



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIA ZEHATZAK ETA NATUR ZIENTZIAK

**Adenilato ziklasa toxinak
bakterioen barneratzea eragiten
du celula ez-fagozitikoetan**

*A. Etxaniz, C. Martin, K. Uribe,
D. Gonzalez-Bullon, A. Etxebarria,
J. Arlucea, J. Arechaga, F. M. Goñi
eta H. Ostolaza.*

445-450 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.61>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Adenilato ziklasa toxinak bakterioen barneratzea eragiten du zelula ez-fagozitikoetan

Etxaniz A., Martin C., Uribe K., Gonzalez-Bullon D., Etxebarria A., Arlucea J., Arechaga J., Goñi.F.M., Ostolaza H.

Biokimika eta Biologi Molekularreko Departamentua eta Biofisikako Unitatea (CSIC, UPV-EHU), Euskal Herriko Unibertsitatea, 48080, Leioa

Laburpena

Bordetella pertussis kukutxeztula deituriko arnas-aparatuko gaixotasunaren eragilea da. Prebentziorako txertoa egon arren, munduan umeen heriotza gehien eragiten duen bosgarren gaixotasuna da. Historikoki patogeno extrazelularra dela pentsatu den arren, bakterio hau *in vitro* eta *in vivo* zelula fagozitiko eta ez-fagozitikoen barnean ikusi da. Hala ere, bakterioak zelula barnean sartzeko erabiltzen dituen mekanismoak eta bere birulentzia fakoreetatik zeinek duen eginkizun hori ez da oraindik ezagutzen. Lan honetan aurkitu dugu Adenilato Ziklasa toxina (ACT), *B. pertussis*-en birulentzia faktore garrantzitsuenetako bat, nahikoa dela bakterioaren barneraketa eragiteko zelula ez-fagozitikoetan.

Abstract

Bordetella pertussis causes whooping cough, a respiratory infectious disease that is the fifth largest cause of vaccine-preventable death in infants. Though historically considered an extracellular pathogen, this bacterium has been detected both in vitro and in vivo inside phagocytic and non-phagocytic cells. However the precise mechanism used by B. pertussis for cell entry, or the putative bacterial factors involved remain largely unknown. Here we find that adenylate cyclase toxin (ACT), one of the important toxins of B. pertussis, is sufficient to promote bacterial internalization into nonphagocytic cells.

1. Sarrera eta motibazioa

Kukutxeztula, *Bordetella pertussis* bakterio gram-negatiboak eragindako arnas aparatuen gaixotasun kutxakorra da. Gaixotasun honen prebentziorako txertoa dagoen arren, azken hamarkadan gero eta infekzio kasu gehiago ari dira gertatzen herrialde garatuetan (Mills et al., 2014). Hori dela eta, gaixotasun hau sortzeko bakterio honek erabiltzen dituen infekzio-mekanismoak aztertzea osasun-intereserako beharrezkoa bihurtu da.

B. pertussis-en infekzio prozesuan onartzen da bakterioak arnas-aparatuko zelula epitelialen mintzera itsasten dela, eta hortik bere toxinak jariazis sistema-immuneko zelulak kaltezen dituela (makrofagoak, zelula dendritikoak...), bere fagozitozia ekidituz. Horrela arnas-aparatuan bere populazioa handitzen hasten da bakterio extrazelular bezala, gaixotasunaren efektuak garatuz (Melvin et al., 2014). Infekzio-eredu hau onartuena izan arren azken urteotan eredu zalantzan jartzen duten emaitzak agertzen hasi dira. Beste autore batzuk frogatu dute *B. pertussis* bakterio intrazelular bezala bizitzeko gaitasuna duela (Ishibashi et al., 2001). Datu honek garrantzi handia izan dezake giza sistema-immuneak bakterioaren kontra duen erantzuna aztertzeko, erantzun hau oso desberdina delako bakterioa extrazelularra edo intrazelularra bada (Higgs et al., 2012). Bi infekzio-mekanismo hauen eredu ezagun eta gehien aztertuenak *Vibrio cholerae*, kolera sortzen duen bakterio extrazelularra eta *Mycobacterium tuberculosis*, makrofagoen barnean bizitzeko eta tuberkulosia sortzen duen bakterioak dira (Duclos and Desjardins, 2000).

