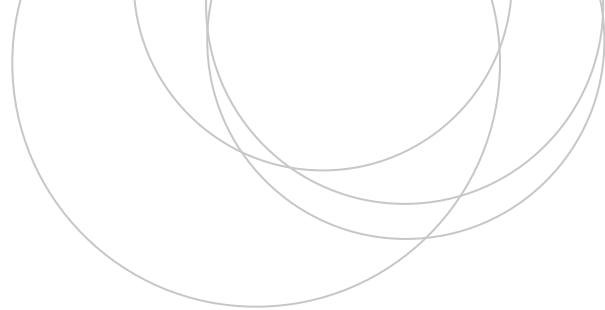




Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

ZIENTZIA  
ETA TEKNOLOGIA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana  
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

# Kolesterolaren eragina adenilato ziklasa toxinaren aktibitate zitotoxikoan

Egilea:  
Izaskun Izagirre Urizar  
Zuzendaria:  
Helena Ostolaza Etxabe

© 2022, Izaskun Izagirre Urizar

Leioa, 2022ko ekainaren 22a

## AURKIBIDEA

<b>1. SARRERA</b> .....	<b>1</b>
1.1. Kukutxeztula eta <i>Bordetella pertussis</i> bakterioa.....	1
1.2. Adenilato ziklasa toxina (ACT).....	1
1.3. Kolesterolarekiko espezifikotasuna eta CRAC/CARC motiboak .....	2
<b>2. HIPOTESIAK ETA HELBURUAK</b> .....	<b>3</b>
<b>3. MATERIAL ETA METODOAK</b> .....	<b>3</b>
3.1. P454-487 peptidoa.....	3
3.2. Liposomen prestaketa.....	4
3.3. ACTren lotura-entseguak flotazio bidez .....	4
3.4. ACTk eritrozitoetan eragindako hemolisi-zinetikak .....	5
3.5. Dikroismo zirkularra P454-487 peptidoarekin.....	6
3.6. P454-487 peptidoaren lotura filtrazio bidez.....	6
3.7. P454-487 peptidoarekin hemolisi-zinetikak .....	7
<b>4. EMAITZAK</b> .....	<b>7</b>
4.1. ACTk mintzeko kolesterolarekiko espezifikotasuna du.....	7
4.2. Mintzeko kolesterolarekiko lotura inhibitzeak ACTk eragindako hemolisia murrizten du .....	8
4.3. P454-487 peptidoak helize itxura du lipido-bigeruzen presentzian .....	9
4.4. Kolesterol kontzentrazioak P454-487ren loturan duen eragina .....	10
4.5. P454-487 peptidoak ACTk eragindako hemolisia eragozten du .....	11
<b>5. EZTABAIDA ETA ONDORIOAK</b> .....	<b>12</b>
<b>6. ESKER ONAK</b> .....	<b>14</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>14</b>
<b>ERANSKINAK</b> .....	<b>16</b>

## 1. SARRERA

### 1.1. Kukutxeztula eta *Bordetella pertussis* bakterioa

Kukutxeztula *Bordetella pertussis* deituriko bakterioak gizakiengan eragindako arnasbideetako gaixotasuna da, eta arnasbideetako jariakin edota listu tanten bidez transmiti daiteke (Kilgore et al., 2016). Infekzio honek pertsona helduetan arrisku larriarik sortzen ez duen arren, jaioberrien kasuan heriotza eragin dezake, pneumonia bezalako zailtasunak gara daitezkeelako.

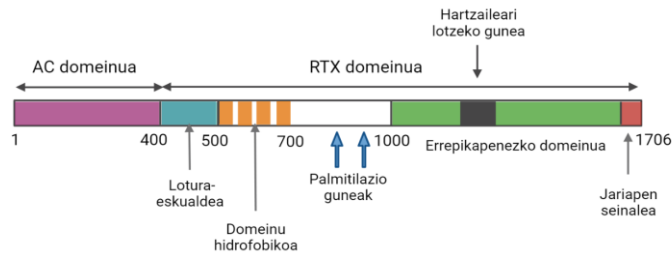
Patogeno hau 1900. urtean identifikatu eta 1906. urtean isolatu zen lehen aldiz eta asko ikertu da harrezkero. Horri esker, 1940an kukutxeztularen aurkako lehenengo txertoa garatu zen, hildako bakterioaren zelulaz osatutakoa (Marzouqi et al., 2010). Orduetik, haurtzaroan jasotako txertoei esker, herrialde garatuetan gaixotasun honek eragindako heriotza-tasak jaitsiera handia izan du. Hala ere, azken hamarkadan kasu kopurua igo egin da (Argondizo-Correia et al., 2019).

*Bordetella pertussis* bakterio Gram negatiboa da, gizakiontzako patogenoa dena. Kokobazilo itxura duen bakterio honek, 0,2 eta 0,7  $\mu\text{m}$  arteko tamaina du eta derrigorrezko aerobioa da. Bakterio mugiezin eta flagelarik gabea da eta bere hazkuntza tenperatura optimoa 35-37 °C bitartean dago (Hoffman et al., 2019). Gizakion goi arnasbideetako mukosekiko afinitate espezifikoa du eta bere patogenotasunerako, immunitate-sistema saihesten laguntzen dioten birulentzia-faktoreez baliatzen da: Adenilato Ziklasa Toxinaz, ingelesezko *Adenylate Cyclase Toxin* (ACT), eta Toxina Pertusikoaz, ingelesezko *Pertussis Toxin* (PT), adibidez (Chenal, 2018).

### 1.2. Adenilato ziklasa toxina (ACT)

ACTa kate polipeptidiko bakar batez osatutako toxina proteikoa da, eta ezinbestekoa da *B. pertussis*ek arnasbideak koloniza ditzan. Proteina honek hainbat zelula ostalaritara lotzeko gaitasuna dauka, adibidez zelula epitelialetara eta eritrozitoetara batu daiteke lotura ez-espezifikoaren bidez. Bestalde, lotura espezifikoak ere era ditzake, CD11b/CD18 integrina hartzailearekin elkarrekiten baitu (El-Azami-El-Idrissi et al., 2003). Hartzaile hau lerro mieloideko zelulek adierazten dute mintzean, hau da, neutrofilo, makrofago eta zelula dendritikoek.

