



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

### III. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29  
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

#### ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Kukutxeztula: gaitz  
zaharrarentzako konponbide  
berrien bila**

*Xabier Fernandez-Martinez,  
Jone Amuategi, David González-  
Bullón, Kepa Beloso-Urbe eta  
Helena Ostolaza*

130-137 or.  
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.05.18>



## Kukutxeztula: gaitz zaharrarentzako konponbide berrien bila

Fernandez-Martinez, Xabier<sup>1</sup>; Amuategi, Jone<sup>1</sup>; González-Bullón, David<sup>1</sup>;  
Belloso-Urbe, Kepa<sup>1</sup> eta Ostolaza, Helena<sup>1</sup>

*Biokimika eta Biologia Molekularra saila eta Biofisika Institutua (UPV/EHU, CSIC)*  
*joneamuategi@gmail.com / xfernandez016@ikasle.ehu.eus*

### Laburpena

Arnasbideetako infekzioek heriotza tasa altuak eragiten dituzte munduan. Infekziorik kutsakorrenen artean dago *Bordetella pertussis* bakterio patogenoak eragindako kukutxeztula. *B. pertussis*ek jariatzen dituen birulentzia faktoreen artean arriskutsuenetako bat da Adenilato Ziklasa Toxina (ACT). Informazio asko bildu den arren, oraindik ez da zehazki deskribatu zelula ostalaria erasotzeko erabiltzen duen mekanismo molekularra. Ikerketa honetan, toxina eta mintzaren arteko elkarrekintzan lipido konposizioak daukan eragina aztertu da. Eskuratutako emaitzetatik kolesterolak toxinarekin aktibitatean eragin zuzena duela dela ondorioztatu da.

Hitz gakoak: *Bordetella pertussis*, adenilato ziklasa toxina, kolesterola, liposomak

### Abstract

*Infectious respiratory diseases are among the main death causes in humans worldwide. The bacterial pathogen Bordetella pertussis causes whooping cough, a highly contagious respiratory disease that remains an important cause of childhood morbidity and mortality. Adenylate Cyclase Toxin (ACT) is one of the important virulence factors secreted by this bacterium and has a crucial role in the early steps of colonization of the respiratory tract by the bacterium. The molecular mechanisms used by ACT to intoxicate the host cells are still poorly understood. In the present study we explored the effect of the lipid composition in the toxin interaction with lipid membranes. We conclude that ACT shows preference for the membrane cholesterol.*

*Keywords: Bordetella pertussis, Adenylate Cyclase Toxin, cholesterol, liposomes*

## 1. Sarrera eta motibazioa

Osasun publikoko arazoei erreparatu gero, komunikabideek aspaldidanik izan dute birusek eragindako epidemiei garrantzia emateko joera. Gaur egungo aldizkarietan, ebola eta dengue sukarrak dira protagonista. Hala ere, bakterio hauek ez dira mundu mailan heriotza-tasarik altuenak eragiten dituztenak. Askoren harridurarako, Osasunaren Mundu Erakundeak (OME) argitaratutakoaren arabera, azkenengo 15 urteetan heriotza tasarik altuenak eragin dituzten gaixotasunen artean kardiopatia iskemikoa, garun hodie loturiko eritasunak eta arnas bideetako infekzioak daude. Sinesten zaila izanagatik, arnasbideetako infekzioak dira gaixotasun kutsakorrik hilgarrienak<sup>1</sup>.

Arnasbideetako infekzioen artean aski ezaguna da kukutxeztula. *Bordetella pertussis* bakterioak sortutako gaixotasuna da. Sintoma nahiko arruntak eragiten ditu: etengabeko ez-tul gertakariak, arnasa hartzeko zailtasuna eta sukarra, besteak beste (Kilgore *et al.*, 2016). Pertsona helduetan arrisku handirik ez duen arren, umeetan heriotza eragin dezake. Izan ere, *B. pertussis*-ek immunitate sistemako zelulak ere erasotzen ditu. Kukutxeztularen ondorioz hiltzen diren gaixoen %90a pneumonia bezalako konplikazioengatik hiltzen da.

