



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Mintzeko-kolesterola: bakterio-
toxinen aspaldiko laguna**

*Jone Amuategi Aulestiarte,
Rocio Alonso Estrada eta
Helena Ostolaza Etxabe*

21-28 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.02>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Mintzeko-kolesterola: bakterio-toxinen aspaldiko laguna

Jone Amuategi Aulestiarte^{1,2}, Rocio Alonso Estrada^{2,3}, Helena Ostolaza Etxabe^{1,2}

*1 Biokimika eta Biologia Molekularra saila (EHU), 2 Biofisika Institutua (UPV/EHU-CSIC),
3 Biofisika Bizkaia Fundazioa
jone.amuategui@ehu.eus*

Laburpena

Adenilato Ziklasa Toxina (ACT) *Bordetella pertussis* bakterioak jariatzen dituen birulentzia-faktoreetako bat da. Ostalariaren defentsak ahultzen ditu, makrofagoak intoxikatuz eta haien mintz plasmaticoak zulatuz. Horretarako, lehen eta azken urratsa proteina itu-zelulen mintz plasmaticora lotu eta mintzean integratzea da. Arloko ikerketan aurrerapauso handiak egin diren arren, ezezagunak dira toxinak forma aktiboa har dezan gertatu beharreko urratsak. Lan honetan, ACTk eta mintzeko kolesterolak elkarrekintza espezifikoa dutela erakutsi dugu, eta kolesterolari lotzeaz arduratzen diren lau motibo identifikatu ditugu, bi jardueretarako funtsezkoak direnak.

Gako-hitzak: kolesterola; bakterio-toxinak; toxina poro-eragileak; lipido-proteina elkarrekintzak

Abstract

Adenylate Cyclase Toxin (ACT) is one of the main virulence factors secreted by Bordetella pertussis, the bacterium causative of whooping cough. It intoxicates and forms pores in the plasma membrane of macrophages, debilitating host defences. The first and last step for these toxin activities are binding to the plasma membrane of target cells and conversion into membrane-integrated proteins. However, the molecular determinants in the protein or the target membrane that govern this conversion to an active toxin form are fully unknown. Here, we show that ACT specifically interacts with membrane cholesterol, and find in two membrane-interacting domains, four cholesterol-binding motifs that are essential for both activities.

Keywords: bacterial toxins; pore-forming toxins; lipid-protein interactions

1. Sarrera eta motibazioa

Toxinak zelulak kaltetzen dituzten erremintak dira eta bizi-erreinu guztietan aurki daitezke, bakterioetatik gizakietaraino. Molekula txikiak, peptidoak edo proteinak izan daitezke eta beren eginkizunak gauzatzeko mekanismo desberdinak jarraitu ditzakete. Hortaz, haien toxikotasun maila ere aldatzen da.

Ikerlan honetan, bakterioek ekoizten dituzten toxina poro-eragileak (ingelesez *Pore-forming toxins* edo PFT) izan ditugu aztergai. PFTak mintzen integritatea mehatxatzen duten proteina sofistikuak dira, mintza alde batetik bestera gurutzatzen duten kanal urtsuak eratzen baitituzte (Dal Peraro eta van der Goot, 2016; Mondal eta Chattopadhyay, 2020) (**1. irudia**). Mintz biologikoek zelularen osotasuna eta arkitektura mantentzeko aldamiu sendo eta dinamikoak osatzen dituzte, eta horiek izorratzeak zelularen heriotza eragin dezake (Bernardes eta Fialho, 2018; Kulma eta Anderluh, 2021; Zhang et al., 2018). Hori dela eta, PFTak bakterio patogenoen birulentziarako ezinbesteko tresnak dira (Gonzalez et al., 2008).