1.irudian ikus daitekeenez, ACTa 1706 aminoazidoz osatuta dago eta 200 kDa-eko masa molekularra du. Bi domeinu dauzkala deskribatu da. Alde batetik, amino muturreko lehen 400 aminoazidoek Adenilato Ziklasa (AC) domeinua osatzen dute. Gainerako aminoazido sekuentzia, hau da, karboxilo muturrari dagokiona, RTX (ingelesez, *Repeats in ToXin*) domeinuaren parte da eta aktibitate poro-eragilea du (Gross et al., 1992). Hauen artean *linker* edo lotura-eskualdea deskribatu da (Masin et al., 2015). Beraz, toxina bifuntzionala da, hau da, bi aktibitate independente ditu eta toxinareneko zitoxizitatea emendatzeko kooperatzen dute.



**1.irudia. *B. Pertussis* bakterioaren ACTren aminoazido sekuentzia eskematikoki.** N-muturreko lehen 400 aminoazidoek AC domeinua osatzen dute eta gainerako aminoazidoak RTX domeinuaren parte dira. 400 eta 500 aminoazidoen artean lotura-eskualdea deskribatu da (Masin eta kideengandik moldatua).

Jakina da AC domeinuak zelula eukariotoen mintz plasmaticoa zeharkatzen duela, translokazio deritzogun prozesuaren bidez (Ostolaza et al., 2017). Aipaturikoa behin zelula ostalariaren zitosolean dagoenean, cAMPren kontrolik gabeko sintesia katalizatzen du, horretarako ATP molekula erabiliz. Aktibitate katalitiko maximorako, magnesioaren eta kalmodulinaren (CaM) beharra du (Ladant eta Ullmann, 1999). Hala ere, AC domeinuaren translokazioaren mekanismo molekularra ez da zehazki ezagutzen.

Lotura-eskualdea 400-500 aminoazidoen artean kokatzen da eta bi  $\alpha$ -helizez (413-434 eta 454-484 hondarrak) osatuta dagoela uste da. Horri esker, mintzarekin elkarrekiteko gaitasuna izango luke. Izan ere, eskualde honetako hondar gehienak (411-490) mintzean txertatzen dira. Gainera, arginina hondarrek mintzeko lipido anionikoekin elkarrekiten dute, AC domeinuaren translokazioa erraztuz. Beraz, lotura-eskualdea beharrezkoa da AC domeinuak mintza zeharka dezan (Subrini et al., 2013).

Bestalde, ACTa RTX toxina poro eragileen familiako kide izanik, mintzean katioiekiko iragazkorak diren poro hidrofobikoak eratzekeo gai da. Egitura aldetik, RTX domeinua azpidomeinutan sailka daiteke. Alde batetik, domeinu hidrofobikoa, mintzean txertatzeko gai diren helize anfipatiko eta hidrofobikoek osatzen dute. Horrez gain, palmitilazio gunea azilatzea (itzulpen osteko eraldaketa) beharrezkoa da aktibitate hemolitiko funtzionala izateko. RTX errepikapenezko domeinuari dagokionez,  $\text{Ca}^{2+}$ -ren lotura gunea da.  $\text{Ca}^{2+}$ -a RTX domeinua tolesteko eta haren egonkortasunerako ezinbestekoa da eta horrenbestez, proteinaren aktibitaterako behar-beharrezkoa da. RTX domeinuaren barruan, CD11b/CD18 integrina hartzaileari lotzeko gunea ere badago. Azkenik, toxinen karboxilo muturrean, jariapen seinalea aurkitzen da, ACTa bakterioaren zitosoletik kanpo mediora jariatzeko.

### 1.3. Kolesterolarekiko espezifitasuna eta CRAC/CARC motiboak

Aurretik aipatu bezala, ACTk zelula ostalarien (eritrozitoak, zelula epitelialak...) mintz plasmaticoarekin elkarrekin dezake. Gainera, gure laborategian aldeztu aurretik egindako ikerketei esker badakigu, mintz plasmaticoan dagoen kolesterolak ACTren aktibitate katalitiko eta

hemolitikoa emenda ditzakeela. Horrez gain, familia bereko beste bakterio-toxina batzuek esterol honekin elkarrekiteko gaitasuna erakutsi dute, hala nola *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*en leukotoxinak (LtxA) eta *Escherichia coli*ren  $\alpha$ -hemolisinak (HlyA) (Brown et al., 2013; Vazquez et al., 2014). Hauetan, kolesterolaren ezagupenerako motiboak (ingelesez *Cholesterol Recognition/Interaction Aminoacid Consensus motifs* (CRAC)) identifikatu dira. Motibo hauek, **L/V-X(1-5)-Y/F-X(1-5)-R/K** patroia jarraitzen dute edo alderantzizkoa CARC motiboen kasuan (**R/K-X(1-5)-Y/F-X(1-5)-L/V**).

Horrenbestez, analisi bioinformatikoak erabiliz, ACTren kasurako ere, motibo hauek bilatu eta identifikatu dira (Gonzalez Bullon et al., 2021). Guztira, 8 CRAC/CARC motibo daude mintzarekin elkarrekitean duten bi segmentuetan, lotura-eskualdean eta domeinu hidrofobikoan hain zuzen (1. eranskina) (Amuategi et al., 2021). Lan honetan, lotura-eskualdean kokatutako (481-487) CRAC motibo jakin baten azterketa burutu da eta horretarako 454-487 hondarrei dagokien peptidoa (P454-487) sintetizatu da, bigarren  $\alpha$ -helizea eta CRAC motiboa dauzkana.

## 2. HIPOTESIAK ETA HELBURUAK

Kukutxeztulak eragin ditzakeen zailtasunak kontutan hartuta, ACTren birulentzia efektua ekiditeko mekanismoak garatzea ezinbestekoa da. Horrenbestez, lan honen bi helburu nagusiak ondorengo hauek dira:

1. **ACTk zelula ostalarien mintz plasmatikoko kolesterolarekin duen elkarrekintza aztertzea.** Izan ere, toxinak CRAC motiboa duenez, kolesterolarekiko interakzioa espezifikoa izatea espero da.
2. **P454-487 peptidoa, toxinak mintzarekiko duen lotura, txertaketa, aktibitate litikoa eta translokazioa inhibitzeko gai den determinatzea.** Peptido honek CRAC motiboa barne duenez, mintzeko kolesterolarekin elkarrekitea eta toxinaren birulentzia efektua ekiditeko gai izatea espero da.

