



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA  
EJE TERMINAL EN MICROBIOLOGÍA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA  
MOLECULAR Y CELULAR

TESIS PROFESIONAL

**El papel de las hemolisinas como factores de  
virulencia. El caso de la hemolisina de  
*Gluconacetobacter diazotrophicus***

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

PRESENTA

Ailyn María Fernanda Ramírez González

DIRECTOR DE TESIS

D. C. Marcos Flores Encarnación

Puebla, Puebla. 18 de junio de 2022



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA  
EJE TERMINAL EN MICROBIOLOGÍA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA  
MOLECULAR Y CELULAR

TESIS PROFESIONAL

**El papel de las hemolisinas como factores de  
virulencia. El caso de la hemolisina de  
*Gluconacetobacter diazotrophicus***

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

PRESENTA

Ailyn María Fernanda Ramírez González

DIRECTOR DE TESIS

D. C. Marcos Flores Encarnación

Puebla, Puebla. 18 de junio de 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Alrededor de mis 6 o 7 años me gustaba imaginar que cuando fuera adulta podría lograr todo lo que me proponía, y este pensamiento fue reforzado durante toda mi vida por mi familia.

Agradezco con todo mi corazón el apoyo incondicional de mi padre Alejandro Ramírez que en cada actividad escolar no me dejaba caer y siempre sabía que decir cuando me encontraba triste o sola. Agradezco infinitamente a mi madre María del Carmen González la fuerza que me ha brindado con sus palabras o el amor demostrado en infinitas veces. A mi hermana Samantha Ramírez le tengo un especial agradecimiento por ayudarme a reconstruir y por aprender juntas cada día el significado de hermandad.

De igual forma le quiero agradecer a mis compañeros de eje, quienes me sentí en familia y supe que podía contar con ellos en cualquier momento. Gracias por esas pláticas, las salidas que tuvimos, e incluso los juegos de mesa que nos hacían las horas de espera más cortas.

También quiero darle un gran agradecimiento a Lalo, por tu apoyo, tu comprensión, y todo el cariño que me has brindado, además de la paciencia y la perspectiva que me prestas, esto me ha brindado los impulsos cuando me sentía agotada. Gracias también por los momentos de diversión y paz que hemos tenido para recargar y seguir adelante.

Quiero mencionar a mi abuela paterna María Félix Arenas Cuatlapantzi, en mis pensamientos te tengo presente cada día, en mi corazón te tengo como mi segunda madre, y en mi vida forjaste una mujer empática, alegre y resiliente como tú lo eras. Te mando un abrazo y un beso enorme en donde estés y espero puedas ver este gran logro que he cumplido.

Expreso un gran reconocimiento a mi director de tesis el D.C. Marcos Flores Encarnación que me ha ayudado en todo este proceso universitario. Siempre ha tenido el tiempo necesario para ayudarme en mis dudas y la paciencia para rectificar

mis errores, en verdad agradezco la oportunidad por aceptarme y pertenecer al gran equipo que tiene en su laboratorio.

*«Algunas veces incluso vivir, es un acto de coraje»*

*Senéca*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	10
<b>PATOGENICIDAD BACTERIANA</b> .....	11
<b>FACTOR DE VIRULENCIA</b> .....	11
<b>TOXINAS BACTERIANAS</b> .....	13
<b>ENDOTOXINAS</b> .....	14
<b>EXOTOXINAS</b> .....	16
EXOTOXINA: TOXINA TIPO I.....	17
EXOTOXINA: TOXINA TIPO II.....	17
EXOTOXINA: TOXINA TIPO III.....	17
<b>SISTEMAS DE SECRECIÓN</b> .....	17
<b>SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO I</b> .....	18
<b>SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO II</b> .....	18
<b>SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III</b> .....	19
<b>SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO IV</b> .....	20
<b>SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO V</b> .....	21
<b>SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO VI</b> .....	22
<b>SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO VII</b> .....	23
<b>TOXINA FORMADORA DE PORO</b> .....	27
<b><math>\alpha</math>-TFP</b> .....	28
<b>ClyA</b> .....	28
<b>HBL</b> .....	31
<b><math>\beta</math>-TFP</b> .....	32
<b><math>\alpha</math>-HEMOLISINA</b> .....	33
<b>PFO</b> .....	35
<b>SLO</b> .....	37
<b>RTX</b> .....	38
<b>ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA PRESENCIA DE UNA POSIBLE HEMOLISINA EN <i>G. DIAZOTROPHICUS</i></b> .....	42

EXPERIMENTOS DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA POR <i>G. DIAZOTROPHICUS</i> .....	48
CASOS REPORTADOS DE ENFERMEDAD POR BAA .....	50
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	53
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	53
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	54
<b>ANEXOS</b> .....	67

## ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>-TFP</b>	Alfa-Toxina formadora de poro
<b><math>\beta</math>-TFP</b>	Beta-Toxina formadora de poro
<b>AT</b>	Autotransportador
<b>BAA</b>	Bacterias ácido acéticas
<b>CD14</b>	Grupo de marcadores de monocitos de diferenciación 14
<b>CMI</b>	Complejo de membrana interna
<b>CNME</b>	Complejo del núcleo de la membrana externa
<b>CRAC</b>	Motivo de consenso y reconocimiento de colesterol
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleuquina 1 beta
<b>Kdo</b>	Ácido $\alpha$ -3-desoxi-D-mano-oct-2-ulopiranosónicobh.
<b>LBP</b>	Proteína de unión a LPS
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos complejos
<b>MD2</b>	Antígeno de linfocitos 96
<b>MEGA 11</b>	Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 11
<b>VME</b>	Vesículas de membrana externa
<b>PMN</b>	Leucocitos polimorfonucleares
<b>RTX</b>	Repeticiones en toxinas
<b>Sec</b>	Sistema general de secreción
<b>SMART</b>	Simple Modular Architecture Research Tool
<b>SS</b>	Sistemas de secreción
<b>SST1</b>	Sistema de secreción tipo I
<b>SST2</b>	Sistema de secreción tipo II
<b>SST3</b>	Sistema de secreción tipo III
<b>SST4</b>	Sistema de secreción tipo IV
<b>SST5</b>	Sistema de secreción tipo V
<b>SST6</b>	Sistema de secreción tipo VI
<b>SST7</b>	Sistema de secreción tipo VII
<b>Tat</b>	Translocación de gemelos de arginina
<b>TFP</b>	Toxina formadora de poro
<b>TLR4</b>	Receptor tipo Toll 4
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa

## RESUMEN

Las bacterias patógenas pueden producir toxinas con capacidad hemolítica conocidas como hemolisinas, estas son consideradas como factores de virulencia las cuales se requieren de manera individual o en conjunto con otros factores para una rápida adaptación dentro del huésped.

Debido a sus características las hemolisinas son catalogados como exotoxinas, y por su mecanismo de formar poros se clasifican como toxinas formadoras de poro, éstas se clasifican según las estructuras secundarias utilizadas para formar dominios de poros transmembrana: las  $\alpha$ -TFP forman poros  $\alpha$ -helicoidales, mientras que las  $\beta$ -TFP producen poros  $\beta$ -barril.

Las bacterias ácido acéticas (BAA) son consideradas de gran ayuda en la industria alimentaria como en el área médica por beneficios que se han desarrollado por la biotecnología. Sin embargo, se han presentado casos clínicos en personas inmunocomprometidas que se encuentran infectadas por BAA, así que la búsqueda de factores de virulencia en este tipo de bacterias es un nuevo fondo de investigación científica.

Por lo que indagar la posible presencia de una hemolisina en una BAA, en este caso en *Gluconacetobacter diazotrophicus* nos demuestra la capacidad de bacterias considerar a estas bacterias como posibles patógenos. Para llegar a esta conclusión se realizaron experimentos y búsqueda de bioinformática con el fin de dilucidar la detección de una hemolisina.

## INTRODUCCIÓN

Los patógenos bacterianos producen toxinas hemolíticas para lisis los eritrocitos y liberar hierro para su crecimiento, ya que casi todo el hierro se localiza intracelularmente, pero las hemolisinas bacterianas juegan un rol en la patogenicidad más allá de la lisis de eritrocitos, porque estas toxinas han adquirido más atributos que les confiere una mayor capacidad de adaptación a nuevos nichos y les permite ya sea solas o en conjunto con otros factores de virulencia causar un amplio espectro de enfermedades **(1)**.

El epitelio renal es dañado por la hemolisina HlyA de *Escherichia coli* junto con otros productos bacterianos, que generan una respuesta inflamatoria aguda recluta leucocitos polimorfonucleares (PMN) en el sitio. También se ha demostrado que la hemolisina induce oscilaciones de calcio en las células epiteliales renales, lo que da como resultado una mayor producción de IL-6 e IL-8. Esto favorece que juntos otros factores de virulencia de *E. coli* pueda ascender en el huésped desde la vejiga a través de los uréteres hasta los riñones, causando con gran frecuencia pielonefritis **(2)**.

Se ha observa que la  $\alpha$ -hemolisina producida por *Staphylococcus aureus* induce la liberación de citocinas y quimiocinas, por ejemplo, la producción excesiva de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  dando como resultado una lesión tisular durante la inflamación.  $\alpha$ -hemolisina junto con otras toxinas facilita la patogenia de la neumonía en infecciones por *S. aureus*/MRSA y un aumento en la incidencia de neumonía grave. Además, la  $\alpha$ -hemolisina induce a las plaquetas a agregarse, mostrando características morfológicas de activación, este proceso es uno de los puntos clave que se requieren para poder influir en los eventos trombóticos asociados con sepsis de *S. aureus*, ya que se ha visto que los pacientes con sepsis frecuentemente tienen vías de coagulación activadas desencadenadas por el factor tisular, niveles reducidos de factores anticoagulantes, fibrinólisis reducida, superficies endoteliales activadas y plaquetas activadas. **(3)**.

Durante una infección, el ambiente anaeróbico o microaeróbico del intestino promueve la producción y secreción de hemolisina BL y otras toxinas producidas por *Bacillus cereus* las cuales causan daño a las células epiteliales del intestino mediante la formación de poros que conducen a la lesión de las microvellosidades, la lisis osmótica de las células epiteliales intestinales y la diarrea subsiguiente (4).

*Clostridium perfringens* es la causa más común de mionecrosis clostridial, un papel importante de la perfringolisina O junto con otra toxina, es el efecto citotóxico para los fagocitos o el aumento de las moléculas de citoadherencia de PMN en las células endoteliales, pero también perfringolisina O ha demostrado que puede mediar la resistencia a la muerte mediada por macrófagos (5).

El siguiente trabajo da una vista general de los factores de virulencia conocidos en bacterias patógenas conocidos hasta el momento, y se centra en las exotoxinas en específico en las hemolisinas, además de dar a conocer el caso de una hemolisina en *G. diazotrophicus*

## **JUSTIFICACIÓN**

Las bacterias patógenas tienen como objetivo proliferar dentro del huésped tras un desenvolvimiento exitoso de la infección, sin embargo, pueden causar una multitud de infecciones diferentes, que varían en gravedad desde inaparentes hasta fulminante. Esto ocurre porque el curso de la enfermedad depende de la interacción de los factores de virulencia con la respuesta del huésped.

Así que los patógenos bacterianos representan una amenaza ante los humanos, por este motivo es de gran importancia comprender como un factor de virulencia en este caso hemolisinas que son mecanismos de ataque de las bacterias causando a su paso enfermedad. Con esto en mente se debe optar por entender que dentro de las BAA se han informado registros que son causantes de enfermedad en humanos, por lo cual es interesante investigar las posibles herramientas que tienen para poder infectar, de este modo se optó por averiguar la existencia de hemolisina en las BAA ya que no se han considerado como posibles patógenos.

## **PATOGENICIDAD BACTERIANA**

La patogenicidad bacteriana se define como la capacidad de una bacteria patógena para poder producir una enfermedad en un huésped susceptible. La manera de expresarlo es utilizando la virulencia, la cual se describe como el grado de daño provocado. De este modo, las moléculas que ayudan a la bacteria a lograr un proceso exitoso de infección en el huésped son los factores de virulencia son **(6)**.

## **FACTOR DE VIRULENCIA**

Para las bacterias patógenas la regulación y el momento de la expresión de los factores de virulencia son importantes porque se requieren durante el proceso de la infección ya que cambian continuamente el microambiente lo que permite una rápida adaptación del patógeno al nuevo entorno para que pueda invadir, sobrevivir, dañar e incluso evadir mecanismos de defensa dentro del anfitrión, además uno o más factores pueden participar juntos o por separado durante la infección **(7)**.

Los factores de virulencia se han dividido en varios grupos en este apartado se presenta la propuesta más reciente. El recurso en línea VFDB por sus siglas en inglés que significa **Virulence Factor Database** es una plataforma que ha recopilado la información de los factores de virulencia conocidos de 32 géneros bacterianos comunes. El esquema de clasificación general contiene 14 categorías principales y más de 100 subcategorías, en la Tabla 1 se presentan solo las subcategorías de mayor cantidad descritas. De esta manera se establece un sistema integral capaz de cubrir todos los factores de virulencia de bacterianas conocidas **(8)**.

Tabla 1. Categoría de factores de virulencia recientemente propuesta

<b>Categoría</b>	<b>Subcategoría</b>	<b>Función</b>
Adhesión	Adhesión fimbrial	Adherir a células del huésped
	Adhesión no fimbrial	

Invasión	No se han catalogado	Penetrar las células del huésped y así diseminarse
Sistemas de suministros de efectores	Sistema de secreción tipo I	Transportar proteínas efectoras del citosol bacteriano a la célula huésped para poder alterar el metabolismo celular
	Sistema de secreción tipo II	
	Sistema de secreción tipo III	
	Sistema de secreción tipo IV	
	Sistema de secreción tipo V	
	Sistema de secreción tipo VI	
	Sistema de secreción tipo VII	
Motilidad	Motilidad mediana por flagelo	Capacidad para moverse
	Motilidad intracelular	
Exotoxina	Toxina que actúa sobre la membrana	Proteína secretada extracelularmente la cual afecta a células que contengan receptores específicos
	Toxina activa intracelularmente	
Exoenzima	Hialuronidasa	Enzima secretada que funciona fuera, siendo crucial en procesos biológicos
	Quinasa	
	Coagulasa	
	Lipasa	
	Proteasa	
	Nucleasa	
Modulación inmune	Antifagocitosis	Sustancia que estimula o deprime el sistema inmunitario
	Evasión del complemento/Resistencia al suero	
	Inmunoglobulina	

	Variación de antígeno	
	Apoptosis	
	Vía de señalización inflamatoria	
Biopelícula	Formación de biopelículas	Capacidad de tener comunicación intercelular
	La detección de quórum	
Factor nutricional/metabólico	Captación de metales	Mejorar el desarrollo del crecimiento bacteriano
	Adaptación metabólica	
Supervivencia al estrés	No se han catalogado	Sobrevivir a condiciones desfavorables en diferentes ambientes
Modificación post-traducciona	No se han catalogado	Funciones vitales en diversos procesos celulares
Actividad antimicrobiana/Ventaja competitiva	No se han catalogado	Compuesto con capacidad para inhibir o eliminar una población bacteriana
Regulación	No se han catalogado	Controlar regulación transcripcional o postraducciona de uno o más genes
Otros	No se han catalogado	

Esta tabla fue tomada y modificada de: **Liu y colaboradores (8)**.

### **TOXINAS BACTERIANAS**

Gran variedad de patógenos bacterianos producen toxinas, estas moléculas son factores de virulencia que se dirigen a las células del huésped y desempeñan funciones clave en la interacción huésped-patógeno, teniendo control de las

actividades biológicas del huésped para facilitar la infección bacteriana, a menudo suficientes para determinar el resultado de la infección **(9)**.

Se ha mantenido la clasificación de las toxinas bacterianas por su localización y naturaleza química como endotoxinas y exotoxinas **(6)**.

## **ENDOTOXINAS**

Las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPS), los cuales forman una fracción inherente de la membrana celular externa de todas las bacterias gramnegativas y son responsables de la organización y estabilidad de la pared celular. No existe una sola molécula de lipopolisacárido que constituya toda la membrana de la bacteria, sino que cada cepa presenta un tipo de lipopolisacárido que determina, en muchos casos, la patogenicidad de la bacteria **(10)**.

Se componen los LPS de tres estructuras principales: el lípido A hidrofílico (lípido A), el oligosacárido central y el polisacárido hidrofílico (región O). La toxicidad está asociada con el componente lipídico (lípido A) y la inmunogenicidad está asociada con los componentes polisacáridos. Además, los antígenos de la pared celular (antígenos O) de las bacterias gramnegativas son componentes del LPS **(11)**. Por otro lado, el oligosacárido central contribuye a la viabilidad bacteriana y la estabilidad de la membrana externa, puede asegurar el carácter específico serológico y posee propiedades antigénicas **(12,13)**.

La expresión de LPS con antígeno O y sin él, se basa en la aparición de colonias bacterianas con cierta característica en una placa de Petri, la visualización de las colonias que presentan el antígeno O se denominan "suaves", mientras que las cepas mutantes con ausencia del antígeno O, se denominan "rugosas" como se observaban sus colonias **(13)**.

La porción del lípido A se ha demostrado que es la molécula responsable de numerosos efectos *in vivo* e *in vitro* de la endotoxina. El LPS estimula las respuestas inmunitarias y potencia las reacciones inmunitarias celulares **(11)**.