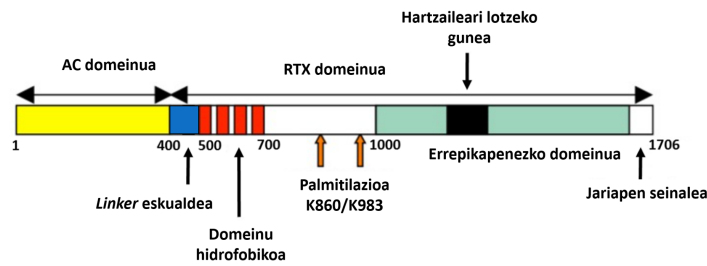
Kukutxeztularen aurkako txertoa 1940an garatu eta geroztik herrialde garatuengan gaixotasunak eragindako heriotza tasa izugarri jaitsi zen. Esaterako, AEB-etan 1980an gaixotasunaren intzidentzia 100.000 biztanleko pertsona bakoitzeko zen. Hala ere, azken hamarkadetan kasu kopurua era kezkagarrian igo da. AEBko intzidentzia kopurua 2012an 1980an baino 9 aldiz handiagoa zen. Bestalde, Brasilen kasu kopurua 2011tik 2014ra bikoiztu egin zen. Beste herrialde askok kukutxeztul kasuen igoera jasaten ari direla jakinarazi dute, esaterako, Erresuma Batuak, Australiak, Argentinak eta Kanadak (Argondizo-Correia *et al.*, 2019).

<sup>1</sup>[www.who.int](http://www.who.int)

*B. pertussis*-ek birulentzia faktore desberdinak jariatzen ditu eta horien artean garrantzitsuenetako bat Adenilato Ziklasia toxina-hemolisina (ACT) da. Oso proteina berezia da ia edozein zelulari lotu eta bere AC domeinu katalitiko zuzenean zelula barnera sartzeko gai delako. Aipagarria da mintz plasmatikoa gurutzatzeko daukan gaitasuna, ez duelako poro baten bidez edo endozitosi bidez egiten; zuzenean mintzean zehar translokatzeko da oraindik guztiz ezaguna ez den prozesu baten bidez. ACT gai da batez ere odoleko eta immunitate sistemako zenbait zelula kaltetzeko, CD18 integrina hartzaileak makrofago eta zelula dendritikoak, hain zuzen ere.

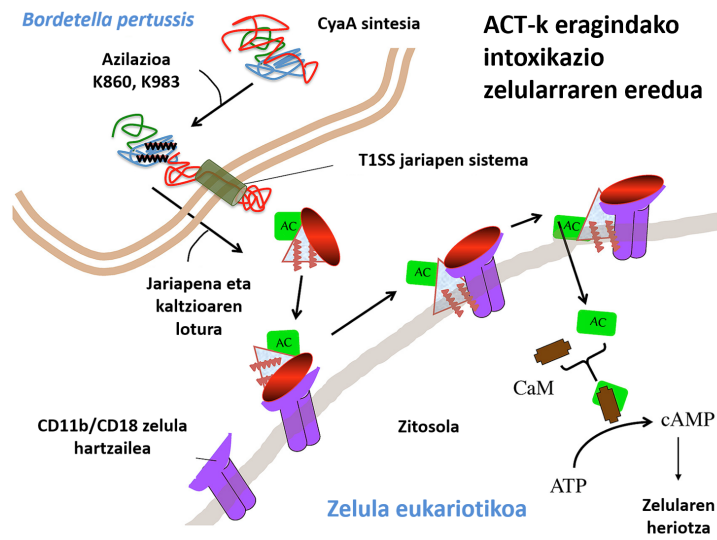
**1. irudian** ikus daitekeenez, egitura eta funtzioari dagokionez, ACT bi domeinu nagusik osatzen dute (Gross *et al.*, 1992). Alde batetik, AC domeinu katalitikoak zelula barnean kontrolik gabeko AMP ziklikoaren (cAMP) sintesia eragiten du, ATP kontsumituta. Honek, seinaleztapen prozesuak asaldatu eta zelularen apoptosia eragiten du. Bestalde, *Repeats in ToXins* (RTX), domeinu hemolitiko edo poro sortzaileak, mintzetan katioiekiko selektiboak diren poroak sortzeko gaitasuna du. Honela, kaltzio-sarrera azkarra eta zelula barneko potasioaren irteera eragingo ditu, ioi-homeostasia desorekatuz. Honek, zelularen lisia eragiten du (Ladant eta Ullmann, 1999). Bi domeinu hauek lotzen *Linker* eskualdea dago eta mintzekin elkarrekiteko gaitasuna duela uste da (Subrini *et al.*, 2013).

