

highest value of b_4+18/b_4 . In the other set we observed light differences between peptides except when Lys and Arg are the amino acids lost during rearrangement which suggest that the stability of the neutral molecules formed for this two amino acids are superior than the other.

We also synthesized five pentapeptides with the same amino acid composition, but the arginine residue was located at different positions along the sequence and the results showed that this amino acid facilitated the rearrangement when it was located at position n-1.

Our results confirmed that this phenomenon is strongly influenced by the basicity of the amino acids within the sequence. In the CAD spectra of a peptide

with the sequence KGIEF the ions of b_4+18 and b_4 has similar intensities, although for the peptide with Gln instead of Lys the rearrangement was almost insignificant. It was found that the appearance of this fragmentation allow to differentiate this two isobaric amino acids.

REFERENCES

1. GROSS, M. L. *et al.* (1989). *J. Am. Chem. Soc.* **111**:2835-2842
2. GASKELL, S. J. *et al.* (1990). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1**:249-257
3. TAKAO, T. *et al.* (1991). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5**: 312-318.

ALGUNAS CARACTERISTICAS DE STICHOLYSINA, UNA NUEVA CITOLISINA DE *Stichodactyla helianthus*

C. Alvarez¹, M Tejuca¹, Vivian Morera², Vladimir Besada², F Pazos¹, R Veitia¹, M C Luzardo¹, A M Acevedo¹, Gabriel Padrón² y M. E. Lanio¹.

¹Departamento de Bioquímica, Fac. de Biología, UH. ²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal 6162. La Habana 6, Cuba.

INTRODUCCION

Sticholysina es un polipéptido básico (pI = 9,8), purificado de la anémona *Stichodactyla helianthus* de alrededor 18 kDa de masa molecular. Se caracteriza por una potente actividad hemolítica ($H_2C_{50} = 25-30$ ng/mL) la cual es activada (Ca^{2+} , Mg^{2+}) o inhibida (Co^{2+} , Mn^{2+}) por diferentes iones divalentes y presenta una moderada actividad fosfolipásica y actividad anticoagulante (1, 2, 3). Otro factor que modula la actividad hemolítica (AH) es el pH del medio.

A partir de los estudios de pH se pudo demostrar que la AH no depende de manera significativa, de su actividad fosfolipásica (4). Resultados preliminares habían sugerido que el incremento de la fuerza iónica del medio provocaba un aumento de la AH (1). En el presente trabajo se muestran otras características moleculares y funcionales de esta citolisina y el estudio de la influencia de la fuerza iónica sobre el mecanismo hemolítico de Sticholysina.

MATERIALES Y METODOS

La AH fue estimada como ha sido previamente informada (1). El perfil de hidropatía se trazó a partir de los estimados de Kyte y Doolittle (5). El curso temporal de la hemólisis fue determinado según (6), a partir de la caída de la turbidez de una suspensión eritrocitaria.

RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de la secuencia aminoacídica de Sticholysina (8) se procedió a realizar el perfil de hidropatía del polipéptido. El análisis del perfil de hidropatía de la citolisina revela la presencia de una zona de Índice medio de hidrofobicidad positiva extendida a partir del aminoterminal, la cual se encuentra seguida de zonas alternas negativas y positivas para concluir en una zona negativa relativamente importante cercana al carboxilo terminal. Estos resultados indican la posible importancia de la región aminoterminal de la proteína en su inserción a la membrana, lo cual permitiría justificar molecularmente su elevada capacidad membranotrópica.

Se determinaron los parámetros cinéticos que caracterizan la actividad fosfolipásica de este polipéptido ($K_m = 19$ mM; $V_m = 0.06$ mU/mg y $K_{cat} = 1.1$ min⁻¹).

Por otra parte, en un sistema eritrocitos-liposomas se comprobó la capacidad fusogénica de esta citolisina mediante la incorporación de la radioactividad asociada a los liposomas al sistema eritrocitario.