El oligosacárido central tiene dos regiones, las cuales son el núcleo interno y externo, el núcleo interno es poco variable y su composición normalmente es característica dentro de un género o familia, por ejemplo, el ácido  $\alpha$ -3-desoxi-D-mano-oct-2-ulopiranosónicobh (Kdo) es el único residuo de monosacárido siempre presente en el núcleo interno del lipopolisacárido bacteriano, y, por lo tanto, es un sello químico de LPS y un marcador de bacterias gramnegativas. Sin embargo, Kdo puede estar reemplazado en las bacterias, por ejemplo, en *Acinetobacter haemolyticus* o *Shewanella algae* **(13)**.

Existen dos formas de liberación de las endotoxinas, una ocurre durante el proceso de multiplicación bacteriana y la otra pasa cuando la bacteria muere este evento provoca que la pared bacteriana se lise liberando así la endotoxina, ya sea cuando la bacteria muere de forma natural o cuando se suministran antibióticos para atacar contra la bacteria **(6)**.

El LPS induce en gran medida una respuesta inflamatoria en las células que expresan el receptor tipo Toll 4 (TLR4). LPS se une a la proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP), esto logra con facilidad el compromiso con TLR4 y la formación del complejo con el grupo de diferenciación 14 (CD14) y el factor de diferenciación mieloides 2 (MD2), así da inicio a la activación celular **(14)**. TLR4 se expresa en muchos tipos de células, sin embargo, las células más reactivas son los monocitos y los macrófagos, que en respuesta a LPS se activan (macrófagos activados clásicamente M1) para convertirse en citocinas y producir una variedad de factores inflamatorios como la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), la interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) **(15)**.

Las endotoxinas tienen las propiedades de ser termoestables y tener baja toxicidad. Todas las endotoxinas producen los mismos síntomas independientemente de la especie bacteriana de que se trate. Entre los síntomas o signos más comunes destacan fiebre, escalofríos, debilidad, dolor en general y, en ocasiones, shock e incluso la muerte. También son capaces de activar las proteínas de coagulación sanguínea, formando pequeños coágulos que pueden obstruir los capilares y, en

consecuencia, provocar una disminución de la irrigación que conduce a la muerte de los tejidos. Incluso en mujeres embarazadas pueden causar abortos espontáneos **(6)**.

Los microorganismos productores de endotoxinas representativos son *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus spp.* y *Neisseria meningitidis* **(13)**.

## **EXOTOXINAS**

Las exotoxinas pueden ser polipéptidos individuales o complejos de proteínas heteroméricas producidas en bacterias gramnegativas y grampositivas, las cuales son liberadas al medio exterior durante el crecimiento o por lisis de la célula bacteriana, incluso son liberadas directamente a células diana para producir virulencia, además pueden actuar sobre diferentes partes de las células **(8, 16)**. Los genes de la mayoría de las exotoxinas son transportados por plásmidos bacterianos o fagos **(17-22)**.

La mayor parte de las toxinas bacterianas conocidas pertenecen a este tipo, así que, por la naturaleza enzimática, la mayor parte de ellas son muy dañinas incluso en bajas concentraciones; además son capaces de actuar más de una vez pudiendo desplazarse desde el foco de la infección, hacia otros tejidos o células donde expresan sus efectos tóxicos **(6)**.

Las exotoxinas son las que producen los signos y los síntomas específicos de la enfermedad, así que las exotoxinas son específicas de la enfermedad **(16)**. Un patógeno bacteriano específico puede producir una sola exotoxina o múltiples exotoxinas **(1)**.

Las exotoxinas bacterianas catalizan modificaciones químicas específicas de los componentes de la célula huésped. Estas modificaciones químicas pueden inhibir o estimular la acción normal de la molécula diana para producir una patología clínica. Las exotoxinas también varían con respecto al huésped porque algunas

toxinas pueden intoxicar células de numerosas especies, mientras que otras, están más restringidas en las especies que pueden intoxicarse **(23)**.

El daño a las células del huésped puede ser fisiológico, por ejemplo, la toxina del cólera promueve la excreción de electrolitos (y fluidos) de los enterocitos sin matar las células, o patológico, donde la toxina (por ejemplo, la toxina diftérica) inhibe la síntesis de proteínas e induce la muerte celular. Las exotoxinas varían en su estructura molecular, función biológica, mecanismo de secreción y propiedades inmunológicas. La clasificación de las exotoxinas es a menudo por su modo de acción sobre las células del huésped: toxinas de tipo I, toxinas de tipo II y toxinas de tipo III **(6)**.

#### **EXOTOXINA: TOXINA TIPO I**

Las toxinas de tipo I (que actúan sobre la membrana) se unen a los receptores de superficie y estimulan las señales transmembrana, como son las enterotoxinas y las toxinas superantigénicas **(6,24-26)**.

#### **EXOTOXINA: TOXINA TIPO II**

Las toxinas de tipo II (que dañan las membranas) afectan directamente a las membranas, formando poros o alterando las bicapas lipídicas. Siendo ejemplo las proteínas formadoras de poro **(6,27)**.

#### **EXOTOXINA: TOXINA TIPO III**

Las toxinas de tipo III (efectoras intracelulares) trasladan un componente enzimático activo a la célula y modifican una molécula diana intracelular. Como ejemplo son toxina Shiga, y toxina del cólera **(6,28)**.

Las bacterias secretan toxinas y otras proteínas utilizando sistemas de secreción **(6)**.

#### **SISTEMAS DE SECRECIÓN**

Los sistemas de secreción (SS) bacteriana son estructuras que permiten el transporte de diversas moléculas a través de la pared celular bacteriana **(6)**. Los

sistemas de secreción son esenciales para el crecimiento y supervivencia de bacterias y se utilizan en una variedad de procesos. Se pueden encontrar en gramnegativas y grampositivas. Además, se han identificado más de un sistema de secreción en una sola bacteria. De igual forma se ha observado que pueden secretar una amplia variedad de sustratos o muy pocas proteínas. Existen diferentes clases de SS bacteriana, y sus diseños pueden diferir en función de si sus sustratos proteicos cruzan una sola membrana de fosfolípidos, dos membranas o incluso tres membranas **(29)**.

### **SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO I**

El sistema de secreción tipo 1 (SST1) se han encontrado en un gran número de bacterias gramnegativas. Los sustratos que transportan son mediante un proceso de un solo paso a través de las membranas bacterianas interna y externa. Este sistema de secreción está formado por tres componentes estructurales esenciales: una proteína transportadora ABC en la membrana interna, una proteína de fusión de membrana que cruza la membrana interna y la conecta con el factor de membrana externa en la membrana externa. Las moléculas que secreta son variables, porque son enzimas digestivas, como proteasas y lipasas, así como adhesinas, proteínas de unión a hemo y RTX **(29)**.

### **SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO II**

El sistema de secreción tipo 2 (SST2) se conserva en la mayoría de las bacterias gramnegativas. Transporta proteínas plegadas desde el periplasma al entorno extracelular, primero son enviadas al periplasma a través del sistema general de secreción (Sec) o la vía de translocación de gemelos de arginina (Tat) que transfieren sustratos proteicos a través de la membrana interna. Cuenta con hasta 15 proteínas diferentes este sistema de secreción **(29)**.

Los componentes del SST2 se pueden dividir en subconjuntos: 1) Complejo de membrana externa compuesto por la proteína GspD, la cual forma un poro rotacionalmente simétrico denominado secretina, se inserta en el complejo con una

GspS llamada pilotina. 2) ATPasa de secreción, la energía es a través de la hidrólisis de ATP proporcionada por GspE. 3) Complejo de membrana interna es una combinación de la proteína GspA, GspB, GspC, GspF, GspL y GspM. 4) Pseudopilo, forma GspG un pseudopilo periplásmico cubierto por las pseudopilinas menores GspH, GspI, GspJ y GspK, componentes que inician la formación del pseudopilus. Antes del ensamblaje del pseudopilus, la prepilina peptidasa GspO las escinde en el extremo N y las metila **(30, 31)**.

Las moléculas que secreta por ejemplo son proteasas, lipasas, fosfatasas, ADNasa, ARNasa, citocromos tipo C, quitinasa, amilasa, toxina del cólera y citolisina **(29)**.

### **SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III**

El sistema de secreción tipo 3 (SST3) se encuentran en un gran número de gramnegativos. Se describe como "inyectosomas" y aparatos similares a "agujas y jeringas" debido a su estructura **(29)**.

El mecanismo de virulencia les permite inyectar proteínas efectoras bacterianas directamente en el citoplasma de la célula huésped, sin pasar por el medio extracelular **(32)**. Está compuesto por un núcleo de 9 proteínas que están altamente conservadas entre todos los sistemas conocidos, tienen entre 10 y 20 proteínas adicionales que desempeñan funciones esenciales **(29)**.

El SST3 se puede describir como una estructura proteica multicomponente que consta de seis constituyentes principales: 1) Componentes citoplasmáticos que consta de 5 proteínas, SctK, SctQ, SctL, SctN y SctO. Juegan un papel importan en el reclutamiento de complejos de chaperona-sustrato SctK, SctQ y SctL. 2) Base, está compuesta por las tres proteínas SctC, SctD y SctJ. 3) Aparato de exportación consta de cinco proteínas, SctR, SctS, SctT, SctU y SctV. 4) Filamento de la aguja está compuesto por copias de SctF, conectado al extremo distal del complejo SctRST por copias de la proteína de varilla interna SctI. SctF forma una horquilla helicoidal con un extremo N orientado hacia el exterior desordenado y débilmente conservado y un bucle conservado y un extremo C orientado hacia el interior. 5)

Aguja, la mayoría de los inyectosomas termina con un complejo de punta de aguja pentamérico formado por la proteína translocadora SctA. 6) Complejo translocón sirve para la penetrar la membrana de la célula huésped, se compone de múltiples copias de dos proteínas translocadoras hidrofóbicas diferentes, SctB y SctE **(33)**.

La secreción a través de SST3 comienza con la exportación de sustratos tempranos. En la mayoría de los SST3, solo se secretan tres sustratos tempranos diferentes: la proteína de varilla interna SctI, la proteína de filamento de aguja SctF y la proteína de control de longitud de aguja SctP **(34,35)**. Por otro lado, la secreción completa a través del inyectosoma solo se induce con la detección de la célula huésped por la punta de la *aguja in vivo*, pero puede imitarse mediante señales químicas **(33)**. La señal de detección se transmite al lado citoplasmático del inyectosoma para cambiar a la secreción de sustratos tardíos, en un componente del SST3 crítico para la inducción de la secreción tardía de sustrato es la denominada proteína gatekeeper, SctW **(32)**.

Las proteínas efectoras incluyen la interferencia con el citoesqueleto de la célula huésped para promover la unión y la invasión, la interferencia con los procesos de tráfico celular, la citotoxicidad y la disfunción de la barrera, y la subversión del sistema inmunitario **(36)**.

#### **SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO IV**

El sistema de secreción tipo 4 (SST4) se componen principalmente de dos subfamilias: 1) sistemas de conjugación que median la transferencia de ADN interbacteriano y 2) translocadores efectores que entregan macromoléculas efectoras, ambos requieren un contacto directo entre células **(29)**.

Existen otros SST4 los cuales exportan ADN o proteínas al medio, o importan ADN exógeno **(37)**. Los T4SS secretan sustratos en una amplia gama de células diana, incluidas otras bacterias (de la misma especie o de especies diferentes) y células eucariotas. Incluso pueden atravesar una membrana celular huésped adicional, lo

que permite la transferencia directa de sustratos al citoplasma de la célula receptora **(29)**.

Los sistemas de secreción están constituidos por 6 o 12 subunidades "centrales" conservadas que elaboran respectivamente sistemas "minimizados" en bacterias grampositivas o gramnegativas. El modelo prototipo es el sistema VirB/D de *Agrobacterium tumeficans*, el cual está formado por 12 proteínas, denominadas VirB1-VirB11 y VirD4. (2021). VirB4, VirB11 y VirD4 son tres ATPasas las cuales comprenden el centro de energía citoplasmático, situado en la base del canal de translocación. VirD4 además, sirve como receptor al que se unen tanto el ADN como los sustratos proteicos antes de ingresar al canal de translocación **(29, 37)**. El canal consta de dos grandes subconjuntos: 1) complejo de la membrana interna (CMI) consta mínimamente de VirB3, VirB6, VirB8 y la región N-terminal de VirB10. La VirB4 ATPasa, que se asocia de manera estable con el canal, también se considera parte del IMC. 2) Complejo del núcleo de la membrana externa (CNME), el CMI se conecta con este complejo por medio de un tallo o cilindro, el CNME consiste mínimamente en la lipoproteína VirB7, VirB9 y un dominio C-terminal de VirB10 **(37)**. Generalmente, los SST4 también incluyen un pilus extracelular, compuesto por una subunidad mayor VirB2 y una menor VirB5 **(29)**.

Los SST4 "expandidos" se construyen a partir de subunidades "básicas" y muchas otras que son específicas del sistema, lo que presumiblemente amplía las capacidades funcionales **(37)**.

#### **SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO V**

El sistema de secreción tipo 5 (SST5) son los más pequeños de todos los sistemas de secreción y solo atraviesan la membrana externa de gramnegativa. Existe una clasificación en subgrupos denominados de tipo Va a e, además en últimos estudios se ha identificado el subgrupo Vf. Los principios generales de su organización y biogénesis de los subgrupos no reflejar la(s) función(es) de los efectores **(38)**.

La fuente de energía de los SST5 no existe, ya que no hay energía química ni gradientes estables de protones u otros iones a través de la membrana externa. Debido a esto se llaman autotransportador que sugiere un sistema de secreción completamente autosuficiente **(39)**.

La constitución general del SST5 es de una sola cadena polipeptídica con un dominio translocador de barril  $\beta$  en la membrana y una región efectora o dominio pasajero extracelular **(38)**.

La proteína secretada tiene su propio dominio de barril  $\beta$  la cual se inserta en la membrana externa, creando así un canal por el cual se transporta la proteína. Para que ocurra esto primero deben ser translocadas a través de la membrana interna y hacia el periplasma en un estado desplegado por el aparato Sec. Estas proteínas del SST5 llevan una secuencia de señal Sec N-terminal que se escinde a medida que pasan al periplasma **(29)**.

Los sustratos funcionan como adhesinas, proteasas, lipasas, esterases, cito/hemolisinas, también inhibición del crecimiento dependiente del contacto (CDI) mediada por ADP ribosil ciclasas, adenosina desaminasas o endonucleasas de corte **(38)**.

### **SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO VI**

El sistema de secreción tipo 6 (SST6) es una nanomáquina de proteínas que está muy extendida en bacterias gramnegativas y se utiliza para trasladar proteínas efectoras directamente a las células específicas. La función principal del SST6 es como un dispositivo para la competencia interbacteriana, pero también desempeña un papel importante secretando proteínas efectoras que destruyen o manipulan las células del huésped **(40)**.

Los aparatos de translocación de efectores se asemejan a un dispositivo invertido de punción de bacteriófagos Este sistema de secreción permite que las

bacterias inyecten toxinas directamente en las membranas de las células del huésped o en el citoplasma **(41)**.

Está constituido por lo general de 13 proteínas denominadas componentes centrales son TssA-M más PAAR. Se ensamblan en tres subcomplejos: un túbulo similar a una cola de fago, una estructura similar a una placa base de fago y un complejo de membrana que abarca la envoltura celular. Los componentes auxiliares se pueden asociar con estas proteínas conservadas para los genes asociados a este sistema de secreción **(41)**. Existen seis subfamilias las cuales se pueden dividir en 1, 2, 3, 4a, 4b, 5 **(40)**.

La maquinaria del SST6 está ensamblada de manera ordenada. Comienza con la formación del complejo de membrana, lo que permite el posicionamiento de la placa base. La placa base sirve como plataforma para el alargamiento contráctil de la cola. La contracción de la vaina impulsa los efectores a través de las membranas. Finalmente, la ATPasa, TssH (ClpV), recicla la vaina y probablemente otros componentes de T6SS como TssA, mientras que el complejo de anclaje de membrana se puede usar para disparar una nueva salva **(41)**.

Los efectores transportados por T6SS se dividen en dos grupos: efectores "especializados" y efectores de "carga". Tienen actividad los efectores de toxinas, proteínas, hidrolasas, amidasas **(40, 41)**.

## **SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO VII**

El sistema de secreción tipo 7 (SST7) se encuentran en grampositivos en el filo de *Actinobacteria* y *Firmicutes*, han sido clasificados como SST7 y SST7b, respectivamente **(42)**. Los SST7 desempeñan una variedad de funciones en la fisiología y la patogenicidad bacteriana. La primera identificación de este sistema fue en *Mycobacterium tuberculosis*. Existe la identificación de cinco SST7 en micobacterias, llamados ESX-1 a ESX-5 y no todas las micobacterias albergan los cinco sistemas **(29)**.

El SST7 por lo general tiene los siguientes componentes, cinco proteínas de membrana centrales, llamados EccB, EccC, EccD, EccE y MycP ensamblan la máquina de secreción en la membrana plasmática de la envoltura celular micobacteriana. De esas proteínas todas, excepto EccD, pueden interactuar con otros componentes accesorios como con la proteína citosólica, EccA, que puede proporcionar la fuente de energía para el transporte de sustrato (43). MycP, es una micosina o proteasa similar a la subtilisina, cuya función es translocar proteínas, falta aún descifrarla por completo, pero se cree que juega un papel importante en la regulación de la secreción (44). Existen proteínas adicionales que son importantes para el funcionamiento de los sistemas específicos (29).