**1. irudia. B. pertussisen ACT toxinarene domeinuen irudikapena (Masin *et al.*, 2015). Aminoazidoen posizioa zenbakiz adierazi da.**



Hipotesi desberdinak proposatu diren arren, oraindik ez da toxinarene translokaziorako mekanismo zehatzik deskribatu. Gaur egun onartuen dagoena **2. irudian** deskribatutakoa da (O'Brien *et al.*, 2018). AC domeinuaren translokazioaren azken pausoa translokazioaren azken pausua lipid raft deituriko mintzaren mikrodomeinuetan gertatzen dela proposatu da. Eskualde hauek, besteak beste, kolesterol eta esfingomielinatan aberatsak dira. Horretaz gain, ACT toxinak A fosfolipasa aktibitate intrintsekoa duela ikusi da González-Bullón *et al.* (2017). Beraz, ACT-ak fosfolipidoen lehenengo nahiz bigarren posizioako gantz azidoak mozteko berezko gaitasuna dauka, eta honek poroen sorrera erraztu dezakeela uste da.

**2. irudia. ACT-aren domeinu katalitikoaren (AC) translokazioa azaltzen duen erudia (O'Brien *et al.*, 2018). Behin toxina jariatuta, kaltzioa lotzen zaio eta konformazio aktiboa hartzen du. AC domeinuaren aktibitateko ezinbestekoa da zelula barrura translokatzeko, kalmodulina (CaM) lotzea.**



## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Toxinak eragindako zitotoxizitatearen erantzule nagusia itu-zelulen zitosomean gertatzen den cAMP-ren ekoizpena da. Gaixotasunari aurre egiteko baliabideak diseinatze aldera, ezinbestekoa da translokazioaren eredu argi eta ulergarri bat planteatzea. Horregatik, ikerketa honen helburu nagusia, AC domeinuaren translokazioa maila molekularrean hobeto ulertzea izan zen. Translokazioa zuzena izan dadin, AC domeinuaren eta zelularen mintzaren arteko elkarrekintza gertatu beharko litzateke. Elkarrekintza hau frogatzeko, esperimentu desberdinak erabili ziren. Prozesua hobeto ulertze aldera, helburu zehatzagoak planteatu ziren:

- ACT toxina basatiak, bigeruzak lipidikoetara batzen denean, lortzen duen topologia eta lipido konposizio ezberdinetako mintzek topologian duten eragina aztertzea.
- ACT toxinak eragindako mintz desegonkortasunean lipido konposizioak, eta bereziki kolesterolak, duen eragina aztertzea.
- Lipido konposizioak ACT toxinaren A fosfolipasa aktibitatean duen eragina aztertzea.
- AC domeinu isolatuak mintz ereduarekin elkarrekintzen duen aztertzea eta elkarrekintza horretan mintzen konposizioak, pH-ak eta indar ionikoak daukaten eragina aztertzea.

## 3. Ikerketaren muina

ACT toxinaz gain, bere AC domeinu isolatua ere aztertu da. Horretarako AC489 proteina mutantea erabili da, ACT-ren lehenengo 489 aminoazidoak dauzkana, AC domeinua eta gorago aipatutako linker sekuentzia barne. Izan ere, Karst eta kideek (Karst *et al.*, 2012) deskribatu zuten mintzekin elkarrekiteko gaitasuna zuela. Bi proteina hauek mintzekin daukaten elkarrekintza aztertzeke zelulak erabili beharrez, mintz biologikoen eredu diren liposomak erabili dira, konkretuki Large Unilamellar Vesicles (LUV) edo geruzak bakarreko liposoma handiak. Tamaina uniformeak dute eta uretan solugarriak diren solutu mota desberdinak kapsulatzea baimentzen dute. Gainera, mintzaren konposizioa (lipido mota eta proportzioa) aukeratu genezake. Erabilitako liposomek hainbat fosfolipido (DOPC), esfingolipido (SM) eta kolesterol (Chol) konbinazio zituzten.

### 3.1. ACT eta LUVen arteko elkarrekintza

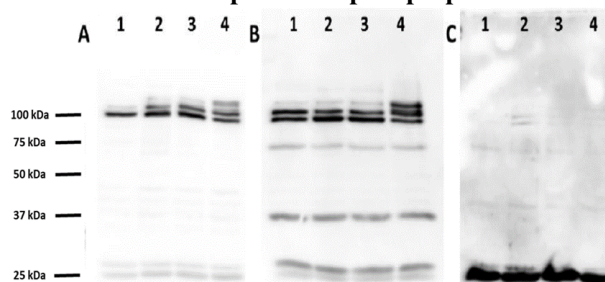
Hasteko, proteinak mintzetan txertatzean lor dezakeen konformazioari eta topologiari buruzko informazioa eskuratzeko, ACTa LUV-ekin inkubatu ostean, proteolisi esperimentuak burutu ziren tripsinarekin. Erabilitako LUV konposizioak DOPC (1), DOPC:Chol (3:1) (2), DOPC:Chol (2:1) (3), DOPC:Chol (1:1) (4) izan dira. SDS-PAGE elektroforesia eta transferentzia erdi-lehorra egin dira. Azkenik, proteinaren identifikaziorako Western Blotting teknika erabili da.