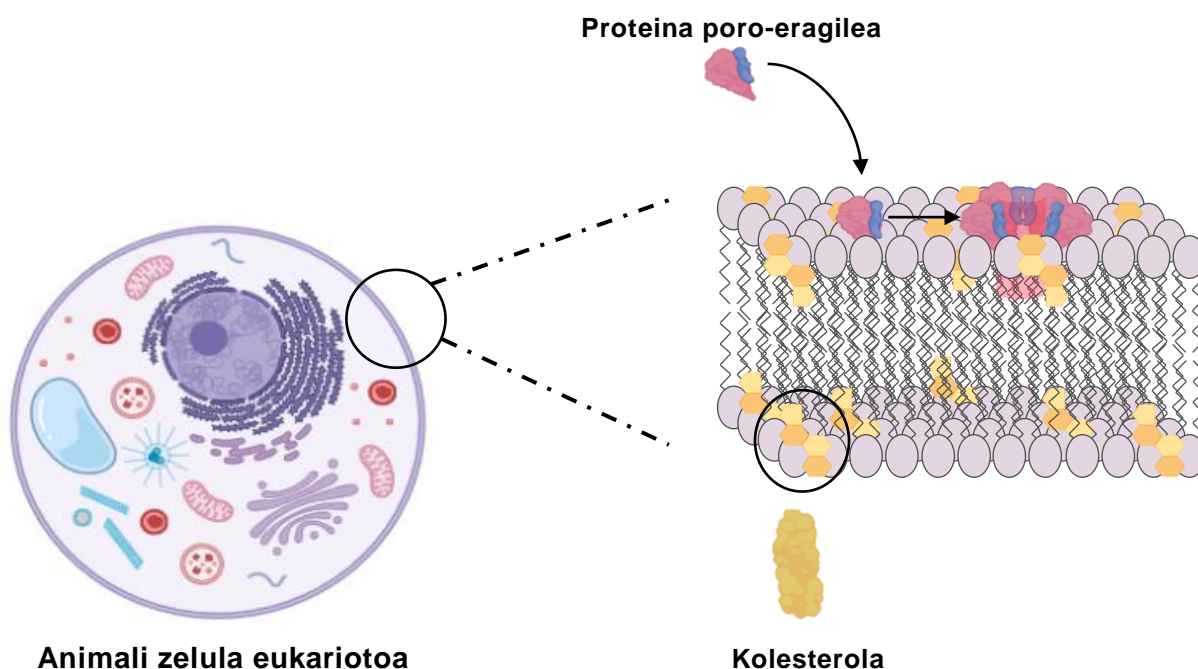
Ezaugarriei dagokienez, PFTek oso talde berezia osatzen dute; izan ere, uretan disolbagarriak diren monomero gisa jariatzen dira, baina ondoren, zelula eukariotoen mintz-plasmaticora zuzentzen dira, bertan poroak eratzeko eta zelulen lisia eragiteko (Da Peraro eta van der Goot, 2016; Gilbert et al., 2014; Parker eta Feil, 2005; Tilley eta Saibil, 2006). Horrenbestez, ingurune urtsutik mintz-ingurunera pasatzean egituraz aldatzen dira (Lata et al., 2022). Horretarako, uretatik babestuta zeuden eskualde hidrofobikoak agerian geratzen dira eta mintzean txertatzen dira.

Mota honetako toxinen artean aski ezagunak dira kolizinak, zitolisinak, hemolisinak, difteria toxina, antrax toxinarene babes-antigenoa edota *Repeats in ToXins* (RTX) familiako PFTak (Lata et al., 2022).

PFTek, askotan, mintzeko lipidoen laguntza izaten dute, bigeruzan behar bezala txerta daitezten. Lipidoek prozesua zuzenean nahiz zeharka doi dezakete, hain zuzen ere. Alde batetik, proteinekin modu espezifikoan elkarreagin dezakete (Laganowsky et al., 2014; Renard eta Byrne, 202; Sych et al., 2022) eta bestetik, mintzaren ezaugarri biofisikoak (jariakortasuna, fase-bereizketa, lodiera, tentsioa, etab.) modulatu ditzakete (Escribá et al., 2008; Janmey eta Kinnunen, 2006; Salas-Estrada et al., 2018). Beraz, proteinaren egitura eta funtzioa alda ditzakete.

Kolesterolak (Chol), esaterako, era askotako mintz-hartzaileen jardura kontrolatzen du, interakzio espezifikoaren bidez. Halaber, zenbait proteinek kolesterola espezifikoki ezagutzen duten eskualdeak eduki ditzakete: neurotransmisoreen hartzaileek eta ABC (ingelesez *ATP-binding cassette*) garraiatzaileek, adibidez. Eskualde horiek CRAC (ingelesez *Cholesterol Recognition Amino acid Consensus*) edo alderantzizko CARC motibo gisa izendatzen dira eta askotariko egiturak dituzten arren, kolesterolari lotzeko antzeko mekanismoak erabiltzen dituzte. Literaturan irakur daitekeenez, zenbait aminoazido sarritan agertzen da segmentu horietan, jada ezaguna den eta deskribatuta dagoen patroia bat jarraituz (Fantini et al., 2016; Fantini eta Barrantes, 2013).