Los sustratos de micobacterias SST7 se han clasificado tradicionalmente en tres familias de proteínas diferentes: Esp (proteínas asociadas a la secreción de ESX-1), Esx y PE-PPE (Pro-Glu (PE) y Pro-Pro-Glu (PPE)). La definición de la contribución específica de los diferentes efectores a las funciones biológicas se ve obstaculizada debido a la naturaleza codependiente de la secreción del sustrato SST7 (42). No obstante, se sabe los SST7 sirven para el escape fagosomal, la modulación inmunitaria, la transferencia horizontal de genes, la absorción de nutrientes y metabolitos y la fisiología celular (45, 46).

Se presentaron los sistemas de secreción más representativos, no obstante, el año de 2019 se han descrito el sistema de secreción tipo IX. Durante los siguientes dos años se han hecho estudios para evidenciar y proponer el sistema de secreción tipo X y el sistema de secreción tipo XI (47,48).

Para recapitular los SS se concentran los puntos más importantes en la Tabla 2.

Tabla 2. Sistemas de secreción

Sistema de secreción	Componentes	Bacterias	Efectores

SST1	Proteína ABC Proteína de fusión de membrana Factor de membrana externa	Gram negativas	Proteasas, lipasas, adhesinas, proteínas de unión a hemo, y RTX
SST2	Complejo de membrana externa ATPasa Complejo de membrana interna Pseudopilo Pseudopilinas Prepilina	Gram negativas	Proteasas, lipasas y fosfatasas, así como varias proteínas que procesan carbohidratos
SST3	Componentes citoplasmáticos Base Aparato de exportación. Filamento de la aguja Varilla interna Aguja formada	Gram negativas	Proteínas
SST4	Complejo de membrana interna Complejo del núcleo de la membrana externa ATPasas Pilus extracelular	Gram positivas  Gram negativas	Proteínas, DNA
SST5	Una sola cadena polipeptídica con un dominio translocador de barril $\beta$ en la membrana	Gram negativas	Adhesinas, proteasas, lipasas, esterasas, cito/hemolisinas

	Región efectora o dominio pasajero extracelular		
SST6	Túbulo similar a una cola de fago Estructura similar a una placa base de fago Complejo de membrana que abarca la envoltura celular	Gram negativas	Toxinas, proteínas, hidrolasas, amidasas
SST7	Proteínas que ensamblan la máquina de secreción en la membrana plasmática de la envoltura celular micobacteriana. EccB, EccC, EccD, EccE y MycP	Gram negativas Mycobacterias	La contribución específica de los diferentes efectores a las funciones biológicas se ve obstaculizada debido a la naturaleza codependiente de la secreción del sustrato.

## HEMOLISINAS

Las hemolisinas son proteínas pequeñas que son excretadas por bacterias y tiene la capacidad de producir lisis en los eritrocitos, mediante la producción de poros en la membrana **(49)**.

En las bacterianas se han caracterizado bien las hemolisinas, debido al descubrimiento de su papel en la patogénesis por lo que se conocen sus detalles estructurales, mecanismos de hemólisis, diferencias de ligandos en las células diana y potencial diagnóstico **(50-52)**.

Debido a sus características las hemolisinas son catalogados como exotoxinas, y por su mecanismo de formar poros se clasifican como toxinas formadoras de poro **(53)**.

### **TOXINA FORMADORA DE PORO**

Las **Toxinas Formadoras de Poro TFP** se oligomerizan al unirse a la membrana del huésped y se ensamblan en poros estables que permeabilizan las células a iones, metabolitos y proteínas, lo que desencadena problemas de homeostasis en la célula huésped y una variedad de respuestas coordinadas de la célula huésped **(53)**.

Las TFP son factores de virulencia producidos por muchas bacterias patógenas **(27)**. Es común encontrar en las bacterias los TFP y se estima que alrededor del 25 al 30 % de las proteínas bacterianas citotóxicas son TFP, lo que las convierte en la categoría más grande de factores de virulencia **(54)**.

La generación de poros en las TFP bacterianas puede ser de dos tamaños, los pequeños abarcan entre 0,5 a 5 nm y los grandes cuya dimensión es a partir de  $\geq 30$  nm **(55)**. Una característica común de las TFP es su capacidad para pasar de un estado monomérico soluble a complejos oligoméricos transmembrana **(56)**.

Las TFP funcionan para perforar las membranas de las células huésped, predominantemente la membrana plasmática pero también las membranas de los orgánulos intracelulares **(57,58)**.

En las bacterias patógenas que tengan TFP y exista una pérdida de ellos generalmente hace que las bacterias sean menos virulentas o completamente avirulentas. En contraste, la expresión transgénica de una TFP puede convertir una bacteria inofensiva en un patógeno **(59)**.

Por lo regular las TFP se secretan como moléculas solubles en agua. El reconocimiento y la unión a un receptor específico hacen que se asocien con la membrana diana, formen multímeros y experimenten un cambio conformacional, lo que lleva a la formación de un poro acuoso en la membrana **(56)**.

Durante la infección bacteriana, a través de la ruptura de las barreras epiteliales y las interacciones con el sistema inmunitario, las TFP promueven el crecimiento y la diseminación de patógenos, aunque es difícil establecer su contribución precisa a estos procesos **(27)**. Las TFP alteran la permeabilidad de la membrana plasmática de sus células diana, lo que puede conducir a la muerte celular, pero también puede conducir a una manipulación más sutil de las funciones celulares **(56)**.

Las TFP se clasifican en dos grupos,  $\alpha$ -TFP y  $\beta$ -TFP, según las estructuras secundarias utilizadas para formar dominios de poros transmembrana: las  $\alpha$ -TFP forman poros  $\alpha$ -helicoidales, mientras que las  $\beta$ -TFP producen poros  $\beta$ -barril **(27)**.

### **$\alpha$ -TFP**

La estructura de las  $\alpha$ -TFP contienen hélices  $\alpha$  hidrófobas, cuya inserción en la membrana se hace en conjunto con el mecanismo de oligomerización secuencial, lo que puede conducir a la formación de un poro parcialmente formado, pero activo, o la formación de poros completos **(27)**.

Entre las subfamilias de  $\alpha$ -TFP las más estudiadas en bacterias son, la subfamilia de citolicina A, donde el miembro más estudiado es la citolisina A (ClyA) producida por ciertas cepas de *E. coli*, *Salmonella enterica* y *Shigella flexneri*, por otro lado, una  $\alpha$ -TFP de la subfamilia de citolicina A de interesante estudio es la hemolisina BL de *Bacillus cereus* **(56)**.

### **ClyA**

ClyA es una proteína formadora de poros también conocida HlyE o SheA **(60-62)**. ClyA es el prototipo de la familia de citolisinas, es una proteína de 34 kDa y su gen se identificó primero dentro del genoma de *E. coli* K-12 **(61)**.

Los homólogos de ClyA se encuentran en las bacterias patógenas *Salmonella* y *Shigella* **(63, 64)**. ClyA formar poro en los eritrocitos comprometiendo la integridad de estos lo que da como resultado una alta actividad hemolítica **(64)**. Las cepas de *Shigella* a menudo albergan copias no funcionales del gen *clyA* que han sido inactivadas por la integración de elementos de la secuencia de inserción o por una

mutación de cambio de marco, similar a las formas inactivadas de *clyA* observado en *E. coli* **(63)**. En cuanto a *Salmonella* solo 2 especies albergan una copia intacta de *clyA* **(64)**. Con esta información se comprobó que el gen *clyA* y sus homólogos se conservan en algunas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*.

ClyA carece de una secuencia de señal canónica y no sufre procesamiento N-terminal durante la secreción **(61)**. Además, se han detectado cantidades sustanciales de proteínas periplásmicas en sobrenadantes de cultivo de células sobreproductoras de ClyA lo que implica que la secreción de ClyA va acompañada de fugas de contenido periplásmico **(66)**. Estos hallazgos indicaron que ClyA no es secretada por un SS, por esto aún se plantea cómo llega ClyA al espacio extracelular **(67)**.

Hasta el momento la forma que se conoce de como ClyA llegue al espacio extracelular es por medio de vesículas de membrana externa (VME) *E. coli* **(68)**. Las VME son vesículas esféricas que liberan naturalmente grampositivas, pero más a menudo gramnegativas **(69)**. La proteína ClyA se transloca al espacio periplásmico en su forma monomérica (inactiva) y luego se oligomeriza para formar conjuntos de poros activos dentro de las VME **(70)**.

ClyA es una de las pocas  $\alpha$ -TFP para las que se dispone de información estructural de alta resolución tanto para el monómero soluble como para el complejo de poro anular **(71-76)**. El monómero ClyA consta de dos dominios: un dominio de cola compuesto por un haz de cinco hélices  $\alpha$  y un dominio de cabeza con una pequeña horquilla  $\beta$  flanqueada por dos hélices  $\alpha$  cortas. Una hélice  $\alpha$  larga ( $\alpha$ A1) es crucial para la formación y función del canal transmembrana **(74)**. Una vez que ClyA alcanza la membrana diana, el monómero primero sufre un cambio conformacional a un protómero y luego se ensambla predominantemente en un octamérico **(72)**. Se presenta en la Figura 1 un modelo en 3D para mostrar la estructura cristalina de la forma soluble en agua de la proteína ClyA de *E. coli*.

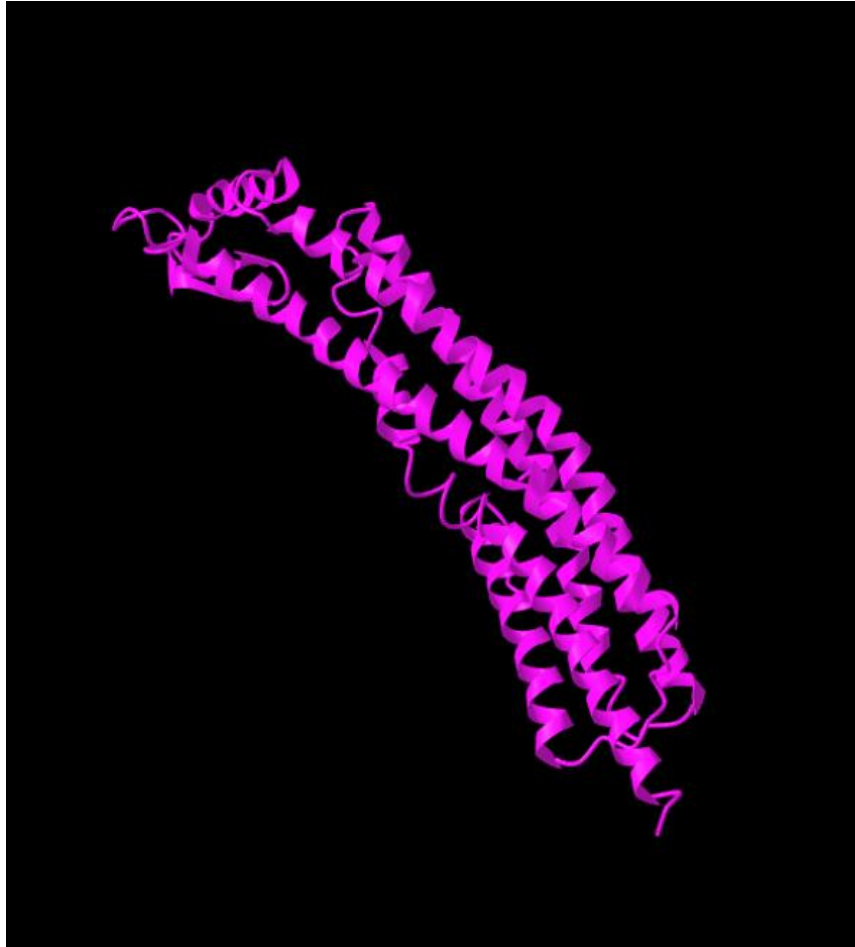


Figura 1. Estructura en 3D de la ClyA.

Esta figura fue tomado y modificada de PDB código: 10.2210/pdb1QOY/pdb

No requiere una modificación postraducciona para ser activa ClyA, sin embargo, la actividad de ClyA está estrictamente controlada a nivel transcripcional bajo ciertas condiciones y por sistemas de regulación que involucran a varios reguladores, y de igual forma está influenciada por cambios estructurales o señales ambientales **(70)**.

El cambio estructural de la forma monomérica a la oligomérica es crucial para la actividad de ClyA y está implicada en la alteración del estado redox **(68)**. Sin embargo, se ha demostrado que la actividad hemolítica es independiente de su estado redox **(76)**. La proteína ClyA contiene un motivo de consenso de

aminoácidos de reconocimiento/interacción del colesterol (CRAC), cuando ClyA está en presencia de colesterol este estimula la formación de poros al estabilizar de manera selectiva una estructura intermedia de un protómero que es clave en la ruta de ensamblaje para la inserción en la membrana. La región ClyA donde está el motivo CRAC, comprende tres residuos que se conserva en homólogos de ClyA de diversas especies bacterianas **(76)**.

Para que haga su función ClyA primero se ensambla un preporo completo en la membrana objetivo (o, en la vía no clásica, se forma un preporo soluble dentro de las VME); luego, la membrana se distorsiona y se forma un poro funcional mediante la inserción de hélices  $\alpha$  en la bicapa lipídica, lo que da como resultado una lisis celular similar a la hemólisis **(69,72,73,77)**.

A altas concentraciones, ClyA induce la citólisis de células diana nucleadas, lo que es útil para lisar células para permitir que las células bacterianas penetren en los tejidos intestinal en la fase de infección. Sin embargo, en concentraciones bajas (no líticas), ClyA puede afectar los procesos de señalización intracelular que regulan las respuestas fisiológicas **(71)**. Las bajas concentraciones de ClyA liberadas por las VME afectan la expresión de citoquinas proinflamatorias **(78)**.

El mecanismo detallado por el cual ClyA contribuye a la virulencia bacteriana *in vivo* e *in vitro* debe abordarse en estudios adicionales para dilucidar el papel fisiológico que desempeña esta toxina en el proceso de infección bacteriana **(71)**.

## **HBL**

La hemolisina BL (Hbl) es una enterotoxina diarreica producida por *B. cereus*, es la primera toxina bacteriana de tres componentes conocida. Los componentes se designan B, L1 y L2 y sus tamaños respectivos son 37,8, 38,5 y 43,2 kDa **(78)**.

La actividad hemolítica ocurre cuando están presentes las tres subunidades. El orden de unión secuencial de la Hlb es primero el componente B seguido por el componente lítico L1 y L2 al final **(80)**. Se sugiere que la oligomerización del componente B es en hepta- o incluso octámeros pero el modo de acción completo

de la formación del complejo aún tiene que dilucidarse más **(81)**. Un exceso del Componente B de unión condujo a una formación acelerada de poros, mientras que un exceso de los componentes líticos, en particular L1, retrasó esta respuesta **(82)**. Estructuralmente, la Hbl-B tiene un parecido sorprendente con la HlyE/ClyA/SheA, una enterotoxina hemolítica de un solo componente de las bacterias gramnegativas *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Shigella flexneri* **(81)**. Debido a la similitud estructural, es probable que las proteínas de unión de las toxinas Hbl funcionen de manera similar. Incluso hay un modelo propuesto de la oligomerización del componente B solo para formar un poro, sin embargo, se necesitan estudios cristalográficos sobre el complejo HBL para saber el papel de L1 y L2 en la formación de poros **(80)**.

Contribuyen a la intoxicación alimentaria diarreica y a las infecciones necrotizantes como la endoftalmitis **(83)**. Por separado, los componentes de HBL no son tóxicos, pero cuando se combinan exhiben una variedad de actividades tóxicas que incluyen hemólisis, citotoxicidad, permeabilidad vascular, dermonecrosis, enterotoxicidad y toxicidad ocular **(79,83,84)**.

### **$\beta$ -TFP**

Las  $\beta$ -TFP está compuesta por barriles  $\beta$ , la oligomerización siempre precede a la inserción de la membrana. La oligomerización ocurre en la superficie de la membrana, lo que produce una estructura intermedia conocida como preporo, que eventualmente sufre reordenamientos conformacionales que conducen a la inserción concertada a la membrana **(85)**.

Los  $\beta$ -TFP comparten un mecanismo básico de actividad: se secretan como monómeros solubles los cuales su difusión es extrabacteriana y reconocen receptores específicos en la superficie de las células diana **(53)**. La agrupación de monómeros de  $\beta$ -TFP en la superficie celular promueve su oligomerización y cambio conformacional de una o dos hojas  $\beta$  anfipáticas de cada monómero que se ensamblan y forman un barril  $\beta$ , también llamado preporo. La inserción del preporo

en la bicapa lipídica da como resultado la formación de poros y la posterior alteración de la permeabilidad de la membrana. Dentro de las  $\beta$ -TFP se encuentran 2 familias bacterianas, una es la familia de las hemolisinas donde algunos miembros relevantes son  $\alpha$ -hemolisina y  $\gamma$ -hemolisina, y la otra es la familia de las citolisinas dependientes del colesterol (CDC) donde algunos miembros destacados son perfringolisina O y estreptolisina O **(56)**.