Hemen erakusten ez den arren, toxina basatia soluzioan baldintza berdinetan inkubatu zenean, peptido txikietan guztiz degradatzen zela ikusi zen. Hau proteasen mozketak puntuak eskuragarri zeudelako izan liteke. Aldiz, toxina basatia LUV-ekin inkubatzeko (3. irudia) pisu molekular handiagoko bandak eskuratu ziren. Izan ere, mintzak edo proteina-proteina arteko elkarrekintzek, moduren batean, toxinari babesa eskaintzen diotela uste dugu. Babes hau kolesterol portzentajea handitu ahala emendatzen zela ikusi genuen. Honen ondorioz, kolesterolak izan ditzakeen efektu desberdinen artean, mintzetan toxinaren txertaketa eta oligomerizazioa errazten dituela ondorioztatu dugu. Honetaz gain, beste gelek alderatuz, toxina kontzentrazioarik diluituena duen gelean (3. irudia, C atala) toxina ia guztiz degradatzen zela ikusi genuen. Ondorioz, toxinaren kontzentrazioa handitzeak oligomerizazioa errazten duela ere iradokitzen dugu.

Azkenik, errebelatzeko erabili genuen antigorputzaren epitopoa RTX domeinuan dagoenez, eta toxinaren pisu molekularra 200 kDa-ekoa denez, AC domeinua mintzetik kanpo geratu dela ondorioztatu dugu. Izan ere, mintzaren babesa jaso ezean guztiz degradatzen dela esan liteke.

Esperimentu hauekin hurrengo ondorioa azpimarra dezakegu: kolesterolaren presentziak bigeruzak lipidikoan ACT toxina basatiaren txertaketa edo/eta oligomerizazioa handitzen ditu, efektua kolesterol kontzentrazioarekiko proportzionala izanik. Maximoa kolesterolaren proportzioa % 50 denean (zelula eukariotoen mintzetan kolesterolak duen portzentajea) lortzen da. Bestalde, ACT toxina basatia bigeruzak lipidikoan txertatzean AC domeinu katalitikoak bigeruzatik kanpo kokatzen dela iradoki daiteke, tripsinarekiko mozketak-gune eskuragarriak erakutsiz. RTX domeinua, aldiz, babestuta gelditzen da. Babes hori AC domeinua proteina-proteina elkarrekintzan inplikaturik egon daitekelako lortzen dela aurrean dezakegu.

**3. irudia. ACT toxinarene proteoliposomen proteolisia. Erabilitako LUV konposizioak DOPC (1), DOPC:Chol (3:1) (2), DOPC:Chol (2:1) (3), DOPC:Chol (1:1) (4) izan dira. 250  $\mu$ M LUV eta 1:250 (A), 1:1000 (B) eta 1:2500(C) izan dira erabilitako proteina:lipido proportzioak.**