## 3. MATERIAL ETA METODOAK

### 3.1. P454-487 peptidoa

Lan honetarako, ACT proteinaren 454tik 487 aminoazidorako peptidoa erabili da, 34 hondarrez osatua dagoena. Lotura-eskualdean kokatutako bigarren  $\alpha$ -helizea eta CRAC motiboa (481-487) barne ditu (1.taula). Peptido hau  $-80^{\circ}\text{C}$ -tan eta etanoletan mantendu da.

**1.taula: P454-487ren ezaugarrien deskribapena.** Aminoazido sekuentzian, CRAC motiboa beltzez azpimarratu da. Bestalde, masa molekularra (M) ere azaltzen da.

Peptidoa	Sekuentzia	M (g/mol)
<b>P<sub>CRAC</sub> 454-487</b>	[ac]-ASAHWGQRALQGAQAVAAAQRLVHAIAL <b>MTQFGR</b> -[NH <sub>2</sub> ]	3699,96

### 3.2. Liposomen prestaketa

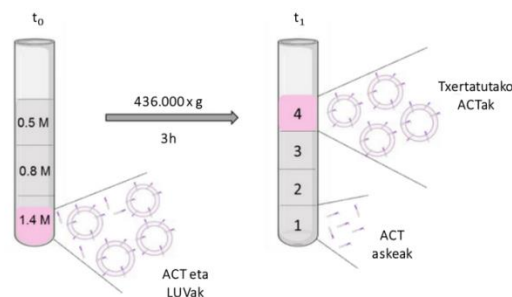
Liposomen prestaketarako, konposizio desberdinetako besikulak prestatu dira. Lipidoak nahastu ondoren, disolbatzaile organikoa kentzeko lehortu egin dira, nitrogenu fluxua erabiliz. Disolbatzaile organikoaren arrastoak ongi kentzeko, lipidoak huts ponpan mantendu dira, 1,5 orduz. Lehortzearen ondorioz eskuratutako lipido geruza liposoma indargetzailean (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.00) berreseki da. Lipidoak medio urtsuan jartzean, geruza anitzeko besikulak, ingelesez *Multilamellar Vesicles* (MLVak) lortzen dira. Jarraian, geruza bakarreko liposoma handiak, ingelesez *Large Unilamellar Vesicles* (LUVs) eskuratzeko, izozte-desiozete zikloak egin dira, 10 aldiz. LUVak *Lipid Extruder*etik (Nothern Lipids, Kanada) 10 aldiz pasatu dira, 0,1  $\mu\text{m}$ -ko porodun polikarbonatozko filtroak erabiliz (Whatman Polycarbonate Membrane Filters, 0.1  $\mu\text{m}$ , GE Healthcare, AEB). Prozesu honetan, 100  $\text{nm}^3$ -tako liposomak eskuratzeko da helburua. Amaitzeko, LUVen lipido-kontzentrazioa determinatzeko, Fiske metodoa erabili da. Metodo honek, fosfolipidoen fosforo inorganikoa neurtzeko balio du eta beraz, era honetara, fosfolipidoen kontzentrazioa ezagutu daiteke (Fiske eta Subbarow, 1925).

### 3.3. ACTren lotura-entseguak flotazio bidez

Aurreko atalean adierazi bezala, 1,2-Dioleil-glizerol-3-fosfatidilkolina (DOPC), kolesterol (Chol) (Avanti Polar Lipids, Inc, AEB) eta ergosteroldun (Erg) (Sigma Aldrich, AEB) besikulak prestatu dira ondorengo erlazio molarretan: DOPC, DOPC.Chol 3:1 eta DOPC.Erg 3:1. Ostean, 1,5 mM LUV, 750 nM ACTrekin inkubatu dira 30 minutuz, 37°C-tan irabiatuz.

Ondoren, sakarosa gradientea prestatu da: lehen geruzan 1,4 M sakarosa jarri dira, bigarrenean 0,8 M eta azkenengoan 0,5 M (2.irudia). Inkubatutako laginak lehenengo geruzan gehitu dira. Gradientea ultrazentrifugatu da, 436.000 g-tan eta 4°C-tan, 3 orduz (Optima Max Bench, Rotor TLA 120.2, Beckman Coulter, AEB). Sakarosa kontzentrazioaren arabera 4 frakzio eskuratu dira. Horrez gain, 5. frakzio bat jaso da, tutuaren paretetan itsatsitakoa batzeko. Horretarako, 100°C-tan zegoen % 1 sodio dodezil sulfatoa (SDS) erabili da.

Lagina dentsitatearen arabera bereizi da: alde batetik, besikuletara lotu gabeko ACT askea 1. frakzioan dago eta besikuletara lotutakoa, berriz, 4. frakzioan.



**2.irudia. ACTren txertaketa analisia liposomen flotazioaren bitartez.** Rodaminaz markatutako liposomak 1,4 M-etako sakarosa disoluzioarekin nahasten dira eta ondoren, 0,8 M eta 0,5 M-etako sakarosa

disoluzioak gainjartzen dira ( $t_0$ ). Lagina zentrifugatu ostean, dentsitatearen arabeko banaketa ematen da, lau frakzioetan banatuz ( $t_1$ ). Liposomak (ACT gabe zein ACT lotuta) goiko frakzioan kokatzen dira. Aldiz, ACT askeak 1. frakzioan eta SDS bidez jasotako frakzioan geratu dira.

Esperimentu honetarako prestatutako LUVak % 0,5 rodaminarekin markatu dira. Horri esker, begi bistaz beha daitezke eta banaketa era egokian gertatu dela berma daiteke. Bestalde, Fluorolog 3 fluorimetria erabiliz (Horiba Japonia), jasotako frakzioetan rodaminaren fluoreszentzia igorpen espektroa neurtu da, kitzikapen uhin-luzera ( $\lambda_{ex}$ ) 560 nm eta igorpen uhin-luzera ( $\lambda_{em}$ ) 570-640 nm-takoak izan direlarik. Kitzikapen zein igorpen arraildura 3 nm-koa izan da eta neurketa hauetarako kuartzozko kubetak erabili dira.