### **$\alpha$ -HEMOLISINA**

La toxina  $\alpha$ -hemolisina es producida por *S. aureus*, es una proteína formadora de poros también conocida  $\alpha$ -toxina o Hla. Se considera como el prototipo de  $\beta$ -TFP de poro pequeño, es una proteína que pesa aproximadamente 33 kDa **(86)**.

El gen que codifica la toxina  $\alpha$  se descubrió utilizando una estrategia basada en fagos recombinantes que transfirió la capacidad de lisar glóbulos rojos a *E. coli* **(87)**. Al poco tiempo se codificó de manera completa del ADN de *S. aureus* Wood 46 y la secuencia de la proteína que produce la  $\alpha$ -hemolisina **(88)**.

Los monómeros de la toxina  $\alpha$  se agregaban en una estructura oligomérica en la superficie de la célula huésped. Se ensambla en un poro a través de la oligomerización de siete polipéptidos monoméricos **(86)**. La toxina abarca tres amplios dominios: 1) Dominio cap en la cara extracelular de la toxina, expuesta al entorno acuoso, que define la entrada del poro. 2) Dominio del borde que se yuxtapone a la hoja exterior de la membrana plasmática del huésped. 3) Dominio del tallo que forma el poro de barril  $\beta$  que perfora la membrana **(89)**.

Se ha considerado que la cabeza de fosfolina agrupados sirven como receptor de alta afinidad para la toxina  $\alpha$  **(90)**. La secreción de la  $\alpha$ -hemolisina se ha observado tras administrar a células huésped por medio de vesículas de membrana, requieren de colesterol en la membrana de la célula diana para facilitar la fusión de MV y toxina  $\alpha$ . acción **(91)**.

Se ha observado que la  $\alpha$ -hemolisina afecta eritrocitos de conejo y en menor medida a los de humano **(92)**. Estudios indican que las principales manifestaciones de la

toxina  $\alpha$ -hemolisina son enfermedad letal, hemólisis y dermonecrosis pero el papel en la patogenia es inclusive más complejo ya que la toxina tiene la capacidad de causar lesiones y provocar respuestas celulares en una amplia gama de tipos de células **(93)**.

### **$\gamma$ -HEMOLISINA**

La  $\gamma$ -hemolisina es una citotoxina de dos componentes producida por *S. aureus*, está constituido por 3 proteínas HlgA y HlgC de 32 kDa y HlgB cde 36 kDa, que pueden formar dos toxinas activas (AB y CB) combinando uno de los componentes de clase S, HlgA o HlgC, con el componente de clase F HlgB **(94)**.

La forma de complejos de poros compuestos por dos polipéptidos separados conocidos como subunidades de clase S (lentas) o clase F (rápidas) **(95)**. El mecanismo de la formación de poros inicia con la subunidad de clase S al ser responsable de la orientación celular, luego es seguida por el reclutamiento de la subunidad de clase F, y se alternan **(96,97)**. Así se unen en forma de un heterodímero octámero **(98)**. Cada heterodímero se ensambla en un oligómero en la célula objetivo para formar una partícula en forma de anillo llamada preporo, en la que el poro de barril  $\beta$  aún no se ha formado **(98,99)**. Después de formar un preporo estable, se forma el poro compuesto de 16 hebras  $\beta$  antiparalela **(96)**.

Hasta el momento se conoce la capacidad de la  $\gamma$ -hemolisina de lisar eritrocitos y de neutrófilos humanos. Sin embargo, todavía hay por describir con exactitud los objetivos celulares proteicos, se considera que puedan unirse a quimiocinas **(100)**.

Además, se cree que pueda existir una superposición entre la  $\gamma$ -hemolisina y los receptores de leucocidina Pantón-Valentine (PVL) según los estudios de unión y homología de toxinas **(101)**.

La  $\gamma$ -hemolisina de *S. aureus* es muy constante en aislados humanos. Sin embargo, la fisiopatología es poco conocida, por lo que estudios reflejan le necesita de evaluar el papel de la  $\gamma$ -hemolisina en la virulencia estafilocócica en humanos **(102)**.

## PFO

La perfringolisina O ó toxina teta es el prototipo de la familia de los CDC que es uno de los tres grupos de las  $\beta$ -TFP clostridiales. La PFO es producido por casi pero no todas las cepas de *C. perfringens* **(103)**. La PFO es una proteína de 53 kDa **(104)**.

La PFO consta de cuatro dominios distintos: 1) Dominio 1 consiste en la parte superior de la molécula alargada, se compone de una hoja  $\beta$  antiparalela de siete hebras y cuatro hélices  $\alpha$  único dominio que no sufre grandes reordenamientos estructurales durante la formación de poros. 2) Dominio 2 consta de cuatro hebras  $\beta$  mixtas, adopta de manera principal una estructura secundaria de cadena  $\beta$  que colapsa verticalmente durante la formación de poros para permitir la inserción de las horquillas  $\beta$ , las cuales forman el barril  $\beta$  transmembrana. 3) Dominio 3 contiene la hoja  $\beta$  involucrada en la oligomerización de la toxina con seis hélices  $\alpha$  cortas que se despliegan para formar dos horquillas  $\beta$  anfipáticas extendidas para formar el barril  $\beta$ . 4) Dominio 4 es una hoja  $\beta$  antiparalela de cuatro cadenas y una hoja  $\beta$  de cuatro cadenas con una topología mixta orientadas en una estructura de sándwich  $\beta$  conectada por cuatro bucles conservados. Este dominio es responsable del reconocimiento del colesterol y de la unión inicial de la toxina a la membrana **(105, 106)**. Se presenta en la Figura 2 un modelo en 3D para mostrar la estructura cristalina de la proteína PFO de *C. perfringens* con la descripción de sus dominios.

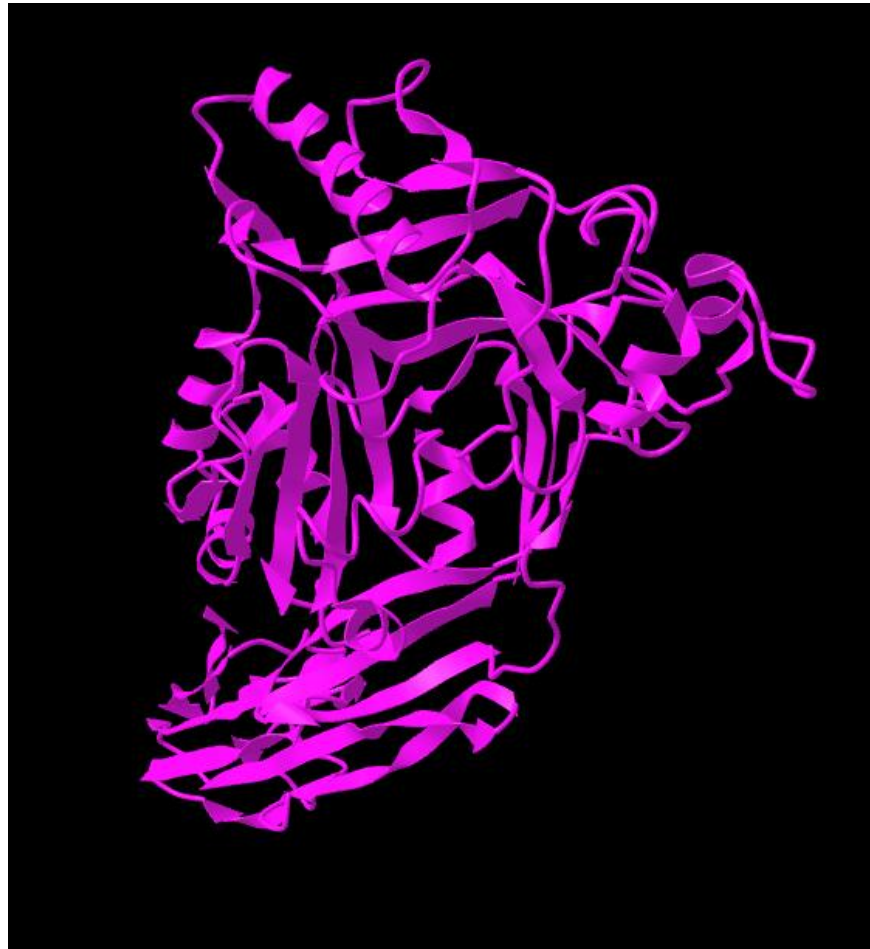


Figura 2. Estructura en 3D de PFO.

Esta figura fue tomado y modificada de PDB código: 10.2210/pdb1PFO/pdb

La propuesta que se tiene del modelo de la formación de poros de PFO incluye la unión de monómeros de PFO solubles en agua al colesterol de la bicapa lipídica **(107)**. El mecanismo de la activación del PFO depende de la unión al colesterol controla por las interacciones de los monómeros y la formación de poros cuando la toxina está en contacto cerrado con la membrana celular y evita la formación de asociaciones de toxinas prematuras y no productivas **(105)**. Además, hay estudios donde se ha demostrado que la capacidad de unión de PFO depende de la cantidad, accesibilidad y por el entorno lipídico del colesterol **(108)**.

Las células diana que tiene PFO en humanos son eritrocitos, células endoteliales, macrófagos **(109)**. Se ha registrado que la PFO tiene un papel en la mionecrosis clostridial, y de igual forma tiene un rol importante en la sepsis en especial en la hemólisis intravascular masiva **(110, 111)**.

## **SLO**

La estreptolisina O es producido por muchas cepas de estreptococos  $\beta$ -hemolíticos de los grupos A, C y G **(112)**. La SLO tiene 571 residuos de largo, pero se somete a la escisión proteolítica por las proteasas estreptocócicas posteriores a la secreción, eliminando una región N-terminal de aproximadamente 70 residuos, y la secuencia de esta región N-terminal no se alinea con ningún otro CDC u otras proteínas **(50,113)**.

Constan de cuatro dominios (D1–D4) ricos en hoja  $\beta$ . La importancia del D3 proporciona regiones transmembrana de la toxina, mientras D4 participa en las interacciones iniciales con la membrana, incluidas las interacciones directas con el colesterol. En este dominio hay estructura de bucle extendido y juntos con otros bucles proporciona los puntos de anclaje iniciales para la interacción de CDC con la superficie de la membrana, y esta interacción inicial de alguna manera desencadena cambios en el D3 remoto para iniciar la membrana completa. penetración y formación de poros **(107, 114)**.

Los poros SLO se han estudiado y se ha sugiero que la unión es un proceso de primer orden con respecto a la disponibilidad del sitio de la superficie y la oligomerización es un proceso de segundo orden limitado por la dimerización inicial monómero-monómero **(115)**.

El modelo más reciente para la formación de poros de SLO propone que su formación de la siguiente manera: 1) Los monómeros solubles se unen a la membrana a través de residuos específicos de colesterol. 2) Luego el monómero se difunde lateralmente para unirse a otros monómeros unidos a la membrana para formar un complejo circular creciente. En medio de este proceso y cuando alcanza

el umbral de una subunidad (dímero, medio anillo o cuando se completa la formación del anillo) dos haces de hélices de cada monómero se desenredan para formar horquillas  $\beta$  que perforan la membrana y forman las paredes del poro. 3) La existencia de arcos sugiere que la oligomerización no puede continuar cuando ya se hizo la inserción de la membrana. Así que contrario al modelo actual, se sugiere que SLO puede formar poros insertados en la membrana parcialmente completados **(115)**.

La SLO es hemolíticamente activa y extremadamente tóxica *in vivo* **(116)**. En dosis subletales *in vivo*, SLO causa necrosis dérmica, congestión venosa, aumento de la permeabilidad vascular y anomalías neurológicas antes de la muerte **(117,118)**.

## **RTX**

Dentro de las TFP se encuentra una subfamilia que es difícil de clasificar debido a al limitado conocimiento de sus propiedades estas son la subfamilia de repeticiones en toxina, algunos la catalogan como un miembro más de familia de las  $\alpha$ -TFP **(56)**. Cuse detectan por la formación de un halo hemolítico rodeando a las colonias, cuando éstas son crecidas en placas agar sangre **(119)**. Las toxinas RTX muestran actividades citolíticas dependientes del calcio, que resultan de su capacidad para formar poros de corta duración en catión en las membranas lipídicas. Producida por una gran variedad de bacterias gramnegativas como *Bordetella pertussis* y *Pseudomonas aeruginosa* **(120, 121)**.

La toxina alfa hemolisina de *E. coli* uropatógena (UPEC) representa el prototipo de la familia de proteínas RTX, donde está presente en aproximadamente el 50% de las cepas UPEC **(122)**. HlyA cuando es una proteína madura de 110 kDa y el gen estructural es *hlyA* **(123, 124)**. En actividades hemolíticas y citóxicas debe ocurrir la acilación para que ocurran estos eventos, sin embargo, esta modificación no es necesaria para la secreción extracelular. Las formas inmaduras, se denominan proHlyA (forma inactiva de la toxina), HlyA es la forma madura que se convierte en lítica luego de una activación postraducciona **(123)**.

Una vez activada, HlyA se exporta por medio del T1SS compuesta por el transportador ABC **(29)**. El sistema de secreción tipo I está compuesto por tres proteínas las cuales se ensamblan para construir un canal continuo desde la membrana interna, pasando el periplasma hasta la membrana externa, al finalizar la exportación de la proteína se desensambla el canal **(29)**. Esta conexión directa permite a la proteína HlyA ser administrada desde el citosol al medio externo, así se libera HlyA sin necesitar la escisión de algún péptido señal. La construcción de este canal es transitorio e inducido por el reconocimiento del sustrato **(119)**.

El polipéptido HlyA comprende cuatro regiones distintas: 1) Dominio N-terminal rico en  $\alpha$ -hélices anfipáticas. Se cree que esta región interactúa con la membrana celular objetivo y se inserta en ella para crear poros selectivos de cationes que desencadenarán la lisis celular. 2) Región central 3) Región que contiene RTX, está formada por aproximadamente 11–13 repeticiones no aseptídicas que están involucradas en la unión de calcio. 4) Dominio C-terminal contiene la señal de secreción esta consiste en una hélice esencial alfa y otra la cual no es esencial ambas se encuentran separadas **(119,123)**.

A pesar de la existencia de su propia maquinaria de exportación en la bacteria, HlyA también se ha detectado en VME **(125)**. Se ha demostrado que la toxina secretada por este mecanismo es transferida a la célula huésped de manera más concentrada, siendo, por lo tanto, hemolíticamente más eficiente que la toxina libre **(126,127)**.

HlyA puede atacar una variedad de células de mamíferos además de eritrocitos, particularmente células epiteliales, linfocitos y leucocitos **(119)**.

A altas dosis de toxina, existe una oligomerización progresiva que lleva a la fusión de pequeños poros con una rápida destrucción de la célula. En contraste, a bajas concentraciones de toxina, los poros serían de menor tamaño, de manera tal que las células, si bien están dañadas, podrían sobrevivir el tiempo suficiente como para que se activen las rutas apoptóticas **(128)**.

El mecanismo de acción lítica es un mecanismo complejo que finaliza en la lisis celular. Se han reconocido 3 etapas: 1) Unión a la membrana de la célula blanco, aun no se esclarece si se necesita o no un receptor proteico. 2) Inserción a la membrana, en el medio extracelular la proteína HlyA es dependiente de la acilación para poder unir calcio, esta unión debe ser irreversible y así sea hemolíticamente activa. 3) Oligomerización, gran parte de las regiones naturalmente desordenadas de HlyA son las responsables de promover interacciones en el proceso de oligomerización, ayuda también los microdominios de membrana que participan como plataformas para concentrar la toxina **(123, 129, 130)**.

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad se conocen diferentes ejemplos de hemolisinas asociadas a bacterias patógenas y no patógenas. Sus mecanismos de acción se están elucidando y se han vinculado con daños en las membranas celulares de las células del hospedero. Sin embargo, en fechas recientes se han reportado algunos casos de enfermedades respiratorias o renales, en las cuales se han aislado o identificado algunos géneros bacterianos poco comunes. Así se ha reportado que ciertas bacterias ácido-acéticas, por ejemplo, *Acetobacter cibinongensis* aparentemente han producido cuadros de neumonías atípicas en pacientes inmunosuprimidos o con abuso de drogas **(131)**.

Las BAA están incluidas en la familia *Acetobacteraceae*, las cuales oxidan etanol y producen ácido acético, de donde tomaron su nombre. Sin embargo, esta capacidad metabólica se deriva de una alta capacidad de oxidación rápida de alcoholes y azúcares que producen los ácidos orgánicos correspondientes, que pueden acumularse fácilmente en su entorno **(132)**. Además, la rápida oxidación de azúcares o alcoholes requiere de una alta disponibilidad de oxígeno, el cual juega un papel fundamental en el crecimiento y actividad de las enzimas involucradas. El pH óptimo de crecimiento de estas bacterias está alrededor de pH 5.5 a 6.3, sin embargo, también pueden crecer plenamente a valores de pH más bajos como 4.0 o 3.0 **(133, 134)**. Resisten a los valores de pH muy bajos **(135)**. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C, **(136)**. Algunas bacterias como *Acetobacter*

*aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans* y *Komagataeibacter xylinus* han sido muy utilizadas en la industria de los alimentos fermentados: han participado en la producción de alimentos y bebidas, como el vinagre, cacao, kombucha y otras bebidas fermentadas similares. En el medio ambiente, los BAA forman parte del microbiota en frutas o flores (ricos en componentes azucarados **(137)**).