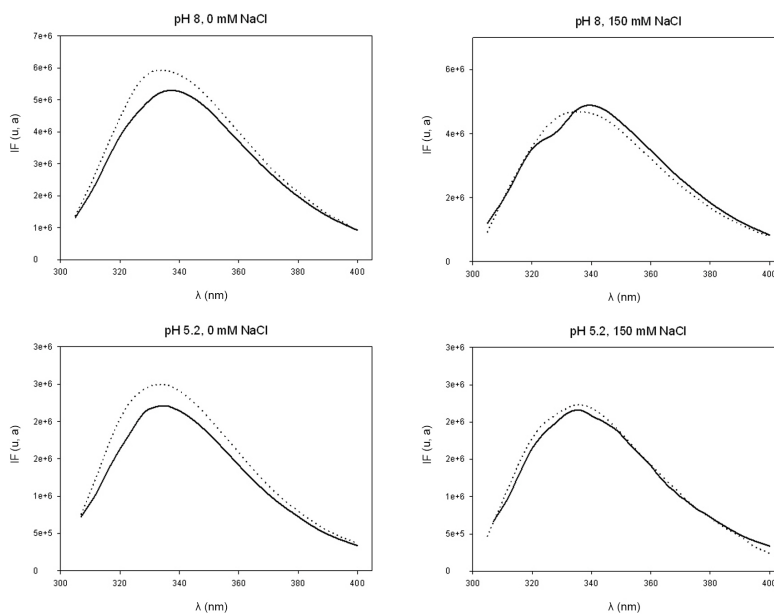


### 3.2. AC489 eta LUVen arteko elkarrekintza

AC489-ren kasuan, uste da mintzekin duen elkarrekintzak AC domeinuaren ondoren dagoen linker sekuentziarekin zerikusia duela. AC domeinua 1-384 aminoaziodetan dago, beraz, AC489 proteinak 100 aminoazido inguruko sekuentzia linkerra barne dauka. Sekuentzia horretan 3 triptofano daudenez (indol eraztuna duen aminoazido bat), bere fluoreszentzia propietateak aprobeztatu dira AC489 eta LUVen arteko elkarrekintza aztertzeko. Triptofanoak 295 nm-ko uhin luzeran kitzikatuz gero, fluoreszentzia emititzen dute 310-400 nm tartean. Proteinak eta mintzek elkarrekintza bat badute, triptofanoei gehiago kostatuko zaie kitzikapenean jasotako energia disipatzea. Ondorioz, fluoreszentziaren intentsitatea handiagoa izango da elkarrekintzarik egotekotan.

Beraz, triptofanoen fluoreszentzia neurtuta **4. irudian** ikus daitezkeen emaitzak lortu dira. AC489-ren fluoreszentzia neurtu da, LUV-ekin eta LUV-rik gabe, gatzdun eta gatzik gabeko disoluzioan, pH 8 eta pH 5.2-an. Lehen esan bezala, liposomen presentzia fluoreszentziaren intentsitatearen igoera bat gertatzekotan, elkarrekintza bat egon dela ondorioztatzen dugu. Beraz, AC489 mintz-ereduekin interakzionatzeko gaitasuna dauka aztertutako bi pH-etan, gatzik gabeko ingurunean dagoenean.

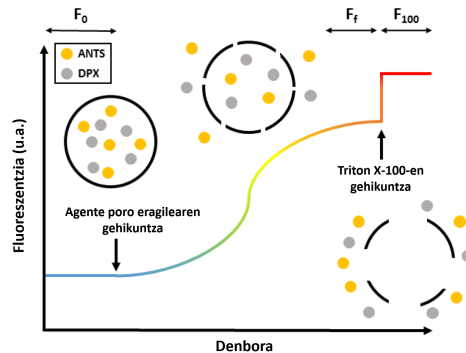
**4. irudia. 250 nM AC489 kontzentrazioan, fluoreszentzia espektroen alderaketa, toxina soluzioan egonda eta toxina 100  $\mu$ M LUV-ekin inkubatuta, pH eta NaCl egoera ezberdinetan. Marra etenak LUV-ekin egindako espektroak dira eta marra zuzenak toxina bakarrik soluzioan egindako espektroak.**



### 3.3. ACT-k eta AC489-k eragindako solutuen askapena

Kolesterolak toxinaren konformazioan eta topologian duen eragina aztertu ostean, ACT-ak mintzak desegonkortzeko duen gaitasunean eraginik ote zeukan aztertu nahi izan genuen. Horretarako, solutu fluoreszenteen askapena neurtu genuen. ANTS molekula fluoreszentea eta bere amatatzailea den DPX-a konposizio desberdinetako LUV-ak erabiliz kapsulatu genituen. **5. Irudian** adierazi den bezala toxinak mintzak desegonkortuz eta solutuak askatuz gero, kanpo medioan diluitu eta fluoreszentzia emendatuko litzateke (Smolarsky *et al.*, 1977).

#### 5. irudia. Molekula fluoreszenteen askapen saioaren irudikapen grafikoa.



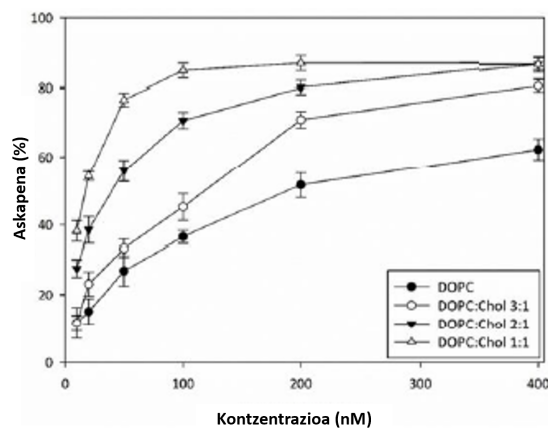
Fluoreszentzia maximoa jakiteko detergente bat gehitu dugu eta askapen portzentajeak ondorengo formularekin kalkulatu dira:

$$\text{Askapen}\% = \frac{F_f - F_0}{(F_{100} - F_0)} \cdot 100 \quad (1)$$

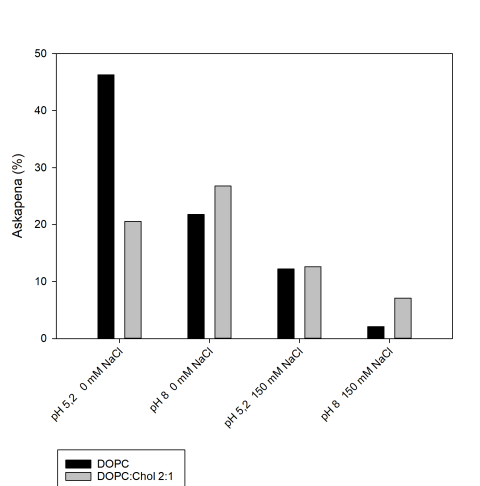
- ACT gehitu aurreko minutuaren fluoreszentzia basala ( $F_0$ ).
- ACT gehitu osteko hurrengo 28 minutuen fluoreszentzia ( $F_f$ ).
- Triton X-100 gehitu osteko azken minutuaren fluoreszentzia ( $F_f$ ). Tritoiaren amaierako kontzentrazioa, % 0,01 [p/b] besikulak disolbatzeko nahikoa izan da.

**6. irudiari** erreparatuz, ACT-a erabilitako konposizio lipidikodun LUV-ak iragazkor bihurtzeko gai zela ikusi genuen, askapena nahiko azkar gertatzen zelarik. Askapen portzentajerik handienak %50-ko kolesterol portzentajearekin eskuratu genituen.

#### 6. irudia. Lipido konposizio bakoitzerako ACT kontzentrazio desberdinekin lortutako askapen maximoak (%)



### 7. irudia. DOPC eta DOPC:Kolesterol (2:1 mol:mol) osatutako LUV-etan 250 nM AC489-k eragindako edukien askapen maximoa.



Besikulen edukien askapena eragiteko ACTren gaitasuna aztertu ondoren, kolesteroldun eta kolesterolik gabeko liposometan, AC domeinu isolatuaren (AC489) ahalmena ere aztertu da. Honetarako, ACTrekin jarraitutako prozedura berbera erabili da baina bere ordez AC489 proteina erabilia. **7. irudian** ikusten da kasu bakoitzean lortu zen askapen ehuneko maximoa. Aipagarria da esatea AC489-ren kasuan interesgarria zela pH-ak eta ingurunekeo NaCl kontzentrazioak bere gain zeukan eragina ere aztertzea.

Askapen saio hauetako emaitzak laburtzearen, ikusi dugu nola bai ACT eta bai AC489 gai diren DOPC eta DOPC:Kolesterol liposometan edukien askapen bat sortzeko. Gainera, liposometako kolesterol kontzentrazioa handitzeak, ACT proteinaren eraginkortasuna handitu du, askapen ehuneko maximo handiagoak lortuta. AC489-ren kasuan, gainera, aztertu dugu nola indar ioniko gabezia (inguruan NaCl ez dagoenean) gai den askapena eragiteko. Liposometan kolesterola dagoenean, askapen maximo apur bat txikiagoak lortu diren arren, kolesterolaren presentzian askapena askoz azkarragoa izan da kolesteroldun liposometan (3-5 aldiz azkarragoa); nahiz eta lan hau konplexuago ez bihurtzeko, irudiak ez ditugun gehitu. Hortaz, pentsa dezakegu batez ere ACT toxina afinitateren bat daukala mintzeko kolesterolarekin.

### 3.4. ACTaren fosfolipasa $A_2$ aktibitatearen neurketa

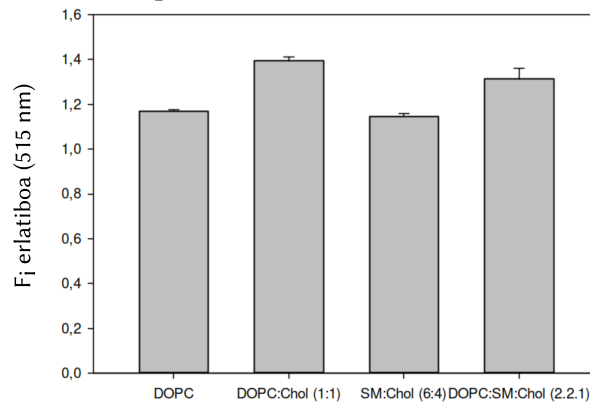
Azken urteotan, hainbat toxina bakterianok lipasa aktibitate intrintsekoak dituztela jakin da. Konkretuki, ACT toxina berezko  $A_1$  eta  $A_2$  fosfolipasa aktibitateak dituela ikusi da (González-Bullón *et al.*, 2017). Fosfolipasa aktibitatearen ondorioz askatzen diren lisofosfolipidoek, eta hauen kurbadura positiboak, mintz arteko flip flop mugimenduak eragiten dituztela uste da. Honek poroen sorrera erraztu eta, ondorioz, translokazioan lagundu dezakeela susmatzen dugu, aktibitate zitotoxikoa faboratuz.