Zentrifugazio ostean jasotako frakzioen laginak SDS-PAGE elektroforesia erabiliz banatu dira eta *Coomassie Blue* erabiliz tindatu dira. ACTk konposizio desberdinekiko LUVei lotzeko daukan gaitasuna determinatzeko, lotura ehunekoak kalkulatu dira. Horretarako, frakzio bakoitzeko proteina kantitatea dentsitometria bidez kuantifikatu da, Image J programa erabiliz. Azkenik, frakzio guztien intentsitateak batuz intentsitate totala kalkulatu da eta horri esker, lagin bakoitzeko ehunekoak kalkulatu dira.

#### 3.4. ACTk eritrozitoetan eragindako hemolisi-zinetikak

Lehenik, ahari odola (Pronadisa, Espainia) hainbat aldiz garbitu da, 3000 rpm-tan, 4 °C-tan, 10 minutuz zentrifugatuz. Horretarako, lehenbizi, % 0,9 NaCl soluzioa erabili da eta ondoren, hemolisi indargetzailea (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.00). Behin gainjalkina gardena denean, odola hemolisi indargetzailetan berreseki eta estandarizatu da, 700 nm-tan 1,2-ko absorbantzia duen diluzioa hautatuz (Louw eta Visser, 1977).

96 putzutako plakak erabiliz, 100 nM ACT, 0, 100, 250 eta 1000  $\mu$ M DOPC.Chol 3:1-ekin inkubatu dira, 15 minutuz, 25 °C-tan irabiatuz. Ondoren, estandarizatutako 150  $\mu$ L eritrozito-suspentsio gehitu zaizkio putzu bakoitzari. Une honetan, hemolisi-zinetika martxan jarri da, 3 orduz, 37 °C-tan, irabiatuz. Zinetika jarraitzeko 96 putzutako Synergy HTX (BioTek Instruments, Inc, AEB) plaka-irakurlea erabili da eta laginaren absorbantzia jaso da minuturo 700 nm-tan.

Hemolisi ehunekoak kalkulatu ahal izateko, % 0 hemolisia eta % 100 hemolisia determinatu dira, indargetzailetan jarritako eritrozitoen eta % 0,1 (p/b) Triton X-100 detergentetan jarritako eritrozitoen absorbantzia neurtuz, hurrenez hurren. Azkenik, aparatua neurtutako absorbantzia balioetatik hemolisi ehunekoak (%) kalkulatu dira, honako ekuazioa (1) erabiliz:

$$Hemolisia (\%) = \frac{Abs_{700} \%0 - Abs_{700} lagina}{Abs_{700} \%0 - Abs_{700} \%100} \times 100 \quad (1)$$

### 3.5. Dikroismo zirkularra P454-487 peptidoarekin

Dikroismo zirkularra proteinen egitura sekundarioa determinatzeko teknika baliagarria da; izan ere, proteinek lotura peptidikoko  $\alpha$  karbonoari esker, aktibitate optikoa dute. Dikroismo zirkularrean, argi polarizatuaren xurgapena neurtzen da. Linealki polarizatutako argiak magnitude bereko bi osagai ditu: eskuinerantz eta ezkererantz polarizatutako argi zirkularra. Horien arteko absorbantzia desberdintasuna neurtzen da espektropolarimetroa erabiliz: eliptikotasuna ( $\theta$ ).

100  $\mu$ M peptido hainbat konposiziotako 2 mM LUVekin (DOPC.Chol 9:1, 3:1, 2:1, 1:1) nahastu dira liposoma indargetzailetan. Neurketak JASCO J-810 espektropolarimetroan (AEB) egin dira, 1 mm-ko kuartzoko kubetak erabiliz (Hellma Analytics, Alemania). Seinalea 200-260 nm tartean jaso da, giro tenperaturan. Erabilitako peptidoak egitura helikoidala har dezakeela uste da, hortaz, kontrol gisa, peptidoak har dezakeen helikoidaltasun maximoa determinatzeko, peptidoa % 20 trifluoroetanolarekin (TFE) nahastu eta neurtu da. Izan ere, konposatu honek helikoidaltasuna eragiten du. Bestalde, soluzio urtsuan zegoen peptidoa ere neurtu da. Azkenik, LUVak bakarrik aztertu dira kontrol moduan.

### 3.6. P454-487 peptidoaren lotura filtrazio bidez

Lehenik eta behin, 70  $\mu$ M P454-487, 2 mM LUVekin (DOPC, DOPC.Chol 9:1, 3:1, 2:1, 1:1) eta LUVik gabe inkubatu dira hemolisi indargetzailetan, giro tenperaturan irabiatuz, 30 minutuz. Liposomen prestaketarako 3.2 atalean azaldutako protokoloa jarraitu da. Ondoren, laginak 30 kDa-eko poroa duten filtroetan (Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filter Devices (Merck Millipore, AEB)) jartzen dira, 6000 g-tan eta 4  $^{\circ}$ C-tan ordubetez zentrifugatzeko. Honi esker, LUVei lotu den peptidoa, aske geratu den peptidotik bereiz dezakegu; izan ere, LUVak handiegiak dira filtroa igarotzeko, aldiz, peptido askeak zeharka dezake.

Kolesterol kontzentrazioak peptidoaren loturan eraginik duen aztertzeke fluoreszentzia intrintsekoa erabili da. Horretarako, ordu beteko zentrifugazioaren ondoren, filtrotik pasatako laginak gorde dira eta horien triptofanoen (W) fluoreszentzia igorpen-espektroa neurtu da kuartzoko kubetetan,  $\lambda_{ex} = 290$  nm izan delarik eta  $\lambda_{em} = 300-400$  nm artean jasoz. P454-487 peptidoak triptofano bakarra du bere aminoazido sekuentzian, beraz, jasotako seinalea triptofano bakar hau kitzikatzetik dator. 5 nm-tako kitzikapen zein igorpen arraildurak ezarri dira eta integrazio denbora 0,1 segundotakoa izan da. Horretarako, FluoroLog-3 (Horiba, Japonia) fluorimetroa erabili da. Horrez gain, etanolaren igorpen espektroa ere neurtu da baldintza berberetan, espektro bakoitzari kendu zaiolarik.

