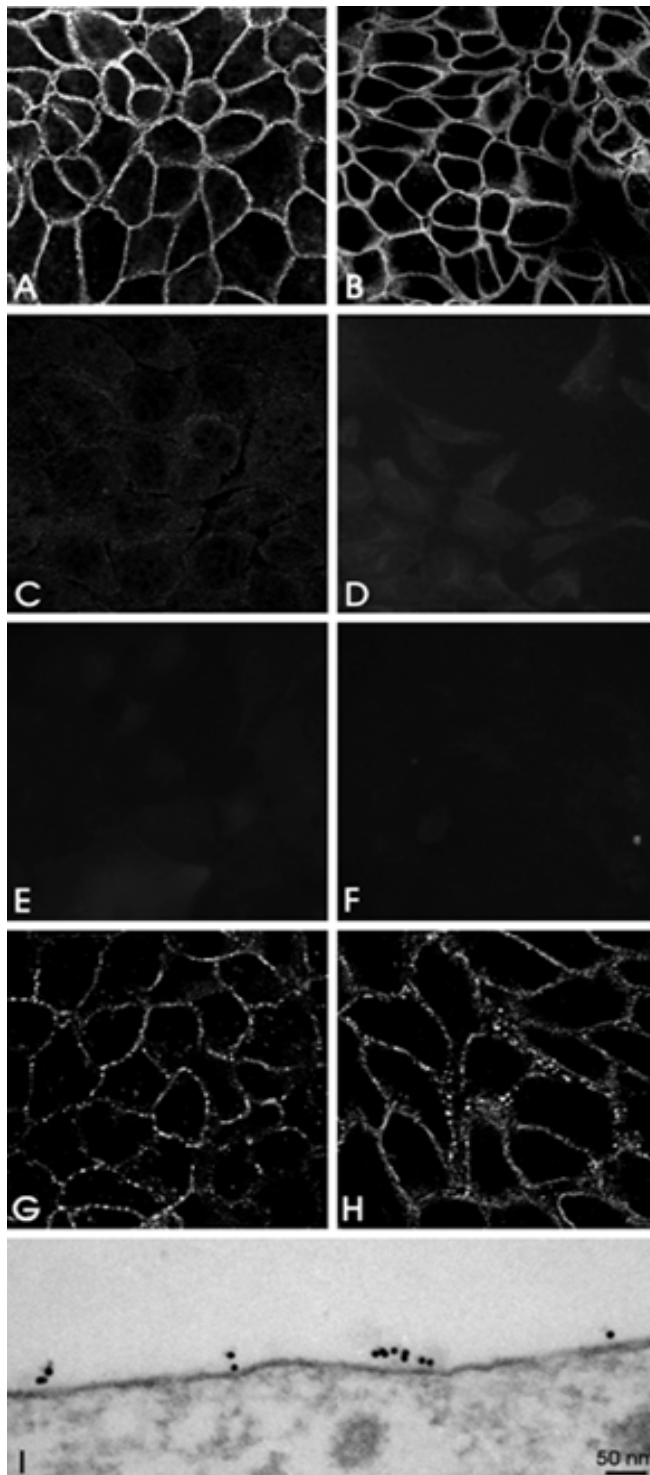
**Figure R-2.2.** Binding of  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP to living MDCK cells. Fluorescence and phase contrast images of MDCK cells incubated with 200 nM of either  $\epsilon$ -toxin-GFP (A) or  $\epsilon$ -prototoxin-GFP (B). Cells were incubated for 1 h at 4°C, warmed to 37°C and maintained at this temperature for 0 (1, 2), 10 (3, 4), 30 (5, 6) or 60 min (7, 8). Notice morphological alterations of  $\epsilon$ -toxin-GFP treated cells (A8) and the lack of toxicity of  $\epsilon$ -prototoxin-GFP (B8). Insets are details of A8 and B8 images.

**Binding of  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP to paraformaldehyde-fixed MDCK cells:**

To further characterize the binding ability of GFP-fusion proteins, we performed binding assays with  $\epsilon$ -toxin-GFP or  $\epsilon$ -prototoxin-GFP on paraformaldehyde-fixed MDCK cells. Both proteins bound to the MDCK cell membrane as revealed by direct fluorescence detection on confocal microscopy (Figure R-2.3A for  $\epsilon$ -prototoxin-GFP and Figure R-2.3B for  $\epsilon$ -toxin-GFP).  $\epsilon$ -Prototoxin immunodetection by electron microscopy showed the binding to the external face of plasma membrane, in particular, to the apical side of polarized cells (a detail of this area is shown in figure R-2.3I). Specific binding was demonstrated by competition experiments in which fluorescence labelling was abolished when non-labelled  $\epsilon$ -toxin was coincubated with GFP-fusion proteins (20:1 molar ratio) (Figure R-2.3C, D). Moreover, no fluorescence was detected when incubations were performed with GFP alone (data not shown).

Incubation of  $\epsilon$ -toxin-GFP (Figure R-2.3E) and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP (Figure R-2.3F) at 4°C confirmed the temperature dependence shown by the binding experiments on living cells.

The presence of 0.2% Triton X-100 in the blocking step diminished fluorescence and changed the uniform membrane labelling to a discontinuous spotted pattern (Figure R-2.3G, H).



**Figure R-2.3.** Binding of  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP on paraformaldehyde-fixed MDCK cells. Fluorescence images of fixed MDCK cells incubated with 200 nM of either  $\epsilon$ -prototoxin-GFP (left panels) or  $\epsilon$ -toxin-GFP (right panels). Specific binding was confirmed by adding 4  $\mu$ M of non-labelled  $\epsilon$ -prototoxin (C) or  $\epsilon$ -toxin (D). The same incubations were done at 4°C (E, F) or preincubating with 0.2% Triton X-100 (G, H). (I) Electron micrograph of  $\epsilon$ -toxin immunodetection (10 nm gold beads) on the apical surface of an MDCK cell incubated with  $\epsilon$ -prototoxin-GFP.

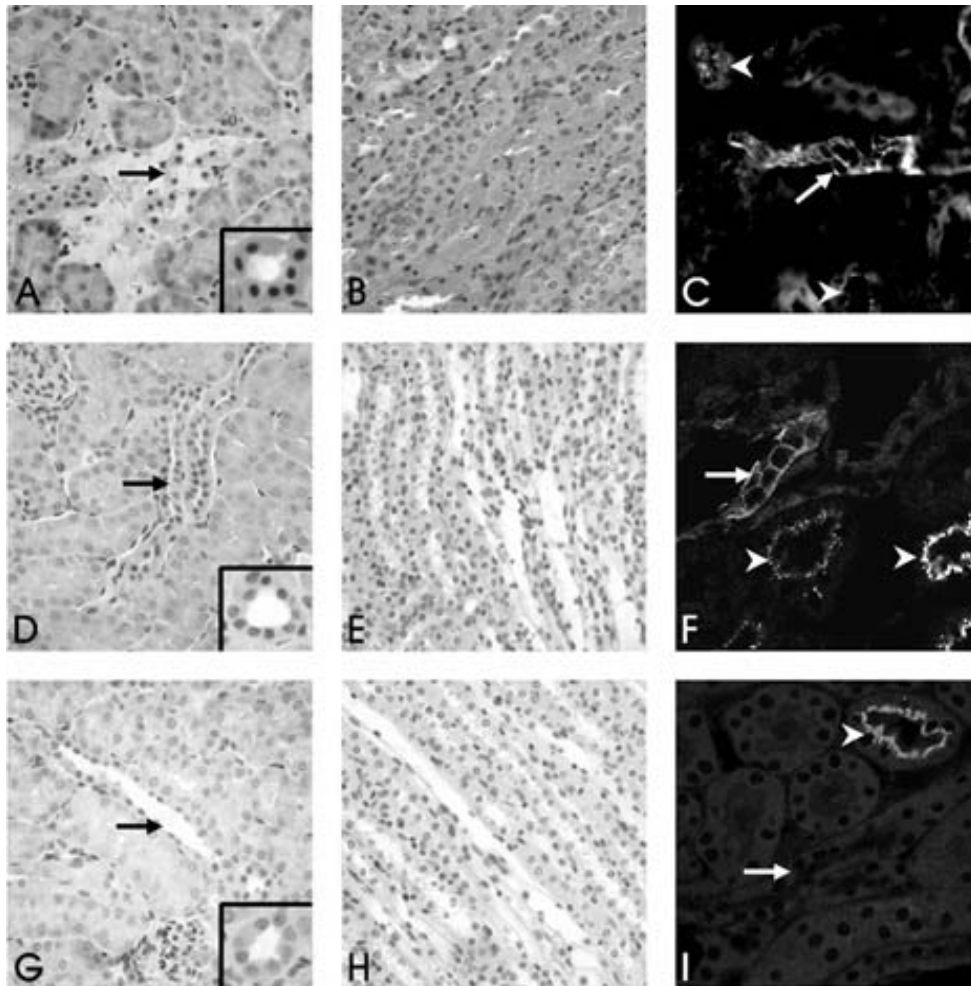


***In vivo* studies in a murine model:**

To determine *in vivo* cytotoxic effects and organ distribution of  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP we injected mice intravenously with these recombinant proteins.

Mice injected with  $\epsilon$ -toxin-GFP died after various periods of time in a dose-dependent manner (from 4 min for 2500 ng/g to 134 min for 7 ng/g). Animals injected with either  $\epsilon$ -prototoxin-GFP or GFP alone were sacrificed after 15 min.

Following post-mortem observation, organs were processed for both histological studies and fluorescence distribution. Haematoxylin-eosin examination of toxin-injected kidneys revealed more congested and haemorrhagic medullae (Figure R-2.4B) than in animals injected with either  $\epsilon$ -prototoxin-GFP or GFP alone (Figure R-2.4E and H). Toxin-injected animals also showed severe alterations on renal distal tubules, including pyknotic nuclei and desquamated epithelia (Figure R-2.4A). These alterations were observed in all animals injected with toxin but were more pronounced in those that received the highest doses. Morphological alterations were not found in animals injected with either  $\epsilon$ -prototoxin-GFP or GFP alone (Figure R-2.4D, G). We did not find any significant morphological alterations in other organs analysed although it is well documented an oedematogenous process, specially in brain, following epsilon-toxin intoxication (reviewed by Finnie, 2004). We sporadically detected perivascular oedema in cerebral microvasculature (data not shown) although routine histopathological techniques used here are not the most appropriate to visualize such changes.



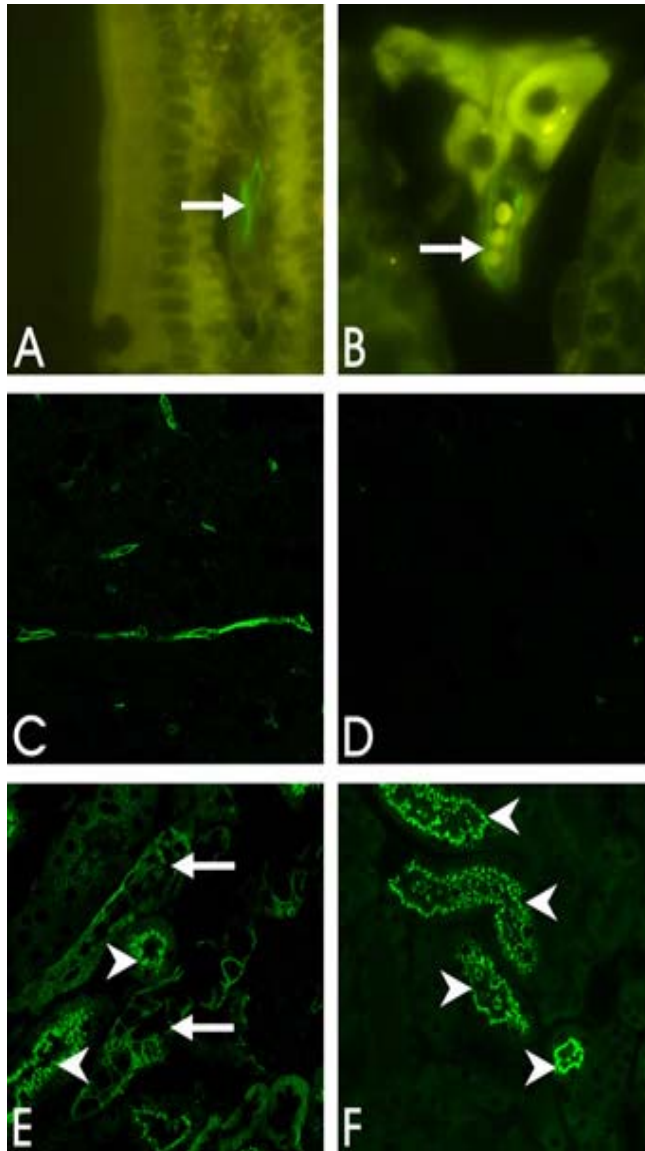
**Figure R-2.4.** Effect of intravenous injection of  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP on mouse kidney. Mice were injected with 7 ng/g  $\epsilon$ -toxin-GFP (A, B), 2.5  $\mu$ g/g  $\epsilon$ -toxin-GFP (C), 2.5  $\mu$ g/g  $\epsilon$ -prototoxin-GFP (D, E, F) and 2.5  $\mu$ g/g GFP alone (G, H, I). Kidneys were divided and processed for haematoxylin-eosin staining (A, B, D, E, G, H) or for cryostat sectioning and examination under a fluorescence confocal microscope (C, F, I). Kidneys from animals injected with  $\epsilon$ -toxin-GFP (A) showed selective degeneration of distal tubules (black arrows) when compared with kidneys from animals injected with  $\epsilon$ -prototoxin-GFP (D) or with GFP (G). Insets show magnified distal tubules showing pyknotic nuclei in  $\epsilon$ -toxin-GFP injected mice. Medullae of animals injected with  $\epsilon$ -toxin-GFP were very haematic (B) compared to those of animals injected with  $\epsilon$ -prototoxin-GFP (E) or with GFP (H). Direct observation of

kidneys from  $\epsilon$ -toxin-GFP (C) and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP (F) injected animals revealed accumulation of fluorescence at the luminal surface of proximal tubules (white arrowheads) and a whole membrane binding pattern on distal tubules (white arrow). Fluorescence of GFP injected animals (I) was exclusively found at luminal surface of proximal tubules (white arrowheads) while no fluorescence was detected on distal tubules (white arrow).

$\epsilon$ -Prototoxin-GFP and  $\epsilon$ -toxin-GFP were localized by direct fluorescence microscopy on cryostat slices of different organs. Fluorescence was detected on the luminal surface of the vascular endothelium of many blood vessels, most abundantly in brain (Figure R-2.5 C), but also in other organs such as intestine and testis (Figure R-2.5 A, B). Fluorescence accumulated mainly on kidneys, in both proximal and distal tubules (Figures R-2.4F and 5E) and to a lesser extent in glomeruli and renal blood vessels (not shown).

These results indicate that  $\epsilon$ -toxin especially affects distal tubules, although it also reached and bound to proximal tubules.

Moreover, immunohistochemistry with anti- $\epsilon$  and anti-GFP antibodies revealed complete co-localization of both molecules (data not shown).