1. Irudia. Proteina poro-eragileen jarduna.

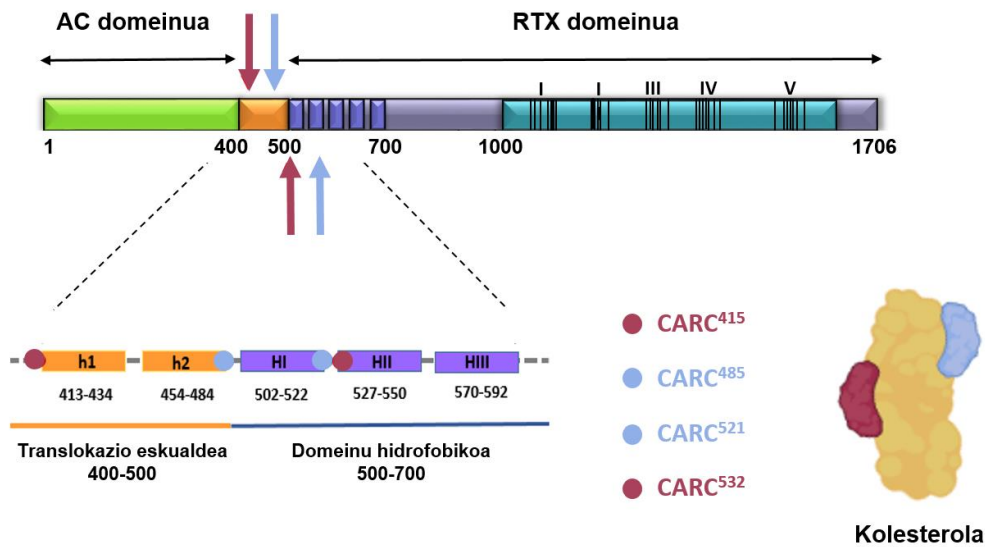


2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lipido eta proteinen arteko elkarrekintzak interes handia sortu du aspaldidanik. Ikertzaile askok mintzeko lipidoen eta proteinen arteko interakzioan jarri dute arreta, hain zuzen ere, eta horien arteko mekanismo molekularrak deskribatzen saiatu dira. Izatez, interes handiko gaia da gaur egun ere eta hainbat diziplina zientifiko uztartzen ditu: biokimika, biofisika, zelulen biologia eta bioinformatika, besteak beste.

Lan honetan, *Bordetella pertussis* bakterio patogenoak jariatutako Adenilato Ziklasa Toxinak (ingelesez *Adenylate Cyclase Toxin* edo ACT) mintzeko kolesterolarekin elkarrekintza espezifikoa ezartzen duela frogatu dugu. Bestalde, ACTk mintzekin elkarrekiteko dituen bi segmentutan, translokazio eskualdean eta domeinu hidrofobikoan, kolesterola espezifikoki errekonozitzen duten lau motibo deskribatu ditugu (2. Irudia).

2. irudia. ACTren aminoazido sekuentzia eta intereseko CRAC/CARC motiboak.



Patogeno honek kukutxeztula izeneko arnasbideetako infekzio kutsakor eta hilgarria eragiten du gizakietan. Garrantzitsua da bakterioa eta hark ekoiztutako birulentzia faktoreak ikertzea, arnasbideetako infekzioak munduan heriotza gehien eragiten duten gaixotasun kutsakorren artean daude eta. Bide horretan ekarpena egiteko asmoz, gure taldean ACT toxinarene egitura eta zelulak kaltetzeko darabilen mekanismo molekularra zein diren ikertu nahi izan dugu.

Jakin badakigu proteina hau RTX familiako PFT bat dela, makrofagoak intoxikatzen dituela eta haien mintz plasmaticoak zulatzen dituela (Chenal, 2018). Horrez gain, bere aktibitate zitotoxiko eta zitolitikoa kolesterolaren menpe daudela ere deskribatu da (González Bullón et al., 2021). Aitzitik, orain arte ezin izan dugu zehaztu ACT eta kolesterolaren arteko elkarrekintza zuzena edo zeharkakoa ote den. Horrexegatik, hemen, ACT kolesterolari zuzenean lotzen al zaion aztertu nahi izan dugu.

Helburu espezifikoiei dagokienez, lehenbizi, proteinak kolesterolik gabeko mintzetan eta kolesteroldunetan daukan portaera aztertu nahi izan dugu. Horrez gain, CRAC/CARC motiboek patroi ezaguna dutenez, bioinformatika erabili dugu ACTren sekuentzian eskualde horiek bilatzeko. Orain arteko ikerketa-ibilbideak translokazio eskualdean eta domeinu hidrofobikoan halako lau motibo koka litezkeela pentsatzera garamatza (**2. Irudia**). Hortaz, lan honetan motibo horiek identifikatu eta deskribatu nahi izan ditugu. Izan ere, toxina mintzean txertatzen eta haren egitura egonkortzen lagun dezaketela uste dugu (Amuategi et al., 2022).

3. Ikerketaren muina

3.1 ACT eta kolesterolaren artean elkarrekintza espezifikoa dago

Hasteko, ACT eta kolesterolaren arteko lotura zuzena eta espezifikoa dela frogatzeko, ACTk hainbat konposiziotako liposomei lotzeko daukan gaitasuna aztertu dugu (**3A. Irudia**). Horretarako, proteina zenbait konposiziotako liposomekin inkubatu da eta ondoren, laginak, sakarosa gradientearen erabiliz, zentrifugatu dira. Honi esker, liposomei loturiko proteina eta proteina askea bereizten dira. Azkenik, zentrifugaziotik jasotako laginak frakzioetan banatu eta SDS-PAGE gel batean kargatu dira. Ondoren, banda bakoitzaren intentsitatea kuantifikatu eta lotutako proteinaren ehunekoa kalkulatu da.