Filtratutako peptido askearen kontzentrazioa determinatu ahal izateko, peptido kontzentrazio ezagunen (0, 15, 30, 45, 60, 75  $\mu$ M) igorpen espektroak neurtu dira. Espektroaren maximoari dagokion uhin luzeran ( $\lambda_{em} = 340$  nm) eskuratutako fluoreszentzia intentsitateak jaso dira eta



zuzen patroia bat eraiki da. Horrela, fluoreszentzia igorpenaren eta peptido kontzentrazioaren arteko erlazioa ezarri da.

### 3.7. P454-487 peptidoarekin hemolisi-zinetikak

Odola 3.4 atalean azaldutako metodoa erabiliz prestatu da. Alde batetik, P454-487 peptidoak hemolisirik eragiten duen behatu nahi izan da. Horretarako, odola 0,6-ko absorbantzia balioan estandarizatu da, 412 nm-tan (hemoglobinarekin xurgapena). Kasu honetan, 96 putzutako plaka erabiliz, diluzio seriatuak prestatu dira 100  $\mu$ M-tan hasita, eta ostean 150  $\mu$ L eritrozito-suspentsio gehitu dira, 3 orduz irabiatzeko, 37 °C-tan. Azkenik, plaka zentrifugatu eta gainjalkina jaso da, 412 nm-tan absorbantzia neurtzeko plaka irakurlean (Synergy HTX, BioTek Instruments, Inc, AEB). Peptidoarekin eskuratutako hemolisia ACTren zenbait diluzioekin lortutakoarekin alderatu da. Kasu honetan, 400 nM ACT kontzentrazioetik hasita egin da diluzio seriatua. Gainera, etanola erabili da kontrol gisa, peptidoa etanoletan mantentzen baita.

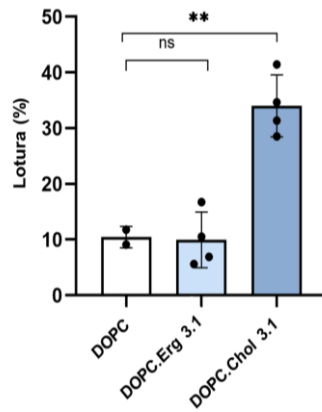
Behin peptidoaren hemolisi gaitasuna aztertuta, ACT eta peptidoaren arteko lehia behatu nahi izan da hemolisi zinetikaren bidez. 96 putzutako plakan, alde batetik, 50 nM ACT, 5  $\mu$ M, 500 nM eta 50 nM peptidoarekin inkubatu dira 30 minutuz eta 4 °C-tan, hemolisi indargetzailetan. Ondoren, 700 nm-tan, 1,2-ko absorbantzia balioan estandarizatutako odola gehitzen da eta hemolisiaren zinetika jarraitzen da, 3 orduz. Bestetik, peptidoa eta eritrozito suspentsioa inkubatzen dira 30 minutuz eta 4 °C-tan, hemolisi indargetzailetan. Azkenik, 50 nM ACT gehitzen dira eta 3 ordutan zehar, hemolisi zinetika jarraitzen da.

Esperimentu hauetan, kontrol gisa, ACT (50 nM), peptido kontzentrazio bakoitza (5  $\mu$ M, 500 nM eta 50 nM) eta etanola (5  $\mu$ M, 500 nM eta 50 nM), bakoitza bere aldetik aztertu dira. Horrez gain, hemolisiaren % 0 eta % 100 determinatzeko kontrolak prestatu dira.

## 4. EMAITZAK

### 4.1. ACTk mintzeko kolesterolarekiko espezifikotasuna du

ACTren 454-487 hondarrek mintzekin elkarrekiteko daukaten gaitasuna aztertu baino lehen, proteina osoa mintz plasmatikoko kolesterolarekin espezifikoki elkarrekiteko gai den behatu da. Horretarako, kolesterol gabeko eta kolesteroldun (DOPC eta DOPC.Chol 3:1, hurrenez hurren) besikulak (LUVak) erabili dira. Gainera, ACTk kolesterolarekiko duen espezifikotasuna frogatzeko, kontrol modura ergosteroldun besikulak (DOPC.Erg 3:1) ere erabili dira, ergosterola kolesterolaren analogoa baita.

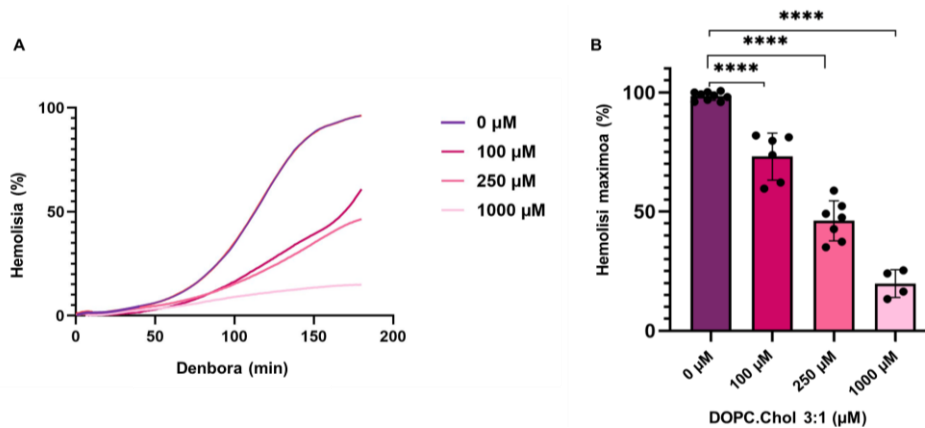


**3. irudia. Kolesterolaren eragina mintzaren eta ACTren arteko elkarrekintzan.** 1,5 mM LUV, 750 nM ACTrekin 37°C-tan inkubatu ostean lortutako lotura ehunekoak adierazi dira (%) zenbait konposiziotako liposomekiko (DOPC, DOPC.Erg 3:1, DOPC.Chol 3:1). Konposizio bakoitzerako 4 esperimentutan eskuratutako balioen batez bestekoa eta desbideraketa estandarra adierazi dira.