**Figure R-2.5.**

Localization of  $\epsilon$ -prototoxin-GFP in blood vessels of several organs (A, B, C, D) and renal tubules (E, F) after intravenous injection in mice. Mice were injected with  $\epsilon$ -prototoxin-GFP and organs were processed for cryostat sectioning and examined under a fluorescence microscope.

We detected  $\epsilon$ -prototoxin-GFP (arrows) in blood vessels from intestine (A), testis (B) and brain (C) and in proximal (arrowheads) and distal (arrows) tubules of kidneys (E). Coinjection of excess native  $\epsilon$ -prototoxin with  $\epsilon$ -prototoxin-GFP drastically diminished vascular fluorescence in brain (D), abolished the label in distal renal tubules (F) and significantly increased label in proximal tubules (F, arrowheads). (A) and (B) show tissue autofluorescence in

yellowish brown while the green fluorescence corresponds to  $\epsilon$ -prototoxin-GFP.

Fluorescence also accumulated at the luminal surface of proximal tubules but not at the distal tubules in GFP-injected animals (Figure R-2.4I). Nor was fluorescence detected on vascular endothelia in these control animals (data not shown).

In summary, the three recombinant proteins crossed the glomerular barrier and bound to the proximal tubules but only  $\epsilon$ -prototoxin-GFP and  $\epsilon$ -toxin-GFP bound to distal tubules and only  $\epsilon$ -toxin-GFP specifically degenerated them. Finally, both  $\epsilon$ -prototoxin-GFP and  $\epsilon$ -toxin-GFP, but not GFP alone, bound to endothelial cells.

To show the specificity of toxin binding, displacement experiments were performed in which excess amounts of native  $\epsilon$ -prototoxin were injected simultaneously with  $\epsilon$ -prototoxin-GFP. Fluorescence label in cerebral endothelia diminished drastically (Figure R-2.5C, D), and was abolished in distal renal tubules (Figure R-2.5E, F), confirming specificity of binding in both structures. Vascular endothelia from other tissues was also displaced but to a lesser extent, which probably indicates that this binding has a non-specific component (not shown). Interestingly, under these experimental conditions, we detected increased label in the proximal tubules (Figure R-2.5F), revealing that  $\epsilon$ -prototoxin-GFP was displaced from its specific binding sites and accumulated unspecifically.

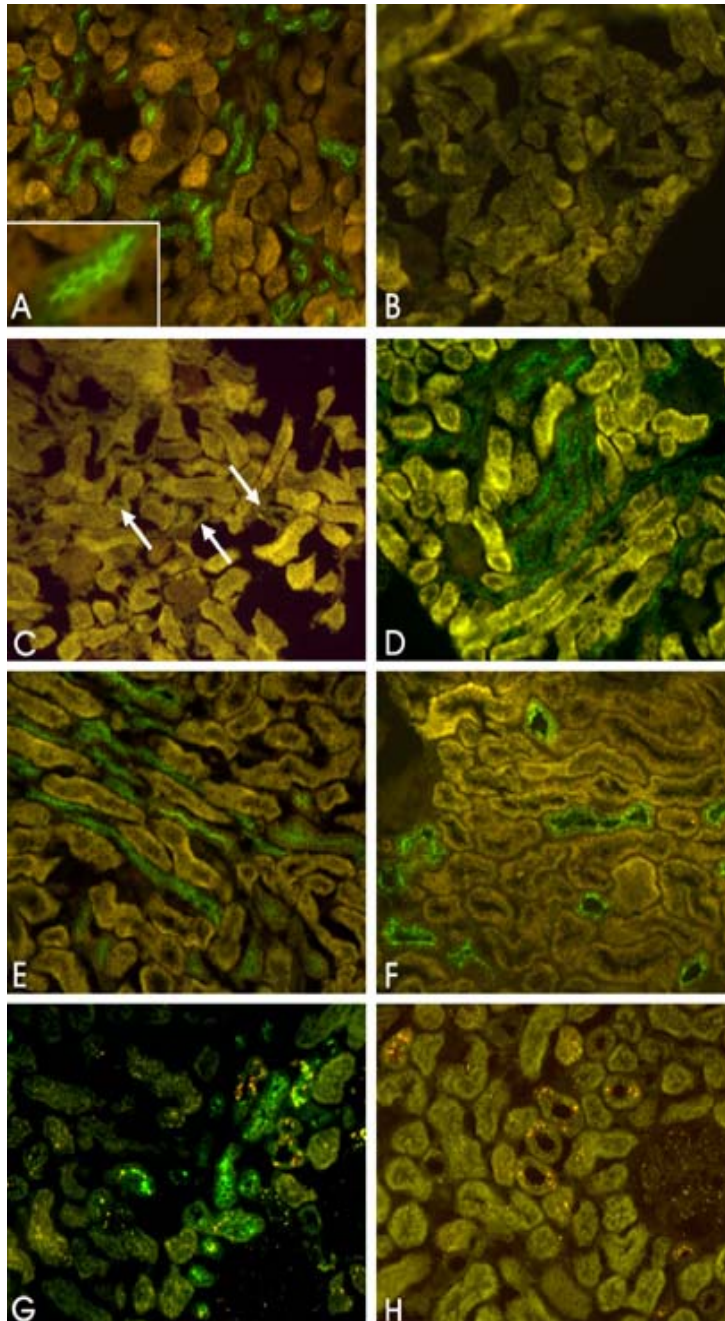
#### **Incubation experiments of $\epsilon$ -toxin-GFP and $\epsilon$ -prototoxin-GFP on cryostat kidney slices:**

We developed another approach, already used in ligand-receptor interaction studies, to analyze the specificity of  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP binding on kidneys, consisting of incubations of cryostat kidney slices of mice with these recombinant proteins. Fluorescence

images revealed that both  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP bind to the luminal surface of distal tubule cells (Figure R-2.6A for prototoxin and not shown for toxin). The specificity of this interaction was demonstrated by co-incubation with native  $\epsilon$ -toxin, which completely abolished fluorescence (Figure R-2.6B).

Incubations in the presence of detergent clearly diminished fluorescence, indicating that the toxin receptor is mainly associated with detergent-soluble domains on the apical surface of distal tubule cells. However, some fluorescence was still detected in association with detergent-resistant areas (arrows in figure R-2.6C).

We obtained similar results in incubation experiments with slices from rat (Figure R-2.6D), sheep (Figure R-2.6E), cow (Figure R-2.6F) and human kidneys (Figure R-2.6G). Specificity of binding was also demonstrated in these species (Figure R-2.6H for human).



**Figure R-2.6.** Binding of  $\epsilon$ -prototoxin-GFP to different species kidney slices. Fluorescence images of cryostat-processed mouse kidney slices incubated with 200 nM  $\epsilon$ -prototoxin-GFP alone (A) or in the presence of 10  $\mu$ M non-labelled  $\epsilon$ -toxin (B). Cells from the distal tubule showed a specific binding of  $\epsilon$ -prototoxin-GFP in the apical pole (A inset). The presence of 0.2 % Triton X-100 in the blocking steps drastically diminished the binding (C), now confined to very few distal tubules (white arrows).

The same binding pattern was obtained for kidneys from rat (D), sheep (E), cow (F) and human (G). (H) shows the displacement of  $\epsilon$ -prototoxin-GFP binding with an excess of non-

labelled  $\epsilon$ -toxin in a human kidney slice. All the images show tissue autofluorescence in yellowish brown while the green fluorescence corresponds to  $\epsilon$ -prototoxin-GFP.

## 2.5 DISCUSSION

In this study we generated recombinant  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP to improve their detection and to study their cell-binding and tissue-distribution profiles by direct fluorescence.

Among the cell lines initially examined in search of the lethal effect of  $\epsilon$ -toxin-GFP, only MDCK was sensitive, in agreement with previous reports indicating that these cells are the most appropriate cell model in which to study  $\epsilon$ -toxin toxicity (Lindsay 1996, Petit et al. 1997, Miyata et al. 2002). More recently, Shortt et al. identified another cell line (G-402), that of human kidney origin, susceptible to effects of  $\epsilon$ -toxin exposure (Shortt et al. 2000). It is relevant due to the effect of the toxin on the kidneys *in vivo*.

Here we show that  $\epsilon$ -toxin-GFP fusion protein retains its full toxic activity on MDCK cells, and no differences from the native  $\epsilon$ -toxin were detected. MTT assays revealed a maximum of about 70% cell death, which was not affected by increasing the dose or the incubation period, consistent with a previously reported subpopulation of resistant cells in MDCK cultures (Shortt et al. 2000). Furthermore, both the time course and morphological changes upon incubation with GFP recombinant  $\epsilon$ -toxin were similar to those also described here for native  $\epsilon$ -toxin. It has been described that the lethality of  $\epsilon$ -toxin in MDCK cells is drastically reduced by lowering temperature (Lindsay 1996, Petit et al. 2003). We show here that incubation at 4°C prevents  $\epsilon$ -prototoxin-GFP and  $\epsilon$ -toxin-GFP binding and, in consequence, cytotoxicity, even at very long incubation periods.

Furthermore, co-incubation of  $\epsilon$ -prototoxin-GFP in excess with  $\epsilon$ -toxin-GFP prevented cell death in MDCK cells, thus revealing that both proteins compete for the same binding sites, but only  $\epsilon$ -toxin-GFP kills the cells (data



not shown). Direct fluorescence studies confirmed that both  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP have similar binding properties to paraformaldehyde-fixed MDCK cells. The labelling showed a peripheral cell pattern, as reported elsewhere using indirect immunofluorescence (Petit *et al.* 1997). Moreover, according to our electron microscopy observations, most of the toxin was found in the apical cell membrane of polarized MDCK cells, where binding has a stronger cytotoxic effect (Petit *et al.* 1997).

Interestingly, pre-treatment of fixed cells with detergent at 4 °C clearly changed the fluorescence distribution on the cell membrane to a punctuated pattern. These observations represent the visual evidence of detergent-resistant membrane domains (DRMs) recently described on MDCK cells in association with toxin heptamerization (Miyata *et al.* 2002).

At this point we confirm that  $\epsilon$ -prototoxin-GFP is a convenient tool for studies of toxin binding mechanisms, since it binds to the same sites as active toxin but has a less damaging effect.

We injected mice intravenously with the above reported recombinant GFP proteins and analysed their organ distribution and histopathology. Macroscopically, we found that kidneys of mice injected with  $\epsilon$ -toxin-GFP were more haematic, especially in the medullary area, than those injected with  $\epsilon$ -prototoxin-GFP or GFP alone. Coincident with these morphological observations histological examination revealed haemorrhagic medullae. Moreover, we show images of selective degeneration found on distal tubules, mainly located in the cortical area, pyknotic nuclei and disorganized epithelia being the main observations. These results may help to understand the soft, friable and very congested kidneys of infected livestock (pulpy kidney disease). On the other hand, no histopathological

alteration were observed in other organs at the  $\epsilon$ -toxin doses administered here.

Direct fluorescence images revealed that fluorescence accumulated on two structures: vascular endothelia and renal distal tubules. Several organs of animals injected with either  $\epsilon$ -prototoxin-GFP or  $\epsilon$ -toxin-GFP showed fluorescence on the luminal surface of blood-vessel endothelia, coinciding with the increased vascular permeability associated with this pathology and the oedematogenous renal medullae described here. Vascular binding was, however, detected mainly in brain, where receptor sites for the toxin have been already described (Buxton 1978a, Nagahama and Sakurai 1991). Experiments in which non-labelled  $\epsilon$ -prototoxin was injected in excess and simultaneously with  $\epsilon$ -prototoxin-GFP further confirmed specificity of toxin binding to brain vascular endothelia since fluorescence label drastically decreased under these experimental conditions.

On kidneys, fluorescence was mainly associated with the luminal surface of proximal tubules of all the mice analysed, including those injected with  $\epsilon$ -toxin-GFP,  $\epsilon$ -prototoxin-GFP or GFP alone, which indicates that these proteins cross the glomerular filter barrier and accumulate, somehow non specifically, on the luminal surface of these tubules. Fluorescence was detected to a lesser extent on the distal tubules of  $\epsilon$ -toxin-GFP and  $\epsilon$ -prototoxin-GFP-injected mice, but never in the case of GFP alone. The control experiments confirmed our hypothesis about the coexistence of two binding components in renal tubules: one related to binding to proximal tubules, which was not specific and thus non-displaceable with non-labelled  $\epsilon$ -prototoxin, and a specific component related to distal tubules, which was displaceable. These findings elucidate a previous report

(Nagahama and Sakurai 1991) in which radioactive  $\epsilon$ -prototoxin was accumulated mainly in kidneys of injected mice but only a small fraction of radioactivity was displaced by  $\epsilon$ -prototoxin.

In order to complete this study of  $\epsilon$ -toxin pathology on kidneys, we incubated cryostat-obtained mice kidney slices with recombinant  $\epsilon$ -prototoxin-GFP,  $\epsilon$ -toxin-GFP or GFP alone as control. Both forms of toxin, but not GFP alone, bound to distal tubules, in a displaceable way, reinforcing our hypothesis about binding specificity. Furthermore, experiments in which samples were pretreated with 0.2% Triton X-100 revealed the presence of an  $\epsilon$ -toxin receptor mainly associated with detergent-sensitive areas. Further experiments are under way to identify this receptor.

Since pulpy kidney disease mainly affects livestock, we also performed the incubation experiments on cryoslices of sheep and cows and obtained the same distribution pattern as that of mice and rats.

Interestingly, incubations performed using human kidney cryoslices further confirm this distribution and could explain the sensitivity to  $\epsilon$ -toxin of a cell line of human kidney origin recently described (Shortt *et al.* 2000). This are the first evidence that  $\epsilon$ -toxin binds specifically to distal tubules of kidneys of different species, including those like sheep and cows in which pulpy kidney disease can be fatal, or those like human in which  $\epsilon$ -toxin-associated pathology has not been reported.

In conclusion, we have generated useful recombinant toxins to study by direct fluorescence the effects and distribution of  $\epsilon$ -toxin. We have shown for the first time the specific binding on distal renal tubules of different species. In addition, we hypothesize that while several animals including mice, rats and also humans could be sensitive to the toxin, intoxication

occurs only in animals in which *Clostridia* overgrow, which leads to an excess of toxin production.

### ***3. Efectes de la toxina- $\epsilon$ sobre el Sistema Nerviós.***

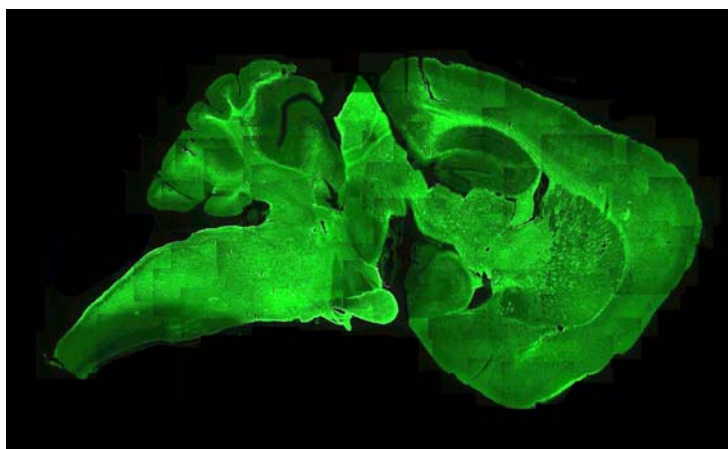
**RESULTATS**



### 3.1 Unió de la toxina- $\epsilon$ a cervell de diferents espècies.

Per tal de comprovar si el cervell també presenta llocs d'unió específics per la toxina- $\epsilon$ , almenys pel que fa a unió *in vitro*, vam fer incubacions amb protoxina- $\epsilon$ -GFP sobre crioseccions de cervell fixat de diferents espècies animals, utilitzant la mateixa aproximació experimental que vam seguir al ronyó (capítol 2 de Resultats).