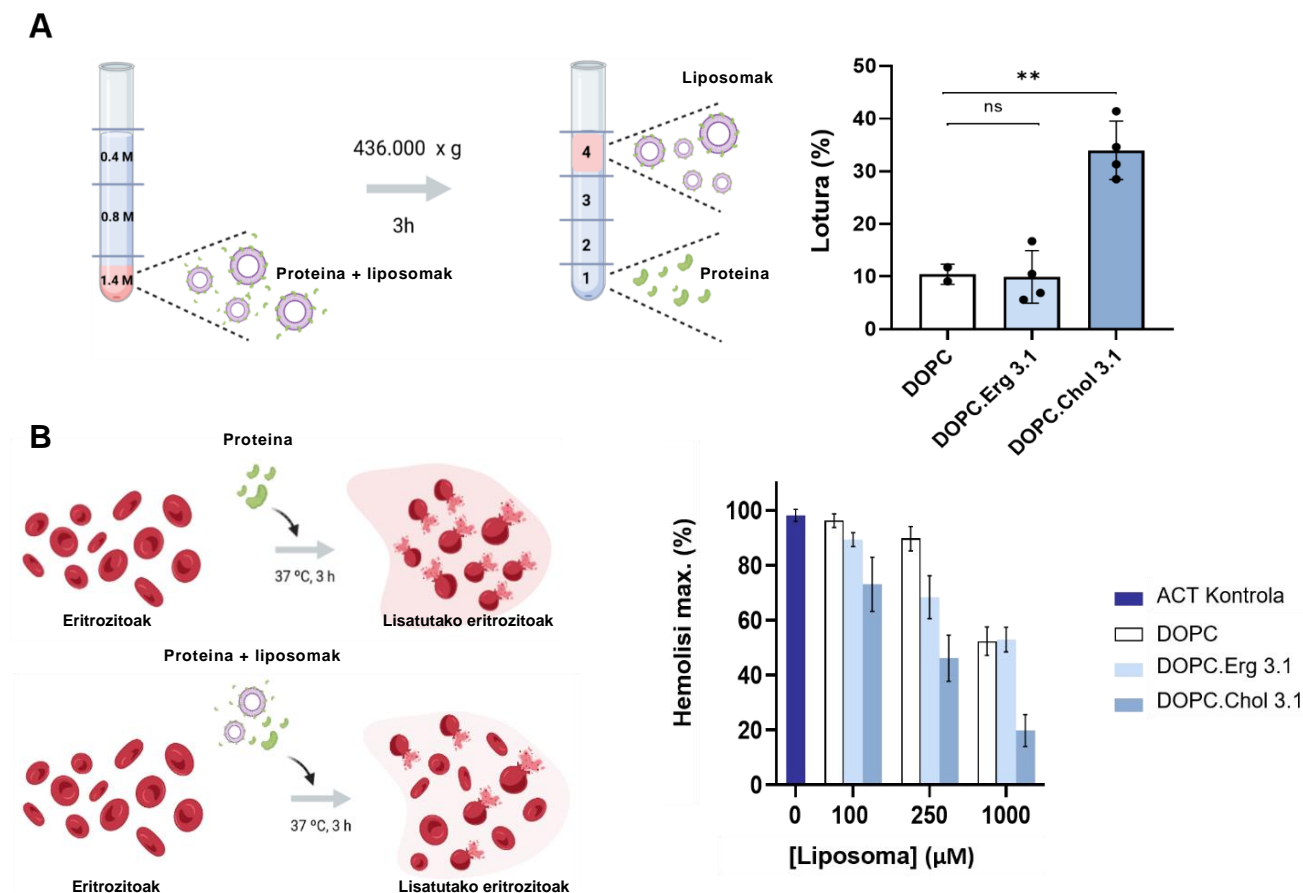
3A. Irudian erakutsitako emaitzek argi erakusten dute proteina fosfolipido hutsezko (DOPC) mintzetan baino hobeto lotzen dela % 25 kolesterola dutenetan, desberdintasuna estatistikoki esangarria izanik. Bestalde, kolesterolaren analogoa den ergosterolari (Erg) ere oso gutxi lotzen da.

Emaitza hauek osatzeko asmoz, ACTk eritrozitoak zulatzeko daukan gaitasuna neurtu da. Horretarako, espektrofotometriaren bidez, laginen uhertasunaren jaitziera neurtu da eta eskuratutako

datuak zelulen heriotza bezala interpretatu dira. Kasu honetan, lehia oinarritutako esperimentu bat burutu da. Izan ere, hemolisi zinetika neurtu aurretik, ACT konposizio desberdinetako liposomekin inkubatu da (**3B. Irudia**). Beraz, proteina liposomei lotuz gero, ezin izango da eritrozitoen mintzera lotu haiek zulatzeko.