3. irudian, ACTa DOPC lipido soilez osatutako mintzetara afinitate txikiz lotzen dela ikus daiteke. Era berean, DOPC.Erg 3:1 konposizioko LUVekin ere, lotura %10 inguruan mantentzen da. Hortaz, ergosterola izateak, ez du aldaketa esanguratsurik suposatu ACTren lotura gaitasunean ( $p=0,9882$ , *One-way ANOVA*). Aldiz, DOPC eta kolesterolaz osatutako liposometan toxinaren lotura estatistikoki handiagoa ( $p=0,0016$ ) izan dela beha daiteke, %35 ingurura iritsi delarik. Beraz, kolesterolarekiko lotura espezifikoa izan da, ACTk kolesterol-dun mintzekiko afinitate handiagoa erakutsi baitu bere analogoa den ergosterolarekin alderatuz.

#### 4.2. Mintzeko kolesterolarekiko lotura inhibitzeak ACTk eragindako hemolisia murrizten du

Entsegu honetan, espektrofotometria bidez eritrozito suspentsioaren uhertasun galera jarraitu da eta ACTren hemolisi-gaitasuna determinatu ahal izan da. Jarraian txertatu den 4. irudian hemolisi-zinetikak (A) eta ACTk eragindako gehienezko hemolisiaren ehunekoak (B) adierazi dira. Proteina eritrozitoekin inkubatu aurretik, DOPC.Chol 3:1 konposizioko liposomekin inkubatu da, toxina eritrozitoen mintzeko kolesterolari batzea eragozteko. 4. irudian ikus daitekeenez, liposoma kontzentrazioa igo ahala ACTk eragindako hemolisia gutxitzen da. Ondorioz, esperimentu honetan mintzeko kolesterolarekiko lotura inhibitzeak ACTren hemolisi gaitasunean duen efektua behatu da.

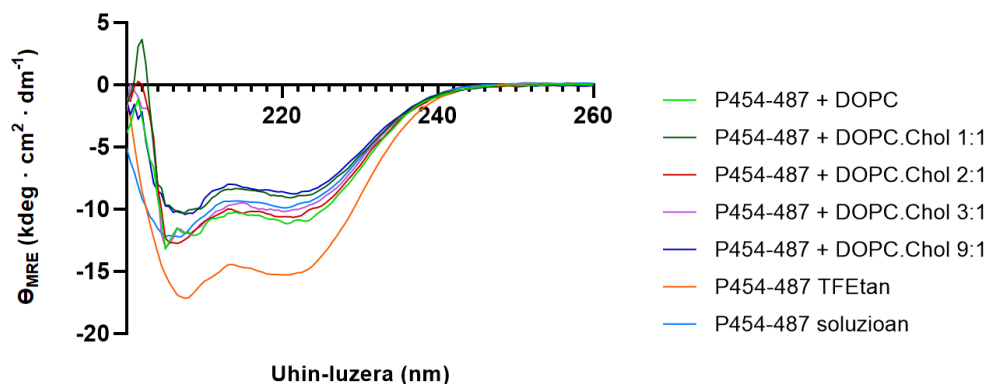


**4. irudia. ACTa kolesteroldun besikulekin aurreinkubatzek, ACTren hemolisi-gaitasunean duen eragina.** (A) 100 nM ACT, 0, 100, 250 eta 1000 μM DOPC.Chol 3:1 LUVekin aurreinkubatu ostean eskuratutako hemolisiaren ehunekoa (%) denboran zehar (min) eta (B) hemolisi-gaitasun maximoa (%), DOPC.Chol 3:1 liposomen kontzentrazioarekiko (μM) irudikatu dira.

4. irudian, A eta B paneletan ikus daitekeenez, liposoma kontzentrazioa handitu ahala, ACTren hemolisi-gaitasuna gutxitzen da: zinetikak gero eta motelagoak dira eta hemolisi-gaitasun maximoa %100 izatetik %25 inguru izatera jaisten da. Izan ere, ACTa liposomekin inkubatzek, beranduago eritrozitoen mintzera lotzea ekidin du toxina honen hemolisi-gaitasuna inhibituz.

#### 4.3. P454-487 peptidoak helize itxura du lipido-bigeruzen presentzian

Inguruneak P454-487 peptidoaren egitura izan dezakeen eragina determinatzeko, peptidoaren helikoidaltasuna aztertu da, dikroismo zirkularra erabiliz. Horretarako, P454-487 peptidoak, soluzio urtsuan nahiz hainbat konposiziotako (DOPC, DOPC.Chol 9:1, 3:1, 2:1 eta 1:1) bigeruzak lipidikoen presentzian, daukan egitura sekundarioa determinatu da.



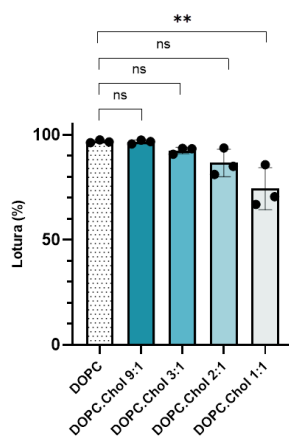
**5. irudia. P454-487 peptidoaren egitura soluzioan eta bigeruzak lipidikoen presentzian.** Eliptikotasuna, ( $\theta_{MRE}$ , *mean residue ellipticity*, ingelesez) uhin-luzerarekiko irudikatu da. Konposizio desberdineko LUVen 2 mM (DOPC, DOPC.Chol 9:1, 3:1, 2:1 eta 1:1) 100 μM peptidorekin nahastu dira. Gainera, P454-487 peptidoa hemolisi indargetzailetan (soluzioan) eta TFEtan aztertu da.