La figura R-3.1 mostra la unió de protoxina- $\epsilon$ -GFP sobre una secció sagital de cervell de ratolí, que inclou encèfal, cerebel i també la part inicial de la medulla espinal, on es pot apreciar un patró de marcatge que sembla coincidir amb la substància blanca.

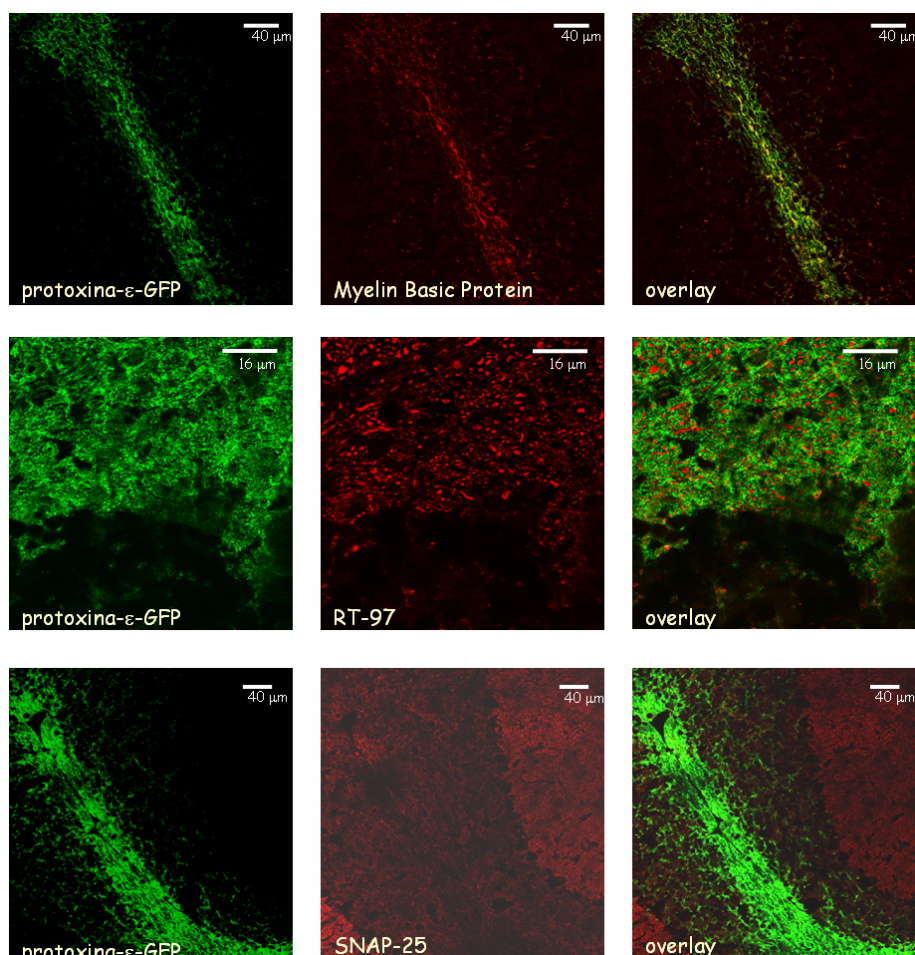


**Figura R-3.1. Unió de la protoxina- $\epsilon$ -GFP sobre una secció sagital de cervell de ratolí. La imatge s'ha obtingut mitjançant la superposició de 116 microfotografies realitzades a 100 augments.**

Per confirmar la unió de la protoxina- $\epsilon$ -GFP a les fibres mielíniques vam realitzar estudis d'immunofluorescència, que van mostrar colocalització

entre la protoxina- $\epsilon$ -GFP i la Proteïna Bàsica de Mielina (PBM). En canvi, els anticossos contra proteïnes sinàptiques com Sintaxina-1 (no mostrada), VAMP-2 o SNAP-25 i contra la proteïna de neurofilaments RT-97 no van mostrar colocalització en absolut (Fig. R-3.2). Queda doncs demostrada l'afinitat de la protoxina- $\epsilon$ -GFP per a la mielina.





**Figura R-3.2. Unió de protoxina-ε-GFP a cerebel de ratolí i immunofluorescència. Les figures de l'esquerra mostren en verd la unió de la protoxina-ε-GFP; les del centre mostren en vermell la immunofluorescència per PBM (imatge superior), RT-97 (imatge del centre) i SNAP-25 (imatge inferior); les de la dreta mostren la superposició entre les dues imatges anteriors.**

Vam extendre aquest estudi a cervells de rata, xai, vedella i home. La protoxina-ε-GFP va mostrar afinitat per les fibres mielíniques a totes aquestes espècies (Fig. R-3.3). En el cas de la vedella i el xai, però, aquesta

unió era molt més feble i, en canvi, hi apareixia una marca nova, corresponent a vasos sanguinis (Fig. R-3.3B i R-3.3C, respectivament).

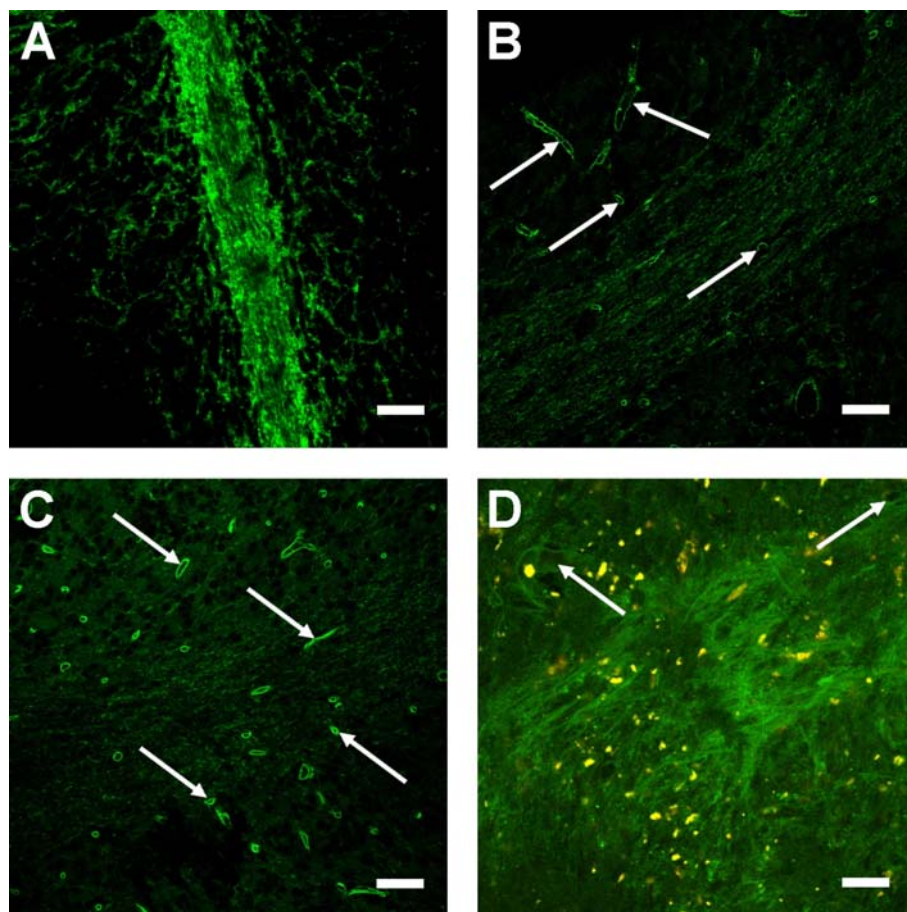


Figura R-3.3. Incubació de protoxina- $\epsilon$ -GFP sobre talls de criostat de cervell de: (A) rata, (B) vedella, (C) xai i (D) home. Les fletxes a (B), (C) i (D) assenyalen vasos sanguinis. Les taques grogues a (D) corresponen a l'autofluorescència del propi teixit. Les barres de mesura equivalen a 40  $\mu$ m.

### **3.2 Distribució i efectes de la toxina- $\epsilon$ administrada intravenosament (i.v.) a rata i ratolí.**

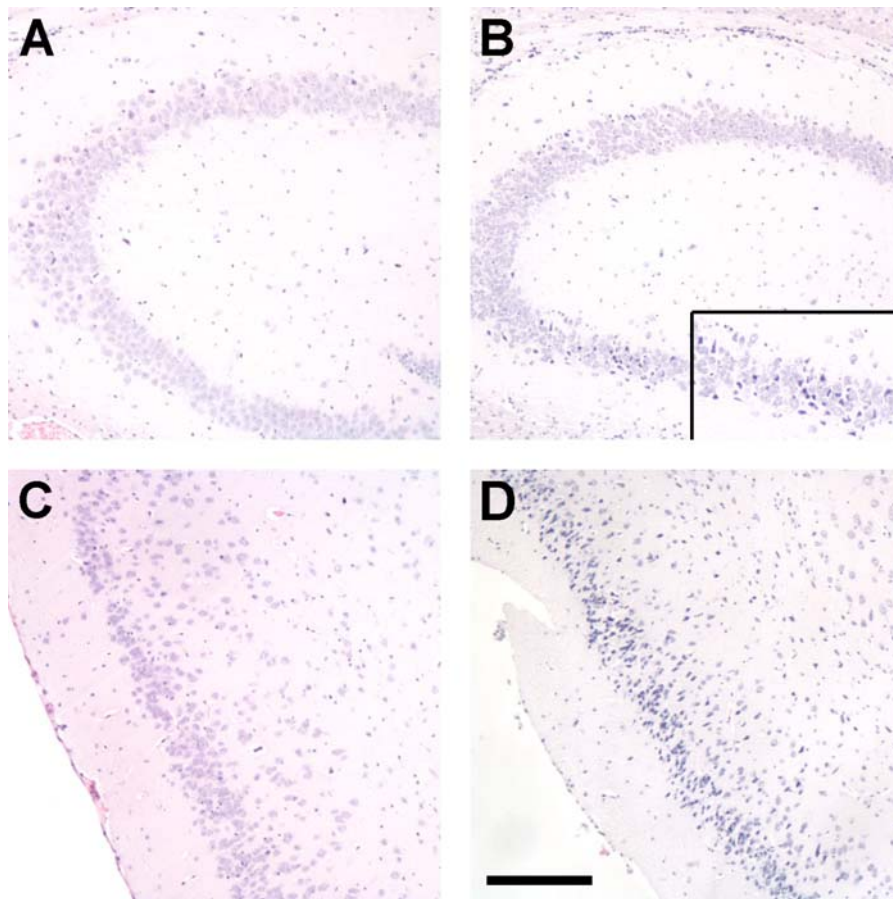
La mort dels animals afectats per la toxina- $\epsilon$  té un component neurològic evident, si bé de moment no es té una evidència clara de quin és i on es dona l'efecte concret de la toxina. La hipòtesi més estesa postula que la toxina provoca excitotoxicitat en evocar la secreció de glutamat de terminals nerviosos glutamatèrgics. Per dur a terme aquesta activitat, la toxina hauria de creuar la barrera hematoencefàlica (BHE) i així poder arribar als terminals nerviosos. Fins ara, però, no s'han mostrat evidències morfològiques que recolzin aquesta hipòtesi. Per tal d'aprofundir en aquest aspecte i d'obtenir més informació sobre l'efecte de la toxina al sistema nerviós central, vam voler estudiar el destí i l'efecte de la toxina- $\epsilon$  injectada intravenosament (unida o no a GFP) al cervell de rata i ratolí.

#### ***3.2.1 Mort neuronal provocada per la injecció de toxina- $\epsilon$ a rata.***

Un dels efectes que provoca la injecció de substàncies excitotòxiques (agonistes glutamatèrgics) és la mort neuronal evident a certes àrees del cervell.

En primer lloc vam injectar dosis altes (50  $\mu$ g/ kg) de toxina- $\epsilon$  activa a rata. Tots els animals injectats van morir en menys de 10 minuts.

L'observació amb tincions d'H/E dels seus cervells va revelar nuclis picnòtics indicatius de mort cel·lular a escorça i hipocamp (Fig. R-3.4), tal com ja s'havia descrit anteriorment (Finnie et al., 1999).



**Figura R-3.4.** Efecte de la injecció de toxina- $\epsilon$  al cervell de rata. (A) Hipocamp de rata control, (B) hipocamp de rata injectada amb toxina- $\epsilon$ , (C) escorça de rata control i (D) escorça de rata injectada amb toxina- $\epsilon$ . L'insert a (B) mostra un detall ampliat de la mateixa imatge. La barra de mesura equival a 200  $\mu$ m.

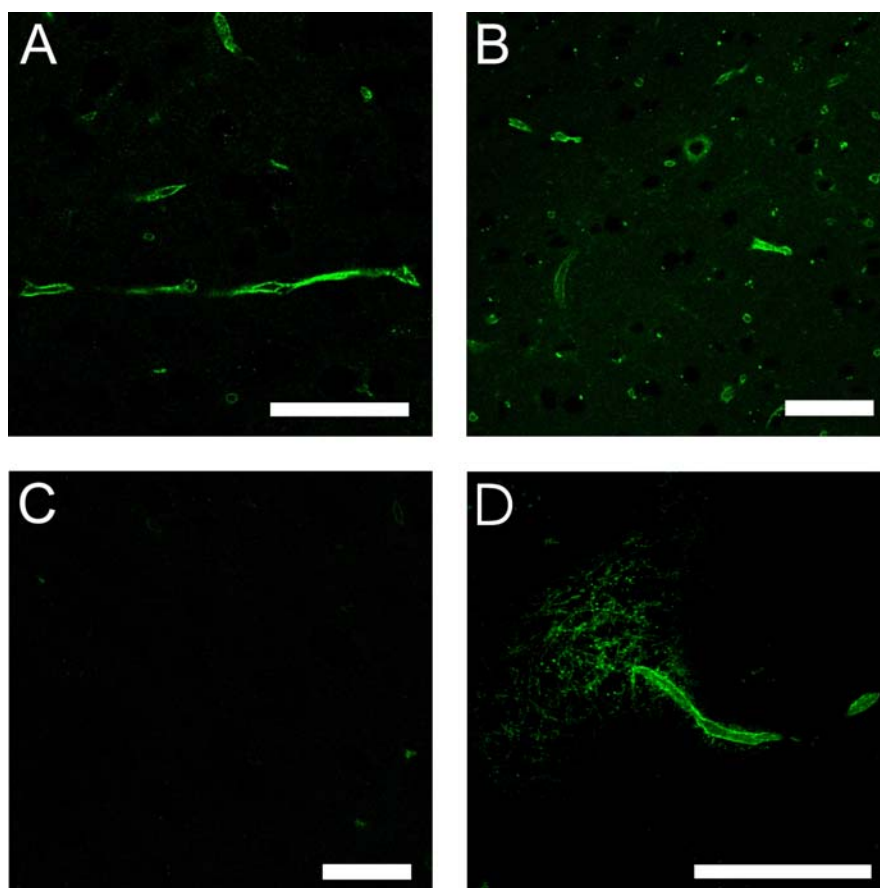
Els ratolins injectats amb les mateixes dosis també van morir en pocs minuts. En aquest cas, però, l'observació amb tincions d'H/E no va revelar mort cel·lular significativa a cap de les zones estudiades (no mostrat).