Horrenbestez, esperimentu hauetatik ondokoa ondoriozta dezakegu: ACTren hemolisi gaitasuna nabarmen jaisten da aldeztu aurretik kolesteroldun liposomekin inkubatzen dugunean. DOPC hutsezko eta DOPC.Erg 3.1 konposizioko mintzek, berriz, hemolisia gutxitzeko antzeko gaitasuna dutela ikusi dugu.

3. irudia. ACTren lotura eta hemolisi entseguak.



3.2 Kolesterolaren errekonozimendurako motiboak mutatzean ACTren aktibitatea aldatzen da

Aurreko atalean, ACT eta kolesterolaren arteko elkarrekintza espezifikoa dela baieztatu dugu. Hemen, arestian aipaturiko CRAC eta CARC motiboen identifikazioa eta deskribapena egin dugu.

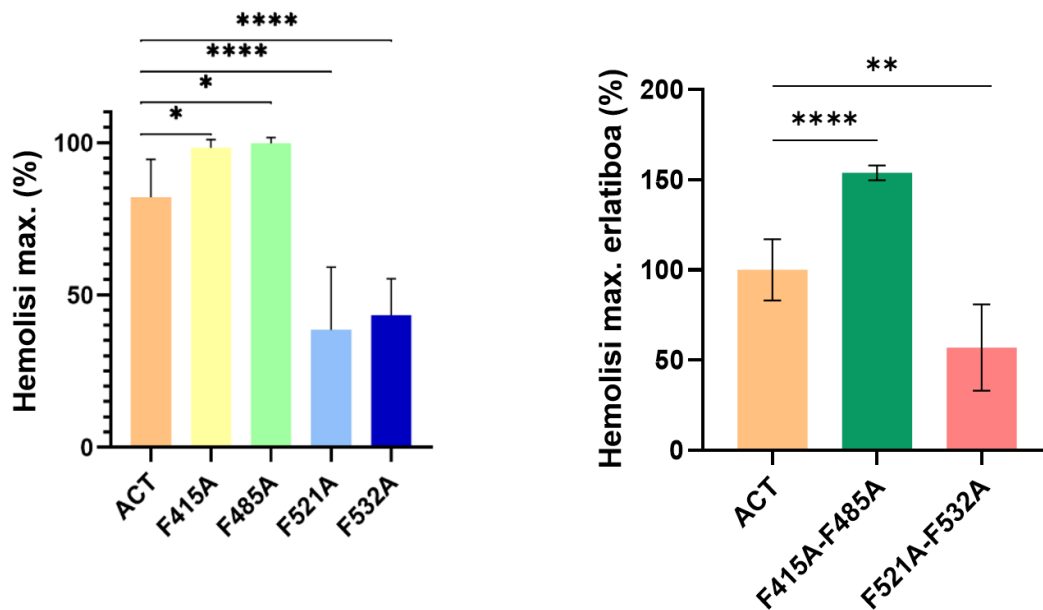
ACTk mintzekin elkarrekiteko dauzkan eskualdeetan kolesterola espezifikoki ezagutu zezaketen CRAC/CARC motiboen bilaketa egin genuen jada (Amuategi et al., 2021). Oraingoan, **2. Irudian** ageri diren lau motiboetan jarri dugu arreta. Literaturan irakur daitekeenez, eskualde hauetan ageri diren fenilalanina edota tirosina zentralak aldatuz gero, proteinen eta kolesterolaren arteko elkarrekintza gutxitu edo ezabatu daiteke (Fantini et al., 2016; Fantini eta Barrantes, 2013). Hori dela eta, ACTren zenbait proteina mutante eskuratu ditugu, motibo bakoitzeko aminoazido bat edo bi eraldatuz. Kasu guztietan fenilalanina (F) alaninarengatik (A) aldatu dugu.

Lehenengo, mutaturako proteinen hemolisi gaitasuna aztertu dugu, 3 orduko hemolisi zinetikak jarraituz. **4. irudian** ikus daitekeenez, F521A. eta F532A mutazioek proteinen lisi-

gaitasuna nabarmen murriztu dute. Aitzitik, F415A eta F485A mutanteek proteina basatiak baino jarduera litiko handiagoa erakutsi dute. Bi mutazio dituzten proteinen kasuan, F521A-F532A mutazio bikoitzak proteinaren hemolisi gaitasuna ia erdira jaitsi du. Halere, mutazio horien efektua ez da gehigarria izan eta beraz, kolesterolari lotzeko eskualde horietako bat galtzea nahikoa da ACTk poroak eratzeko daukan gaitasuna gal dezan. F415A-F485A mutantearekin lortutako emaitzek berriz, mutazio horien efektua gehigarria dela adierazi dute, hemolisi maximoa nabarmen handitu baita.