5. irudiak eskainitako informazioari esker, peptidoak  $\alpha$ -helize egitura hartzen duela ikus daiteke, soluzioan nahiz bigeruz lipidikoen presentzian. Izan ere, proteinek  $\alpha$ -egitura helikoidala dutenean, 3 banda esanguratsu agertzen dira dikroismo zirkularreko espektroetan: bi banda negatibo, 208 eta 222 nm-tan, eta hirugarren banda positibo bat 193 nm-tan. Kasu honetan, peptidoa soluzioan bakarrik jartzean edo aipaturiko lipido konposizioekin inkubatzean 3 banda horiek ageri dira. Hala ere, ez da konposizioari lotutako desberdintasun esanguratsurik behatu. Horrez gain, peptidoak antzeko portaera izan du soluzio urtsuan eta mintzen presentzian. Kasu guztietan  $\alpha$ -helize egitura hartzen duela soilik baieztatu daiteke. Espektroen artean nabarmenki desberdinen %20 trifluoroetanoetan (TFE) jarritako peptidoarena izan da. Konposatu honek peptidoaren helikoidaltasuna emendatzen du eta beraz, peptidoak eskuratuko lukeen helikoidaltasun maximoa zein izan daitekeen adierazten du.

#### 4.4. Kolesterol kontzentrazioak P454-487ren loturan duen eragina

ACT eta mintzeko kolesterolaren arteko lotura espezifikoa dela frogatu ostean, P454-487 peptidoak kolesterol proportzio aldakorrek liposomekin elkarrekiteko duen gaitasuna aztertu da. Kolesteroletan aberatsagoak diren liposomen kasuan, lotura ehuneko handiagoa izatea espero da, CRAC motiboek esterol honekiko elkarrekintza espezifikoa erakutsi baitute (Fantini eta Barrantes, 2013).

6. irudian ikus daitekeenez, lotura esperimentuetako emaitzek adierazi dute liposomen kolesterol proportzioa handitzeak, 454-487 hondarren lotura murrizten duela. DOPC duten besikulekin alderatuz, DOPC.Chol 9:1 ( $p=0,9996$ ), 3:1 ( $p=0,4571$ ) eta 2:1 ( $p=0,0912$ ) kasuetan antzeman den loturaren beherakada ez da estatistikoki esanguratsua izan. Aldiz, DOPC.Chol 1:1 kasuan, loturaren jaitsiera esanguratsua izan dela esan daiteke,  $p=0,016$  izanik. Hala ere, emaitza hauek ez dute esperotakoarekin bat egiten.



**6. irudia. P454-487 peptidoak hainbat konposiziotako liposometara lotzeko daukan gaitasuna.** 70  $\mu$ M P454-487, 2 mM DOPC, DOPC.Chol 9:1, 3:1, 2:1 eta 1:1 konposizioetako liposomekin inkubatuz

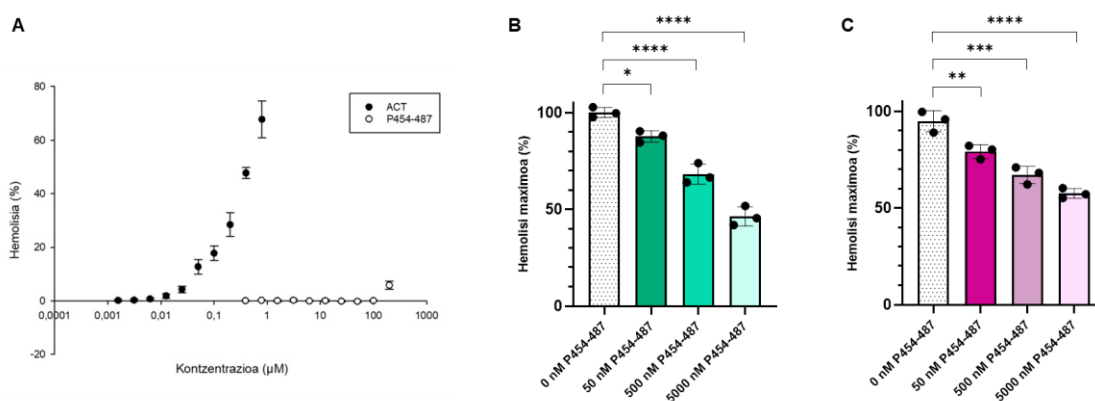
eskuratutako lotura ehunekoak (%) adierazi dira. 3 neurketaren batez bestekoak eta desbideraketa estandarrak adierazi dira.

#### 4.5. P454-487 peptidoak ACTk eragindako hemolisia eragozten du

P454-487 peptidoak ACTk eragindako hemolisia inhibi dezakeen aztertu aurretik, peptido honek zuzenean eritrozitoak ezin ditzakeela lisatu frogatu nahi izan da. Izan ere, 454-487 hondarrak lotura-eskualdean daude eta honek ez du poroa sortzeko ezta zitotoxikotasuna eragiteko gaitasunik. Hori dela eta, ez da espero peptidoak hemolisia eragiterik.

Horixe da hain zuzen, 7.A irudiko datuek frogatu dutena: peptidoak bere aldetik ez duela hemolisia eragiteko gaitasunik. Kontrol gisa, ACTa erabili da eta peptidoarekin ez bezala, toxinaren kontzentrazioa handitu ahala, eritrozitoen lisiaren ehunekoa handitu dela behatu da.

Ondoren, P454-487 peptidoak toxinak eragindako eritrozitoen lisia inhibi dezakeen aztertu da. Horretarako, hemolisi-zinetikak burutu dira, alde batetik ACTa eta P454-487 aurreinkubatuz (7.B. irudia) eta bestetik, P454-487 eritrozitoekin aurreinkubatuz eta jarraian ACTa gehituz (7.C.irudia).



**7. irudia. P454-487 peptidoak eritrozitoen hemolisia galarazteko daukan gaitasunaren azterketa.** (A) Hemolisi ehunekoak (%) ACT eta P454-487 peptidoaren kontzentrazioarekiko ( $\mu\text{M}$ ). (B) ACT (50 nM) eta P454-487 (0, 50, 500, 5000 nM) aurreinkubatu ostean, neurtutako hiru orduko hemolisi-zinetiketarik lortutako eritrozitoen lisi maximoa (%) erabilitako peptido kontzentrazioarekiko (nM). (C) P454-487 (0, 50, 500, 5000 nM) eritrozitoekin aurreinkubatu eta ACT (50 nM) gehitu ostean, neurtutako hiru ordutako hemolisi-zinetiketarik jasotako hemolisi maximoa (%) erabilitako peptido kontzentrazioarekiko (nM).