En ese contexto, *G. diazotrophicus* es también una bacteria incluida en el grupo de las BAA, es un bacilo Gram-negativo, ácido tolerante, que puede crecer aeróbica y microaerófilicamente, mide 1 a 2  $\mu\text{m}$  de longitud, es móvil y posee flagelos laterales o peritricos **(136-138)**. Es una bacteria que hace simbiosis con diferentes plantas. La asociación con la caña de azúcar ha sido de las interacciones más estudiadas, de hecho, se ha establecido que para estas condiciones *G. diazotrophicus* requiere de altas concentraciones de sacarosa (10%) para su crecimiento **(136)**. Además de la sacarosa, la bacteria también puede crecer utilizando otras fuentes de carbono como glucosa, gluconato, lactato, piruvato, acetato **(138)**.

Hasta el momento no existen reportes en la literatura que refieran al papel patógeno de *G. diazotrophicus*, como ha acontecido con otras bacterias del grupo de las BAA. Sin embargo, se han reportado diferentes estudios en los que se han estudiado algunos componentes de *G. diazotrophicus*, como los sistemas de secreción, presencia de sideróforos, resistencia a antibióticos, etc., que podrían ser considerados como factores de virulencia presentes en esta bacteria **(139-141)**.

Por ello, en el presente trabajo se realizó un breve estudio que proporciona información referente a la existencia de una novedosa hemolisina presente en *G. diazotrophicus*, la cual podría causar algún daño en las personas consideradas como población en riesgo, tal como ha ocurrido con otras bacterias BAA.

## ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA PRESENCIA DE UNA POSIBLE HEMOLISINA EN *G. DIAZOTROPHICUS*

Debido a que se conoce la secuencia del genoma completo de *G. diazotrophicus*, se realizó la búsqueda de una hemolisina en la base de datos de NCBI, dando como resultado el gen putativo con el nombre Gdia\_0086, que codifica para la hemolisina A (a) en esta bacteria, la cual se muestra en la Figura 3. La hemolisina A de *G. diazotrophicus* cuenta con 741pb. Se trata de un péptido de un tamaño aproximado de 26 kDa, contando con una secuencia de aminoácidos de 246 (b) que se muestra en la Figura 3.

### a. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5, secuencia completa

Secuencia de referencia NCBI: NC\_011365.1

```
>NC_011365.1:c99736-98996 Gluconacetobacter diazotrophicus PAL 5, secuencia completa
GTGGCCAAGCAACGCGCGGACCAGATGCTGGTCGACCGGGGACTGGTGGAAAGCCGTA
CCCGCGCCCAGGCGCTGATCCTGGCCGGCCTGGTCTTTTCGGGCGACCGGCGCGTGG
CCAAGGCCGGCGACCAGTTGCCGAGGACGCGCCGCTGCGGCTGAAGGGACAGGATC
ATCCCTGGGTGTCGCGCGGCGGCATCAAATGGCGCATGCGCTGGCGCATTTTCGGCCT
GTCGCCCCGAAGGCGGCATCTGCCTGGATGTCGGCGCGTCGACCGGCGGCTTACCGAC
GTCCTGCTGACGCACGGCGCGGCAAAAATCTATGCCGTCGATGTCGGGCATGGCCAAC
TGGCCTGGAAGCTGCGCAGCGACCCGCGCGTGACGGTGCTGGAAAATGCAACGCCCG
CGCGCTGGATGCGACGACGATCCCCGACCCGATCGACGTGCTGGTCTGCGATGCCAGC
TTCATCGGCCTGCGCACGGTCCTGCCCGCCGGGCTGGCGTTGTGCCGTCCGGGCGCC
GGGGCCGTGGCCCTGATCAAGCCGCAATTCGAGGCCGGGCGCGACGCGGTGGGGCCA
AAGGGCGTGGTGCGCGACCCCGCGATCCATGACGCGGTCTGCGCCACCATCCGCGACT
GGTGGTCCGCCATGCCCGGCTGGACGGTGCTGGGGATCGAACCCAGCCCGATCACGG
GCCCGGAAGGCAACCGCGAATTCCTGATCGCCGCGCGGGCGGGACGGATAG
```

### b. hemolisina A [*Gluconacetobacter diazotrophicus* PA1 5]

Secuencia YP\_002274501

```
>YP_002274501.1 hemolysin A [Gluconacetobacter diazotrophicus PA1 5]
MAKQRADQMLVDRGLVESRTRAQALILAGLVFSGDRRVAKAGDQLPEDAPLRLKGQDHPW
VSRGGIKLAHALAHFGLSPEGGICLDVGASTGGFTDVLVTHGAAKIYAVDVGHGQLAWKLRS
DPRVTVLEKCNARALDATTIPDIDVLVCDASFIGLRTVLPAGLALCRPGAGAVALIKPQFEAG
RDAVGPKGVVVRDPAIHDAVCATIRDWWSAMPGWTVLGIESPITGPEGNREFLIAARRDG
```

Figura 3. a) Gen Gdia\_0086 en formato FASTA y b) la secuencia de aminoácidos en formato FASTA que codifica para la hemolisina A de *G. diazotrophicus*.

Se utilizó el programa de Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 11 (MEGA 11) para realizar un análisis filogenético por el método de vecino más cercano. Para esto el primer paso a realizar fue usar la base de datos NCBI donde se empleó el programa BLAST, el cual sirvió para hacer un alineamiento de secuencias parciales.

Entonces se introdujo la secuencia del gen de la hemolisina de *G. diazotrophicus*, de los resultados se eligió 17 secuencias (Figura 4), además de que no sean repetidas, de las cuales tienen de 72% a 81% de identidad. Después se usó la base de datos de NCBI para saber si existían estudios que demuestren la actividad hemolítica sobre cada gen de las 17 secuencias seleccionadas, sin embargo, no existen estudios que demuestren que sean hemolisinas verdaderas.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gluconacetobacter diazotrophicus PA1 5 complete genome</a>	<a href="#">Gluconacetobacter diazotrophicus PA1 5</a>	1369	1369	100%	0.0	100.00%	3887492	<a href="#">CP001189.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gluconacetobacter diazotrophicus PA1 5 complete genome</a>	<a href="#">Gluconacetobacter diazotrophicus PA1 5</a>	1369	1369	100%	0.0	100.00%	3944163	<a href="#">AM889285.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Komagataeibacter nataicola strain RZS01 chromosome complete genome</a>	<a href="#">Komagataeibacter nataicola</a>	580	580	97%	7e-161	81.34%	3485191	<a href="#">CP019875.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Komagataeibacter xylinus strain DSM 2325 chromosome</a>	<a href="#">Komagataeibacter xylinus</a>	566	566	95%	2e-156	81.27%	3353346	<a href="#">CP025269.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Roseomonas sp. S08 DNA complete genome</a>	<a href="#">Roseomonas sp. S08</a>	444	444	89%	1e-119	79.11%	5481269	<a href="#">AP025637.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lichenicola cladoniae strain PAMC 26569 chromosome complete genome</a>	<a href="#">Lichenicola cladoniae</a>	411	411	97%	1e-109	77.20%	4799761	<a href="#">CP053708.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gluconobacter oxydans 621H isolate WT-DSMZ genome assembly chromosome 1</a>	<a href="#">Gluconobacter oxydans 621H</a>	368	368	97%	6e-97	76.26%	2704625	<a href="#">LT900338.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gluconobacter oxydans 621H complete genome</a>	<a href="#">Gluconobacter oxydans 621H</a>	368	368	97%	6e-97	76.26%	2702173	<a href="#">CP000009.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Roseococcus microcysteis strain NIBR12 chromosome complete genome</a>	<a href="#">Roseococcus microcysteis</a>	357	357	98%	1e-93	75.97%	4208010	<a href="#">CP061718.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Rhodovastum atsumiense strain G2-11 genome assembly chromosome RHOA</a>	<a href="#">Rhodovastum atsumiense</a>	333	333	97%	2e-86	75.37%	6482810	<a href="#">QW485601.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gluconobacter sphaericus strain SJF2-1 chromosome complete genome</a>	<a href="#">Gluconobacter sphaericus</a>	315	315	95%	8e-81	75.14%	2844550	<a href="#">CP068419.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Acetobacter aceti JCM20276 DNA complete genome</a>	<a href="#">Acetobacter aceti</a>	315	315	98%	8e-81	74.70%	3743357	<a href="#">AP023326.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Acetobacter aceti NBRC 14818 DNA complete genome</a>	<a href="#">Acetobacter aceti NBRC 14818</a>	309	309	98%	4e-79	74.59%	3596270	<a href="#">AP023410.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Skermanella sp. TT6 chromosome complete genome</a>	<a href="#">Skermanella sp. TT6</a>	285	285	93%	6e-72	74.68%	5940203	<a href="#">CP067420.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Skermanella rosea strain KEMB 2255-458 chromosome complete genome</a>	<a href="#">Skermanella rosea</a>	263	263	95%	3e-65	74.00%	6098631	<a href="#">CP086111.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Rhodospirillum photometricum DSM 122 draft genome sequence</a>	<a href="#">Pararhodospirillum photometricum DSM 122</a>	252	252	94%	6e-62	73.74%	3876289	<a href="#">HE663493.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Skermanella mucosa strain KEMB 2255-438 chromosome SKMUc complete genome</a>	<a href="#">Skermanella mucosa</a>	235	235	95%	6e-57	73.13%	6407183	<a href="#">CP086106.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stella vacuolata ATCC 43931 DNA complete genome</a>	<a href="#">Stella vacuolata</a>	233	233	86%	2e-56	73.82%	5834761	<a href="#">AP019702.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stella sp. ATCC 35155 DNA complete genome</a>	<a href="#">Stella sp. ATCC 35155</a>	224	224	96%	1e-53	73.20%	5339096	<a href="#">AP019701.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sphingobium phenoxybenzoativorans strain Tas13 chromosome complete genome</a>	<a href="#">Sphingobium phenoxybenzoativorans</a>	196	196	98%	3e-45	72.21%	4828758	<a href="#">CP073910.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sphingobium chlorophenolicum L-1 chromosome 1 complete sequence</a>	<a href="#">Sphingobium chlorophenolicum L-1</a>	172	172	83%	5e-38	72.13%	3080818	<a href="#">CP002798.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sphingosinicella sp. BN140058 chromosome complete genome</a>	<a href="#">Sphingosinicella sp. BN140058</a>	169	169	48%	7e-37	75.48%	5729595	<a href="#">CP035501.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sphingobium xenophagum strain C1 chromosome 1 complete sequence</a>	<a href="#">Sphingobium xenophagum</a>	167	167	81%	2e-36	72.44%	3058963	<a href="#">CP022745.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sphingobium xenophagum strain PH3-15 chromosome 1 complete sequence</a>	<a href="#">Sphingobium xenophagum</a>	167	167	81%	2e-36	72.44%	3472664	<a href="#">CP076556.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sphingomonas sp. S8-45 chromosome complete genome</a>	<a href="#">Sphingomonas sp. S8-45</a>	159	159	57%	4e-34	74.14%	2880162	<a href="#">CP097253.1</a>

Figura 4. Análisis de alineamiento de secuencias parciales del gen de la hemolisina de *G. diazotrophicus* en BLAST.

En la bibliografía se encontró que el gen *tlyA* está presente en cada una de las 17 secuencias del análisis de BLAST, el producto es una ARNr de la familia TlyA (citidina-2'-O)-metiltransferasa. El gen *tlyA* ha sido estudiada en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y su proteína se llamada 16S/23S rRNA (citidina-2'-O)-metiltransferasa TlyA de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv se ha detectado un estudio de la capacidad hemolítica por medio de experimentos, uno fue la hemólisis dependiente de contacto de la proteína 16S/23S rRNA (citidina-2'-O)-metiltransferasa (con y sin etiqueta His) y *E. coli* transformada con vector simulado. Otro experimento fue la actividad hemolítica de la proteína 16S/23S rRNA (citidina-2'-O)-metiltransferasa purificada. Un experimento más fue la actividad hemolítica de la proteína 16S/23S rRNA (citidina-2'-O)-metiltransferasa generada *in vitro* por transcripción y traducción acoplada. Basados en los ensayos realizados se demostró hemólisis dependiente de la concentración y del tiempo de eritrocitos de conejo y humanos. En esta investigación también se llegó a conocer la actividad de metilación del ARN ribosómico, con esta información parece que el gen *tlyA* puede contener dos funciones diversas (142).

Con estos datos se decidió introducir las 17 secuencias de los genes del análisis BLAST, el gen de *M. tuberculosis* y el gen de la hemolisina de *G. diazotrophicus* y en el programa MEGA 11 para hacer el análisis filogenético y así saber si estaban relacionadas las secuencias. En la Figura 5 se observa el árbol filogenético y en rectángulo color naranja se encuentra el gen *tlyA* de *M. tuberculosis*, se observa que está alejado del gen *G. diazotrophicus*, con esta información aún no puedo afirmar que el gen de *G. diazotrophicus* es una hemolisina. En contraste dentro del rectángulo color azul se puede ver una gran cercanía de vecindad entre el gen *G. diazotrophicus* y el de *K. xylinus strain DSM 2325*. Sin embargo, al no contar con

bibliografía *K. xylinus strain DSM 2325* que demuestre ser una hemolisina verdadera se hizo la búsqueda de dominios conservados para saber si se parecen entre ellas.



Figura 5. Árbol filogenético por el método de vecino más cercano, creado por el programa MEGA 11.

Se usó el servicio de búsqueda de dominio conservado (Búsqueda de CD) de NCBI para identificar su existencia en una secuencia de proteína. Primero se comparó la proteína de *G. diazotrophicus* con la de *K. xylinus strain DSM 2325*, en la Figura 6 se muestra el resultado del análisis, el cual demuestra a la familia de dominios de proteínas conservadas *Yqxc*, la cual se ha hecho experimentos en *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae* y en *Treponema denticola* que demuestran ser una hemolisina (143,144). Esto nos da mayor posibilidad que el gen de *G. diazotrophicus* sea una hemolisina.

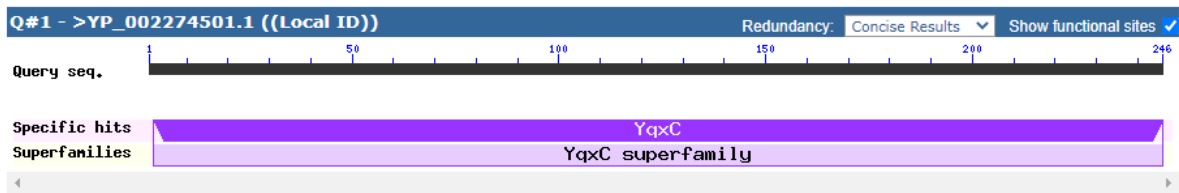


Figura 6. Análisis de dominio conservado. Se observa que es familia de dominios de proteínas conservadas *Yqxc*.

Para validar el hallazgo de la búsqueda de dominio conservado, se introdujo la secuencia proteica del gen de *G. diazotrophicus* en la herramienta de investigación Simple Modular Architecture Research Tool (SMART en sus siglas en inglés), que es una base de datos biológicos para identificar y analizar dominios. Dio como resultado la homología con otros genes de hemolisinas como se muestran en la - Figura 7, dando respaldo a los datos demostrando que sí es una hemolisina el gen estudiado de *G. diazotrophicus*.

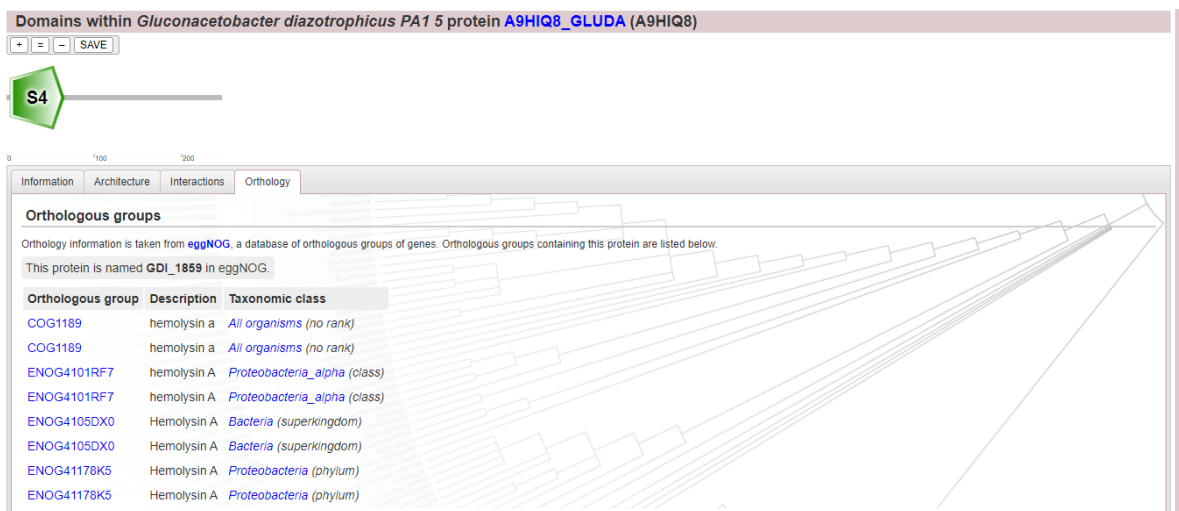


Figura 7. Resultado de la búsqueda de dominios conservados por medio de SMART del gen de *G. diazotrophicus*.