Bordetella-k bere infekzioa aurrera eramateko bost birulentzia-faktore ezagun ditu eta hauetatik garrantzitsuenak Pertussis toxina eta ACT toxina dira (Fedele et al., 2013). Bi toxinak

itu-zelulen cAMP ikaragarri handitzeko gaitasuna dute ATP-a cAMP bihurtzeko duten aktibitate katalitikoarengatik. cAMP-a zelula barneko prozesu asko erregulatzen dituen bigarren-mezularia da. Toxina hauen eraginez cAMP igotzeak zelularen prozesu asko blokeatzen ditu, makrofagoen fagozitosi aktibitatea adibidez (Weingart and Weiss, 2000). Adenilato ziklasa aktibitateaz gain ACT (Adenylate Cyclase Toxin) toxina zelulen mintzean poroak eratzeko gaitasuna du (Basler et al., 2007).

Adenilato ziklasa toxina (ACT) 1706 aminoazidoz osaturik dagoen eta 200 kDa –ko pisua duen RTX (Repeats in ToXin) familiako toxina da (Linhartová et al., 2010). Estrukturalki bi domeinutan banatuta dago, amino muturreko lehenengo 400 aminoazidoek adenilato ziklasa (AC) aktibitatea duen domeinua osatzen dute. Domeinu hau itu-zelularen mintzetik zuzenean translokatzeko da, eta zelularen kalpainak moztu eta gero, bere aktibitatea zitosolean egiten du. Beste 1306 aminoazidoek toxinareneko domeinu hemolitikoa osatzen dute. Domeinu honek zelulen mintzean txertatzeko eta poroak eratzeko gaitasuna du. Poro eraketa honek zelula kanpoko kaltzio-sarrerara azkarra eta zelula barneko potasioaren irteera eragiten du, zelularen prozesu askotarako beharrezkoa den ioi-homeostasia desorekatuz. (Goyard et al., 1993). Domeinu hemolitikoaren bukaeran toxinareneko hartzailea ezagutzen duen sekuentzia aurkitzen da. Hartzaile hau CR3 integrina da, makrofago eta zelula dendritikoetan aurkitzen dena, toxinareneko itu zelula garrantzitsuenetan. Hala ere, toxina hartzaile gabeko zeluletan txertatzeko ahalmena duela argi ikusi da. Zelula hauetan toxina endozitosi mekanismoak aktibatzen dituzte ikusi dugu gure taldean (Uribe et al., 2013). Efektu honek bakterioari ekarri diezazkiokeen abantailak aztertzea gai interesgarria izan daiteke bakterioaren infekzio-prozesua hobeto ulertzeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

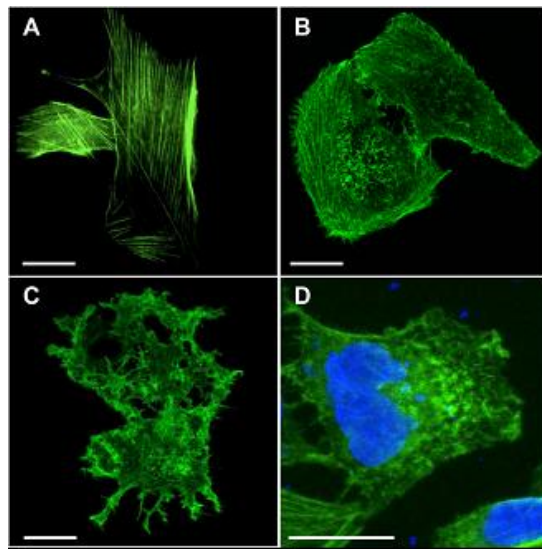
Lan honen helburua *Bordetella pertussi*-k fagozitosi gaitasun gabeko zeluletan barneratzeko duen mekanismoa aztertzea izango da, eta mekanismo horretan ACT toxina jokatzeko duen eginkizuna ikustea.

3. Ikerketaren muina

Ikerketa honetarako *B. pertussis*-en itu-zelula eredu bezala fibroblasto fenotipoa duten CHO-K1 zelulak erabili dira. Zelula hauek ACT toxinareneko lan askotan erabili dira hartzaile gabeko itu-zelula eredu modura (Uribe et al., 2013). Lanaren helburua inbasio prozesuan ACT-ren eginkizuna ikustea denez, ez dugu *B. pertussis* basatia erabili, ACT-z gain beste birulentzia faktoreak ditu eta. Horren ordez, *B. pertussis* 18323H⁺ mutantea erabili dugu. Mutante honek ez du birulentzia faktorerik eta bi baldintzetan erabiliko da, bera bakarrik edo ACT toxina kanpotik erantsita duela.

