



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**ACT toxina eta mintzeko
kolesterolaren arteko
elkarrekintzaren azterketa**

*Jone Amuategi Aulestiarte,
Asier Benito Vicente, David
González Bullón, Rocio Alonso
Estrada, Cesar Martín Plágaro
eta Helena Ostolaza Etxabe*

13-20 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.01>



ACT toxina eta mintzeko kolesterolaren arteko elkarrekintzaren azterketa

Amuategi, J.¹, Benito, A.¹, González D.¹, Alonso, R.¹, Martin, C.¹ eta Ostolaza, H.¹
Biokimika eta Biologia Molekularra saila eta Biofisika Institutua (UPV/EHU, CSIC)
jamuategui001@ehu.es

Laburpena

Gaixotasun kutsakorren artean munduan heriotza gehien eragiten dutenak arnasbideetako infekzioak dira eta horren adibide izan daiteke COVID-19 birusa. Hala ere, badira gizakiak kaltetzen dituzten beste patogeno batzuk ere: *Bordetella pertussis* bakterioak, esaterako, kukutxeztula eragiten du. Bakterio honek ostalaria inbaditzeko erabiltzen dituen mekanismoetako bat adenilato ziklasa toxina da (ACT). Toxina honen eta zelula ostalariaren arteko elkarrekintza sakon ikertu da. Hala ere, zelularen inbasiorako erabiltzen duen mekanismo molekularra oraindik ez da zehaztasunez deskribatu. Ikerketa honetan, mintzeko kolesterolak toxina eta mintzaren arteko elkarrekintzan izan dezakeen eragina aztertu da.

Hitz gakoak: kukutxeztula, *Bordetella pertussis*, Adenilato Ziklasa Toxina, toxina poro eragileak

Abstract

Respiratory infections cause the great majority of deaths among contagious diseases. There are several pathogens that infect humans, for example: Bordetella pertussis bacteria cause whooping-cough. Adenylate Cyclase Toxin (ACT) is one of the mechanisms used by this bacterium to invade the host. The interaction between the toxin and the host cell has been studied in depth. However, the molecular mechanisms used for cell invasion have not been accurately described yet. This study analyses the possible influence of membrane-cholesterol in the toxin/membrane interaction.

Keywords: Pertussis, Bordetella pertussis, Adenylate Cyclase Toxin, pore forming toxins

1. Sarrera

Arnasbideetako infekzioak dira mundu mailako gaixotasun kutsakorrik hilgarrienak. Esaterako, 2019an 2.6 milioi pertsona hil ziren behe arnasbideetako (trakeako, bronkioetako, bronkioloetako edota albeoloetako) infekzioen ondorioz¹. Azken urtean COVID-19 birusari arreta berezia eskaini zaion arren, gizakiak kutsatzen dituzten beste patogeno batzuk ere oraindik libre dabilta. Horien artean *Bordetella pertussis* bakterioak kukutxeztula eragiten du, zenbait populazioentzat infekzio larri eta kutsakorra izan daitekeena (**1A. Irudia**). Eragindako sintomen larritasuna gaixoaren adinaren, immunitate-sistemaren erantzunaren eta bakterioaren barreatze sistemikoaren arabera da. Helduen kasuan ez da oso arriskutsua izaten: etengabeko eztul gertakari zakarrak, arnasa hartzeko zailtasuna, sukarra edota goragalea eragiten ditu. Bestalde, haur jaioberrietan apnea bezalako konplikazioak ohikoak dira eta kasurik larrienetan, biriketako hipertentsioaren eta arnas gutxiegitasunaren ondorioz, heriotza eragin dezake. Kukutxeztula fase goiztiar batean gaintu ez duten gaixoei bigarren mailako pneumonia bezalako konplikazioak garatu ditzakete, horixe izaten delarik kukutxeztulaz hiltzen diren gehienek (% 90) arrazoi nagusia (Kilgore *et al.*, 2016). Txerto desberdinen garapenak gaixotasuna kontrolpean izaten lagundu du. Hala ere, biztanleriaren % 95 inguruk txertoa jaso duen arren, azken urteetan kukutxeztul kasuen igoera nabarmena erregistratu da hainbat herrialdetan. Hori dela eta, Osasunaren Mundu Erakundeak (OME) gaixotasunaren gorakada mundu mailan gertatzen ari dela onartu behar izan du². Espainiari dagokionez, 2015ean EAE izan zen kukutxeztul kasu gehien erregistratu zituen autonomia erkidegoa, 100.000 biztanleko 91,67 kasurekin³. Irakurleak kukutxeztularen inguruko informazio gehiago jaso nahiko balu, argitaratu dugun berrikuspina irakurtzera gonbidatzen dugu (Amuategi *et al.* 2020).