### ***3.2.2 Localització a nivell del sistema nerviós de toxina- $\epsilon$ -GFP i protoxina- $\epsilon$ -GFP.***

Amb la injecció intravenosa a ratolí de les formes de la toxina- $\epsilon$  conjugades a GFP vam fer el seguiment de la toxina un cop arriba al cervell, per intentar visualitzar els seus possibles llocs d'acció. Les dosis utilitzades van ser al voltant de 2 mg/kg. Els animals injectats amb toxina- $\epsilon$ -GFP van morir en menys de 10 minuts. Els animals injectats amb protoxina- $\epsilon$ -GFP van ser sacrificats als 15 minuts.

L'observació directa al microscopi de fluorescència de talls histològics de criostat dels cervells d'aquests animals va revelar acumulació de totes dues proteïnes a nivell de l'endoteli vascular arreu del cervell (Fig. R-3.5A i B). La injecció simultània de protoxina- $\epsilon$  en excès (relació 1:20 molar) provocava una disminució dràstica de la marca fluorescent (Fig. R-3.5C), demostrant l'especificitat de la unió. Curiosament, aquest desplaçament només es donava a nivell de la vasculatura del cervell, mentre que als vasos sanguinis d'altres òrgans i teixits la marca fluorescent no es va veure afectada, com hem vist anteriorment (capítol 2, fig. R-2.5).

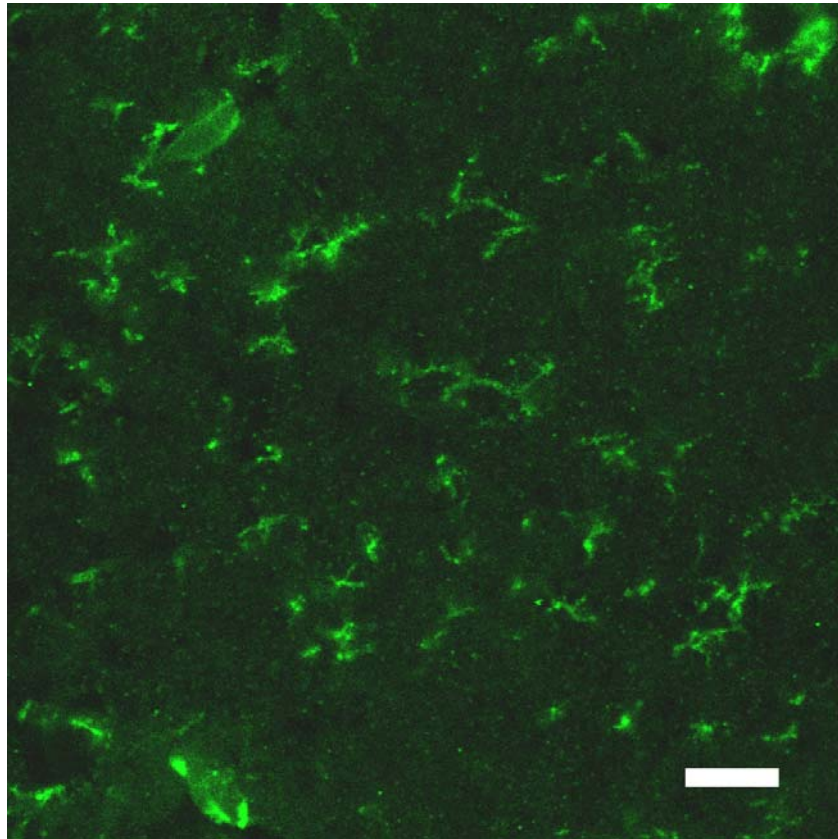
En alguns animals vam visualitzar toxina- $\epsilon$ -GFP a fora dels vasos sanguinis, al voltant d'aquests, dins ja del parènquima cerebral (Fig. R-3.5D).



**Figura R-3.5. Observació al microscopi confocal dels cervells de ratolins injectats amb: (A) protoxina- $\epsilon$ -GFP, (B) toxina- $\epsilon$ -GFP o (C) injecció conjunta de protoxina- $\epsilon$ -GFP i protoxina- $\epsilon$  en excès. En alguns ratolins (D) es va detectar toxina- $\epsilon$ -GFP a fora dels vasos sanguinis. Les barres de mesura corresponen a 50  $\mu\text{m}$ .**

Per amplificar el senyal i detectar toxina- $\epsilon$ -GFP en d'altres zones del cervell on hi hagués arribat en quantitats massa baixes per ser detectades per visualització directa vam fer immunofluorescència amb anticossos contra la GFP. Els resultats van mostrar que la toxina- $\epsilon$ -GFP, però no pas la protoxina- $\epsilon$ -GFP, travessava la BHE i s'acumulava en unes cèl·lules

concretes del teixit nerviós, que per la seva morfologia semblaven pertanyer a la neuroglia (Fig. R-3.6).



**Figura R-3.6. Immunofluorescència amb anticossos contra GFP en cervell de ratolí injectat amb toxina- $\epsilon$ -GFP. La barra de mesura equival a 10  $\mu$ m.**

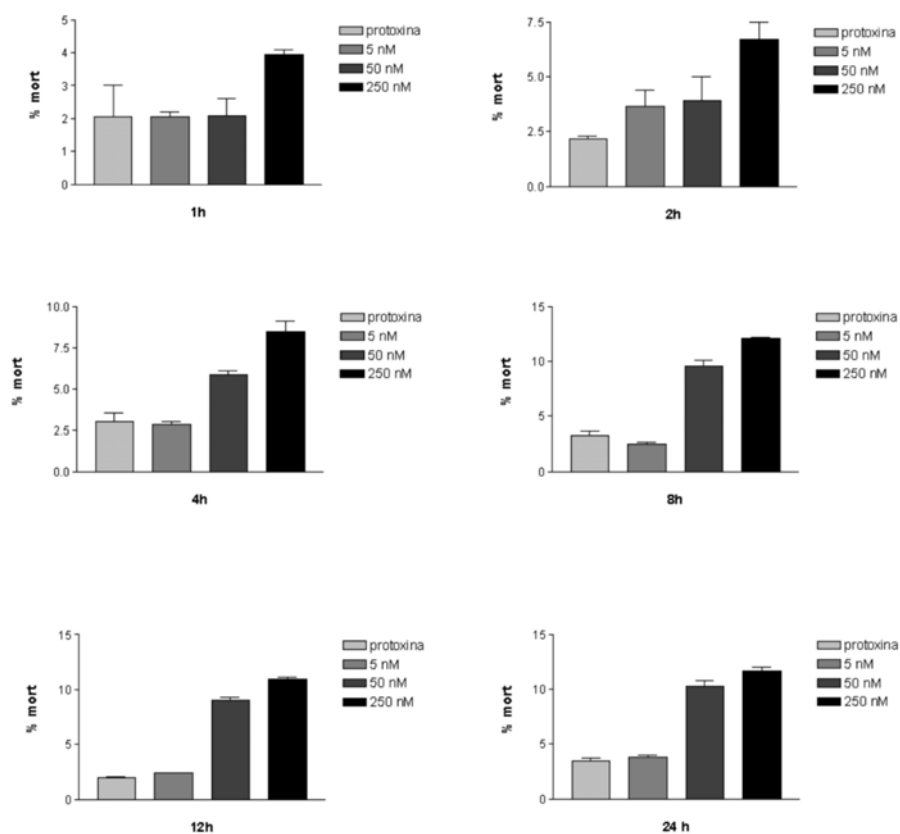
### **3.3 Efecte de la toxina- $\epsilon$ sobre cultius neurogials mixtes d'astroglia i microglia.**

Havent vist que la toxina- $\epsilon$  s'uneix a cèl·lules gials *in vivo* vam decidir estudiar i comprovar quin podia ser el seu efecte sobre cultius mixtes de microglia i astroglia de cervell de ratolí, centrant-nos en dos aspectes: la unió de la toxina- $\epsilon$  als dos tipus cel·lulars i el seu possible efecte citotòxic sobre ells.

#### **3.3.1 Mort cel·lular a cultius gials.**

Per comprovar si la toxina- $\epsilon$  tenia un efecte citotòxic sobre aquests cultius es va fer un assaig de citotoxicitat amb MTT, amb 3 concentracions de toxina- $\epsilon$  diferents (5, 50 i 250 nM) i fent servir protoxina- $\epsilon$  com a control (a 250 nM), a diferents temps (1, 4, 8, 12 i 24 h). La figura R-3.8 mostra els resultats. Es pot veure com la concentració de 5 nM no afecta la viabilitat del cultiu, mentre que tant la de 50 com la de 250 nM provoquen mort cel·lular de manera temps-depenent, assolint un màxim de mort cel·lular al voltant de les 8 hores. Els percentatges màxims de mort obtinguts se situen al voltant del 13%.

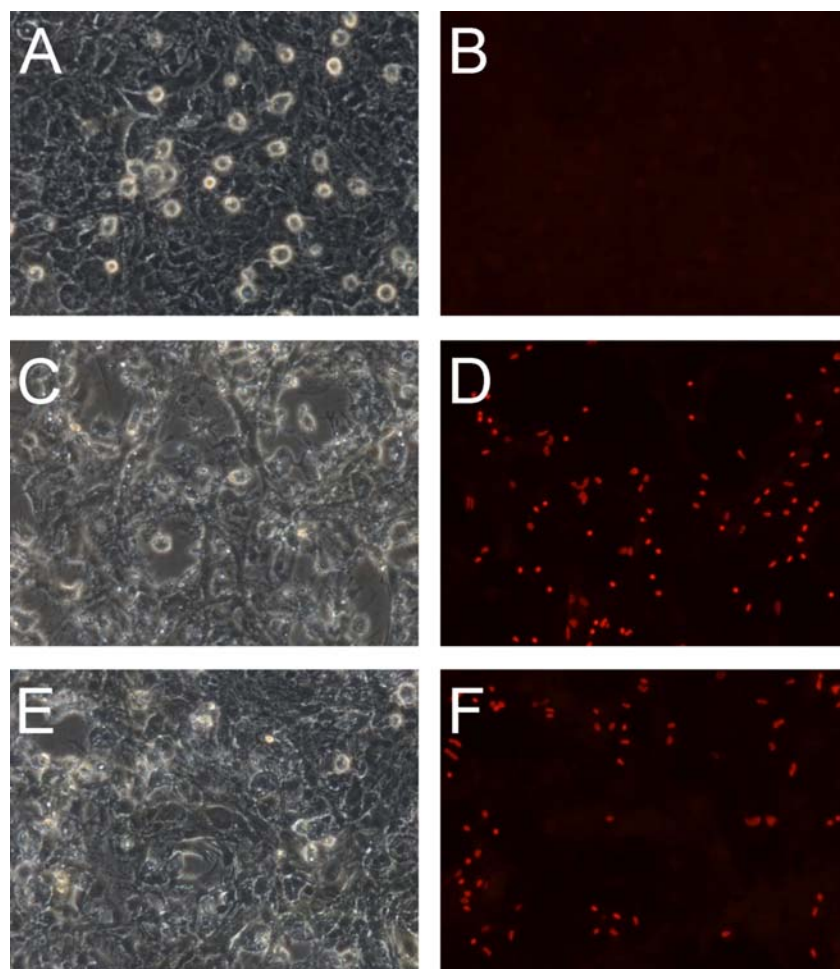




**Figura R-3.8. Assaig de viabilitat cel·lular amb MTT de cultius mixtes d'astroglia i microglia en presència de protaxina- $\epsilon$  250 nM o toxina- $\epsilon$  5, 50 nM o 250 nM, després d'1, 2, 4, 8, 12 o 24 hores d'incubació.**

A més de l'assaig amb MTT, es va fer un altre tipus d'aproximació, aprofitant la capacitat que té el iodur de propidi (IP) de penetrar les membranes de les cèl·lules mortes i acumular-se al seu nucli. Així doncs, es van incubar els cultius amb toxina- $\epsilon$  a 3 concentracions (5, 50 i 250 nM), o

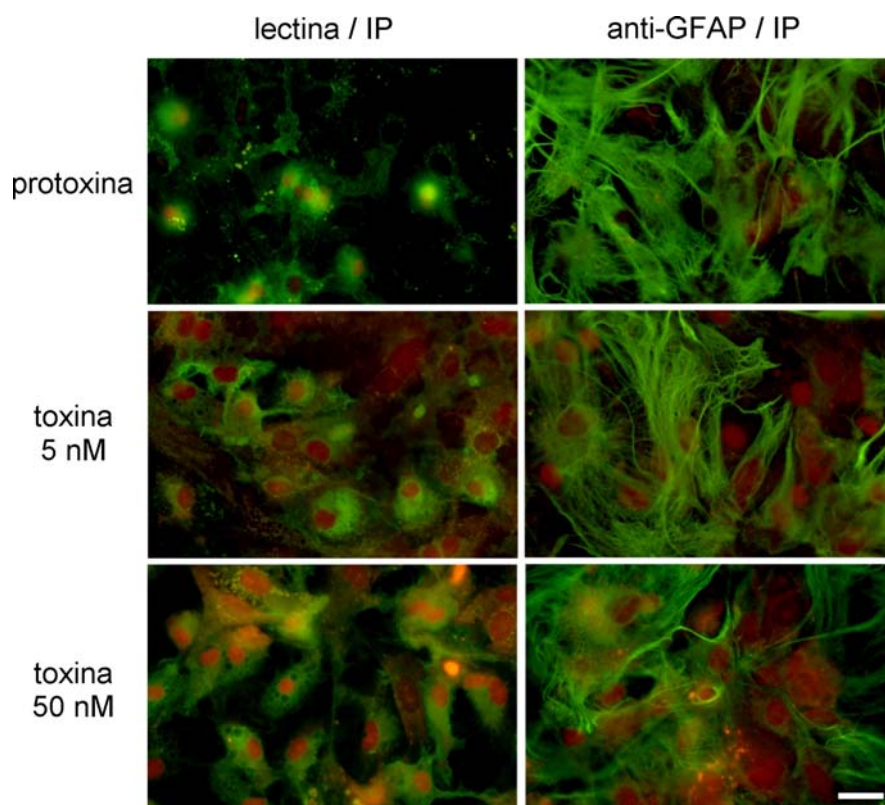
amb protoxina- $\epsilon$  a 50 nM com a control, durant diferents temps (0, 4, 15 i 18 h), per immediatament després afegir-hi el IP i observar al microscopi invertit de fluorescència. A la concentració de 5 nM de toxina- $\epsilon$  no es van detectar diferències en l'acumulació de IP respecte al control de protoxina- $\epsilon$ . En canvi, tant a 50 nM com a 250 nM es va poder detectar un increment substancial de cèl·lules marcades amb IP, a tots els temps estudiats. La figura R-3.9 mostra, a tall d'exemple, l'efecte a les 4 hores, amb protoxina- $\epsilon$  i toxina- $\epsilon$  50 i 250 nM.