Fagozitosi mekanismoak ez duen zelula batetan printzipioz ezin da bakterio oso bat barneratu. Hau lortzen duten bakterio espezializatuek itu-zelularen zitoeskeletoaren antolakuntza desegiteko gaitasuna duten toxina erabiltzen dituzte (Aktories et al., 2011). Zitoeskeletoaren desantolaketa toxina hauen poro eraketan bidez eragindako kaltzio sarreraren zeharkako efektu bat izaten daiteke. ACT-k efektu hori eragiteko gaitasuna duen ikusteko, CHO-K1 zelulen zitoeskeleto phalloidina bidez fluoreszentez markatu genuen eta ACT kontzentrazio desberdinekin inkubatu ondoren mikroskopi-konfokal bidez argazkiak ateratu genuen. Lehenengo irudian ikusi daiteke nola CHO-K1 zelulek ondo antolatutako zitoeskeleto zurruna dutela (1.A irudia) eta toxinareneko 2 µg/ml (1B irudia) eta 5 µg/ml-rekin (1C irudia) inkubatuak izatean zitoeskeletoaren antolakuntza desegiten dela. Hau ikustean esperimendu berdina baina *B. pertussis* (18323H⁺ mutantea) zelulei gehituz egin genuen. Hoechst DNAren markatzaile fluoreszentea gehitu genuen zelulen nukleoaz gain bakterioak ikusi ahal izateko. 1D irudian ikusten den bezala, *B. pertussis* ACT-k eragiten duen zitoeskeletoaren desantolakuntzaz aprobetxatu daiteke CHO-K1 zeluletan barneratzeko, zelulen zitosolean bereizten diren puntu urdinak (bakterioen DNA Hoechst-ekin markatuta) adierazten dutenez.

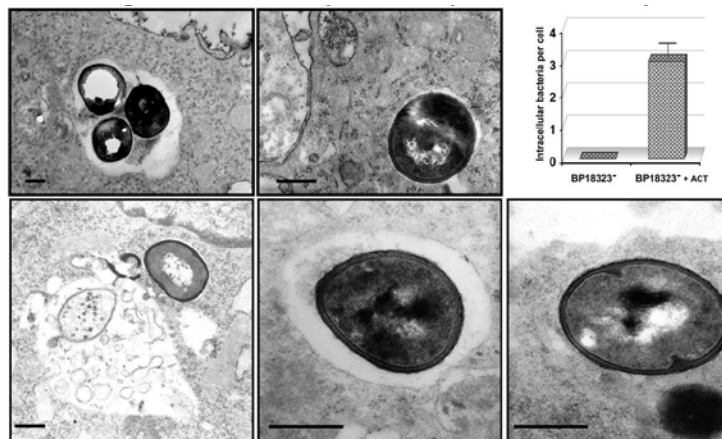
1.irudia: Mikroskopi konfokalez ikusitako ACT toxinaren efektua CHO-K1 zelulen zitoeskeletoan



Inbasio prozesu hau hobeto ikusteko bakterio mutanteak ACTrekin eta ACT gabe CHO zelulekin inkubatu eta laginen argazkiak atera ziren mikroskopia elektronikoaren bidez. 2. irudian ikusten da bakterioak zelulen barnean ikusi zirela, gehienetan endosoma/lisosoma antzeko egituren barnean eta batzuetan zitosolean aske. Toxinarik gabeko bakterioekin ez zen bakterio barneraturik ikusi.

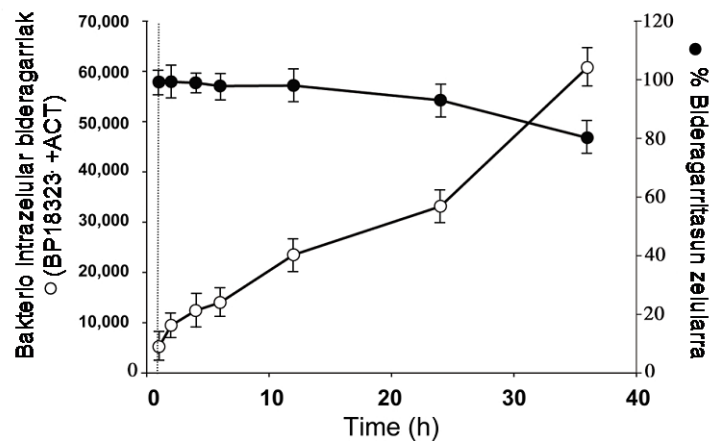
2.irudia: Mikroskopi elektronikoz ikusitako *B. pertussis*-en barneraketa CHO zeluletan

Birulentzia-faktorerik adierazten ez duen *B. pertussis*
anduia (BP18323⁻ anduia) + ACT