¹ The top 10 causes of death, World Health Organization (WHO): <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (2021-02-01)

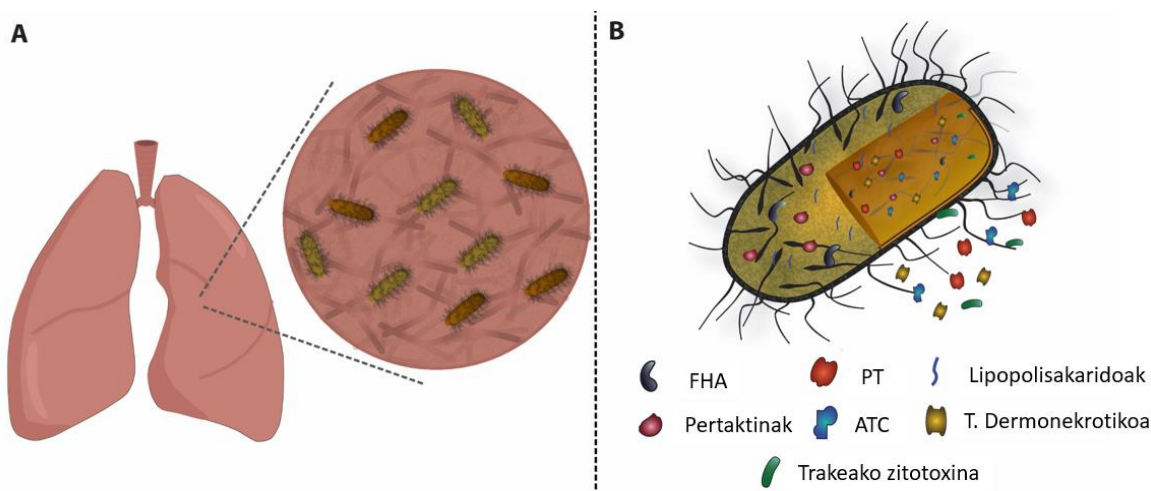
² Pertussis, WHO: <https://www.who.int/immunization/diseases/pertussis/en/> (2021-02-01)

³ Tosferina. Adaptación de los protocolos de la RENAVE, Osakidetza:

https://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/vigilancia_protocolos/es_def/adjuntos/Tosferina_cast_01-03-18.pdf (2021-02-01)

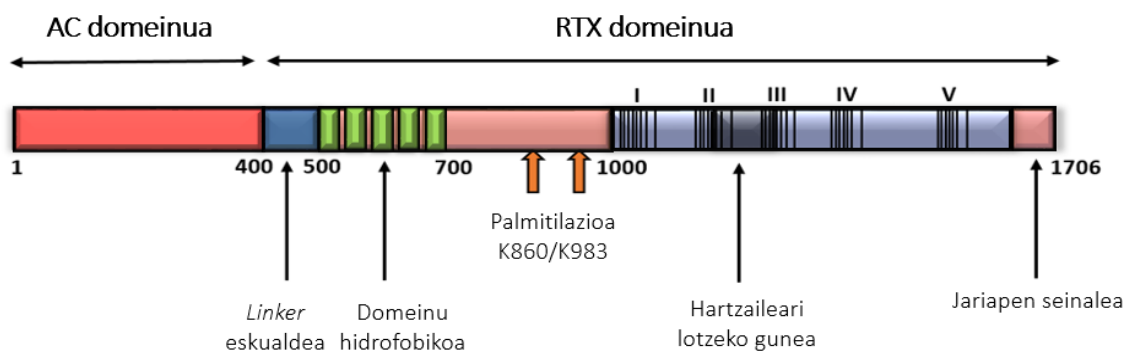
B. pertussis bakterioak inbasio prozesuetan epiteliara itsasteko eta bertako estalkia suntsitzeko hainbat birulentzia-faktore jariatzen ditu (**1B. Irudia**). Garrantzitsuenak gainazaleko proteinak (Hemaglutinina haritsua, ingelesez *Filamentous Haemagglutinin Adhesin* (FHA) eta pertaktina) eta jariatzen dituen toxinak (Toxina Pertusikoa, ingelesez *Pertussis Toxin* (PT); Trakeako Zitotoxina; Toxina dermonekrotikoa eta Adenilato Ziklasa Toxina, ingelesez *Adenylate Cyclase Toxin* (ACT)) dira. Toxinak zelulak kaltetzen dituzten erremintak dira. Bizi-erreinu guztietan aurki daitezke eta tamaina eta forma anitzak izan ditzakete: kargaturiko atomoetatik hasita, hainbat proteinaz osatutako konplexuetaraino⁴. Horrez gain, lipopolisakaridoen ekoizpenak bakterioak eragindako hantura murrizten laguntzen du.

1. Irudia. (A) *Bordetella pertussis* eta (B) bere birulentzia-faktoreak.



ACTa 1706 aminoazidoz osatutako proteina bat da eta 200 kDa inguruko pisu molekularra du (**2. Irudia**). Egitura eta funtzio aldetik argi bereiz daitezkeen bi domeinuk osatzen dute: proteinaren hasierako, hots, amino- edo N-muturreko lehenengo 400 aminoazidoek Adenilato Ziklasa (AC) domeinua osatzen dute eta beste 1306 aminoazidoek RTX domeinu hemolitiko edo poro-eragilea. Bi domeinu hauen artean *linker* edo lotura-eskualdea deskribatu da, 400-500 aminoazidoen artean (Subrini *et al.*, 2013).