Fosfolipasa aktibitatean lipido konposizioak, eta bereziki kolesterolak, izan dezakeen eragina determinatzeko, lipido konposizio desberdinetako liposomak prestatu dira, PED6 substratu fluorogenikoa gehituz. Honek bigarren gantz azidoan zunda fluoreszente bat eta buru polarrari konjugatuta dinitrofenol taldea ditu. Hauen artean quenching efektua gertatuko da. Baina, glizerolaren bigarren karbonoari lotutako gantz azidoa askatuz gero, fluoreszentzian emendio bat ikusiko genuke berriro ere.

Fluoreszentzia erlatiboa kalkulatu da, 30. minutuko espektroa ( $F_{max}$ ) kontrolaren espektroarekin ( $F_0$ ) zatitu da. Kontrol modura 0. minutuko fluoreszentzia espektroa, hau da, toxinarik gabekoa erabili da. **8. irudian** datuen prozesamendua egin ostean lortutako emaitzak adierazi dira.

Esfingomielina eta kolesterolez osatutako LUVetan oso aktibitate baxua detektatu genuen. Izan ere, egitura zurruna hartzen dutenez, toxina fosfolipasa aktibitatea erakusteko zailtasun handiagoak dituela uste dugu. DOPC-ak egitura fluidoa izan arren, kasu hauetan ere, nahiko aktibitate baxua detektatu genuen. Aitzitik,  $A_2$  fosfolipasa aktibitatearik altuena DOPC eta kolesterolezko LUV-ekin eskuratu zen. Konposizio honetako liposomek likido ordenatu eta desordenatuaren arteko egitura hartzen dutenez, toxinarentzat errazagoa da bertan sartzea. DOPC,

### 8. irudia. Fosfolipasa $A_2$ aktibitatearen neurketa 515 nm-tan.



esfingomielina eta kolesterola konbinatzen zituzten LUV-ek, berriz, bitarteko aktibitatea erakutsi zuten. Ondorioz, toxinak likido desordenatugan edo fluidoagoan jarduteko duen gaitasuna handiagoa dela iradokitzen dugu.

## 4. Ondorioak

Azken aldian, gizarteak egiten dugun guztiari erabilera bat topatzeko eskatzen digu eta zientzia ez da horren salbuespen. Zientzia aplikatua edo translazionala moda-modan dagoen garaian bizi gara eta oinarrizko ikerketak bere izen ona arriskuan ikusi du. Hala ere, pentsaera hau ez da oso zuzena. Izan ere, biomedikuntzan gertatzen diren aurrerapenek ikerketa akademikoa dute oinarritzat eta gizarteak aurrera egiteko bien konbinazioa ezinbestekoa da. Hain zuzen, ACT-aren inguruko ikerketaren aurrerabideak ikuspegi berriak zabaldu ditu oinarrizko ikerkuntzan nahiz aplikatuan (Chenal, 2018). Gaur egun, antigenoa daramaten garraiatzaileak edota ACTa daramaten txertoak sintetizatzen dira. Gainera, proteinen ingeniartzan oinarrituta, ACT-aren RTX domeinua erabili da kaltzio menpeko nanotresnak garatzeko (Bulutoglu eta Banta, 2017). Aipaturikoak, biobereizketan, hidrogel katalisian, ezagutza molekularreko prozesuetan erabili daitezke.

Ikerketa honek ACTak zelula ostalariari sartzeko erabiltzen duen mekanismoa argitzen laguntzeko ekarpenak egin ditu. Bilduriko emaitzei esker badakigu ACTak kolesterol proportzio altuak dituzten mintzekiko afinitate handiagoa duela. Aldi berean, froga honek onartuen dagoen translokazio teoriarekin (**2. Irudia**) bat egiten du. Proteinak kolesterolarekiko duen afinitateak kolesterola ezagutu eta hari lotzen zaion sekuentziaren bat, gutxienez, izan dezakela iradokitzen digu.