Gdia\_0086 amplificado, esperando un producto de PCR de 391 pb se observa en la Figura 8 b.

Las condiciones elegidas para realizar la PCR fueron: temperatura de desnaturalización inicial de 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos a desnaturalización a 95°C durante 30 s, alineado a 55°C durante 30 s, y extensión a 72°C durante 1 min y luego una extensión final a 72°C durante 5 min. Al final, los productos de la PCR se examinarían mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio, y visualizado bajo transiluminador UV.

#### EXPERIMENTOS DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA POR *G. DIAZOTROPHICUS*

Una evidencia sobre la actividad hemolítica, correspondió a los resultados obtenidos cuando la bacteria fue crecida en placas de agar sangre, donde se observó una hemólisis en la placa de cultivo. Para ello, se emplearon placas de agar sangre que contenían 5% de sangre de carnero en agar de infusión de cerebro y corazón (Bacto-Difco-BBL). *G. diazotrophicus* se inoculó por estría cruzada y se incubó a 30 °C durante 72 horas (manteniendo en cámara de humedad). Como se dijo anteriormente, se produjo una hemólisis en la placa de cultivo. El tipo de hemólisis producida fue de tipo alfa, demostrando una actividad hemolítica en la Figura 9.

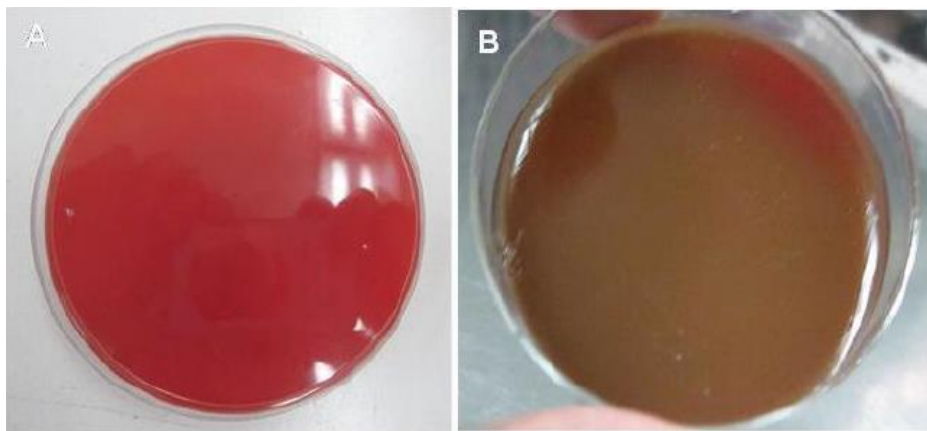


Figura 9. La actividad hemolítica de las placas de agar sangre de *G. diazotrophicus*. A. Plato de agar sangre no inoculado; B. La hemólisis alfa producida por *G. diazotrophicus*.

Una segunda evidencia de la actividad hemolítica por *G. diazotrophicus*, fue determinada midiendo la liberación de hemoglobina a partir de una suspensión de eritrocitos. La mezcla de reacción contenía: 800  $\mu\text{L}$  de NaCl al 0.9%, 100  $\mu\text{L}$  de suspensión de eritrocitos e inóculo bacteriano activo 100  $\mu\text{L}$ , prelavado y resuspendido en NaCl 0,9% estéril. La mezcla se incubó a 30 °C durante 0, 10, 20, 30 y 40 minutos. Al final del tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla y se añadió bencidina para cuantificar la concentración de hemoglobina liberada. Así se demostró la liberación de hemoglobina por la hemolisina de *G. diazotrophicus* como se muestra en la Figura 10.

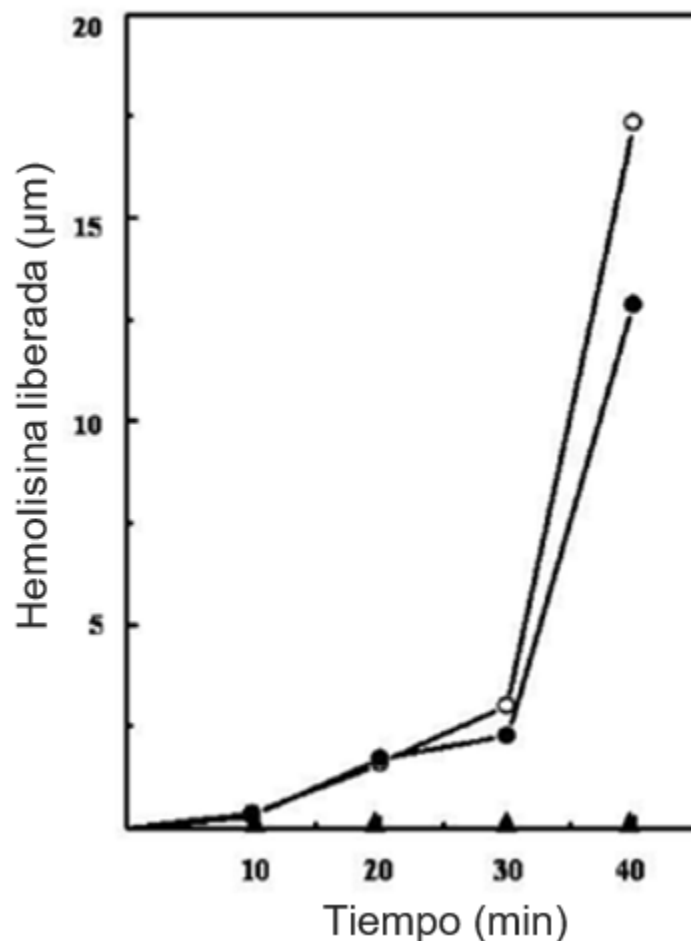


Figura 10. Medición de la actividad hemolítica usando bencidina, actividad hemolítica de *G. dizotrophicus* (●); actividad hemolítica de *E. coli* (control positivo) (○); control negativo (▲).

### CASOS REPORTADOS DE ENFERMEDAD POR BAA

Se ha evidenciado la actividad patógena de bacterias de la familia *Acetobacteraceae*.

En el Hospital de la Universidad de Pennsylvania en noviembre de 2002 se presentó el ingreso de una mujer de 41 años con dolor abdominal y líquido peritoneal turbio de 5 días de duración. Como antecedentes médicos se informaba de una

enfermedad renal en etapa terminal secundaria a diabetes mellitus, había estado en tratamiento de diálisis peritoneal 5 años atrás. El Laboratorio de Microbiología Clínica no pudo identificar por bioquímica convencional al microorganismo que la afectaba, por lo que realizaron un análisis de secuencia de ADN del gen 16S rRNA, identificaron el organismo gramnegativo como *Asaia bogorensis*, una BAA, basada en una búsqueda BLAST de la base de datos Genbank (> 99% identidad). El aislamiento del organismo a partir de múltiples muestras del líquido peritoneal, junto con un cuadro clínico consistente de peritonitis infecciosa, hace que sea muy poco probable que el organismo represente un contaminante **(145)**.

En febrero de 2005 en un hospital de Francia se describió una infección humana causada por *Acetobacter cibinongensis* en un paciente de 40 años de edad, cero negativo al VIH, que durante un año había estado recibiendo hemodiálisis crónica por insuficiencia renal en etapa terminal. Tenía un historial de uso de drogas por vía intravenosa, y se sospechaba su uso continuo. Se ingresó en una sesión de diálisis de rutina, pero tuvo fiebre (38°C) y bronquitis. Su estado respiratorio mejoró levemente, pero la fiebre persistió después de 48 horas. En el antebrazo derecho, tenía una gran lesión inflamatoria de la piel que seguía el curso de una fístula arteriovenosa, que sugería una infección estafilocócica. Se extrajeron muestras de sangre sin embargo no se identificó la bacteria, por lo que se tuvo que realizar una secuencia del gen 16S r RNA de 1389 pb para la cepa nîmes373. La secuencia coincidió con la de *A. cibinongensis* depositada en la base de datos GenBank (> 99.6% de identidad). El paciente negó viajar fuera de Francia y no tenía hábitos dietéticos exóticos. Probablemente se infectó por inoculación directa, posible durante la inyección intravenosa de una droga o después de una lesión inadvertida cuando trabajaba en viñedos **(146)**.

El 25 de enero de 2007, un hombre de 31 años con fibrosis quística ingresó en el Hôpital Sainte Marguerite en Marsella, Francia, para un trasplante de pulmón. Desde 2003, el paciente fue colonizado crónicamente por *S. aureus* resistente a meticilina, *P. aeruginosa* y *Candida albicans*. Para el trasplante se encontraba en

un régimen inmunosupresor. En el día 11 postoperatorio, la condición clínica del paciente empeoró. Los leucocitos aumentaron. El cultivo de muestras de esputo produjo el crecimiento de gramnegativo sin embargo no se identificaron el bacilo. La identificación final de este aislado fue de *Acetobacter indonesiensis* se logró después de la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, (GenBank número de acceso AJ199841, 99% de similitud) **(132)**.

Cinco pacientes que padecían enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X, fueron seguidos en el Centro Clínico de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) (Bethesda, MD, EUA), ya que las pruebas convencionales no eran concluyentes sobre el tipo de bacteria que los infectó. Todos los pacientes tenían fiebre, linfadenopatía y aumento de la velocidad de sedimentación globular durante semanas o meses. Se realizó una secuenciación parcial del gen 16S rRNA, los 5 aislados de pacientes se secuenciaron y analizaron, dando como resultado *Granulibacter bethesdensis* como la bacteria que los infectaba **(147)**.

## CONCLUSIÓN

Los factores de virulencia en este caso las hemolisinas son parte del arsenal de las bacterias patógenas grampositivas y gramnegativas abriendo paso para comenzar el proceso de contagio o son auxiliares junto con otros factores de virulencia para lograr desarrollo exitoso de la infección.

Por otro lado, es importante considerar la posibilidad de las BAA como posibles bacterias oportunistas, ya se encuentran registros de ellas causando enfermedades en humanos inmunocomprometidos.

Tras realizar la bioinformática de la hemolisina de *G. diazotrophicus* se demostró la presencia del gen de una hemolisina dentro del genoma de la bacteria. Además, se pudo constatar por la presencia de dominios conservados que el gen si es una hemolisina por la presencia de la familia de dominio conservado YqxC el cual tiene investigaciones demostrando ser una hemolisina. Con los experimentos de cultivo de agar y la cinética de liberación de hemoglobina se llegó a la conclusión también de que existe la presencia de una hemolisina activa, haciendo pensar que puede poseer un posible factor de virulencia en *G. diazotrophicus*.

## PERSPECTIVAS

- Amplificar los oligonucleótidos por PCR punto final en *G. diazotrophicus* para comprobar la presencia de la hemolisina.
- Realizar pruebas de sensibilidad a antibióticos en *G. diazotrophicus* ampliar el mapa de herramientas contra una posible infección de esta bacteria.
- Retar a *G. diazotrophicus* con leucocitos humanos, para así conocer la capacidad citotóxica frente a otro tipo de células.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Venkatasubramaniam A, Kanipakala T, Ganjbaksh N, Mehr R, Mukherjee I, Krishnan S, Bae T, Aman MJ, Adhikari RP. (2018). A Critical Role for HlgA in *Staphylococcus aureus* Pathogenesis Revealed by A Switch in the SaeRS Two-Component Regulatory System. *Toxins*, 10(9):377. <https://doi.org/10.3390/toxins10090377>
2. Wang C, Li Q, Lv J, Sun X, Cao Y, Yu K, Miao C, Zhang ZS, Wang Q. (2020) Alpha-hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* induces GM-CSF-mediated acute kidney injury. *Mucosal Immunol* 13, 22–33. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0225-6>
3. Divyakolu S, Chikkala R, Ratnakar K, Sritharan V. (2019) Hemolysins of *Staphylococcus aureus*—An Update on Their Biology, Role in Pathogenesis and as Targets for Anti-Virulence Therapy. *Advances in Infectious Diseases*, 9, 80-104. <https://doi.org/10.4236/aid.2019.92007>.
4. Tuipulotu DE, Mathur A, Ngo C, Man SM. (2021). *Bacillus cereus*: Epidemiology, Virulence Factors, and Host-Pathogen Interactions. *Trends Microbiol*, 29(5):458-471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.09.003>
5. O'Brien DK, Melville SB. (2004). Effects of *Clostridium perfringens* alpha-toxin (PLC) and perfringolysin O (PFO) on cytotoxicity to macrophages, on escape from the phagosomes of macrophages, and on persistence of *C. perfringens* in host tissues. *Infect Immun*, 72(9):5204-15. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5204-5215.2004>
6. Ala'Aldeen DAA, Wooldridge KG. (2012). Bacterial pathogenicity. In: Greenwood D, Barer MSR, Irving W, (eds). *Medical Microbiology*. Eighteenth, 156–67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4089-4.00028-7>
7. Wilson JW, Schurr MJ, LeBlanc LC, Ramamurthy R, Buchanan KL, Nickerson CA. (2002). Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad Med J*, 78(918):216–24. <http://dx.doi.org/10.1136/pmj.78.918.216>
8. Liu B, Zheng D, Zhou S, Chen L, Yang J. (2022). VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*, 7;50(D1):D912-D917. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>
9. do Vale A, Cabanes D, Sousa S. (2016). Bacterial Toxins as Pathogen Weapons Against Phagocytes. *Front Microbiol*, 7:42. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00042>
10. Kim SE, Su W, Cho M, Lee Y, Choe WS. (2012). Harnessing aptamers for electrochemical detection of endotoxin. *Anal Biochem*, 424(1):12-20. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.02.016>
11. Sampath V. (2018). Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates. *Agriculture and Natural Resources*, 52:115–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00042>
12. Clifton LA, Ciesielski F, Skoda MW, Paracini N, Holt SA, Lakey JH. (2016). The Effect of Lipopolysaccharide Core Oligosaccharide Size on the

- Electrostatic Binding of Antimicrobial Proteins to Models of the Gram Negative Bacterial Outer Membrane. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 32(14), 3485–3494.  
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00240>
13. Silipo A, Molinaro A. (2010). The Diversity of the Core Oligosaccharide in Lipopolysaccharides. En: Wang X, Quinn P, editores. *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. Springer, Dordrecht; 66–99.  
[https://doi.org/10.1007/978-90-481-9078-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9078-2_4)
  14. Li Y, Shi Z, Radauer-Preiml I, Andosch A, Casals E, Luetz-Meindl U, Cobaleda M, Lin Z, Jaber-Douraki M, Italiani P, Horejs-Hoeck J, Himly M, Monteiro-Riviere NA, Duschl A, Puntès VF, Boraschi D. (2017). Bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) binds to the surface of gold nanoparticles, interferes with biocorona formation and induces human monocyte inflammatory activation. *Nanotoxicology*, 11(9-10):1157-1175.  
<https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1401142>
  15. Li Y, Boraschi D. (2016). Endotoxin contamination: a key element in the interpretation of nanosafety studies. *Nanomedicine*, 11:269–287.  
<https://doi.org/10.2217/nnm.15.196>
  16. Erkmen O, Bozoglu. (2016). Bacterial Pathogenicity and Microbial. In: Erkmen O, Bozoglu T (eds) *Food Microbiology: Principles into Practice Toxins*. John Wiley & Son, Vol 1: 126-137  
<https://doi.org/10.1002/9781119237860.ch7>
  17. Freeman VJ. (1951). Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of bacteriology*, 61(6), 675–688. <https://doi.org/10.1128/jb.61.6.675-688.1951>
  18. Eklund MW, Poysky FT. (1974). Interconversion of type C and D strains of *Clostridium botulinum* by specific bacteriophages. *Appl Microbiol*, 27(1):251-8. <https://doi.org/10.1128/am.27.1.251-258.1974>
  19. Betley MJ, Mekalanos JJ. (1985). Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science*, 12;229(4709):185-7. DOI: 10.1126/science.3160112
  20. Calderwood SB, Auclair F, Donohue-Rolfe A, Keusch GT, Mekalanos JJ. (1987). Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(13):4364-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.13.4364>
  21. Waldor MK, Mekalanos JJ. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, 28;272(5270):1910-4. DOI: 10.1126/science.272.5270.1910
  22. Okinaka R, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster A, Hill K, Keim P, Koehler T, Lamke G, Kumano S, Manter D, Martinez Y, Ricke D, Svensson R, Jackson P. (1999). Secuencia, ensamblaje y análisis de pX01 y pX02. *J. Appl. Microbiol*, 87: 261-262. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00883.x>
  23. Barbieri JT. (2009). Exotoxins. In: Moselio Schaechter (eds). *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. Academic Press, 355-364. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00225-X>.