Datu hauetan oinarrituz, kolesterola ezagutzen duten CRAC⁵²¹ eta CARC⁵³² motiboak proteinaren aktibitate poro-eragilerako beharrezkoak direla pentsa daiteke, ziurrenik, mintzetan txertatzen direlako eta poro egituraren parte direlako.

4. irudia. ACTren CRAC eta CARC mutanteen hemolisi gaitasuna.

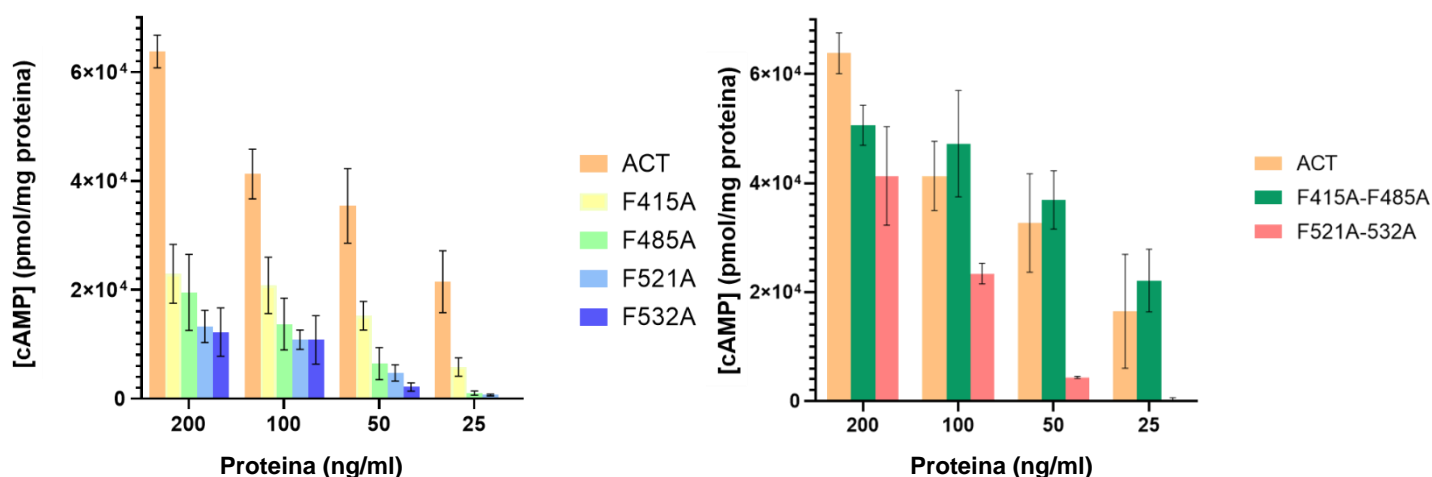


Irudietan erakusten ez den arren, proteina mutanteek kolesteroldun mintzei lotzeko duten gaitasuna proteina basatiaren antzekoa dela frogatu dugu (Amuategi et al. 2022). Beraz, loturan hainbat CRAC/CARC motibok parte hartzen dutela pentsa genezake.

Bestalde, proteinaren aktibitate zitotoxikoari erreparatzeko, proteina mutanteek makrofagoetan AMP ziklikoa (cAMP) sintetizatzen duten gaitasuna aztertu dugu. Izan ere, literaturan deskribatuenez, toxina honek zelula ostalariaren zitosolean cAMPren gehiegizko sintesia eragiten du, zelularen heriotza eraginez (Ladant eta Ullmann, 1999).

Esperimentua gauzatzeko, makrofagoak proteinekin inkubatu eta sintetizatutako cAMP kontzentrazioa neurtu dugu, kit espezifiko bat erabiliz. **5. Irudian** ikus daitekeenez, mutazio puntualek nabarmen jaitsi dute cAMP ekoizpena. Bi mutazio dituzten proteinen emaitzak aztertuz, berriz, F415A-F485A mutantearen kasuan jaitsiera ez da horren nabarmena izan; F521A-F532A mutantearen kasuan, aldiz, bai. Ondorioz, identifikaturiko CRAC/CARC motiboak proteinaren jarduera egokirako (translokaziorako nahiz hemolisirako) beharrezkoak direla baieztatu dezakegu.

5. irudia. ACTren CRAC eta CARC mutanteen translokaziorako gaitasuna.



4. Ondorioak

PFTak ikertzeak proteinen egitura aldaketak hobeto ulertzeko balio izan du, oro har. Izan ere, egitura aldatzen duten beste proteina batzuek ere antzeko mekanismoak erabiltzen dituzte: ornodunen immunitate sistemako hainbat proteinek eta proteina amiloideek, besteak beste (Lashuel eta Lansbury, 2006; Rosado et al., 2007).