2. Irudia. ACT proteinaren aminoazido sekuentziaren irudi eskematikoa.



ACTa zelula ostalari desberdinetara lotu daiteke: eritrozitoetatik hasita zelula epitelialetara, eta baita immunitate-sistemako zenbait zeluletara ere (Eby *et al.*, 2015; Hanski eta Farfel, 1985; Rogel eta Hanski, 1992). Gainera, *Repeats in ToXins* (RTX) toxina poro-eragileen familiako kidea denez (Linhartová *et al.*, 2010), mintza alde batetik bestera zeharkatzen duten poroak eratze gaitza da (Fradin *et al.*, 2009) eta ondorioz, zelularen lisia eragin dezake. Horretarako, proteinaren domeinu hidrofobikoa eta α -helizeak mintzean txertatzen dira eta proteinaz eta lipidoz osatutako egitura nahiko dinamiko bat eratzen da (González-Bullón *et al.*, 2019). Gainera, mintz-egiturak, liposomak artean, iragazkor bihurtzeko gai ere bada (Martin *et al.*, 2004). Bestalde, zenbait bakterio-toxinak bezala, zelula ostalariaren barneko itu molekularrak baliatzen ditu hura erasotzeko. Proteinaren AC domeinu katalitikoak, zelularen zitosoan adenosin monofosfato-3',5' ziklikoaren (cAMP) kontrolik gabeko sintesia katalizatzen du. Jakina da cAMPak bigarren mezulari gisa jarduten duela zelularen seinaleztapen prozesuetan

⁴ Biology Dictionary: <https://biologydictionary.net/toxin/> (2021-02-04)

(Yan *et al.*, 2016) eta beraz, haren gehiegizko kontzentrazioak zelularen heriotza eragin dezake (Ladant eta Ullmann, 1999). AC domeinuak zelula ostalariaren mintza zuzenean zeharkatzen duela jotzen da. Izan ere, bakterio-toxina gutxi batzuk gai dira translokazio sistema propioak erabiltzeko: difteria toxina, toxina botulinikoa, toxina letala eta ACTa, besteak beste. Zerrendatutako toxinak uretan solugarriak dira, baina, helize hidrofobikoz osaturiko zatiak ere badituzte: esaterako, ACTaren linker eskualdea. Segmentu horiek anfiptikoak izaten dira, hots, mutur hidrofilo eta mutur hidrofobo bana dituzte, eta hortaz, mintzetan txertatu daitezke, horietatik desegonkortuz eta iragazkor bihurtuz. Hainbestez, translokazio prozesua erraztu dezaketela pentsa daiteke (Masin *et al.*, 2016), lekuko mintzaren osotasuna asaldatzen baitute, domeinu katalitikoa zelula barnera garraiatzeko beharrezko energia gutxituz (Voegelé *et al.*, 2017). Irakurleak ACTaren inguruko informazio gehiago jaso nahiko balu, erreferentzien ataleko berrikuspen hauek irakurtzera gonbidatzen dugu (Chenal *et al.*, 2018; Ladant eta Ullmann, 1999).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Zenbait patogenok, eta haiek ekoiztutako birulentzia-faktore batzuek, zelula ostalariaren mintzeko kolesterola (Chol) ezagutu eta hari lotzeko abilezia garatu dute. Esaterako, kolesterolarekin elkar eragiten duten proteina batzuek beren sekuentzietan *Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus* edo CRAC delako motiboak dituztela deskribatu da. Gainera, zenbaitetan kolesterolaren eta CRAC motiboaren artean elkarrekintza zuzen eta espezifikoa dagoela frogatu da (Epanand *et al.*, 2006; Fantini *et al.*, 2016; Fantini eta Barrantes, 2013). Adibidez, RTX familiako beste kide batek, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*ek, ekoiztutako LtxA leukotoxinak ere gaitasun bera daukela deskribatu da. Elkarrekintzarako bi CRAC motibo baliatzen ditu eta horietako bat RTX familiako beste toxina batzuetan ere deskribatu da (Brown *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2016). Hortaz, horiek CRAC motiboak baldin badituzte, antzekotasunagatik ACTak ere izan ditzakela iradoki genezake.

Laborategiko aurretiazko emaitzei esker ondorioztatu genuen kolesterolak eragina zuela mintzaren eta ACTaren arteko elkarrekintzan. Gainera, kolesterolak AC domeinuaren translokazioa erraztu zezakeela iradoki genuen. Ikerketa honetan, aldiz, kolesterolak aktibitate poro-eragilean zein inplikazio duen aztertu dugu. Horrez gain, ACTa eta mintzeko kolesterolaren artean elkarrekintza espezifikoa egon litekela frogatu nahi izan dugu. Horretarako, helburu zehatzagoak planteatu dira. Lehenik eta behin, kolesterolaren ezagutzarako eskualde posibleak kokatzeko, bilaketa bioinformatiko bat egingo da. Bestalde, aktibitate poro-eragilean kolesterolak izan dezaken eragina aztertzeko, ACTak liposometan eragiten duen solutuen askapena aztertuko da. Esperimentu hauek osatzeko Z potentziala deritzon teknika ere erabiliko da. Azkenik, ACTak eragindako eritrozitoen hemolisia aztertuko da, eta kolesterolez osatutako liposomak hemolisia inhibitzeko gai diren entseatuko da.