24. Sähr A, Förmer S, Hildebrand D, Heeg K. (2015). T-cell activation or tolerization: the Yin and Yang of bacterial superantigens *Front Microbiol*, 6,1153. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01153>
25. Carlsson R, Sjögren HO. (1985). Kinetics of IL-2 and interferon-gamma production, expression of IL-2 receptors, and cell proliferation in human mononuclear cells exposed to staphylococcal enterotoxin A. *Cell Immunol*, 96(1):175-83. doi: 10.1016/0008-8749(85)90349-1. PMID: 3939109. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(85\)90349-1](https://doi.org/10.1016/0008-8749(85)90349-1)
26. Miethke T, Wahl C, Heeg K, Echtenacher B, Krammer PH, Wagner H. (1992). T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 1;175(1):91-8. <https://doi.org/10.1084/jem.175.1.91>
27. Dal Peraro M, van der Goot FG. (2016). Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat Rev Microbiol*, 14(2):77-92. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.3>
28. Sandvig K, van Deurs B. (1996). Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev*, 76(4):949-66. <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.4.949>
29. Green ER, Meccas J. (2016). Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>
30. Chernyatina, A.A., Low, H.H. (2019). Core architecture of a bacterial type II secretion system. *Nat Commun*, 10, 5437. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13301-3>
31. Korotkov KV, Sandkvist M. (2019). Architecture, Function, and Substrates of the Type II Secretion System. *EcoSal Plus*, 8(2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0034-2018>
32. Coburn B, Sekirov I, Finlay BB. (2007). Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev*, 20(4):535-49. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-07>
33. Wagner S, Grin I, Malmsheimer S, Singh N, Torres-Vargas CE, Westerhausen S. (2019). Bacterial type III secretion systems: a complex device for the delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. *FEMS Microbiol Lett*, 365(19). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny201>
34. Kimbrough TG, Miller SI. (2000). Contribution of *Salmonella typhimurium* Type III Secretion Components to Needle Complex Formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20), 11008–11013. <http://www.jstor.org/stable/123243>
35. Kubori T, Sukhan A, Aizawa SI, Galán JE. (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 29;97(18). <https://doi.org/10.1073/pnas.170128997>
36. Lee VT, Mazmanian S K, Schneewind O. (2001). A program of *Yersinia enterocolitica* type III secretion reactions is activated by specific signals.

- Journal of bacteriology, 183(17), 4970–4978.  
<https://doi.org/10.1128/JB.183.17.4970-4978.2001>
37. Costa TRD, Harb L, Khara P, Zeng L, Hu B, Christie PJ. (2021). Type IV secretion systems: Advances in structure, function, and activation. *Mol Microbiol* 115(3):436-452. <https://doi.org/10.1111/mmi.14670>
  38. Meuskens I, Saragliadis A, Leo JC, Linke D. (2019). Type V Secretion Systems: An Overview of Passenger Domain Functions. *Front Microbiol*. May 31;10:1163. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01163>
  39. Klauser T, Pohlner J, Meyer TF. (1993). The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram-negative bacteria. *Bioessays*, 15(12):799-805. <https://doi.org/10.1002/bies.950151205>
  40. Coulthurst S. (2019). The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. *Microbiology (Reading)*, 165(5):503-515. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000789>
  41. Gallique M, Bouteiller M, Merieau A. (2017). The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication? *Front Microbiol*, 28;8:1454. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01454>
  42. Rivera-Calzada A, Famelis N, Llorca O, Geibelet S. (2021). Type VII secretion systems: structure, functions and transport models. *Nat Rev Microbiol* 19, 567–584. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00560-5>
  43. Luthra A, Mahmood A, Arora A, Ramachandran R. (2008). Characterization of Rv3868, an essential hypothetical protein of the ESX-1 secretion system in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of biological chemistry*, 283(52), 36532–36541. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807144200>
  44. Ohol YM, Goetz DH, Chan K, Shiloh MU, Craik CS, Cox JS. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence. *Cell Host Microbe*, 18;7(3):210-20. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.02.006>
  45. Majlessi L, Prados-Rosales R, Casadevall A, Brosch R. (2015). Release of mycobacterial antigens. *Immunol Rev*, 264(1):25-45. <https://doi.org/10.1111/imr.12251>
  46. van Winden VJC, Houben ENG, Braunstein M. (2019). Protein Export into and across the Atypical Diderm Cell Envelope of Mycobacteria. *Microbiol Spectr*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0043-2018>
  47. Palmer T, Finney AJ, Saha CK, Atkinson GC, Sargent F. (2020). A holin/peptidoglycan hydrolase-dependent protein secretion system. *Mol Microbiol*. 115(3):345-355. <https://doi.org/10.1111/mmi.14599>
  48. Grossman AS, Mauer TJ, Forest KT, Goodrich-Blair H. (2021). A Widespread Bacterial Secretion System with Diverse Substrates. *mBio*. 12(4):e0195621. <https://doi.org/10.1128/mBio.01956-21>
  49. Redder P, Linder P. (2012). DEAD-box RNA helicases in gram-positive RNA decay. In: Jankowsky E. *Methods Enzymol*, Academic Press, Vol 511:369-83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396546-2.00017-6>
  50. Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Kehoe M, Palmer M. (1996). Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin:

- prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol*, 165(2):73-9. <https://doi.org/10.1007/s002030050300>
51. Nizet V. (2002). Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends Microbiol*, 10(12):575-80. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02473-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02473-3)
  52. Granström M, Julander I, Möllby R. (1983). Serological diagnosis of deep *Staphylococcus aureus* infections by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for staphylococcal hemolysins and teichoic acid. *Scand J Infect Dis Suppl*, 41:132-9.
  53. Duport C, Alpha-Bazin B, Armengaud AJ. (2019). Advanced Proteomics as a Powerful Tool for Studying Toxins of Human Bacterial Pathogens. *Toxins (Basel)*. 4;11(10):576. <https://doi.org/10.3390/toxins11100576>
  54. Alouf JE. (2003). Molecular features of the cytolytic pore-forming bacterial protein toxins. *Folia Microbiol (Praha)*, 48(1):5-16. <https://doi.org/10.1007/BF02931271>
  55. Kao CY, Los FC, Huffman DL, Wachi S, Kloft N, Husmann M, Karabrahimi V, Schwartz JL, Bellier A, Ha C, Sagong Y, Fan H, Ghosh P, Hsieh M, Hsu, CS, Chen L, Aroian RV. (2011). Global functional analyses of cellular responses to pore-forming toxins. *PLoS pathogens*, 7(3), e1001314. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001314>
  56. Li Y, Li Y, Mengist HM, Shi C, Zhang C, Wang B, Li T, Huang Y, Xu Y, Jin T. (2021). Structural Basis of the Pore-Forming Toxin/Membrane Interaction. *Toxins*, 13(2), 128. <https://doi.org/10.3390/toxins13020128>
  57. Gekara NO, Groebe L, Viegas N, Weiss S. (2008). *Listeria monocytogenes* desensitizes immune cells to subsequent Ca<sup>2+</sup> signaling via listeriolysin O-induced depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *Infect Immun*, 76(2):857-62. <https://doi.org/10.1128/IAI.00622-07>
  58. Jover E, Tawk MY, Laventie BJ, Poulain B, Prévost G. (2013). Staphylococcal leukotoxins trigger free intracellular Ca(2+) rise in neurones, signalling through acidic stores and activation of store-operated channels. *Cellular microbiology*, 15(5), 742–758. <https://doi.org/10.1111/cmi.12069>
  59. Kho MF, Bellier A, Balasubramani V, Hu Y, Hsu W, Nielsen-LeRoux C, McGillivray SM, Nizet V, Aroian RV. (2011). The pore-forming protein Cry5B elicits the pathogenicity of *Bacillus* sp. against *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*, 6(12), e29122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029122>
  60. Atkins A, Wyborn NR, Wallace AJ, Stillman TJ, Black LK, Fielding AB, Hisakado M, Artymiuk PJ, Green J. (2000). Structure-function relationships of a novel bacterial toxin, hemolysin E. The role of alpha G. *J Biol Chem*, 275(52):41150-5. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005420200>
  61. del Castillo FJ, Leal SC, Moreno F, del Castillo I. (1997). The *Escherichia coli* K-12 sheA gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. *Mol Microbiol*, 25(1):107-15 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4391813.x>
  62. Ludwig A, Tengel C, Bauer S, Bubert A, Benz R, Mollenkopf HJ, Goebel W. (1995). SlyA, a regulatory protein from *Salmonella typhimurium*, induces a

- haemolytic and pore-forming protein in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 15;249(5):474-86. <https://doi.org/10.1007/BF00290573>
63. Von Rhein C, Bauer S, Simon V, Ludwig A. (2008). Occurrence and characteristics of the cytolysin A gene in *Shigella* strains and other members of the family *Enterobacteriaceae*, *FEMS Microbiology Letters*, 287(2):143–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01290.x>
  64. von Rhein C, Bauer S, López Sanjurjo EJ, Benz R, Goebel W, Ludwig A. (2009). ClyA cytolysin from *Salmonella*: distribution within the genus, regulation of expression by SlyA, and pore-forming characteristics. *Int J Med Microbiol*, 299(1):21-35. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.06.004>
  65. Oscarsson J, Westermark M, Löfdahl S, Olsen B, Palmgren H, Mizunoe Y, Wai SN, Uhlin BE. (2002). Characterization of a pore-forming cytotoxin expressed by *Salmonella enterica* serovars typhi and paratyphi A. *Infection and immunity*, 70(10),5759–5769. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5759-5769.2002>
  66. Ludwig A, Bauer S, Benz R, Bergmann B, Goebel W. (1999). Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*. 31(2):557-567. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01196.x>
  67. Murase K, Ooka T, Iguchi A, Ogura Y, Nakayama K, Asadulghani M, Islam MR, Hiyoshi H, Kodama T, Beutin L, Hayashi T. (2012). Haemolysin E- and enterohaemolysin-derived haemolytic activity of O55/O157 strains and other *Escherichia coli* lineages. *Microbiology*. 158(3):746-758. <https://doi.org/10.1099/mic.0.054775-0>
  68. Wai SN, Lindmark B, Söderblom T, Takade A, Westermark M, Oscarsson J, Jass J, Richter-Dahlfors A, Mizunoe Y, Uhlin BE. (2003). Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*, 3;115(1):25-35. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00754-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00754-2)
  69. Toyofuku M, Nomura N, Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol*, 17, 13–24. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
  70. Murase K. (2022). Cytolysin A (ClyA): A Bacterial Virulence Factor with Potential Applications in Nanopore Technology, Vaccine Development, and Tumor Therapy. *Toxins*. 14(2):78. <https://doi.org/10.3390/toxins14020078>
  71. Wallace AJ, Stillman TJ, Atkins A, Jamieson SJ, Bullough PA, Green J, Artymiuk PJ. (2000). *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell*, 100(2):265-76. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81564-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81564-0)
  72. Tzokov SB, Wyborn NR, Stillman TJ, Jamieson S, Czudnochowski N, Artymiuk PJ, Green J, Bullough PA. (2006). Structure of the hemolysin E (HlyE, ClyA, and SheA) channel in its membrane-bound form. *J Biol Chem*, 281(32):23042-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602421200>

73. Sathyanarayana P, Visweswariah SS, Ayappa KG. (2021). Mechanistic Insights into Pore Formation by an  $\alpha$ -Pore Forming Toxin: Protein and Lipid Bilayer Interactions of Cytolysin A. *Acc Chem Res*, 54(1):120-131. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00551>
74. Ludwig A, Völkerink G, von Rhein C, Bauer S, Maier E, Bergmann B, Goebel W, Benz R. (2010). Mutations Affecting Export and Activity of Cytolysin A from *Escherichia coli*. *J Bacteriol Res*, 192(15):4001-4011 <https://doi.org/10.1128/JB.01283-09>
75. Eifler N, Vetsch M, Gregorini M, Ringler P, Chami M, Philippesen A, Fritz A, Müller SA, Glockshuber R, Engel A, Grauschopf U. (2006). Cytotoxin ClyA from *Escherichia coli* assembles to a 13-meric pore independent of its redox-state. *The EMBO journal*, 25(11), 2652–2661. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601130>
76. Sathyanarayana P, Maurya S, Behera A, Ravichandran M, Visweswariah SS, Ayappa KG, Roy R. (2018). Cholesterol promotes Cytolysin A activity by stabilizing the intermediates during pore formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(31):E7323-E7330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721228115>
77. Söderblom T, Oxhamre C, Wai SN, Uhlén P, Aperia A, Uhlin BE, Richter-Dahlfors A. (2005). Effects of the *Escherichia coli* toxin cytolysin A on mucosal immunostimulation via epithelial Ca<sup>2+</sup> signalling and Toll-like receptor 4. *Cell Microbiol*, (6):779-88. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00510.x>
78. Beecher DJ, Wong AC. (1997). Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *J Biol Chem*. 3;272(1):233-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.1.233>
79. Sastalla I, Fattah R, Coppage N, Nandy P, Crown D, Pomerantsev AP, Leppla SH. (2013). The *Bacillus cereus* Hbl and Nhe Tripartite Enterotoxin Components Assemble Sequentially on the Surface of Target Cells and Are Not Interchangeable. *PLoS ONE* 8(10): e76955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076955>
80. Madegowda M, Eswaramoorthy S, Burley SK, Swaminathan S. (2008). X-ray crystal structure of the B component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Proteins*. 71(2):534-540. <https://doi.org/10.1002/prot.21888>
81. Jessberger N, Dietrich R, Schwemmer S, Tausch F, Schwenk V, Didier A, Märklbauer E. (2019). Binding to The Target Cell Surface Is The Crucial Step in Pore Formation of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Toxins*. 11(5):281. <https://doi.org/10.3390/toxins11050281>
82. Beecher DJ, Schoeni JL, Wong AC. (1995). Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun*. 63(11):4423-8. <https://doi.org/10.1128/iai.63.11.4423-4428.1995>
83. Beecher DJ, Wong AC. (1994). Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *Infect Immun*. 62(3):980-6. <https://doi.org/10.1128/iai.62.3.980-986.1994>

84. Geny B, Popoff M.R. (2006), Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. *Biol Cell*, 98:667-678. <https://doi.org/10.1042/BC20050082>
85. Bhakdi S, Tranum-Jensen J. (1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev*, 55(4), 733–751. <https://doi.org/10.1128/mr.55.4.733-751.1991>
86. Kehoe, M. A., Miller, L., Walker, J. A., & Boulnois, G. J. (1987). Nucleotide sequence of the streptolysin O (SLO) gene: structural homologies between SLO and other membrane-damaging, thiol-activated toxins. *Infection and immunity*, 55(12), 3228–3232. <https://doi.org/10.1128/iai.55.12.3228-3232.1987>
87. Gray GS, Kehoe M. (1984). Primary sequence of the alpha-toxin gene from *Staphylococcus aureus* wood 46. *Infection and immunity*, 46(2):615–618. <https://doi.org/10.1128/iai.46.2.615-618.1984>
88. Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE. (1996). Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*, 274(5294):859-66
89. Valeva A, Hellmann N, Walev I, Strand D, Plate M, Boukhallouk F, Brack A, Hanada K, Decker H, Bhakdi S. (2006). Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. *J Biol Chem*, 281(36):26014-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601960200>
90. Thay B, Wai SN, Oscarsson J. (2013). *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin-dependent induction of host cell death by membrane-derived vesicles. *PLoS One*, 8(1):e54661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054661>
91. Wilke GA, Bubeck Wardenburg J. (2010). Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(30):13473-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001815107>
92. Berube BJ, Bubeck Wardenburg J. (2013). *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins*, 5(6):1140–1166. <https://doi.org/10.3390/toxins5061140>
93. Dalla Serra M, Coraiola M, Viero G, Comai M, Potrich C, Ferreras M, Baba-Moussa L, Colin DA, Menestrina G, Bhakdi S, Prévost G. (2005). *Staphylococcus aureus* bicomponent gamma-hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, can form mixed pores containing all components. *J Chem Inf Model*, 45(6):1539-45. <https://doi.org/10.1021/ci050175y>
94. Woodin AM. (1960). Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *The Biochemical journal*, 75(1), 158–165. <https://doi.org/10.1042/bj0750158>
95. Colin DA, Mazurier I, Sire S, Finck-Barbançon V. (1994). Interaction of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation. *Infection and immunity*, 62(8): 3184–3188. <https://doi.org/10.1128/iai.62.8.3184-3188.1994>

96. Yamashita K, Kawai Y, Tanaka Y, Hirano N, Kaneko J, Tomita N, Ohta M, Kamio Y, Yao M, Tanaka I. (2011). Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal  $\gamma$ -hemolysin reveals the  $\beta$ -barrel pore formation mechanism by two components. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(42):17314-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110402108>
97. Kaneko J, Kamio Y. (2004). Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68(5):981-1003. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.981>
98. Nguyen AH, Nguyen VT, Kamio Y, Higuchi H. (2006). Single-molecule visualization of environment-sensitive fluorophores inserted into cell membranes by staphylococcal gamma-hemolysin. *Biochemistry*, 45(8):2570-6. <https://doi.org/10.1021/bi0514156>
99. Monma N, Nguyen VT, Kaneko J, Higuchi H, Kamio Y. (2004). Essential residues, W177 and R198, of LukF for phosphatidylcholine-binding and pore-formation by staphylococcal gamma-hemolysin on human erythrocyte membranes. *J Biochem*, 136(4):427-31. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh140>
100. DuMont AL, Yoong P, Day CJ, Alonzo F 3rd, McDonald WH, Jennings MP, Torres VJ. (2013). *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin Mac-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(26):10794-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305121110>
101. Gauduchon V, Werner S, Prévost G, Monteil H, Colin DA. (2001). Flow cytometric determination of Panton-Valentine leucocidin S component binding. *Infection and immunity*, 69(4), 2390–2395. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2390-2395.2001>
102. Spaan AN, Vrieling M, Wallet P, Badiou C, Reyes-Robles T, Ohneck EA, Benito Y, de Haas CJ, Day CJ, Jennings MP, Lina G, Vandenesch F, van Kessel KP, Torres VJ, van Strijp JA, Henry T. (2014). The staphylococcal toxins  $\gamma$ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat Commun*, 5:5438. <https://doi.org/10.1038/ncomms6438>
103. Deguchi A, Miyamoto K, Kuwahara T, Miki Y, Kaneko I, Li J, McClane BA, Akimoto S. (2009). Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. *PLoS One*, 4(5):e5598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005598>
104. Tweten RK. (1988). Nucleotide sequence of the gene for perfringolysin O (theta- toxin) from *Clostridium perfringens*: significant homology with the genes for streptolysin O and pneumolysin. *Infect Immun*, 56(12):3235-40. <https://doi.org/10.1128/iai.56.12.3235-3240.1988>
105. Johnson B.B., Heuck A.P. (2014) Perfringolysin O Structure and Mechanism of Pore Formation as a Paradigm for Cholesterol-Dependent Cytolysins. In: Anderluh G., Gilbert R. (eds) MACPF/CDC Proteins - Agents of Defence, Attack and Invasion. *Subcellular Biochemistry*, Vol 80. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8881-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8881-6_5)