Aurretik ere bagenekien ACTren jardura litikoa eta zitotoxikoa mintzeko kolesterol kontzentrazioaren menpe zeudela; alta, ez genekien kolesterolak eragin zuzenik ba ote zuen jardura horietan. Ikerketa honetan aurkeztutako emaitzei esker, badakigu ACT toxina mintzeko kolesterolari espezifiki lotzen zaiola eta horretarako lau motibo funtzional erabiltzen dituela. Aipaturikoak ACTk mintzekin elkarrekiteko erabiltzen dituen bi eskualdetan kokatzen dira: translokazio eskualdean eta domeinu hidrofobikoan. Hala ere, badirudi motibo hauek ez direla RTX familiako beste toxinetan ageri eta beraz, toxina honen berezkoak direla (Amuategi et al. 2022).

Motibo horiek toxinen funtzionamendu egokirako ezinbestekoak direnez, ACT kolesterolari lotzeko giltza izan daitezke. Horrenbestez, toxina honen aktibitatea murrizteko itu molekular aproposa izan litezke. Kukatxetula bezalako gaixotasun kutsakor eta hilgarriari aurre egiteko, patogenoen erasorako tresneria eta mekanismoak zein diren argi ulertzea premiazkoa da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunean, aipatutako lau CRAC/CARC motibo isolatuek mintz-ingurunean daudenean duten egitura eta portaera aztertu nahi ditugu. Horretarako, 20-30 aminoazidoko peptido sintetikoak lortu ditugu eta haien egitura sekundarioa analizatzen ari gara transmisiozko espektroskopia infragorria (FT-IR) erabiliz. Kolesterolaren presentziak motibo horien egituran aldaketarik eragiten al duen aztertuko dugu. Era berean, sekuentzia horiek mutatzeko peptidoen egituran izan ditzakeen efektuak ere aztertuko ditugu. Bestalde, segmentu horiek mintzetan hartzen duten orientazioari eta topologiari ere erreparatu nahi diegu, horretarako, *Attenuated Total Reflectance* (ATR) espektroskopia infragorria erabiliz.

Azkenik, motibo horien ezaugarri funtzionalak ikertzeko asmoz, proteina osoaren aktibitatea inhibitzeko gai ote diren ikertuko dugu, makrofago nahiz eritrozitoetan. Finean, tesi proiektu honen helburu nagusia, AC domeinuaren mintzean zeharreko translokazioa urratsez urrats deskribatzea da eta translokaziorako eredu errealista bat proposatzea.