3. Ikerketaren muina

3.1. CRAC/CARC motiboen bilaketa bioinformatikoa

CRAC domeinuak motibo labur eta linealak dira. Oso algoritmo sinpleak betetzen dituzte, N-muturretik hasita C-muturrerantz: Leuzina (L) edo Valina (V) hondar apolar bat; jarraian, 1-5 (edozein) hondarrez osaturiko segmentu bat; tirosina (Y) hondar aromatiko bat; berriro 1-5 hondarrez osaturiko segmentu bat; eta bukatzeko, karga positiboa eta polaritate altua dituen Lisina (K) edo Arginina (R) basiko bat: [L/V]-X(1-5)-(Y)-X(1-5)-[R/K]. Proteinen mintz arteko domeinuen parte diren CRAC motiboetan X hondarra mintzeko inguru hidrofobikoarekiko bateragarria izan beharko litzateke. Gainera, C-muturreko hondar basikoa lipido-ura interfasean kokatuko litzateke, mintzarekin elkarrekintza optimoa ziurtatuz. Domeinu hauetan gertatutako mutazio puntualek kolesterolarekiko elkarrekintza gutxiagotu edo ezeztatu dezaketela ere ikusi da (Fantini eta Barrantes, 2013). CARC domeinuei dagokienez, N-muturretik hasita C-muturrerantz [R/K]-X(1-5)-(Y)-X(1-5)-[L/V] sekuentzia izango lukete. Beraz, “alderantzizko CRAC” domeinuak direla esan daiteke. Hala ere, erdiko aminoazidoak ez du zertan Y izan behar, F ere izan daiteke. Kasu honetan, hondar basiko baten presentziak CARC motiboa mintz-arteko domeinuaren interfase polar-apolarrean kokatzea ahalbidetuko du, justu kolesterola

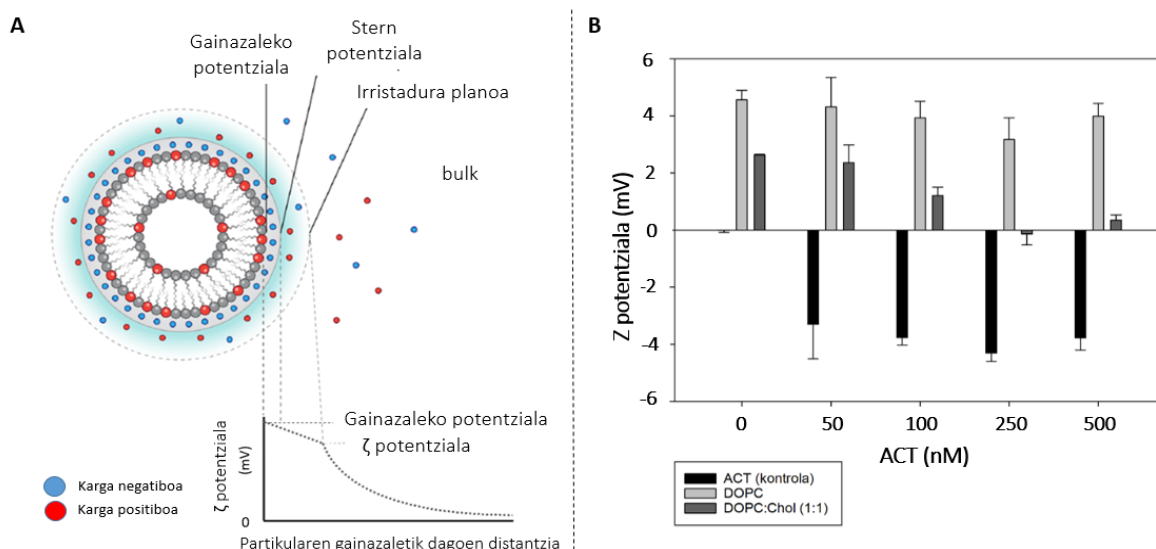
kokatu beharko litzatekeen lekuan. Hala ere, CARC motiboa ez da beti proteinen mintz-arteke guneetan ageri. Halaber, proteina baten mintz-arteke domeinu berak CRAC eta CARC motiboak izan ditzake aldi berean, honek, bi kolesterol molekularen batura ahalbideetuko duelarik (Fantini eta Barrantes, 2013).

EMBROSS fuzzpro4 zerbitzua erabili da ACTaren sekuentzia CRAC eta CARC motiboen bilaketa burutzeko. Era berean, Yren ordeaz F aminoazido zentrala duten CRAC itxurako motiboen bilaketa ere burutu da. Azterketa honen ondorioz, ACTaren sekuentzia CRAC/CARC/CRAC itxurako 41 motibo posible identifikatu dira: 18 AC domeinuan (2 linker eskualdean) eta beste 23 RTX domeinuan. Domeinu kontserbatuak direla esan daitekeen arren, egitura aldetik malguak izan ohi dira. Ondorioz, bioinformatikari esker auresandako sekuentzia guztiek *in vivo* ez dute zertan kolesterola lotzeko gaitasunik izan behar (Brown *et al.*, 2016). Bestalde, zenbaitetan kolesterolak bere 3D egitura moldatu dezake CRAC domeinuak ez diren beste gune batzuetara lotzeko. Honenbestez, CRAC algoritmoak proteinetan kolesterolari lotzen zaizkion motiboak auresateko gaitasuna duen arren, zenbaitetan analisi bioinformatikoek huts egin izan dute (Fantini eta Barrantes, 2013).