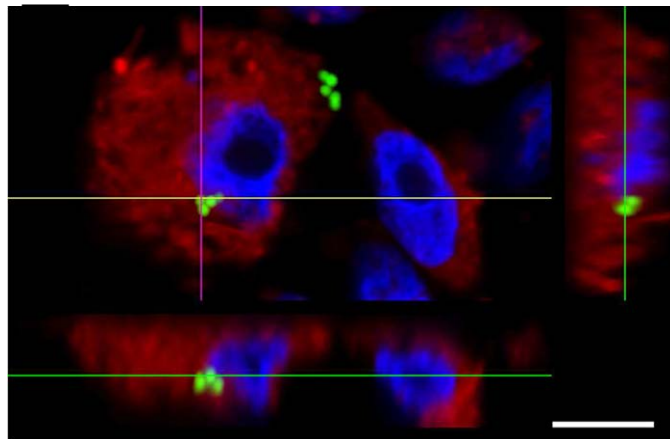
Inbasio prozesu honen kuantifikazio zehatza egiteko gentamizina inbasio-saio bat egin zen (Ishibashi et al., 2001). Saio honeta ACT gehituta duten bakterioak zelulekin inkubatu ziren eta bi ordu pasata gentamizina antibiotikoa gehitu zitzaion barneratu ez ziren bakterioak hiltzeko. Hurrengo pausuan ordu desberdinak pasa eta gero zelula guztiak lisatu ziren eta lagina petri-plaka batean gehitu zen, zelulen barnean zeuden bakterioak hazteko eta sortu ziren koloniak kuantifikatzeko. 3A irudian ikusi daiteke bakterioak zeluletan barneratzeaz gain barnean erreplikatzeko gaitasuna duela, gero eta ordu gehiago pasa bakterio intrazelular gehiago daudelako (kanpoaldeko guztiak gentamizina bidez hiltzen dira lehenengo 2h pasatzean). Kontrol modura saioko ordu desberdinetan zelulen bideragarritasuna neurtu zen, saioaren lehenengo 24 ordutan ez dagoela garrantzizko heriotza-portzentairik ikusiz.

3. irudia: Bakterioen biziraupen eta bikoizketa zelulen barnean



Inbasio mekanismo hau ACTak bakarrik eragin dezakeen edo bakterioaren beste osagai batzuekin batera lortzen duen aztertze bihiekina saio bat egin genuen. Bihiekina 1 μm diametroa (bakterio baten antzeko tamaina) duten poliestirenozko bolatxo fluoreszenteak dira (Veiga et al., 2007). Saiorako ACT toxina atxikitzen zaie bihiei eta BSA proteina beste batzuei kontrol bezala. Bakterioekin egiten zen inbasio-saiorearen baldintza berdinak erabili ziren eta mikroskopio konfokala bidez argazkiak atera ziren. BSA itsatsita zuten bihiekina ez zen zelula barnean bihirik aurkitu, ACT zutenekin ordea bai, 4.irudian ikusten den bezala. Zelularen mintzak DyeI-rekin markatu ziren, nukleoa Hoechts-ekin urdinez eta bihiak berezko fluoreszentzia berdea dute. 4 irudian barnealdean dauden bihiak ikusi daitezke plano desberdinetatik.

4.irudia: ACT erantsita duten bihien barneraketa CHO zeluletan mikroskopi konfokalez ikusita.



4. Ondorioak

Emaitza hauek aztertuta ondorioztatu daiteke *B. pertussis*-en ACT toxinak bakterio guztiaren barneraketa eragiteko gaitasuna duela bere kabuz. Horrez gain, oso interesgarria da jakitea bakterioa zelula barnean egonda bikoiztu egin daitekeela, endosoma/lisosoma barnean bizirauteko mekanismoren bat duelako seguraski. Itu-zelulen barnean bizitzeko gaitasuna duten bakterio gehienek poro-eratzailerak edukitzen dituzte (Alonso and García-del Portillo, 2004). Toxina hauek bi funtzio garrantzitsu dituzte bakterio intrazelularrentzako, batetik itu-zelulen mintzean egiten dituzten poroek zelularren endozitosi mekanismoak aktibatzen dituzte

bakterioaren barneraketa bultzatuz (Fernandes et al., 2011). Bestetik, bakterioa barnean dagoela endosomaren mintza zulatuz endosomaren azidifikazioa geldiarazten dute, bakterioa endosomaren barnean bizirautea baimenduz (Duclos and Desjardins, 2000). Hau jakinda pentsa daiteke ACT-ren poro-eratzailerako gaitasuna dela garrantzitsuena inbasio-faktore bezala jokatzeko. Hau ziurtatzeko saio gehiago egin beharko dira eta AC aktibitatea ez duen edo poroak eratzeko gaitasuna ez duten toxina mutanteak erabiltzea beharrezkoa izango da.