La fuerza iónica del medio provocó la agregación de Sticholysina en solución en estructuras oligoméricas de mayor efectividad hemolítica. Tal agregación tiene lugar de manera inmediata. Este proceso se favorece con la

temperatura, al menos hasta 37°C, lo cual apoya la hipótesis de que la formación del oligómero está mediada por interacciones hidrofóbicas. La preincubación de Sticholysina en un medio desprovisto de sales origina la pérdida de su AH y ésta se recupera por la adición de fuerza iónica al medio de incubación.

Estos resultados aportan nuevas evidencias sobre el mecanismo de acción de Sticholysina, en particular, sobre el importante papel de la fuerza iónica del medio sobre su actividad biológica, lo cual pudiera estar relacionado con los mecanismos de regulación de su actividad en el entorno actual en que ejerce su función.

REFERENCIAS

1. TEJUCA, M. *et al.* (1994). *Biología* **8** (1).
2. VEITÍA, R. *et al.* (1994). *Biología* (en prensa).
3. DÍAZ, A. *et al.* (1992). *Rev. Iberoamer Tromb Homeost.* **5**: 8-11
4. TEJUCA *et al.* (1994) *Biología* (en prensa).
5. KYTE, J. and R. F. DOOLITTLE (1982) *J. Mol. Biol.* **157**:105-132
6. HARSHAMAN, S. and N. SUGG (1985) *Infect and Immunity* **25**:37-40.
7. KEM, W. and B. DUNN (1988). *Toxicon* **26** (11) 997-1008
8. MORERA, V. *et al.* (1994). *Biotecnología Habana 94. Libro de Resúmenes.*

PRIMARY STRUCTURE ANALYSIS OF THE HAEMOLYTIC POLYPEPTIDE Sticholysin ISOLATED FROM A SEA ANEMONE

Vivian Morera¹, J. Gómez¹, Vladimir Besada¹, Regla Estrada¹, T. Pons¹, C Alvarez²,
M. Tejuca², Gabriel Padrón¹, M. E. Lanio² and F. Pazos².

¹Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Apdo. 6162, La Habana 6. Cuba. ²Dept. of Biochemistry, Faculty of Biology, University of Havana, La Habana, Cuba.

INTRODUCTION

Sticholysin (STIC), a new discovered polypeptide isolated from the caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus* has been shown to have a potent haemolytic activity (HC₅₀=25-30 ng/mL) and moderate fosfolipase A₂ activity (15-20 mU/mg). Here we report the verification of 95% of the primary structure obtained by automated Edman degradation, amino acid analysis and mass spectrometry. Sequence alignment with protein databases revealed very high homology with other natural proteins.

MATERIALS AND METHODS

The last purification step of the protein was HPLC in a reversed phase (rp) column C8 using an acetonitrile gradient (in 0.1% TFA).

Peptides from trypsin digestion were isolated by using a rp-C18 column. Amino acid analysis of the hydrolyzed protein was performed by the automatic analyzer Alpha Plus 4151 (LKB, Sweden). Protein was previously oxidized by performic acid. Intact protein and isolated peptides were sequenced in a dual-phase automatic sequencer 810 (KNAUER, Germany), released amino acids were detected on line by rp-HPLC. Fast atom bombardment (FAB) mass spectra of the tryptic peptides were

obtained in a double sector mass spectrometer HX-110HF (JEOL, Japan) at 10 kV accelerating voltage. Electrospray (ESI) mass spectrum was acquired in the first stage of a tandem HX-110HF spectrometer. Similarity between sequences were found by searching in SWISSPROT database with FASTA program. CLUSTALV program was used for multiple sequence alignments.

RESULTS AND DISCUSSION

The protein was finally obtained with high purity by rp-HPLC and then verified by SDS-PAGE, migrating as a single band close to the 18 kDa molecular weight marker. Amino acid analysis of the totally hydrolyzed protein was performed after performic acid oxidation of cysteines and methionines. Cysteic acid was not found and therefore our protein is cystein free. The calculated molecular mass considering the amino acid analysis and excluding triptofan and proline was 17 899.0 and the experimental molecular mass obtained by ESI mass spectrometry of the intact protein was 19 401 ± 11 Da.

Amino terminal sequencing of the purified protein exhibits exactly the same amino acids per cycles (up to cycle 29) than the already reported Cytolysin-III, which