3.2. ACTak kolesterola duten mintzekiko lehentasuna du

ACTak eta konposizio desberdinetako mintzek elkarrekintzarik ote duten aztertzeko, Z potentziala neurtu da. Teknika honek nanopartikulen gainazaleko kargaren balioespena egiteko balio du. Eremu elektrikoa aplikatzean kargatutako partikulek dagokien elektrodora migratuko dute, migrazio abiadura Z potentzialarekiko proportzionala izanik (Smith *et al.*, 2017). Entsegu honetan, *Large Unilamellar Vesicles* (LUV) edo geruza bakarreko liposoma handiak erabili dira (Patil eta Jadhav, 2014). DOPC (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) eta DOPC:Chol (1:1, mol:mol) konposizioak erabili dira. **3A. Irudian** adierazi bezala, konposizio hauetako LUVek gainazaleko karga positiboa dute. ACTak pH 8.0an karga neto negatiboa duenez, mintzaren gainazaletik gertu kokatuko balitz, Z potentzialaren balioa jaitsiko litzateke. **3B. Irudian** behatu dezakegu, DOPC soilez osatutako LUVen kasuan, Z potentzialaren aldakortasuna txikia dela, eta hortaz, ACTarekin duten elkarrekintza ahula dela iradoki genezake. Aldiz, DOPC:Chol 1:1 konposizio LUVen kasuan, ACT kontzentrazioa igo ahala Z potentziala era nabarmenean jaisten da. Hortaz, mintza eta ACTaren artean elkarrekintza dagoela pentsa genezake (**3. Irudia**).

3. Irudia. Z potentziala. (A) Oinarriak (Smith *et al.*, 2017). (B) ACT-LUV elkarrekintza.



3.3. Kolesterol askeak ACTaren eta LUVen arteko elkarrekintza oztopatzen du

Ondorio esanguratsuagoak atera ahal izateko, kolesterol askeak ACTaren eta mintzen arteko elkarrekintza oztopatzen ote duen aztertu nahi izan da. Horretarako, solutu fluoreszenteen askapena neurtu da. **4A. Irudian** adierazi bezala, ANTS molekula fluoreszentea eta bere amatatzailea den DPXa DOPC eta DOPC:Chol (1:1) liposomen barnean kapsulatu dira. ACTa

gehitzean besikulen mintza desegonkortu eta iragazkor bihurtuko litzateke, eta ondorioz, solutuak kanpo mediora askatuko lirateke. Ondorioz, ANTS eta DPX kanpo medioan diluitzean, fluoreszentzia seinalea emendatuko litzateke (Smolarsky *et al.*, 1977) (**4A. Irudia**). Entsegua burutu aurretik, etanoletan disolbaturik zegoen kolesterol askea ACTarekin inkubatu da. Soluzio honi LUVak gehitu eta fluoreszentzia seinalea jaso da 30 minutuz. Fluoreszentzia seinalea maximoa zein den jakiteko detergentea gehitu da. Askapen portzentajeak kalkulatzeko (**1 Ekuazioa**) erabili da:

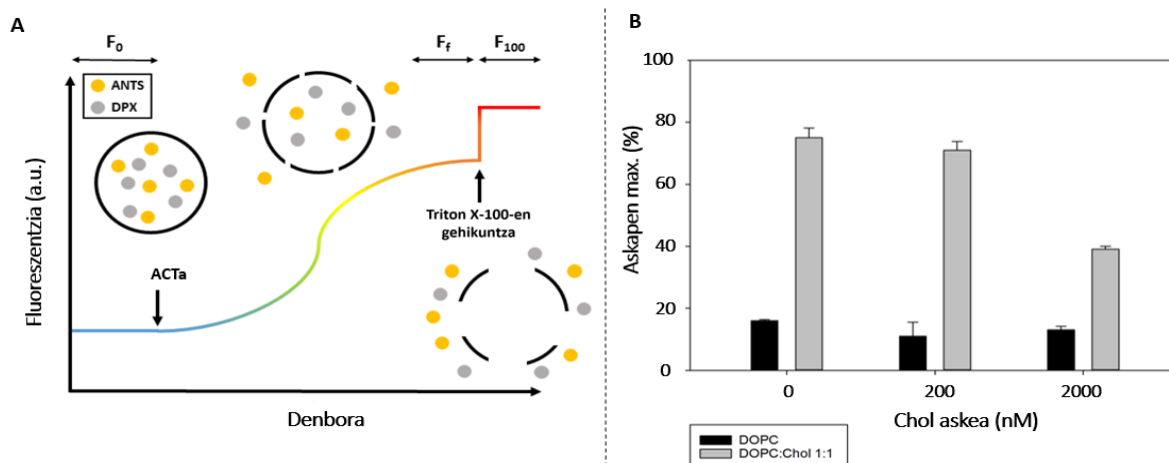
$$\text{Askapena (\%)} = \frac{(F_f - F_0)}{(F_{100} - F_0)} \times 100 \quad (1)$$

ACT gehitu aurreko minutuaren fluoreszentzia basala (F_0).

- ACT gehitu osteko hurrengo 29 minutuen fluoreszentzia (F_f).
- Detergentea gehitu osteko azken minutuaren fluoreszentzia (F_{100}).

Askapen-zinetiken bidez (**4B. Irudia**), lehenik eta behin, Z potentzialeko esperimenduetan iradokitakoa berretsi dugu: ACT DOPC nahiz DOPC:Chol (1:1) konposizioko mintzak iragazkor bihurtzeko gai da. Hala ere, DOPCz osaturiko mintzetan askapena ez da % 20ra heltzen. Beraz, afinitate gutxiz lotzen dela ondorioztatu genezake. DOPC:Chol (1:1) konposizioko mintzetan, berriz, kolesterol askea gehitu ahala, askapen maximoaren jaitiera nabarmena ikusten da. Badirudi liposomen mintzekin alderatuz gero, ACTak kolesterol askearekiko afinitate handiagoa erakusten duela.