**Figura R-3.9.** Assaig de citotoxicitat de toxina- $\epsilon$  sobre cultius mixtes d'astroglia i microglia. La columna de l'esquerra mostra la imatge en camp clar de cèl·lules tractades amb protoxina- $\epsilon$  50 nM (A) o amb toxina- $\epsilon$  50 nM (C) i 250 nM (E). La columna de la dreta mostra la captació de IP per part de les cèl·lules del mateix camp.

Quedava doncs demostrat que la toxina- $\epsilon$  era capaç de provocar mort cel·lular sobre cultius mixtes d'astroglia i microglia.

Ara bé, quin dels dos tipus cel·lulars estava morint? En fer doble immunofluorescència amb anticossos contra la proteïna GFAP (específica d'astroglia) vam comprovar que en algunes cèl·lules coincidia el marcatge de iodur de propidi amb el d'anti-GFAP, però en moltes altres no existia colocalització. En canvi, incubant les cèl·lules amb lectina de tomàquet (marcador de microglia), es va observar que la majoria de cèl·lules que contenien iodur de propidi també es van marcar amb la lectina (Fig. R-3.10). Aquests resultats suggereixen que la toxina- $\epsilon$  pot estar afectant ambdós tipus cel·lulars, però amb certa preferència per la microglia.



**Figura R-3.10.** Identificació de les cèl·lules afectades per la toxina- $\epsilon$ . Les imatges mostren en vermell la incorporació de IP per part de cultius mixtes de microglia i astroglià incubats durant 4 h amb protoxina- $\epsilon$  50 nM, toxina- $\epsilon$  5 nM i toxina- $\epsilon$  50 nM. La columna de l'esquerra mostra en verd el marcatge amb lectina de tomàquet i la de la dreta el marcatge amb anticossos contra GFAP. La barra de mesura equival a 20  $\mu$ m.

### 3.3.2 Unió a cultius glials fixats.

Els experiments d'unió de protoxina- $\epsilon$ -GFP sobre cultius mixtes de microglia i astroglià, tant sobre cèl·lules vives com fixades, no van revelar cap unió

específica. O bé no s'uneix, o bé ho fa en unes quantitats que estan per sota del límit de detecció de la tècnica (dades no mostrades).

### **3.4 Efecte de la toxina- $\epsilon$ sobre cultius cel·lulars endotelials.**

Un dels passos evidents en el mecanisme d'acció de la toxina- $\epsilon$  al sistema nerviós central és la seva unió a l'endoteli vascular. Per estudiar quin podia ser l'efecte de la toxina sobre l'endoteli, vam analitzar 4 tipus de cultius cel·lulars endotelials:

**Cèl·lules HUVEC.** Provenents de vena de cordó umbilical humà.

**Cèl·lules 1G11.** Provenents de capil·lar de pulmó de ratolí.

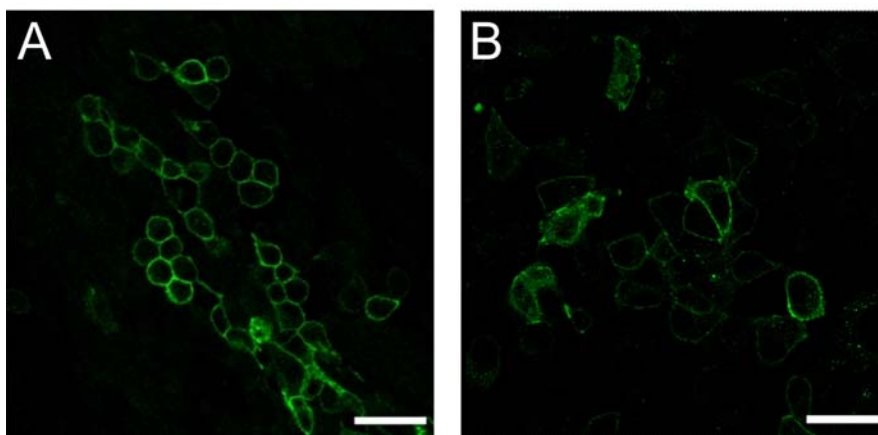
**Línia H5V.** Provenent d'endoteli cerebral de ratolí.

**Cultius primaris de cèl·lules endotelials de cervell boví (BBEC).**

Per una banda vam estudiar la unió de la protoxina- $\epsilon$ -GFP sobre aquests cultius i per l'altra la citotoxicitat de la toxina- $\epsilon$  sobre ells.

#### ***3.4.1 Unió de la toxina- $\epsilon$ a les cèl·lules endotelials.***

Tant els estudis d'unió sobre cèl·lules fixades com sobre cèl·lules vives van mostrar que la protoxina- $\epsilon$ -GFP és capaç d'unir-se als cultius endotelials de les cèl·lules 1G11 (Fig R-3.11). En canvi no vam detectar unió per cap dels altres tres tipus cel·lulars estudiats (no mostrats).



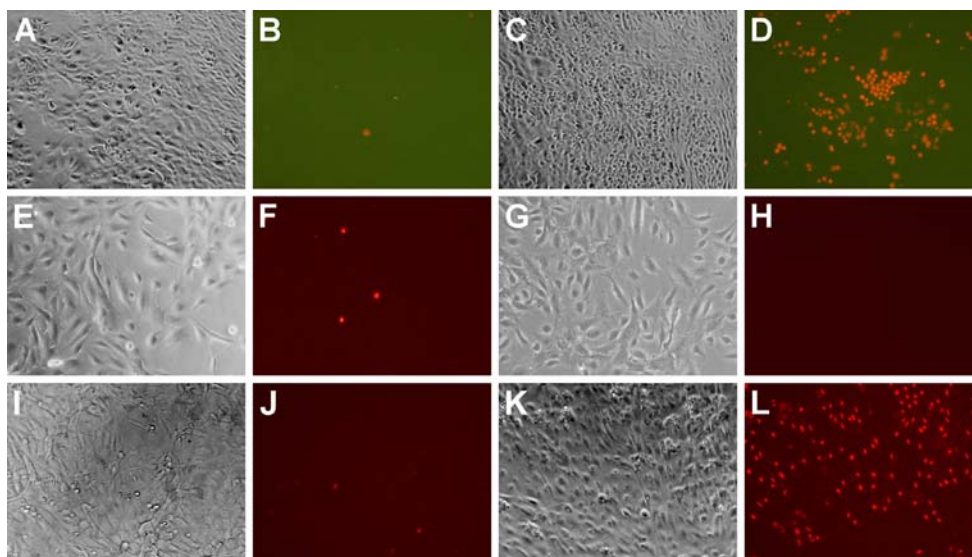
**Figura R-3.11.** Unió de protoxina- $\epsilon$ -GFP sobre un cultiu de cèl·lules 1G11 fixades (A) i sobre cèl·lules 1G11 vives. Les barres blanques equivalen a 40  $\mu$ m.

#### 3.4.2 Efecte citotòxic de la toxina- $\epsilon$ sobre cultius de cèl·lules endotelials.

Amb les cèl·lules HUVEC, 1G11 i BBEC vam seguir la mateixa estratègia emprada amb els cultius de microglia i astroglija per comprovar la citotoxicitat de la toxina- $\epsilon$ . Vam incubar les cèl·lules amb toxina- $\epsilon$  a concentracions 100 nM i 250 nM, a diferents temps (0, 30, 120 i 300 minuts), abans d'afegir-hi IP. Els controls van ser cèl·lules no incubades i cèl·lules incubades amb protoxina- $\epsilon$  250 nM.

Les cèl·lules HUVEC incubades amb toxina- $\epsilon$  no van mostrar diferències en la incorporació de IP respecte els controls no incubats amb toxina (o incubats amb protoxina), mentre que els altres 2 tipus cel·lulars incubats amb toxina- $\epsilon$  van mostrar més incorporació de IP als seus nuclis que els controls. Aquest efecte va ser molt més ràpid a la dosi de 250 nM que a la de 100 nM. A la figura R-3.12 es mostra l'efecte a la dosi de 250 nM de toxina- $\epsilon$  als 30 minuts sobre els 3 tipus cel·lulars, comparats amb els

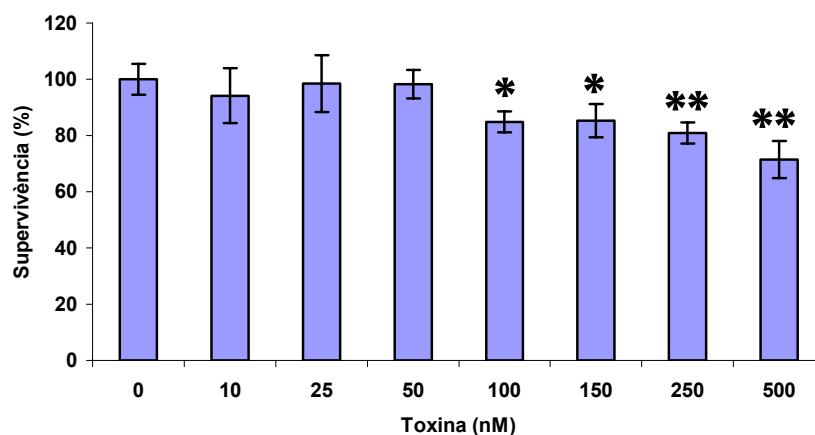
respectius controls. La protoxina- $\epsilon$  no va mostrar diferències respecte al control (dades no mostrades).



**Figura R-3.12. Assaig de citotoxicitat de toxina- $\epsilon$  sobre cèl·lules 1G11 (A-D), cèl·lules HUVEC (E-H) i cèl·lules BBEC (I-L). La primera i tercera columnes mostren la imatge en camp clar de cèl·lules control i cèl·lules tractades 30 minuts amb toxina- $\epsilon$  250 nM, respectivament. La segona i quarta columnes mostren els mateixos camps en imatge de fluorescència per posar de manifest la incorporació de IP per part de les cèl·lules mortes.**

Amb les cèl·lules H5V vam realitzar un assaig d'MTT on la toxina va mostrar citotoxicitat, encara que lleugera, per dosis a partir de 100 nM després d'una hora de incubació (Fig. R-3.13).





**Figura R-3.13. Assaig de citotoxicitat (MTT) de cèl·lules H5V amb dosis de toxina- $\epsilon$  des de 0 fins a 500 nM. Les dosis a partir de 100 nM de toxina- $\epsilon$  mostren diferències significatives respecte el control sense toxina ( $p < 0,05$  per 100 i 150 nM;  $p < 0,01$  per 250 i 500 nM).**

### 3.4.3 Assaig de l'efecte permeabilitzador de la toxina- $\epsilon$ sobre l'endoteli.

Ja que la toxina- $\epsilon$  és capaç de provocar edema vascular vam voler analitzar la seva capacitat d'induir permeabilitat en un model de barrera hematoencefàlica *in vitro*, utilitzant cultius primaris de cèl·lules BBEC, endotelials de cervell boví. El mètode es basa en la quantificació del pas d'inulina- $H^3$  a través de la monocapa de cèl·lules endotelials. Es van incubar les cèl·lules amb 10 i 100 nM de toxina- $\epsilon$  i de protoxina- $\epsilon$  i es va mesurar el pas d'inulina- $H^3$  als 30, 90 i 180 minuts posteriors. No es va produir un augment significatiu de la permeabilitat per la inulina- $H^3$  respecte als controls ni per la toxina- $\epsilon$  ni per la protoxina- $\epsilon$  en cap de les concentracions i temps estudiats (Taula R-3.1).

	30 min	90 min	180 min
<b>Sense Tractament</b>	4,60 ± 1,47	14,13 ± 3,90	23,96 ± 2,86
<b>Protoxina 100 nM</b>	4,61 ± 1,32	11,07 ± 2,72	23,41 ± 1,78
<b>Toxina 10 nM</b>	2,35 ± 1,28	8,82 ± 4,72	19,1 ± 4,13
<b>Toxina 100 nM</b>	5,34 ± 1,3	13,85 ± 3,12	26,69 ± 5,48

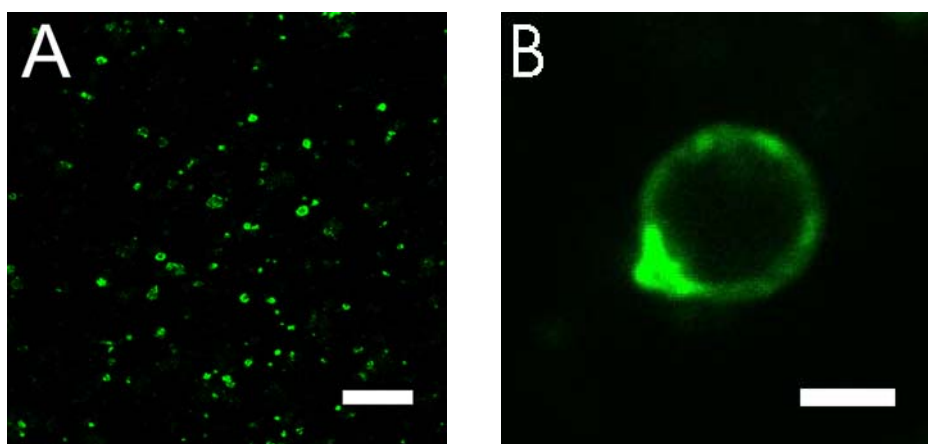
**Taula R-3.1. Flux d'inulina-H<sup>3</sup> (%) del compartiment apical al basal de cèl·lules BBEC, sense tractament o en presència de protoxina 100 nM, toxina 10 nM o toxina 100 nM. Les mesures es van fer als 30, 90 i 180 minuts.**

### **3.5 Efecte de la toxina-ε sobre sinaptosomes aïllats de rata i ratolí.**

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 de provocar la secreció de glutamat induïda per l'entrada d'ions Ca<sup>2+</sup>, d'acord amb la hipòtesi excitotòxica. El mecanisme molecular proposat per induir la secreció de neurotransmissor (i possiblement l'efecte citotòxic) és la inserció de la toxina-ε a la membrana plasmàtica seguit de la formació d'oligòmers i la subseqüent formació de porus. Per una banda vam testar la unió *in vitro* de la protoxina-ε-GFP sobre els sinaptosomes i per l'altra vam avaluar l'efecte de la toxina-ε sobre l'alliberació de glutamat de sinaptosomes aïllats.

### 3.5.1 Incubacions amb toxina- $\epsilon$ -GFP i protoxina- $\epsilon$ -GFP.

Per comprovar si la toxina- $\epsilon$  és capaç d'unir-se a la fracció de sinaptosomes aïllats de rata o ratolí, vam fixar aquests sinaptosomes sobre cubreobjectes de vidre recoberts amb poli-lisina. Fet això, els vam incubar amb protoxina- $\epsilon$ -GFP a una concentració de 500 nM per poder visualitzar la unió al microscopi de fluorescència. Les imatges mostraven unió de la protoxina a unes estructures circulars (Fig. R-3.14).