6. Erreferentziak

- Amuategi J., Benito A., González D., Alonso R., Martín C. eta Ostolaza H. (2021) ACT toxina eta mintzeko kolesterolaren arteko elkarrekintzaren azterketa. O. Arbelaitz, A. Latatu, M.J. Omaetxebarria, eta B. Urgell IV. *Ikergazte. Nazioarteko ikerketa euskaraz. Kongresuko artikulu bilduma, Zientziak eta Natura Zientziak*. UEU, Gasteiz, 13-20.
- Amuategi, J., Alonso, R., & Ostolaza, H. (2022). Four Cholesterol-Recognition Motifs in the Pore-Forming and Translocation Domains of Adenylate Cyclase Toxin Are Essential for Invasion of Eukaryotic Cells and Lysis of Erythrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), Art. 15. <https://doi.org/10.3390/ijms23158703>
- Bernardes, N., & M. Fialho, A. (2018). Perturbing the Dynamics and Organization of Cell Membrane Components: A New Paradigm for Cancer-Targeted Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3871. <https://doi.org/10.3390/ijms19123871>
- 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>
- Escribá, P. V., González-Ros, J. M., Goñi, F. M., Kinnunen, P. K. J., Vigh, L., Sánchez-Magraner, L., Fernández, A. M., Busquets, X., Horváth, I., & Barceló-Coblijn, G. (2008). Membranes: A meeting point for lipids, proteins and therapies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(3), 829-875. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00281.x>
- Fantini, J., & 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., & Barrantes, F. J. (2016). A mirror code for protein-cholesterol interactions in the two leaflets of biological membranes. *Scientific Reports*, 6(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/srep21907>
- Gilbert, R. J. C., Dalla Serra, M., Froelich, C. J., Wallace, M. I., & Anderluh, G. (2014). Membrane pore formation at protein-lipid interfaces. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(11), 510-516. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.09.002>
- González Bullón, D., Uribe, K. B., Amuategi, J., Martín, C., & Ostolaza, H. (2021). Cholesterol stimulates the lytic activity of Adenylate Cyclase Toxin on lipid membranes by promoting toxin oligomerization and formation of pores with a greater effective size. *The FEBS Journal*, 288(23), 6795-6814. <https://doi.org/10.1111/febs.16107>
- Gonzalez, M. R., Bischofberger, M., Pernot, L., van der Goot, F. G., & Frêche, B. (2008). Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story? *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(3), 493-507. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7434-y>
- Janmey, P. A., & Kinnunen, P. K. J. (2006). Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends in Cell Biology*, 16(10), 538-546. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.08.009>
- Kulma, M., & Anderluh, G. (2021). Beyond pore formation: Reorganization of the plasma membrane induced by pore-forming proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(17), 6229-6249. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03914-7>
- Ladant, D., & Ullmann, A. (1999). Bordatella pertussis adenylate cyclase: A toxin with multiple talents. *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)
- Laganowsky, A., Reading, E., Allison, T. M., Ulmschneider, M. B., Degiacomi, M. T., Baldwin, A. J., & Robinson, C. V. (2014). Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature*, 510(7503), 172-175. <https://doi.org/10.1038/nature13419>
- Lashuel, H. A., & Lansbury, P. T. (2006). Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Quarterly Reviews of Biophysics*, 39(2), 167-201. <https://doi.org/10.1017/S0033583506004422>
- Lata, K., Singh, M., Chatterjee, S., & Chattopadhyay, K. (2022). Membrane Dynamics and Remodelling in Response to the Action of the Membrane-Damaging Pore-Forming Toxins. *The Journal of Membrane Biology*, 255(2-3), 161-173. <https://doi.org/10.1007/s00232-022-00227-z>
- Mondal, A. K., & Chattopadhyay, K. (2020). Taking Toll on Membranes: Curious Cases of Bacterial β -Barrel Pore-Forming Toxins. *Biochemistry*, 59(2), 163-170. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00783>
- Parker, M. W., & Feil, S. C. (2005). Pore-forming protein toxins: From structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 88(1), 91-142. <https://doi.org/10.1016/j.pbmolbio.2004.01.009>
- Peraro, M. D., & van der Goot, F. G. (2016). Pore-forming toxins: Ancient, but never really out of fashion. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.3>

- Renard, K., & Byrne, B. (2021). Insights into the Role of Membrane Lipids in the Structure, Function and Regulation of Integral Membrane Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), Art. 16. <https://doi.org/10.3390/ijms22169026>
- Rosado, C. J., Buckle, A. M., Law, R. H. P., Butcher, R. E., Kan, W.-T., Bird, C. H., Ung, K., Browne, K. A., Baran, K., Bashtannyk-Puhlovich, T. A., Faux, N. G., Wong, W., Porter, C. J., Pike, R. N., Ellidson, A. M., Pearce, M. C., Bottomley, S. P., Emsley, J., Smith, A. I., ... Whisstock, J. C. (2007). A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5844), 1548-1551. <https://doi.org/10.1126/science.1144706>
- Salas-Estrada, L. A., Leioatts, N., Romo, T. D., & Grossfield, A. (2018). Lipids Alter Rhodopsin Function via Ligand-like and Solvent-like Interactions. *Biophysical Journal*, 114(2), 355-367. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.021>
- Sych, T., Levental, K. R., & Sezgin, E. (2022). Lipid-Protein Interactions in Plasma Membrane Organization and Function. *Annual Review of Biophysics*, 51, 135-156. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-090721-072718>
- Tilley, S. J., & Saibil, H. R. (2006). The mechanism of pore formation by bacterial toxins. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(2), 230-236. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.03.008>
- Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., & Han, J. (2018). Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*, 28(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.133>

7. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau Jone Amuategi Aulestiarteri Doktorego Tesia egiteko esleitutako EHU/UPVko PIF19/62 diru-laguntzari esker eta Helena Ostolaza Etxabek jasotako Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioiko BFU2017-82758-P (AEI/FEDER, UE) eta Eusko Jaurlaritzako Grupos Consolidados IT1264 -19 eta IT1720-22 proiektuei esker idatzi da. Eskerrak eman nahi dizkiot Rocío Alonso Estradari lan honen alderdi esperimentalean nahiz artikuluaren garapenean eskaintako ezinbesteko laguntzagatik; Helena Ostolaza Etxaberi, ideia planteatu eta zuzentzeagatik; Euskal Herriko Unibertsitateari eta Biofisika Institutuari esperimentuak egiteko beharrezko baliabideak eskaintzeagatik.

Artikulu hau ondorengo nazioarteko artikulutik eratorri da: Amuategi, J., Alonso, R., & Ostolaza, H. (2022). Four Cholesterol-Recognition Motifs in the Pore-Forming and Translocation Domains of Adenylate Cyclase Toxin Are Essential for Invasion of Eukaryotic Cells and Lysis of Erythrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), Art. 15. <https://doi.org/10.3390/ijms23158703>