4. Irudia. Askapen-zinetikak. (A) Oinarriak eta (B) kolesterol askearen eragina.



3.4. Kolesterolaren lotura inhibitzeak ACTak eragindako hemolisia murrizten du

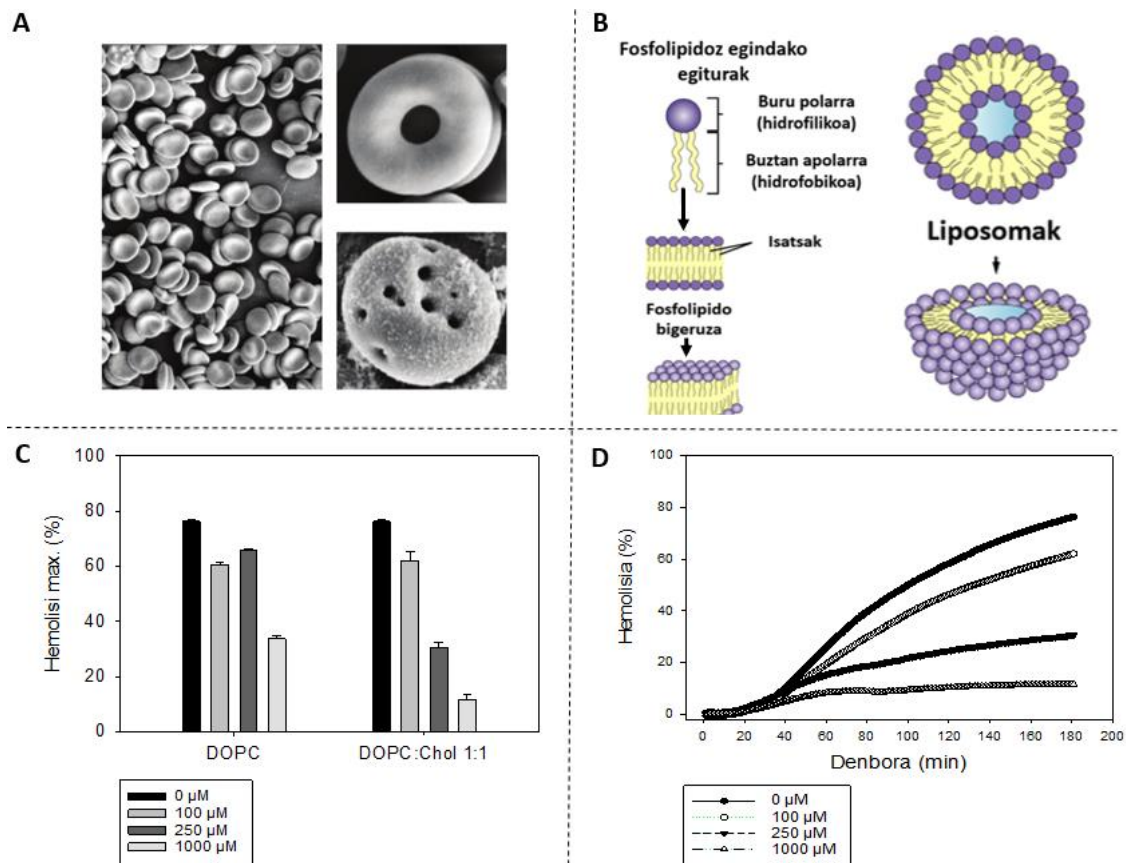
Kolesterolak ACTaren aktibitate poro-eragilean izan dezakeen eragina aztertzeko, Bellalou eta kideen lanetik moldatutako aktibitate hemolitikoaren protokoloa erabili da (Bellalou *et al.*, 1990). Hemolisia denboran zehar neurtzeko, argi dispersioan oinarritutako entsegu espektrofotometrikoa burutu da. Egoera onean dagoen eritrozito suspentsio batek bere tamaina eta formagatik, argia barreiatzen du, eta horrenbestez, uherra da. Baina, hemolisiak aurrera jarraitu ahala, eritrozitoak puskatuz joango dira eta laginak uhertasuna galduko du. Honela, ACTak eritrozitoetan eragiten duen uhertasunaren galera jarraitu eta toxinak eragindako lisi zelularrekin erlazionatu daiteke (Louw eta Visser, 1977). Lehenago Brown eta kideek LtxArekin egin zuten bezala (Brown *et al.*, 2016), guk ACTaren aktibitate poro eragilea inhibititu nahi izan dugu. Entsegu honetan, ACTa LUVekin inkubatu da, ondoren, eritrozito suspentsio bat gehitu eta hemolisi-zinetika burutu da. (**2 Ekuazioa**) erabili da aparatua neurtutako absorbantzia balioetatik hemolisi portzentajeak kalkulatzeko:

$$\text{Hemolisia (\%)} = \frac{(Abs_{700\%lagina} - Abs_{700\%0})}{(Abs_{700\%100} - Abs_{700\%0})} \times 100 \quad (2)$$

5C. eta 5D. Irudiei erreparaturik gero, DOPC:Chol (1:1) LUVen kasuan, liposoma kontzentrazioa igo ahala hemolisi portzentajea nabarmen jaisten dela ikus dezakegu. Horrek,

hasiera batean egindako hurbilketa egokia dela baieztatzen du. Gainera, inhibizioa espezifikoa dela frogatzeko, soilik DOPCz osatutako LUVak erabili dira eta ACTaren aktibitatea inhibitzeko gaitasun txikiagoa erakutsi dute. Bi kasuetan hemolisi portzentaje maximoaren (%) jaitsiera behatu dugun arren, kolesterolaren presentzia jaitsiera hau askoz ere nabarmenagoa izan da. Beraz, kolesterola duten liposomak hemolisia inhibitzeko gai dira.