106. Maekawa M, Yang Y, Fairn GD. (2016). Perfringolysin O Theta Toxin as a Tool to Monitor the Distribution and Inhomogeneity of Cholesterol in Cellular Membranes. *Toxins* (Basel). 8(3):67. <https://doi.org/10.3390/toxins8030067>
107. Soltani CE, Hotze EM, Johnson AE, Tweten RK. (2007). Structural elements of the cholesterol-dependent cytolysins that are responsible for their cholesterol-sensitive membrane interactions. *PNAS*, 104(51):20226-20231 <https://doi.org/10.1073/pnas.0708104105>
108. Mitsui K, Saeki Y, Hase J. (1982). Effects of cholesterol evulsion on susceptibility to perfringolysin o of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 686(2): 177-181. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(82\)90110-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(82)90110-9)
109. Verherstraeten S, Goossens E, Valgaeren B, Pardon B, Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R, Deprez P, Wade KR, Tweten R, Van Immerseel F. (2015). Perfringolysin O: The Underrated *Clostridium perfringens* Toxin? *Toxins*, 7(5):1702-1721. <https://doi.org/10.3390/toxins7051702>
110. Suzaki A, Ohtani K, Komine-Aizawa S, Matsumoto A, Kamiya S, Hayakawa S. (2021). Pathogenic Characterization of *Clostridium perfringens* Strains Isolated From Patients With Massive Intravascular Hemolysis. *Front Microbiol*, 12:713509. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713509>
111. Efstratiou A, Lamagni T, Turner C. (2017). Streptococci and Enterococci. In: Cohen J, Powderly W, Opal S. (eds) *Infectious Diseases*. Fourth Edition, Elsevier, 1523-1536.e2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00177-5>.
112. Kehoe MA, Miller L, Walker JA, Boulnois GJ. (1987). Nucleotide sequence of the streptolysin O (SLO) gene: structural homologies between SLO and other membrane-damaging, thiol-activated toxins. *Infect Immun*. 55(12):3228-32. <https://doi.org/10.1128/iai.55.12.3228-3232.1987>
113. Ramachandran, R., Heuck, A., Tweten, R. Johnson A. (2002). Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nat Struct Mol Biol* 9, 823–827. <https://doi.org/10.1038/nsb855>
114. Sekiya K, Satoh R, Danbara, H, Futaesaku Y. (1993). A ring-shaped structure with a crown formed by streptolysin O on the erythrocyte membrane. *Journal of bacteriology*, 175(18), 5953–5961. <https://doi.org/10.1128/jb.175.18.5953-5961.1993>
115. Stewart SE, D'Angelo ME, Piantavigna S, Tabor RF, Martin L, Bird PI. (2015). Assembly of streptolysin O pores assessed by quartz crystal microbalance and atomic force microscopy provides evidence for the formation of anchored but incomplete oligomers. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1848 (1)115-126. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.012>
116. Shewell LK, Harvey RM, Higgins MA, Day CJ, Hartley-Tassell LE, Chen AY, Gillen CM, James DB, Alonzo F 3rd, Torres VJ, Walker MJ, Paton AW, Paton JC, Jennings MP. (2014). The cholesterol-dependent cytolysins

- pneumolysin and streptolysin O require binding to red blood cell glycans for hemolytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(49):E5312-20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412703111>
117. Ginsburg I. (1972). Mechanisms of cell and tissue injury induced by group A streptococci: relation to poststreptococcal sequelae. *J Infect Dis*, 126(3):294-340. <https://doi.org/10.1093/infdis/126.3.294>
  118. Cunningham MW. (2000). Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical microbiology reviews*, 13(3), 470–511. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.470>
  119. Chenal A, Sotomayor-Perez AC, Ladant D. (2015). Structure and function of RTX toxins. In: Alouf J, Ladant FD, Popoff FM. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Academic Press, Edition Fourth: 677-718. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800188-2.00001-X>
  120. Wang X, Gray MC, Hewlett EL, Maynard JA. (2015). The *Bordetella* adenylate cyclase repeat-in-toxin (RTX) domain is immunodominant and elicits neutralizing antibodies. *J Biol Chem*, 290(6):3576-91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.585281>
  121. Zhang L, Franks J, Stolz DB, Conway JF, Thibodeau PH. (2014). Inducible Polymerization and Two-Dimensional Assembly of the Repeats-in-Toxin (RTX) Domain from the *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease. *Biochemistry*, 53 (41), 6452-6462. <https://doi.org/10.1021/bi5007546>
  122. Wiles TJ, Mulev MA. (2012). The RTX pore-forming toxin  $\alpha$ -hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: progress and perspectives. *Future Microbiol*, 8(1):73-84. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.131>
  123. Benz R. (2015). Basic mechanism of pore-forming toxins. In: *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Academic Press, Edition Fourth:677-718. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800188-2.00021-5>
  124. Felmler T, Pellett S, Welch RA. (1985). Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J Bacteriol*, 163(1):94-105. <https://doi.org/10.1128/jb.163.1.94-105.1985>
  125. Mackman N, Holland B. (1984). Secretion of a 107 K Dalton Polypeptide into the Medium from a Haemolytic *E. coli* K12 Strain. *Mol Gen Genet*, 193:312-315.
  126. Bielaszewska M, Rüter C, Kunsmann L, Greune L, Bauwens A, Zhang W, Kuczius T, Kim KS, Mellmann A, Schmidt MA, Karch H. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin employs outer membrane vesicles to target mitochondria and cause endothelial and epithelial apoptosis. *PLoS Pathog*. 9(12):e1003797. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003797>
  127. Herlax V, Maté S, Rimoldi O, Bakás L. (2009). Relevance of fatty acid covalently bound to *Escherichia coli* alpha-hemolysin and membrane microdomains in the oligomerization process. *J Biol Chem* 11;284(37):25199-210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009365>

128. Herlax V, Henning M, Bernasconi A, Goni F, Bakas L. (2010) The lytic mechanism of *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin associated to outer membrane vesicles. *Health*, 2(5):484-492. DOI: 10.4236/health.2010.25072
129. Ostolaza H, Goñi FM. (1995). Interaction of the bacterial protein toxin alpha-haemolysin with model membranes: protein binding does not always lead to lytic activity *FEBS Lett*, 371:303-306. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00927-28](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00927-28)
130. Soloaga A, Ostolaza H, Goñi FM, de la Cruz F. (1996). Purification of *Escherichia coli* pro-haemolysin, and a comparison with the properties of mature alpha-haemolysin. *Eur J Biochem*, 238(2):418-22. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0418z.x>
131. Bittar F, Reynaud-Gaubert M, Thomas P, Boniface S, Raoult D, Rolain J M. (2008). *Acetobacter indonesiensis* pneumonia after lung transplant. *Emerging infectious diseases*, 14(6), 997–998. <https://doi.org/10.3201/eid1406.071236>
132. Guillamón JM, Mas A. (2009). Acetic Acid Bateria. In: König H, Unden G, Fröhlich J. (eds). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_2)
133. De Ley J, Gillis M, Swings J. (1984). Family VI. *Acetobacteraceae*. In Krieg NR, Holt JG (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, Vol 1:267-278
134. Torija MJ, Mateo E, Guillamón JM, Mas A. (2010). Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. *Food Microbiol*, 27(2):257-65. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.10.001>
135. Kösebalan F, Özilgen M. (1992). Kinetics of wine spoilage by acetic acid bacteria. *J Chem Tech Biotechnol*, 55: 59-63 <https://doi.org/10.1002/jctb.280550110>
136. Cavalcante VA, Dobereiner J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* 108: 23-31.
137. Gillis M, Kersters K, Hoste B, Janssens D, Kroppenstedt RM, Stephan MP, Teixeira KRS, Dobereiner J, De Ley J. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int J Syst. Bacteriol*, 39:361-364. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-361>
138. Stephan MP, Oliveira M, Teixeira KRS, Martinez-Drets G, Döbereiner J. (1991). Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol Lett.*, 7(1):67–72. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04323.x>
139. Bertalan M, Albano R, de Pádua V, Rouws L, Rojas C, Hemerly A, et al. (2009). Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*, 10(450) <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-450>
140. de Paula Soares C, Rodrigues EP, de Paula Ferreira J, Simões Araújo JL, Rouws LF, Baldani JI, Vidal MS. (2015). Tn5 insertion in the tonB gene

- promoter affects iron-related phenotypes and increases extracellular siderophore levels in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Arch Microbiol, 197(2):223-33. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1045-4>
141. Muñoz-Rojas J, Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J. (2005). Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. FEMS Microbiol Ecol. 1;54(1):57-66. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.011>
  142. Rahman A, Srivastava SS, Sneh A, Ahmed N, Krishnasastri MV. (2010). Molecular characterization of tlyA gene product, Rv1694 of *Mycobacterium tuberculosis*: A non-conventional hemolysin and a ribosomal RNA methyl transferase. BMC Biochem 11, 35. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-11-35>
  143. Muir S, Koopman MB, Libby SJ, Joens LA, Heffron F, Kusters JG. (1992) Cloning and expression of a *Serpula* (*Treponema*) *hyodysenteriae* hemolysin gene. Infect. Immun, 60(2):529-535. <https://doi.org/10.1128/iai.60.2.529-535.1992>
  144. Chu L, Burgum A, Kolodrubetz D, Holt SC. (1995). The 46-kilodalton-hemolysin gene from *Treponema denticola* encodes a novel hemolysin homologous to aminotransferases. Infect Immun, 63(11):4448-55. <https://doi.org/10.1128/iai.63.11.4448-4455.1995>
  145. Snyder RW, Ruhe J, Kobrin S, Wasserstein A, Doline C, Nachamkin I, Lipschutz JH. (2004). *Asaia bogorensis* peritonitis identified by 16S ribosomal RNA sequence analysis in a patient receiving peritoneal dialysis. Am J Kidney Dis, 44(2):e15-7. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2004.04.042>
  146. Gouby A, Teyssier C, Vecina F, Marchandin H, Granolleras C, Zorogniotti I, & Jumas-Bilak E. (2007). *Acetobacter cibirongensis* bacteremia in human. Emerging infectious diseases, 13(5), 784–785. <https://doi.org/10.3201/eid1305.060532>
  147. Greenberg DE, Shoffner AR, Zelazny AM, Fenster ME, Zarembek KA, Stock F, Ding L, Marshall-Batty KR, Wasserman RL, Welch DF, Kanakabandi K, Sturdevant DE, Virtaneva K, Porcella SF, Murray PR, Malech HL, Holland SM. (2010). Recurrent *Granulibacter bethesdensis* infections and chronic granulomatous disease. Emerging infectious diseases, 16(9), 1341–1348. <https://doi.org/10.3201/eid1609.091800>

# ANEXOS



## La hemolisina de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología Molecular y Celular. 421 EMA1. Biomedicina, Facultad de Medicina. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 13 sur 2702, Col. Volcanes, Puebla, Puebla. <sup>2</sup> Centro de Investigaciones Microbiológicas-BUAP

### Introducción

Las bacterias del ácido acético son un gran aliado en la industria alimentaria siendo un gran productor de ácido acético, y en aplicaciones biotecnológicas utilizándose como biofertilizante.

Tabla 1. Ejemplo de bacterias ácido acéticas		
<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Gluconacetobacter johannae</i>
<i>A. pasteurianus</i>	<i>G. asaii</i>	<i>G. liquefaciens</i>
<i>A. cerevisiae</i>	<i>G. cerinus</i>	<i>G. diazotrophicus</i>

Sin embargo, se han informado casos humanos de bacteriemia, peritonitis, linfadenitis, endocarditis y neumonía posoperatoria, asociados con bacterias del ácido acético. En este trabajo se presentan algunas evidencias sobre el posible papel patogénico de *G. diazotrophicus* debido a la capacidad hemolítica de esta bacteria.

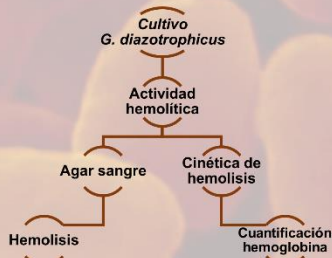
Tabla 2. Bacterias ácido acéticas asociadas con diferentes patologías

Lugar	Genero y edad	Manifestaciones	Identificación
Noviembre 2002 Hospital de la Universidad de Pennsylvania, USA	Mujer 41 años	Diates mellitus Dialisis peritoneal	<i>Asaia bogorensis</i>
Abril 2003 Centro Clínico NIH, Bethesda, EUA	Hombre 39 años	Enfermedad granulomatosa crónica Linfadenitis	<i>Gluconacetobacter sacchari</i> <i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>
Febrero 2005 Hospital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, Francia	Hombre 40 años	Adicción a las drogas Bronquitis	<i>Acetobacter cibirongensis</i>
Enero 2007 Hospital Sainte Marguerite, Francia	Hombre 31 años	Fibrosis quística Trasplante de pulmón	<i>Acetobacter indonesiensis</i>
2003-2008 Centro Clínico NIH, EUA-Panamá	Hombres 13-39 años	Enfermedad granulomatosa crónica Linfadenitis	<i>Granulibacter bethsensis</i>

### Objetivo

Demostrar la presencia de una hemolisina de *G. diazotrophicus* como posible factor de virulencia en la bacteria.

### Esquema:



### Resultado

*G. diazotrophicus* produjo una hemólisis alfa cuando creció en placas de agar sangre. Mientras que la actividad hemolítica medida espectrofotométricamente mostró liberación de hemoglobina en pruebas realizadas en diferentes momentos.

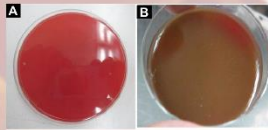


Figura 1. La actividad hemolítica de las placas de agar sangre de *G. diazotrophicus*. A. Placa de agar sangre no inoculada; B. La hemólisis alfa producida por *G. diazotrophicus*.

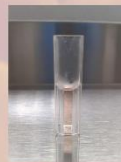


Figura 2. Cinética de liberación de hemoglobina.

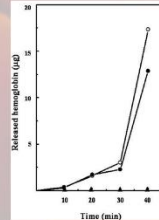


Figura 3. Medición de la actividad hemolítica utilizando bendicina. Actividad hemolítica de *G. diazotrophicus* (●); actividad hemolítica de *E. coli* (control positivo) (○); control negativo (▲).

### Discusión

Las bacterias del ácido acético son consideradas como una herramienta en biotecnología, sin embargo la literatura nos marca infecciones por estos microorganismos en pacientes humanos alrededor del mundo. Esto nos da la pauta de considerarlos como nocivos para la salud.

### Conclusión

*G. diazotrophicus* tiene la capacidad de producir hemólisis.

### Agradecimientos

Agradecimiento a la Facultad de Medicina-BUAP por las facilidades brindadas como apoyo económico para el desarrollo de este trabajo. En el laboratorio por su colaboración con Sahian y Alejandra. Mientras que en tiempos difíciles para Eduardo. Finalmente a mis padres y mi hermana por el entusiasmo, haciéndome mirar hacia el futuro.

### References

Bittar, F., Reynaud-Gaubert, M., Thomas, P., Boniface, S., Raoult, D., & Rolain, J. M. (2008). *Acetobacter indonesiensis* pneumonia after lung transplant. *Emerging infectious diseases*, 997-998.

Gouby, A., Teyssier, C., Vecina, F., Marchandin, H., Granolleras, C., Zorogniotti, I., & Jumas-Bilak, E. (2007). *Acetobacter cibirongensis* bacteremia in human. *Emerging infectious diseases*, 784-785.

Greenberg, D. E., Ding, L., Zelazny, A. M., Stock, F., Wong, A., Anderson, V. L., Miller, G., Kleiner, D. E., Tenorio, A. R., Brinster, L., Dorward, D. W., Murray, P. R., ... Holland, S. M. (2006). A novel bacterium associated with lymphadenitis in a patient with chronic granulomatous disease. *PLoS pathogens*, 28.

Prabudoss, V., & Stella, D. (2009). Isolation and Nitrogen Fixing Efficiency of novel diazotrophic *Gluconacetobacter diazotrophicus* associated with different Sugar Rich crops. *Glob. J. Env. Res.*, 96-98.