**Figura R-3.14. Unió de protoxina- $\epsilon$ -GFP sobre preparació de sinaptosomes de rata aïllats. (A) Visió general, barra blanca 20  $\mu$ m. (B) Detall, barra blanca 2  $\mu$ m.**

Per comprovar si aquestes estructures podien ser sinaptosomes vam realitzar estudis de dobles marcatges amb protoxina- $\epsilon$ -GFP i anticossos contra proteïnes sinàptiques com SNAP-25, VAMP-2 i syntaxina-1, però no vam trobar colocalització (Fig. R-3.15). En canvi, sí en vam trobar amb anticossos contra la proteïna bàsica de mielina (MBP), confirmant que la

toxina s'estava unint a fragments de mielina recircularitzada presents a la preparació, i que per contra, no era capaç d'unir-se a sinaptosomes fixats sobre vidre.

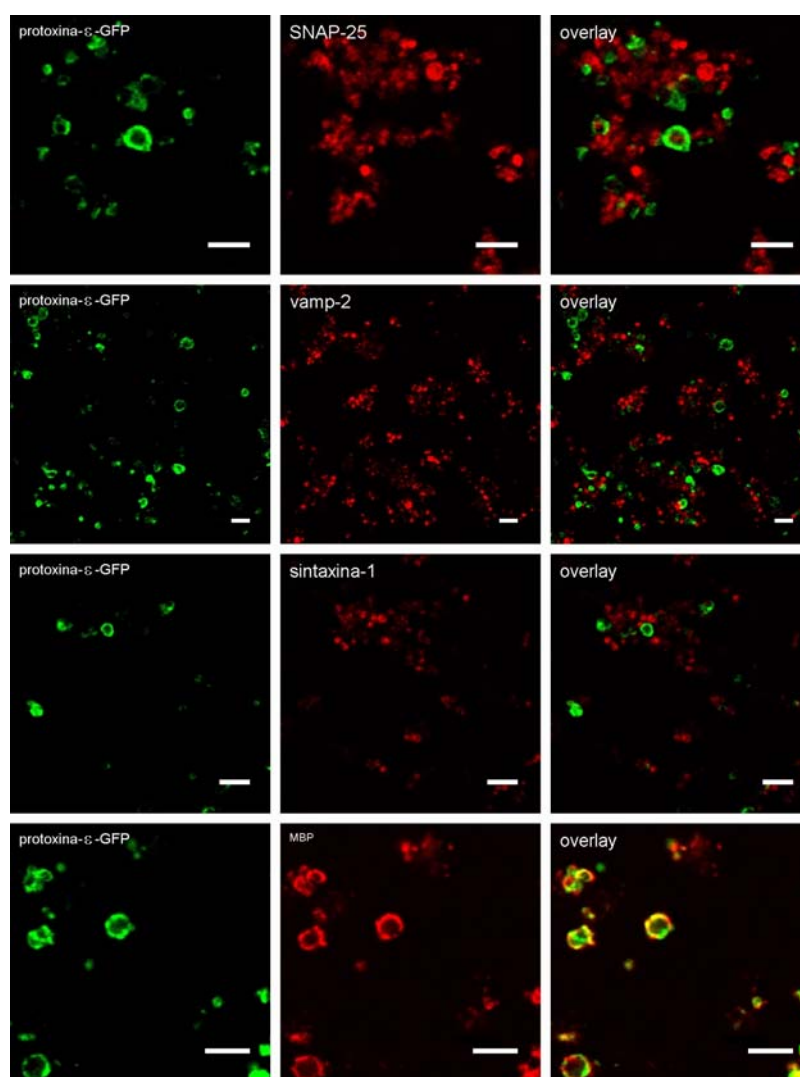


Figura R-3.15. Marcatge de protoxina- $\epsilon$ -GFP sobre fraccions enriquides en sinaptosomes de rata. La columna de l'esquerra mostra en verd el marcatge de protoxina- $\epsilon$ -GFP; la columna central, immunofluorescència de la mateixa zona

**amb anticossos contra SNAP-25, vamp-2, sintaxina-1 i MBP; la columna de la dreta mostra la superposició de les dues imatges anteriors: només l'anti-MBP mostra colocalització amb protoxina- $\epsilon$ -GFP. Les barres blanques corresponen a 4  $\mu\text{m}$ .**

Fent la incubació de protoxina- $\epsilon$ -GFP amb la fracció de sinaptosomes en suspensió, abans de la fixar-los sobre els cubreobjectes, es van obtenir idèntics resultats (dades no mostrades).

### ***3.5.2 Efecte de la toxina- $\epsilon$ sobre la secreció de glutamat.***

Els sinaptosomes, un cop aïllats, mantenen durant unes hores les propietats bioquímiques i metabòliques, de manera que es pot estimular la fusió de vesícules sinàptiques mitjançant la despolarització de la membrana amb KCl, provocant l'obertura de canals iònics depenents de voltatge, i per tant l'entrada d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . El glutamat alliberat es pot mesurar en un fluorímetre, gràcies a la reacció de la glutamat deshidrogenasa (GDH).

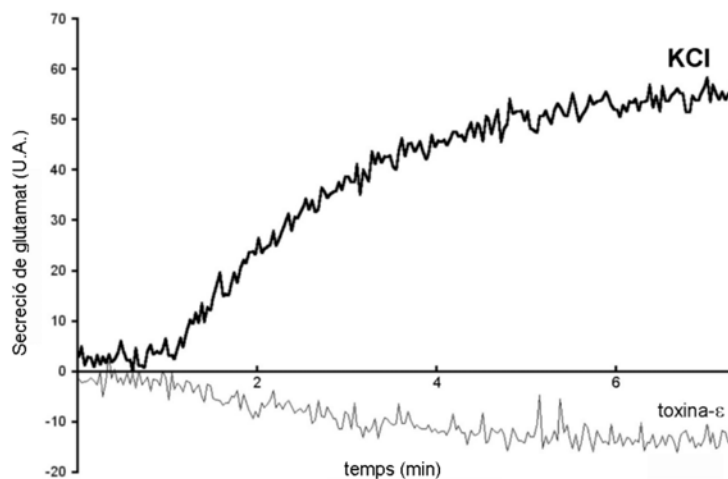
Per comprovar la hipòtesi de què la toxina- $\epsilon$  és capaç d'estimular l'alliberació de glutamat, vam analitzar el seu efecte en aquest model de secreció *in vitro* amb sinaptosomes aïllats de cervell tant de rata com de ratolí.

Si la toxina formés porus a la membrana dels sinaptosomes, provocaria l'entrada d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  i per tant la secreció de glutamat.

La figura R-3.16 mostra les mesures de glutamat alliberat a sinaptosomes de ratolí per la despolarització amb KCl (traç gruixut) o per la toxina- $\epsilon$  100 nM (traç prim). La toxina- $\epsilon$  no va ser capaç de despolaritzar els

sinaptosomes en cap de les rèpliques experimentals realitzades, almenys a les concentracions i temps estudiats.

En experiments en què els sinaptosomes van ser preincubats amb toxina- $\epsilon$  15 minuts abans de la mesura, no es va detectar tampoc cap alliberament significatiu de glutamat.



**Figura R-3.16. Mesura de l'alliberament de glutamat provocat per KCl (traç gruixut) o per toxina- $\epsilon$  100 nM (traç prim) sobre sinaptosomes de ratolí.**

Els experiments realitzats amb sinaptosomes de rata van mostrar idèntics resultats.

**DISCUSSIÓ**





## **1. Obtenció i validació de les eines moleculars.**

Tradicionalment, els estudis sobre els efectes de la toxina- $\epsilon$  s'han fet amb extractes proteics de cultius bacterians de *C. perfringens*, amb l'inconvenient que aquests bacteris produeixen un gran nombre de toxines diferents. Això redueix el grau de puresa de la toxina- $\epsilon$  obtinguda i dificulta també l'anàlisi dels resultats, ja que s'ha d'identificar correctament quins efectes són deguts a la toxina- $\epsilon$  i quins són produïts per alguna de les toxines clostridials contaminants.

Donat que l'obtenció de proteïnes recombinants facilita la producció ràpida i, sobretot, efectiva, de proteïnes, ens vam proposar clonar i expressar a *E. coli*, tant la toxina- $\epsilon$  com la protoxina- $\epsilon$ . A més, vam dissenyar diferents formes de fusió amb la GFP amb l'objectiu de visualitzar directament la toxina i la protoxina amb microscopia de fluorescència, tant en experiments *in vivo* com *in vitro*.

Un cop obtingudes, el primer pas va ser validar aquestes proteïnes recombinants. És a dir, havíem de testar si es comportaven de manera comparable a la toxina nativa de *C. perfringens* i, en definitiva, eren una bona eina per a l'estudi de la toxina- $\epsilon$ .

Per fer-ho vam fer servir les cèl·lules MDCK, sense dubte el model *in vitro* més utilitzat per a l'estudi de la toxina- $\epsilon$ , ja que són cèl·lules molt sensibles a la toxina- $\epsilon$ . De fet, durant molts anys es va considerar que eren l'únic tipus cel·lular sensible als efectes de la toxina, exceptuant els cultius primaris de macròfags de conill d'índies (Buxton, 1978c). Recentment s'ha descrit que la toxina- $\epsilon$  també és citotòxica per la línia derivada de ronyó humà G-402 (Shortt et al., 2000), tot i que les dosis necessàries per veure l'efecte són molt més altes que per les MDCK. Nosaltres, en aquest estudi,

---

hem trobat altres tipus cel·lulars sensibles, com són els cultius endotelials 1G11, BBEC i H5V, tot i que, com ja discutirem més endavant, ho són en menor grau que les MDCK (veure apartat 4).

En definitiva, l'elevat efecte citotòxic que presenta la toxina- $\epsilon$  sobre les cèl·lules MDCK ens va permetre fer un assaig de mort cel·lular per comparar les formes recombinants amb la toxina- $\epsilon$  nativa, purificada de cultius de *Clostridium*.

Totes les formes recombinants que contenen la forma activa de la toxina- $\epsilon$  van mostrar un grau de toxicitat sobre les cèl·lules MDCK equivalent al de la forma nativa, mentre que les formes que contenen protoxina no van mostrar citotoxicitat significativa sobre els cultius. A més, tant la pre- com la co-incubació amb protoxina- $\epsilon$  en excès va evitar la mort provocada per totes les formes de toxina- $\epsilon$ , suggerint que totes dues competeixen pels mateixos llocs d'unió.

Cal destacar que els valors de mortalitat no van superar mai el 70%, quedant sempre una subpoblació de cèl·lules resistents que representaven aproximadament el 25-30% del total, en consonància amb altres estudis que han descrit aquest fenomen (Shortt et al., 2000). Recentment s'ha aconseguit generar soques de cèl·lules amb una sensibilitat a la toxina- $\epsilon$  molt més baixa, tant per MDCK com per G-402, mitjançant l'exposició repetida a dosis creixents de toxina- $\epsilon$  (Beal et al., 2003), confirmant l'existència d'aquesta subpoblació de característiques diferents.

En definitiva, podem concloure que les formes recombinants de la toxina- $\epsilon$  obtingudes conserven la citotoxicitat de les formes natives i que per tant són una bona eina per a l'estudi dels efectes de la toxina- $\epsilon$ .

## **2. Unió i efectes de la toxina- $\epsilon$ a la línia cel·lular MDCK.**

La toxina- $\epsilon$  presenta afinitat per la membrana de les cèl·lules MDCK i s'hi uneix en el procés d'intoxicació (Petit et al., 1997).

Els nostres experiments amb les formes recombinants de la toxina- $\epsilon$  fusionades a GFP ens van permetre visualitzar, per primer cop de manera directa, la unió de la toxina- $\epsilon$  a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK. Aquesta unió es donava tant a les incubacions amb protoxina- $\epsilon$ -GFP com amb toxina- $\epsilon$ -GFP, ja fos sobre cèl·lules vives o fixades, i era inhibida amb un excès de protoxina- $\epsilon$ . Cal destacar que el desplaçament amb protoxina- $\epsilon$  també va evitar la mort cel·lular provocada per la toxina- $\epsilon$ , confirmant que la unió a la membrana plasmàtica és un requisit per a que es pugui donar tot el procés d'intoxicació.

En extendre l'estudi a altres tipus cel·lulars, vam comprovar que les cèl·lules que no es mostraven sensibles als assajos de citotoxicitat tampoc no presentaven unió de protoxina- $\epsilon$ -GFP ni de toxina- $\epsilon$ -GFP a la seva membrana plasmàtica.

Així doncs, considerant la importància de la unió a la membrana plasmàtica per a que es pugui donar la resta del procés d'intoxicació, el nostre següent pas va ser caracteritzar en més detall la unió de la toxina- $\epsilon$  a les cèl·lules MDCK.

En primer lloc, els nostres estudis al microscopi electrònic van confirmar que la toxina té més afinitat per la membrana plasmàtica del pol apical de la cèl·lula. Aquest resultat reforça observacions prèvies de que la toxina presenta en aquesta zona un efecte més potent (Petit et al., 1997).

A més, tornant als estudis de fluorescència, vam comprovar que la unió s'inhibeix completament en realitzar la incubació a 4°C, en consonància

amb estudis previs que veien com la letalitat de la toxina- $\epsilon$  es reduïa dràsticament al disminuir la temperatura d'incubació (Lindsay, 1996; Petit et al., 2003).

Finalment, la incubació prèvia de les cèl·lules amb 0,2% de tritó X-100 va disminuir de manera molt important la unió de protoxina- $\epsilon$ -GFP i de toxina- $\epsilon$ -GFP, quedant reduïda a un patró de marcatge puntejat, que podria correspondre als dominis de membrana resistents a detergent (DRMs), on té lloc l'heptamerització de la toxina- $\epsilon$  a la membrana (Miyata et al., 2002). En el nostre laboratori també hem vist com la toxina- $\epsilon$  presenta afinitat per preparacions de DRMs aïllats i fixats sobre membranes de nitrocel·lulosa (dades no mostrades). Així doncs, tant la protoxina com la toxina tindrien afinitat pels DRMs, però només la toxina mostraria capacitat per formar els heptàmers i continuar el procés citotòxic.

Com és la unió a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK? Existeix un receptor proteic?

De tots els estudis fets amb toxina- $\epsilon$  i cèl·lules MDCK, només el realitzat per Petit i col·laboradors al 1997 identifica una proteïna d'uns 37 kDa, candidata a ser el receptor de la toxina- $\epsilon$ , però sense identificar de quina proteïna es tractava.

Donat que la incubació prèvia de les cèl·lules amb proteinasa K reduïa dràsticament la unió de protoxina- $\epsilon$ -GFP a les cèl·lules (dades no mostrades), els nostres experiments confirmen la implicació d'algun component proteic en la unió.

De la mateixa manera, els nostres experiments descarten la implicació d'alguns residus glucídics com l'àcid neuramínic en el mecanisme d'unió, ja que ni la competència amb aquest àcid ni la preincubació amb

neuraminidasa no van modificar la unió de protoxina- $\epsilon$ -GFP a la membrana plasmàtica.