5. Irudia. ACTak eragindako hemolisi-zinetikak. (A) Eritrozitoen ekorketa bidezko mikrografia (2500x) (Mustafa et al., 2016). (B) Liposomen irudikapen eskematikoa (Mishra et al., 2011). (C) Hemolisi-portzentaje maximoak. (D) DOPC:Chol (1:1) LUVekin egindako hemolisi-zinetikak.



3. Ondorioak

Bilduriko emaitzei esker badakigu ACTak kolesterol proportzio altuak dituzten mintzekiko afinitate handia duela. Gainera, kanpotik kolesterol askea gehitzean, ACTak mintzak desegonkortzeko eta eritrozitoen hemolisia eragiteko daukan gaitasuna murrizten dela ikusi dugu. Hortaz, proteinak kolesterolarekiko duen afinitateak kolesterola ezagutu eta hari lotzen zaion sekuentziaren bat, gutxienez, izan dezakela pentsarazten digu eta hare gehiago, gutxienez bat linker eskualdean kokatuta egon litekela uste dugu.

4. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunera begira, motibo hauek toxina eta mintzaren arteko elkarrekintza duten garrantzia ikertu nahi da. Alde batetik, eredu errealistago bat eraiki nahian, ikerketa honetan frogatutako emaitzak J774A-1 makrofago lerro-zelularretan betetzen ote diren egiaztatzen ari gara. Izan ere, liposomek ez dute mintz potentzialik eta beraz, ez dute ACTa eta zelula-mintzaren arteko elkarrekintza zehatz mehatz erreproduzitzen (Masin *et al.*, 2004). Bestetik, bibliografian deskribatutako mintzaren eta linker eskualdearen arteko elkarrekintza CRAC motibo bidez gertatzen dela ziurtatu nahi dugu eta motibo hori/horiek zehazki zein den/diren identifikatu. Izan ere, linker eskualdearen zati esanguratsu bat mintzeko lipidoekin elkarrekintzak izateko gai dela deskribatu da (Masin *et al.*, 2016). Gainera, eskualde honen parte den peptido batek (454-484 hondarrak) mintzetan txertatzeko eta horiek desegonkortzeko gaitasuna daukala frogatu dute (Voegele *et al.*, 2017). Bilaketa bioinformatikoetan oinarrituz, behinik behin, 413-420 eta 481-487 hondarrak CRAC motibo posibleak izan daitezkeela jakin

dugu. Horregatik, 20 aminoazido inguruz osatutako ACTaren zenbait peptido eskuratu ditugu (400-600 hondarren bitartekoak) eta mintzeko kolesterolarekin elkarrekintzarik ote duten aztertzen ari gara. Bestalde, CRAC sekuentzia posibleak eraldatuta dauzkaten ACTaren mutanteak purifikatu ditugu eta horien aktibitate katalitiko eta poro-eragileak aztertzen ari gara. Bukatzeko, ACTaren segmentu bakoitzari dagozkion aktibitate eta funtzioak esleitu nahi dizkiogu, AC domeinuaren mintzean zeharreko translokazioa urratsez urrats karakterizatu ahal izateko.

5. Erreferentziak

- Amuategi, J., Benito-Vicente, A., Uribe, K.B., Martín, C. eta Ostolaza, H. (2020), Kukutxeztula: “gainditutako” gaitz baten itzulera, *EKAIA. EHUko Zientzia eta Teknologia aldizkaria*. <https://doi.org/10.1387/ekaia.21789>
- Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C., & Ullmann, A. (1990), Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infection and Immunity*, 58(10), 3242–3247. <https://iaa.asm.org/content/58/10/3242/figures-only>
- Hanski, E. eta Farfel, Z. (1985), *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration. *Journal of Biological Chemistry*, 10;260(9):5526-32. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2859287/>
- Brown, A.C., Koufos, E., Balashova, N. V., Boesze-Battaglia, K., eta Lally, E. T. (2016), Inhibition of LtxA toxicity by blocking cholesterol binding with peptides. *Molecular Oral Microbiology*, 31(1), 94–105. <https://doi.org/10.1111/omi.12133>
- Brown, A. C., Balashova, N. V., Epand, R. M., Epand, R. F., Bragin, A., Kachlany, S. C., Walters, M. J., Du, Y., Boesze-Battaglia, K., eta Lally, E. T. (2013), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin Utilizes a Cholesterol Recognition/Amino Acid Consensus Site for Membrane Association. *Journal of Biological Chemistry*, 288(32), 23607–23621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.486654>
- Chenal, A. (2018), An Introduction to the Toxins Special Issue on the Adenylate Cyclase Toxin. *Toxins*, 10(10), 386. <https://doi.org/10.3390/toxins10100386>
- Eby, J. C., Hoffman, C. L., Gonyar, L. A., eta Hewlett, E. L. (2015), Review of the neutrophil response to *Bordetella pertussis* infection. In *Pathogens and Disease* 73(9). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv081>
- Epand, R. F., Thomas, A., Brasseur, R., Vishwanathan, S. A., Hunter, E., eta Epand, R. M. (2006), Juxtamembrane protein segments that contribute to recruitment of cholesterol into domains. *Biochemistry*, 45(19), 6105–6114. <https://doi.org/10.1021/bi060245+>
- Fantini, J., eta Barrantes, F. J. (2013), How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Frontiers in Physiology*, 4, 31. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00031>
- Fantini, J., Di Scala, C., Evans, L. S., Williamson, P. T. F., eta Barrantes, F. J. (2016), A mirror code for protein-cholesterol interactions in the two leaflets of biological membranes. *Scientific Reports*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep21907>
- Fradin, C., Satsoura, D., eta Andrews, D. W. (2009), Punching Holes in Membranes: How Oligomeric Pore-Forming Proteins and Lipids Cooperate to Form Aqueous Channels in Membranes. *Biomembrane Frontiers* (pp. 223–262). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-314-5_9
- González-Bullón, D., B. Uribe, K., Largo, E., Guembelzu, G., García-Arribas, A. B., Martín, C., eta Ostolaza, H. (2019), Membrane Permeabilization by *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin Involves Pores of Tunable Size. *Biomolecules*, 9(5), 183. <https://doi.org/10.3390/biom9050183>
- Kilgore, P. E., Salim, A. M., Zervos, M. J., eta Schmitt, H.-J. (2016), Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 449–486. <https://doi.org/10.1128/CMR.00083-15>
- Ladant, D., eta Ullmann, A. (1999), *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: A toxin with multiple talents. In *Trends in Microbiology* 7 (4), 172–176. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01468-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01468-7)
- Lakowicz, J. R. (2006): *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, USA. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>