## 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Proteina osoaren sekuentzia eta domeinuen funtzioa ezaguna den arren, baliteke oraindik ezezagunak diren eginkizunak existitzea. Esaterako, beste zenbait toxinatan kolesterola ezagutzen duten adostasun guneak (*Cholesterol Recognizing Aminoacid Consensus*, CRAC) aurkitu dira, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*ek jariatutako leukotoxinak, kasu (Brown *et al.*, 2013). Duela gutxi egindako *in silico* azterketetan iragarri da ACTak 8 CRAC sekuentzia posible dituela. Etorkizunera begira, sekuentzia hauek toxina eta mintzaren arteko elkarrekintzan duten garrantzia ikertu nahi da. Teorikoki posible dela ikusi dugun arren esperimentera frogatzea ezinbestekoa da. Ikerketa honetatik lortutako emaitzetatik aurreikusten dugu ACTa, leukotoxinak bezala, CRAC domeinu hauetaz baliatu daitekeela mintzarekin elkarrekiteko.

## 6. Erreferentziak

- Argondizo-Correia, Carolina, Ana Kelly Sousa Rodrigues, eta Cyro Alves de Brito. 2019. Neonatal immunity to bordetella pertussis infection and current prevention strategies. *Journal of Immunology Research* 2019.
- Brown, Angela C, Nataliya V Balashova, Richard M Eband, Raquel F Eband, Alvina Bragin, Scott C Kachlany, Michael J Walters, Yurong Du, Kathleen Boesze-Battaglia, eta Edward T Lally. 2013. Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin utilizes a cholesterol recognition/amino acid consensus site for membrane association. *Journal of Biological Chemistry* 288.23607–23621.



- Bulutoglu, Beyza, eta Scott Banta. 2017. Block v rtx domain of adenylate cyclase from bordetella pertussis: A conformationally dynamic scaffold for protein engineering applications. *Toxins* 9.289.
- Chenal, Alexandre, 2018. An introduction to the toxins special issue on the adenylate cyclase toxin.
- González-Bullón, David, Kepa B Uribe, César Martín, eta Helena Ostolaza. 2017. Phospholipase a activity of adenylate cyclase toxin mediates translocation of its adenylate cyclase domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114.E6784–E6793.
- Gross, Mary K, Douglas C Au, Arnold L Smith, eta Daniel R Storm. 1992. Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional cyaa toxin of bordetella pertussis abolish virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.4898–4902.
- Karst, Johanna C, Robert Barker, Usha Devi, Marcus J Swann, Marilyne Davi, Stephen J Roser, Daniel Ladant, eta Alexandre Chenal. 2012. Identification of a region that assists membrane insertion and translocation of the catalytic domain of bordetella pertussis cyaa toxin. *Journal of Biological Chemistry* 287.9200–9212.
- Kilgore, Paul E, Abdulbaset M Salim, Marcus J Zervos, eta Heinz-Josef Schmitt. 2016. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clinical microbiology reviews* 29.449–486.
- Ladant, Daniel, eta Agnes Ullmann. 1999. Bordetella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in microbiology* 7.172–176.
- Masin, Jiri, Radim Osicka, Ladislav Bumba, eta Peter Sebo. 2015. Bordetella adenylate cyclase toxin: a unique combination of a pore forming moiety with a cell invading adenylate cyclase enzyme. *Pathogens and disease* 73.
- O'Brien, Darragh P, Ana Cristina Sotomayor Perez, Johanna Karst, Sara E Cannella, Enguéné Véronique Yvette Ntsogo, Audrey Hessel, Dorothée Raoux-Barbot, Alexis Voegelé, Orso Subrini, Marilyne Davi, eta others. 2018. Calcium-dependent disorder-to-order transitions are central to the secretion and folding of the cyaa toxin of bordetella pertussis, the causative agent of whooping cough. *Toxicon* 149.37–44.
- Smolarsky, Moshe, Dvora Teitelbaum, Michael Sela, eta Carlos Gitler. 1977. A simple fluorescent method to determine complement-mediated liposome immune lysis. *Journal of immunological methods* 15.255–265.
- Subrini, Orso, Ana-Cristina Sotomayor-Pérez, Audrey Hessel, Johanna Spiaczka-Karst, Edith Selwa, Nicolas Sapay, Rémi Veneziano, Jonathan Pansieri, Joel Chopineau, Daniel Ladant, eta others. 2013. Characterization of a membrane-active peptide from the bordetella pertussis cyaa toxin. *Journal of Biological Chemistry* 288.32585–32598.

## 7. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau gure gradu amaierako lanetik eratorri eta moldatu dugu. Eskerrak eman nahi dizkiogu Kepa Belloso-Uriberri eta David González-Bullóni teknika esperimental guztiak irakatsi eta ikerketak aurrera eramaten laguntzeagatik; Rocío Alonso, gure taldeko teknikariari, bere laguntzeagatik; Helena Ostolaza Etxaberi, ideia planteatu eta zuzentzeagatik; Euskal Herriko Unibertsitateari eta Biofisika Institutoari esperimentuak egiteko beharrezko baliabideak eskaintzeagatik.