Així doncs, sembla que el receptor per la toxina- $\epsilon$  de les cèl·lules MDCK presentaria característiques diferents al receptor de naturalesa glicoproteica descrit per Nagahama i Sakurai (1992) a cervell, la unió al qual sí es veia modificada per la neuraminidasa.

De totes maneres, una dada interessant a tenir en compte és la capacitat de la toxina- $\epsilon$  de formar porus en membranes lipídiques artificials, independentment del tipus de lípid que les forma (Petit et al., 2001). Això indicaria que no necessita de cap proteïna per adherir-se a les membranes cel·lulars. Però si així fos, s'enganxaria a totes les cèl·lules, cosa que no succeeix. Com es resol aquesta aparent contradicció?

Probablement, la resposta està en què la membrana plasmàtica d'una cèl·lula és força més complexa que una bicapa lipídica artificial. Així, seria necessària l'existència d'algun factor que ajudés la toxina a arribar a insertar-se a la membrana, com passa amb altres toxines com l' $\alpha$ -toxina d'*Staphylococcus aureus* o l'aerolisina d'*Aeromonas hydrophila* (la qual recordem que presenta gran homologia amb la toxina- $\epsilon$ ), que tot i ser capaces d'insertar-se a membranes artificials per elles mateixes, necessiten de receptors per dur a terme la seva activitat biològica (Petit et al., 2001).

De moment, però, no podem dir quin és aquest factor, tot i que les nostres dades apunten a l'existència d'un receptor de naturalesa proteica.

### **3. Distribució i efectes de la toxina- $\epsilon$ a ronyó.**

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

En aquest sentit, estudiar quina era la distribució i l'efecte de la toxina- $\epsilon$  en ronyons de ratolí va ser un dels objectius inicials del nostre estudi.

Vam poder demostrar que la injecció intravenosa de toxina- $\epsilon$  en rata i ratolí provoca la mort de les cèl·lules epitelials dels túbuls contornejats distals, manifestada en un principi per l'aparició de nuclis picnòtics a la majoria de túbuls distals i posteriorment per la completa desorganització dels mateixos. Aquests efectes no es donaven en injectar la protoxina- $\epsilon$ .

Amb l'ús de les formes recombinants fusionades a GFP vam poder visualitzar, per primer cop de manera directa, l'acumulació de toxina a nivell dels túbuls renals. Vam detectar acumulació de toxina- $\epsilon$ -GFP i protoxina- $\epsilon$ -GFP tant a túbuls proximals com a distals, així com a glomèruls, tubs col·lectors i capil·lars sanguinis.

Pel que fa a la fluorescència detectada a nivell dels túbuls proximals i distals, vam observar marcades diferències, tant de caràcter quantitatiu com qualitatiu, entre els dos tipus de túbuls. Els túbuls proximals presentaven gran quantitat de fluorescència a la part apical de les cèl·lules epitelials, mentre que els distals presentaven molta menys fluorescència que s'acumulava de manera uniforme al voltant de tota la membrana plasmàtica de les cèl·lules epitelials. A més, aquesta marca als túbuls distals era desplaçada amb la co-injecció en excès de protoxina- $\epsilon$  no marcada, mentre que la marca observada a proximals restava intacta.

Aquest desplaçament suggereix que només la unió a túbuls distals és específica. La injecció de GFP sola va confirmar aquesta hipòtesi, ja que també s'acumulava a túbuls proximals però no n'apareixia en absolut a distals.

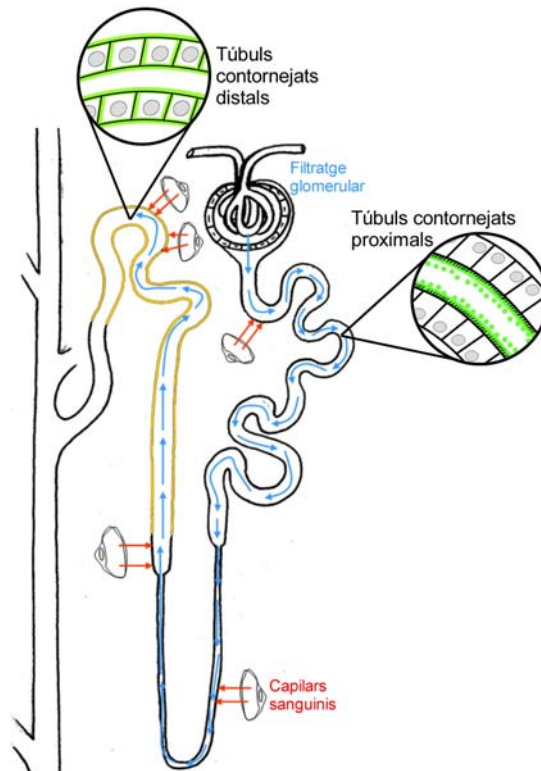
El fet que només la unió a distals fos específica explicaria perquè als experiments realitzats per Nagahama i Sakurai al 1991, en què injectaven protoxina- $\epsilon$  marcada radioactivament, només una petita part de la radioactivitat acumulada a ronyó fos desplaçada amb protoxina- $\epsilon$  freda. Segons els nostres experiments, el què estaven veient era el desplaçament específic de la protoxina- $\epsilon$  localitzada als túbuls distals, mentre que la acumulada inespecíficament als túbuls proximals no seria desplaçada.

Un dels punts claus per entendre les diferències entre l'acumulació de toxina a uns i altres túbuls seria esbrinar quina és la via d'arribada de la toxina als túbuls renals. Malauradament, amb les dades de què disposem fins el moment, només podem especular sobre quina seria aquesta via.

El més plausible seria que l'entrada fos a través del filtrat glomerular. Grans quantitats de toxina arribarien als túbuls proximals, on seria reabsorbida cap a la circulació juntament amb la resta de proteïnes que hi arribessin. Si una petita part, però, n'escapés cap als túbuls distals, hi podria trobar els seus llocs d'unió específics i provocar la citotoxicitat que hem vist a les cèl·lules epitelials.

No podem descartar, però, que la toxina arribi als túbuls distals per la circulació sistèmica a través dels capil·lars que nodreixen les seves cèl·lules. Més si tenim en compte que als capil·lars renals també hi trobem acumulació de toxina- $\epsilon$ -GFP i protoxina- $\epsilon$ -GFP.

La figura D-1 esquematitza la unió de la toxina- $\epsilon$ -GFP als túbuls proximals i distals i aquestes dues possibles vies d'entrada a la nefrona.



**Figura D-1. Les dues possibles vies d'entrada de la toxina- $\epsilon$  a la nefrona. Les fletxes blaves mostren l'entrada a partir del filtratge glomerular. Les fletxes vermelles esquematitzen l'arribada directa des dels capilars sanguinis. En verd, els dos patrons de marcatge que trobem als túbul proximal i als túbul distal. En groc, la zona on la toxina- $\epsilon$  provoca mort de cèl·lules epitelials.**

Una dada que apuntaria cap a la primera hipòtesi és que en experiments *in vitro*, incubant talls de ronyó fixats amb protoxina- $\epsilon$ -GFP també vam veure una unió específica (desplaçada amb protoxina- $\epsilon$ ) sobre les cèl·lules epitelials dels túbul distal, però curiosament només sobre la part luminal de la seva membrana plasmàtica, suggerint que si una petita part de toxina escapés de la reabsorció als túbul proximal i arribés a estar en



contacte amb la membrana apical de les cèl·lules epitelials dels túbuls distals, podria unir-s'hi amb una especificitat molt alta.

Així doncs, hem pogut demostrar que la toxina-ε s'uneix de manera específica als túbuls distals de ronyó de ratolí i que provoca una ràpida degeneració de les seves cèl·lules epitelials.

Pel que fa a l'estudi amb altres espècies animals, vam comprovar que els efectes *in vivo* es donen també a rata, fins i tot de manera més dràstica. La mort cel·lular a túbuls distals es dona de manera molt més generalitzada. Pràcticament tots els túbuls distals presenten nuclis picnòtics.

L'estudi d'unió *in vitro* el vam poder estendre a rata, xai, vaca i també a l'home. En tots els casos vam visualitzar unió de protoxina-ε-GFP sobre les cèl·lules epitelials dels túbuls distals, amb el mateix patró observat a ratolí. Aquesta unió també era desplaçable amb protoxina-ε i afectada per l'ús de detergent. Per tant, totes aquestes espècies ténen llocs d'unió específica per la toxina-ε als túbuls distals. Això és important, ja que mostra un comportament de la toxina-ε sobre mostres humanes idèntic al mostrat en espècies sensibles als efectes de la toxina de manera natural.

El cas de l'espècie humana podria ser equivalent al de rata i ratolí, on no s'han descrit casos d'intoxicació natural per toxina-ε, però la injecció intravenosa demostra que es tracta d'espècies sensibles. Així, semblaria que tot i haver-hi moltes espècies potencialment sensibles, la intoxicació només progressaria en aquells animals on els *C. perfringens* poguessin proliferar en un ambient anaeròbic òptim per produir grans quantitats de toxina.

#### **4. Distribució i efectes de la toxina-ε al Sistema Nerviós Central.**

El cervell és un important òrgan diana de la toxina-ε, ja que són finalment els efectes neurològics els que provoquen la mort sobtada dels animals (almenys a dosis baixes).

Malgrat això, poc se sap del mecanisme d'acció de la toxina a nivell cerebral. Se sap que la toxina-ε injectada i.v. en ratolí s'acumula en grans quantitats, a banda del ronyó, a cervell (Nagahama i Sakurai, 1991). Però no és clar a quin lloc concret del cervell ho fa. Fins a la data de començar aquest estudi, només s'havia detectat toxina-ε a nivell de l'endoteli vascular del cervell, mitjançant tècniques immunohistoquímiques (Buxton, 1978a).

Com hem dit a la introducció, la toxina-ε és capaç de produir edema vascular sever a nivell cerebral, a més de danys cel·lulars concrets com l'inflament dels peus perivasculars dels astròcits, lesions a nivell de l'endoteli, o també mort neuronal (Finnie, 1984b). 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).

Per entendre com es poden donar aquests efectes és important conèixer com es distribueix la toxina-ε un cop arriba al sistema nerviós central.

S'ha descrit que els efectes al cervell depenen de la dosi de toxina-ε que s'uneix a l'endoteli cerebral. 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, per una via encara per identificar, amb mort neuronal en determinades zones del cervell i amb una mort molt més tardana de l'animal (Finnie, 2004).

En aquests darrer cas, no se sap si els danys provocats per la toxina- $\epsilon$  a l'endoteli són suficients per donar lloc a la resta de processos, o si per contra la toxina- $\epsilon$  travessa la BHE i exerceix algun altre efecte a l'interior del teixit cerebral.

Nosaltres vam voler utilitzar les nostres eines moleculars per estudiar la distribució i els posteriors efectes al cervell de la toxina- $\epsilon$ .

Amb la injecció i.v. de toxina- $\epsilon$ -GFP vam poder seguir la trajectòria de la toxina dins del cervell de ratolí. Per visualització directa vam observar acumulació de toxina a l'endoteli vascular arreu del cervell. Aquesta unió era evitada amb la co-injecció de protoxina- $\epsilon$  en excès, assenyalant-ne l'especificitat. Cal remarcar que la unió a l'endoteli d'altres òrgans no va ser desplaçada per la protoxina- $\epsilon$  no marcada, assenyalant l'elevada especificitat per l'endoteli vascular cerebral.

S'ha descrit que la toxina- $\epsilon$  provoca degeneració de les cèl·lules endotelials de la vasculatura del cervell (Finnie, 1984 b). Nosaltres vam realitzar una sèrie d'experiments *in vitro* per testar el possible efecte citotòxic de la toxina sobre diferents tipus cel·lulars endotelials. Els cultius cel·lulars HUVEC (provinents de vena de cordó umbilical humà) es van mostrar insensibles als efectes de la toxina- $\epsilon$ , mentre que tant les cèl·lules 1G11 (derivades de capil·lar de pulmó murí), com les BBEC (d'endoteli cerebral boví), com la línia H5V (d'endotelí cerebral murí) van mostrar mort cel·lular en ser incubades amb toxina- $\epsilon$ . Curiosament, amb incubacions amb protoxina- $\epsilon$ -GFP sobre aquests tipus cel·lulars, només vam detectar unió a la membrana plasmàtica de les cèl·lules 1G11, suggerint que la

unió sobre la resta de cèl·lules sensibles (BBEC i H5V) no seria prou gran com per detectar-les per visualització directa amb fluorescència, però sí per provocar els efectes citotòxics.

Tornant als experiments *in vivo*, la marca fluorescent observada als vasos cerebrals desapareixia en aquells animals on el sacrifici i posterior fixació del cervell es van fer més enllà dels 15 minuts post-injecció (resultats no mostrats), suggerint que la toxina- $\epsilon$ -GFP realment travessava la BHE. Nosaltres vam confirmar aquesta hipòtesi ja que per visualització directa vam detectar fluorescència al voltant dels capil·lars sanguinis, i amb tècniques d'immunofluorescència vam poder localitzar la toxina- $\epsilon$ -GFP al parènquima cerebral, associada a cèl·lules glials. Tot i així, en aquests animals no vam apreciar cap efecte directe ni sobre cèl·lules microglials ni astroglials, almenys pel que fa a canvis en la morfologia. Això no és estrany, ja que treballàvem amb dosis molt altes de toxina- $\epsilon$ -GFP que, com hem dit, provoquen la mort molt ràpida dels ratolins, sense temps per a què es puguin donar aquests efectes (de forma evident) a nivell cel·lular. Per estudiar quin podia ser l'efecte de la toxina- $\epsilon$  sobre la microglia i l'astroglia, vam realitzar estudis *in vitro* amb cultius primaris mixtes d'astroglia i microglia de cervell de ratolí, així com amb cultius purs d'ambdós tipus cel·lulars.

La toxina- $\epsilon$  té efecte citotòxic sobre els cultius mixtes d'astroglia i microglia. Aquesta citotoxicitat no era massa gran, ja que per dosis relativament altes de toxina (250 nM) i a temps llargs d'incubació (8 hores) mai no va sobrepassar valors més alts del 13% del total de cèl·lules en cultiu. Amb immunofluorescència vam poder identificar les cèl·lules que estaven morint, que van resultar ser de tots dos tipus, però preferentment microglials.

Els estudis amb cultius purs d'un i d'altre tipus cel·lular van mostrar idèntics resultats, confirmant que tant la microglia com l'astroglia són sensibles però que el grau de citotoxicitat és més elevat per la microglia (dades no mostrades).

Amb aquests cultius primaris vam també realitzar estudis d'unió amb protoxina- $\epsilon$ -GFP, però malauradament no vam trobar unió significativa a la membrana de cap dels dos tipus cel·lulars, ni en cèl·lules vives ni en cèl·lules fixades prèviament.

El fet que no detectem unió, però, no vol dir que no n'hi hagi. Potser la quantitat de molècules que s'uneixen no és prou alta com per poder-la detectar per visualització directa amb la pròpia fluorescència de la molècula. Aquests nivells baixos d'unió podrien explicar els relativament llargs temps d'incubació necessaris per veure efecte citotòxic i també el baix percentatge de mort cel·lular als cultius mixtes d'astroglia i microglia.