Lan honek *B. pertussis*-ren infekzio-prozesuan orain arte kontuan hartu ez diren urratsak daudela ikustarazteko balio dezake. *B. pertussis* soilik patogeno extrazelular bat bezala ikusteak tratamendu desegokiak diseinatzea eragin dezake. Lan honek erakusten digu infekzio-prozesuan *B. pertussis* zelula ez-fagozitzaileen barnea biziraun eta bikoiztu daitezkeela ACT toxinari esker. Honek ACT toxina bakterioaren kontrako tratamenduen iturri garrantzitsua bihurtzea ekarri beharko luke.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honen hurrengo saioentzako interesgarria izango litzake adenilato ziklasa aktibitate edo poroak eratzeko gaitasuna ez duten ACT toxina mutanteak erabiltzea. Honi esker aztertu daiteke ze domeinuk ematen dio ACT-ri inbasio-faktore bezala jokatzeko gaitasuna. Bakterioak zelula barnean biziraun eta bikoizteko behar dituen mekanismoak zeintzuk diren aztertzea gai interesgarria izango litzake, hau argitzeak patogeno intrazelularren kontrako tratamenduen hobetzea ekarri dezake eta.

6. Erreferentziak

- Aktories, K., Lang, A.E., Schwan, C., and Mannherz, H.G. (2011). Actin as target for modification by bacterial protein toxins. *FEBS J.* 278, 4526–4543.
- Alonso, A., and García-del Portillo, F. (2004). Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int. Microbiol.* 7, 181–191.
- Basler, M., Knapp, O., Masin, J., Fiser, R., Maier, E., Benz, R., Sebo, P., and Osicka, R. (2007). Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of Bordetella adenylate cyclase toxin. *J. Biol. Chem.* 282, 12419–12429.
- Duclos, S., and Desjardins, M. (2000). Microreview Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. 2.
- Fedele, G., Bianco, M., and Ausiello, C.M. (2013). The virulence factors of Bordetella pertussis: talented modulators of host immune response. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 61, 445–457.
- Fernandes, M.C., Cortez, M., Flannery, A.R., Tam, C., Mortara, R. a, and Andrews, N.W. (2011). Trypanosoma cruzi subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J. Exp. Med.* 208, 909–921.
- Goyard, S., Sebo, P., D'Andria, O., Ladant, D., and Ullmann, a (1993). Bordetella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Zentralbl. Bakteriol.* 278, 326–333.
- Higgs, R., Higgins, S.C., Ross, P.J., and Mills, K.H.G. (2012). Immunity to the respiratory pathogen Bordetella pertussis. *Mucosal Immunol.* 5, 485–500.
- Ishibashi, Y., Relman, D.A., and Nishikawa, A. (2001). Invasion of human respiratory epithelial cells by Bordetella pertussis: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb. Pathog.* 30, 279–288.
- Linhartová, I., Bumba, L., Mašín, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J., Procházková, K., Adkins, I., Hejnová-Holubová, J., Sadílková, L., et al. (2010). RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1076–1112.

- Melvin, J. a, Scheller, E. V, Miller, J.F., and Cotter, P. a (2014). *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 274–288.
- Mills, K.H.G., Ross, P.J., Allen, A.C., and Wilk, M.M. (2014). Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis? *Trends Microbiol.* 22, 49–52.
- Uribe, K.B., Martín, C., Etxebarria, A., González-Bullón, D., Gómez-Bilbao, G., and Ostolaza, H. (2013). Ca²⁺ Influx and Tyrosine Kinases Trigger *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin (ACT) Endocytosis. Cell Physiology and Expression of the CD11b/CD18 Integrin Major Determinants of the Entry Route. *PLoS One* 8, e74248.
- Veiga, E., Guttman, J.A., Bonazzi, M., Boucrot, E., Toledo-Arana, A., Lin, A.E., Enninga, J., Pizarro-Cerdá, J., Finlay, B.B., Kirchhausen, T., et al. (2007). Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection. *Cell Host Microbe* 2, 340–351.
- Weingart, C.L., and Weiss, A.A. (2000). *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. *Infect. Immun.* 68, 1735–1739.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak ematen diogu gure laborategiko teknikaria den Rocio Alonsori bere laguntzarengatik eta SGIker UPV/EHU-ko zerbitzuari mikroskopi konfokal eta elektronikorako emandako laguntza teknikoarengatik.