- Linhartová, I., Bumba, L., Mašn, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J., Procházková, K., Adkins, I., Hejnová-Holubová, J., Sadílková, L., Morová, J., eta Šebo, P. (2010), RTX proteins: A highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiology Reviews* (34) (6), 1076–1112. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x>
- Louw, A. I., eta Visser, L. (1977), Kinetics of erythrocyte lysis by snake venom cardiotoxins. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 498(1), 143–153. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(77\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(77)90095-2)
- Martin, C., Requero, M.-A., Masin, J., Konopasek, I., Goni, F. M., Sebo, P., eta Ostolaza, H. (2004), Membrane Restructuring by *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin, a Member of the RTX Toxin Family. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3760–3765. <https://doi.org/10.1128/JB.186.12.3760-3765.2004>
- Masin, J., Konopásek, I., Svobodová, J., eta Sebo, P. (2004), Different structural requirements for adenylate cyclase toxin interactions with erythrocyte and liposome membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1660(1–2), 144–154. <https://europepmc.org/abstract/med/14757230>
- Masin, J., Osickova, A., Sukova, A., Fiser, R., Halada, P., Bumba, L., Linhartova, I., Osicka, R., eta Sebo, P. (2016), Negatively charged residues of the segment linking the enzyme and cytolysin moieties restrict the membrane-permeabilizing capacity of adenylate cyclase toxin. *Scientific Reports*, 6(1), 29137. <https://doi.org/10.1038/srep29137>
- Mustafa, I., Al Marwani, A., Mamdouh Nasr, K., Abdulla Kano, N., eta Hadwan, T. (2016), Time Dependent Assessment of Morphological Changes: Leukodepleted Packed Red Blood Cells Stored in SAGM. *BioMed Research International*, 2016, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/4529434>
- Patil, Y. P., eta Jadhav, S. (2014), Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011>
- Rogel, A., eta Hanski, E. (1992), Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 267(31), 22599–22605.
- Smith, M. C., Crist, R. M., Clogston, J. D., eta McNeil, S. E. (2017), Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(24), 5779–5787. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0527-z>
- Smolarsky, M., Teitelbaum, D., Sela, M., eta Gitler, C. (1977), A simple fluorescent method to determine complement-mediated liposome immune lysis. *Journal of Immunological Methods*, 15(3), 255–265. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/323363>
- Subrini, O., Sotomayor-Pérez, A.-C., Hessel, A., Spiczka-Karst, J., Selwa, E., Sapay, N., Veneziano, R., Pansieri, J., Chopineau, J., Ladant, D., eta Chenal, A. (2013), Characterization of a Membrane-active Peptide from the *Bordetella pertussis* CyaA Toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 288(45), 32585–32598. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.508838>
- Voegele, A., Subrini, O., Sapay, N., Ladant, D., eta Chenal, A. (2017), Membrane-Active Properties of an Amphitropic Peptide from the CyaA Toxin Translocation Region. *Toxins*, 9(11), 369. <https://doi.org/10.3390/toxins9110369>
- Yan, K., Gao, L. N., Cui, Y. L., Zhang, Y., eta Zhou, X. (2016), The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery. *Molecular Medicine Reports*, 13(5), 3715–3723. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5005>

6. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau Jone Amategiri esleitutako UPV/EHuren Doktorego Tesirako beka bati esker eta Helena Ostolazak jasotako Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioko (BFU2017-82758-P (AEI/FEDER, UE) eta Eusko Jaurlaritzako (Grupos Consolidados IT1264-19) diru-laguntzei esker idatzi da. Eskerrak eman nahi dizkiot David González Bullóni teknika esperimental guztiak irakasteagatik; Rocío Alonsori proteinen purifikazioan eskaintako ezinbesteko laguntzagatik; Helena Ostolaza Etxaberi, ideia planteatu eta zuzentzeagatik; Euskal Herriko Unibertsitateari eta Biofisika Institutuari esperimentuak egiteko beharrezko baliabideak eskaintzeagatik.