En qualsevol cas, s'hauria d'aprofundir en aquests estudis per determinar exactament com es produeix la mort d'aquestes cèl·lules.

Així doncs, responent a la pregunta de si la toxina- $\epsilon$  és capaç d'entrar al teixit nerviós, nosaltres hem vist que la toxina- $\epsilon$  injectada i.v. a ratolí travessa la BHE i s'uneix a la membrana de cèl·lules glials, probablement microglials i/o astroglials. No hem vist cap canvi morfològic evident en aquestes cèl·lules, probablement pels curts temps d'exposició, però sí hem vist que la toxina- $\epsilon$  és capaç de provocar mort cel·lular sobre cèl·lules microglials i astroglials en cultius *in vitro*. Si aquest efecte es dona també *in vivo*, podria jugar un paper important en el curs de la intoxicació a nivell del cervell. A la literatura s'ha reportat que la microglia pot ser responsable de processos d'excitotoxicitat augmentant els nivells de glutamat extracel·lular per inhibició de la seva recaptació, a través de la

interleuquina-1 $\beta$  secretada per la microglia activada (Takahashi et al., 2003). Per tant, una activació de la microglia per part de la toxina- $\epsilon$  podria estar relacionada amb la mort neuronal descrita als animals intoxicats amb dosis baixes de toxina- $\epsilon$ .

Evidentment, també existeix la possibilitat de què la toxina- $\epsilon$ , un cop dins del teixit nerviós, pugui arribar a entrar en contacte amb els terminals nerviosos i provocar l'alliberació de manera directa. De fet, això és el que suggereixen els experiments de Nagahama i Sakurai (1992), que van observar unió específica de la toxina- $\epsilon$  a preparacions de sinaptosomes aïllats de cervell de rata. Fins i tot van descriure que aquesta unió seria a través d'una sialoglicoproteïna. Per tant, si existeix un lloc d'unió específic a la membrana de sinaptosomes, i la toxina és capaç de travessar la BHE, seria possible que hi tingués algun efecte directe en l'alliberació de neurotransmissor associada a la mort neuronal.

És en aquest sentit que vam iniciar els nostres experiments amb sinaptosomes de rata i ratolí. La nostra hipòtesi inicial era que la toxina- $\epsilon$  provocava l'alliberació de glutamat dels sinaptosomes mitjançant la formació de porus a la membrana, de manera equivalent a com ho fa a les cèl·lules MDCK. A través dels porus podrien entrar ions  $Ca^{2+}$ , responsables d'evocar l'exocitosi de les vesícules sinàptiques.

Per comprovar aquesta hipòtesi vam fer preparacions enriquides en sinaptosomes de rata o ratolí per determinar, d'una banda la capacitat de la protoxina- $\epsilon$ -GFP d'unir-s'hi, i de l'altra la capacitat de la toxina- $\epsilon$  d'estimular l'alliberació de glutamat.

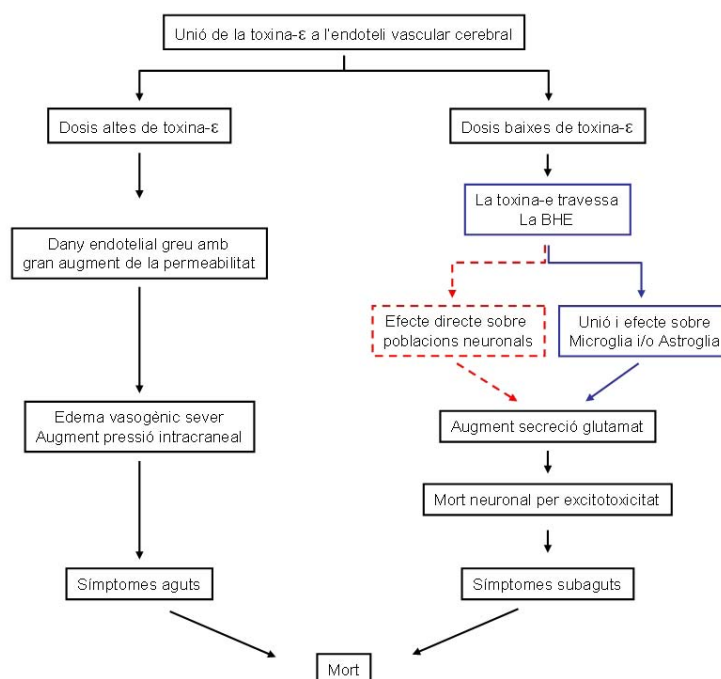
Sorprenentment, vam descobrir que si bé existia unió específica a les preparacions de sinaptosomes, aquesta no es donava a la membrana sinaptosomal sinó a fragments de mielina presents a la preparació. Així

doncs, els nostres experiments posaven en entredit la unió específica descrita sobre sinaptosomes de rata (Nagahama i Sakurai, 1992). A més, en consonància amb aquests resultats, la toxina-ε es va mostrar incapaç de provocar secreció de glutamat de l'interior dels sinaptosomes de cervell d'ambdues espècies, rata i ratolí.

I reforçant encara més aquests experiments, les nostres incubacions amb protoxina-ε-GFP sobre talls histològics de cervell de ratolí confirmen l'afinitat de la toxina pels tractes mielínics, almenys en incubacions *in vitro*. Curiosament, tot i que *in vivo* la toxina s'acumula principalment a vasos sanguinis, a les incubacions *in vitro* de ratolí la vasculatura no es va marcar en absolut. El mateix passava amb incubacions sobre cervell de rata, però quan vam realitzar el mateix experiment a vaca, xai i home, la vasculatura no només sí es marcava, sinó que ho feia amb més intensitat que els tractes mielínics. Aquestes diferències podrien respondre al fet que la vaca i el xai siguin de les espècies més afectades per la toxina-ε de manera natural, però sorprèn el cas de l'espècie humana, ja que si bé no es coneixen casos d'intoxicació natural per *C. perfringens*, tot sembla indicar que podria ser una espècie molt sensible.

En definitiva, distingirem dues situacions pel que fa a l'efecte de la toxina-ε sobre el cervell. Les dosis altes de toxina-ε provocarien danys greus a l'endoteli vascular que donarien lloc a edema vasogènic i a 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 a nivell cel·lular. 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. La via per la qual la toxina-ε

provoca aquesta mort neuronal no és clara, però els nostres experiments suggereixen una acció sobre les neurones de tipus indirecta, a través de la microglia (preferentment) i/o l'astroglia, tot i que no podem descartar una acció directa sobre la neurona. La figura D-2 resumeix totes aquestes possibilitats.



**Figura D-2. Possibles vies d'acció de la toxina-ε al cervell després de la seva unió a l'endoteli vascular. A l'esquerra la via descrita per altes dosis de toxina-ε. A la dreta, possibles vies d'acció per dosis baixes de toxina-ε. En blau la via que suggereixen els nostres experiments amb efecte indirecte sobre les neurones a través de la microglia i/o l'astroglia. En vermell, la via alternativa amb efecte directe sobre les neurones.**



## 5. Consideracions finals.

Després del nostre estudi podem dir que els efectes de la toxina-ε són molt variats i amb una distribució molt gran dins l'organisme. Així, tenim un edema generalitzat a gran part dels òrgans i teixits del cos, uns efectes citotòxics molt greus a ronyó i un component nerviós amb edema, contraccions i espasmes que finalment desencadenen la mort de l'animal. Com pot una mateixa molècula donar lloc a aquest gran ventall d'efectes tant diferents? La nostra resposta és que probablement no siguin tant diferents. Pensem que el mateix mecanisme d'acció pot ser el responsable de tots els efectes.

A cèl·lules MDCK la toxina-ε heptameritza per formar porus a la membrana, desequilibrant iònicament la cèl·lula i provocant-li la mort. Degut a l'origen renal d'aquesta línia cel·lular, tot fa pensar que el mateix mecanisme d'acció està implicat en la mort cel·lular als túbuls distals.

Nosaltres hem vist com la toxina-ε presenta citotoxicitat sobre alguns cultius de cèl·lules endotelials. Aquesta mort cel·lular, si es dona *in vivo*, podria ser la responsable de l'edema generalitzat.

Finalment, també hem observat que la toxina-ε és capaç d'arribar a la glia en animals injectats i.v. i que, a més, és capaç de matar cèl·lules d'aquest tipus en experiments *in vitro*. Aquesta mort, si es donés *in vivo*, també podria explicar els efectes nerviosos descrits.

En resum, la toxina-ε presenta citotoxicitat sobre alguns tipus cel·lulars molt concrets, la mort dels quals donaria lloc als diferents efectes descrits en la intoxicació per *C. perfringens*.

Aquestes cèl·lules diana, de localització i característiques tant diferents, han de tenir un factor comú a la seva membrana plasmàtica per a què la

toxina- $\epsilon$  sigui capaç d'unir-s'hi i desencadenar tot el procés de citotoxicitat.

La futura identificació d'aquest receptor és, sense dubte, el gran repte que ajudarà a caracteritzar el mecanisme d'acció de la toxina- $\epsilon$  de *Clostridium perfringens*.

## **CONCLUSIONS**



1.- Les formes recombinants de la toxina-ε obtingudes com a proteïnes de fusió amb la GFP són una bona eina per a l'estudi de la toxina-ε, ja que es comporten de manera equivalent a les formes natives aïllades de *Clostridium perfringens* tant pel que fa a la seva citotoxicitat com als seus efectes in vivo.

2.- La unió específica de la toxina-ε-GFP a la membrana plasmàtica de les cèl·lules MDCK depèn de la temperatura, de la presència de detergent i és sensible a la proteinasa K, indicant que el receptor té un component proteic.

3.- La toxina-ε injectada intravenosament a ratolí s'uneix específicament a les cèl·lules epitelials dels túbuls distals del ronyó i a les cèl·lules endotelials dels capil·lars cerebrals, i s'acumula inespecíficament als túbuls proximals.

4.- La toxina-ε injectada intravenosament a rata i ratolí provoca la mort de les cèl·lules epitelials dels túbuls distals del ronyó.

5.- La toxina-ε injectada intravenosament a ratolí és capaç de travessar l'endoteli vascular cerebral, arribar al parènquima cerebral i unir-se a cèl·lules microglials i astroglials, per les quals presenta citotoxicitat en experiments in vitro.

6.- L'activitat excitotòxica atribuïda a la toxina-ε no és deguda a un efecte directe sobre els terminals nerviosos, ja que per sí mateixa no provoca l'alliberació de glutamat.

7.- La toxina- $\epsilon$  provoca la mort de cèl·lules endotelials en cultiu d'origen boví i murí.

8.- En teixit nerviós la toxina- $\epsilon$  incubada s'uneix específicament a les fibres mielíniques, a més de l'endoteli capil·lar cerebral de diferents espècies animals, entre elles la humana.

## **BIBLIOGRAFIA**





**Beal DR, Titball RW, Lindsay CD.** The development of tolerance to Clostridium perfringens type D epsilon-toxin in MDCK and G-402 cells. *Human & Experimental Toxicology* **22**: 593-605, 2003

**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 AS, Habeeb AF.** Structural studies on epsilon-prototoxin of Clostridium perfringens type D. Localization of the site of tryptic scission necessary for activation to epsilon-toxin. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **78**: 889-896, 1977

**Binz T, Blasi J, Yamasaki S, et al.** Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 1617-1620, 1994

**Borrmann E, Gunther H, Kohler H.** Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on MDCK cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **31**: 85-92, 2001

**Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254, 1976

**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.** 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

**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 C, Hogue DE, Thonney ML.** 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

**Donelli G, Fiorentini C, Matarrese P, et al.** Evidence for cytoskeletal changes secondary to plasma membrane functional alterations in the in vitro cell response to Clostridium perfringens epsilon-toxin. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* **26**: 145-156, 2003

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

**Fernandez MM, Uzal FA.** The early effects of Clostridium perfringens type D epsilon toxin in ligated intestinal loops of goats and sheep. *Veterinary Research Communications* **27**: 231-241, 2003

**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

**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. [Review] [31 refs]. *Australian Veterinary Journal* **81**: 219-221, 2003

**Finnie JW.** Neurological disorders produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Anaerobe* **10**: 145-150, 2004

**Fivaz M, Abrami L, Tsitrin Y, et al.** Not as simple as just punching a hole. *Toxicon* **39**: 1637-1645, 2001

**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, 1973

**Ghabriel MN, Zhu C, Reilly PL, et al.** Toxin-induced vasogenic cerebral oedema in a rat model. *Acta Neurochirurgica - Supplement* **76**: 231-236, 2000

**Giulian D, Baker TJ.** Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *Journal of Neuroscience* **6**: 2163-2178, 1986

**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

**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

**Hatheway CL.** Bacterial Sources of Clostridial Neurotoxins. A Lance Simpson, ed. *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*. Academic Press, Inc. 1-19, 1989

**Havard HL, Hunter SE, Titball RW.** Comparison of the nucleotide sequence and development of a PCR test for the epsilon toxin gene of *Clostridium perfringens* type B and type D. *FEMS Microbiology Letters* **76**: 77-81, 1992

**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

**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

**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

**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

**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, 1991

**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, 1991

**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, Iida H, Sakurai J.** Effect of Clostridium perfringens epsilon toxin on rat isolated aorta. *Microbiology & Immunology* **37**: 447-450, 1993

**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

**Payne D, Oyston P.** The Clostridium perfringens  $\epsilon$ -toxin. A Rood JI, ed. *The Clostridia. Molecular Biology and Pathogenesis*. San Diego, Academic Press, 439-447, 1997

**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, Gouch A, et al.** Clostridium perfringens epsilon toxin rapidly decreases membrane barrier permeability of polarized MDCK cells. *Cellular Microbiology* **5**: 155-164, 2003



**Popoff MR.** Purification and characterization of *Clostridium sordellii* lethal toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin. *Infection & Immunity* **55**: 35-43, 1987

**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, 1987

**Sakurai J, Nagahama M.** The inactivation of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by treatment with tetranitromethane and N-acetylimidazole. *Toxicon* **25**: 279-284, 1987

**Sakurai J, Nagahama M, Takahashi T.** Contraction induced by *Clostridium perfringens* epsilon toxin in the isolated rat ileum. *FEMS Microbiology Letters* **49**: 269-272, 1989

**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

**Songer JG.** Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* **9**: 216-234, 1996

**Takahashi JL, Giuliani F, Power C, et al.** Interleukin-1beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Annals of Neurology* **53**: 588-595, 2003

**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

**Uzal FA, Plumb JJ, Blackall LL, et al.** 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, Wong JP, Kelly WR, et al.** Antibody response in goats vaccinated with liposome-adjuvanted *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. *Veterinary Research Communications* **23**: 143-150, 1999b

**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, 1999c

**Uzal FA, Kelly WR, Morris WE, et al.** Effects of intravenous injection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in calves. *Journal of Comparative Pathology* **126**: 71-75, 2002

**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

**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

La imatge de la portada és una microfotografia d'una secció d'escorça renal de ratolí incubada amb protoxina- $\epsilon$ -GFP, mostrant unió específica sobre túbuls distals.