7.B zein 7.C irudietan emaitza berbera lortu da, hau da, peptidoaren kontzentrazio altuak erabiliz, hemolisia modu esanguratsuan gutxitu da ( $p < 0,0001$ ), %50 ingururaino jaitsiz hemolisi maximoa. Beraz, P454-487 peptidoak hemolisia inhibitzeko gaitasuna duela frogatu da. Aipatzekoa da, P454-487 eritrozitoekin aurreinkubatzea garrantzitsua izan dela, hemolisiaren inhibizioa

peptidoaren eta ACTren arteko lehiaren ondorioz gertatzen dela frogatzeko, eta ACT eta P454-487ren artean elkarrekintza egon daitekeela baztertzeko.

## 5. EZTABAIDA ETA ONDORIOAK

Gure laborategian aurretik egindako ikerketei esker, *Bordetella pertussis* bakterioak ekoiztutako Adenilato Ziklasa Toxinak (ACT) mintz plasmatikoko kolesterolarekin espezifikoki elkarrekiten duela frogatu da. RTX familiako beste bakterio-toxina batzuek ere gaitasun bera dutela deskribatu da: esaterako, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bakterioaren leukotoxinak (Koufos et al., 2016). Gainera, poro-sortzaileak diren toxinek,  $\alpha$ -helize hidrofobiko eta anfipatikoak izan ohi dituzte beren sekuentzietan eta hainbatek kolesterolaren ezagupenerako (edo CRAC) motiboak dituztela deskribatu da. Kasu honetan ere, analisi bioinformatikoei esker, ACT proteinaren aminoazido sekuentzian hainbat CRAC, edota alderantzizko CARC, motibo posible identifikatu dira (Gonzalez Bullon et al., 2021).

Lan hau ikerketa sakonago baten parte da eta bertan domeinu hidrofobikoan eta lotura-eskualdean kokatzen diren CRAC motiboak aztertu nahi izan dira, mintzarekiko elkarrekintzan parte hartzen baitute. Horien artean, lan honek 454-487 hondarrak izan ditu aztergai, lotura-eskualdeko bigarren  $\alpha$ -helizea eta CRAC motiboa barne dauzkana. Hala, ikerketa honek ekarpen interesgarriak egin ditzake ACT eta zelula ostalarien mintzen arteko lotura inhibitzeko mekanismoa bilatzerako orduan.

Hasteko, Fantini eta Barrantesek (2013) deskribatu bezala, ACTa mintzeko kolesterolera afinitate handiz lotzen dela frogatzea garrantzitsua izan da (3.irudia). Gainera, ergosteroldun besikuletara ia lotzen ez dela ikusita, elkarrekintza hau kolesterolarekiko espezifikoa dela pentsa liteke.

Horrez gain, Brown eta kideek LtxA-rekin egin zuten moduan (Brown et al., 2016), kasu honetan ere, ACTk mintzeko kolesterolarekiko duen elkarrekintza oztopatu nahi izan da. Horrela, toxina honen hemolisi-gaitasuna inhibi daitekeela ikusi da (4.irudia), mintzeko kolesterolaren eta toxinaren arteko elkarrekintza espezifikoa dela adieraziz. Beraz, etorkizunean ACTren birulentzia gaitasuna murrizteko tresnak gara daitezke, aipatutako interakzioa inhibituz.

P454-487 peptidoari dagokionez,  $\alpha$ -helize egitura hartzen duela ikusi da soluzioan eta hainbat konposiziotako liposomen presentzian (5.irudia). Horrek bat egiten du orain arte auresandakoarekin, hondar horien artean lotura-eskualdeko bigarren  $\alpha$ -helizea deskribatu baita. Mintzarekin elkarrekiten duten segmentuek egitura helikoidalak eratzen dituzte, eta kasu honetan, eskualde honetako hainbat aminoazido mintzean txertatzen direla uste da, AC domeinuaren translokazioa errazteko (Karst et al., 2012). Literaturan jasotakoaren arabera, helize honetako

karga positibodun argininek mintzeko lipido anionikoekin elkarrekiten dute, AC domeinuak mintza zeharka dezan (Masin et al., 2016).

Hala ere, 5. irudiari dagokion esperimentuak eskainitako informazioa, hein batean, mugatua izan denez, neurketetarako laginen prestaketa desberdina izatea planteatzen da. Hau da, peptidoa liposomen gainean gehitu eta jarraian espektroa neurtu beharrean, ideia hobea litzateke, liposomen prestaketa prozesuan, peptidoa lipidoekin batera lehortzea eta biak batera berreskitzea. Honela, peptidoa mintzean txertatzea erraztuko litzateke eta beraz, peptido gutxi geratuko litzake aske soluzioan. Beste erara, baliteke aske zegoen peptidoaren eta mintzean txertatuta zegoenaren informazioa nahastuta jaso izana, eta lipido konposizio bakoitzak peptidoaren egituraren eragindako ñabardurak galdu izana.

Era berean, interesgarria litzateke dikroismo zirkularri dagozkion esperimentu hauek, infragorri espektroaren neurketekin uztartzea. Izan ere,  $\alpha$ -helize egituraz gain,  $\beta$ -orriak ere egon litezke edota desordenatuta egon liteke. Ikerketa honekin jarraitzeko, etorkizun laburrean, aipatutako bi lerro hauek irekitzea da asmoa.

Horrez gain, literaturan irakurritakoarekin (Koufos et al., 2016), hasiera batean P454-487k kolesterolarekin lotura espezifikoa ezar zezakeela pentsatu da eta, hein batean, hori frogatzeko diseinatu nahi izan da ikerketa-lan hau. Hala ere, lotura neurtzeko entseguen bidez, kolesterol kontzentrazioa igo ahala lotura murrizten dela behatu da (6.irudia).

6.irudiari dagokion emaitzak ez du planteaturiko hipotesiarekin bat egiten, kolesterol proportzio altuak erabiltzean, peptido aske gehiago detektatzen baita filtrotik pasatako laginetan. Baliteke kolesterolak lipido-bigeruza zurruntzen duenez, peptidoak bertan txertatzeko zailtasun gehiago izatea. Hala ere, nahiko kontraesankorra litzateke orain arteko datuekin alderatuz gero.

Beste arrazoi posibleetako bat erabili den peptido:lipido ratioa izan daiteke. Hau da, erabilitako peptidoaren kontzentrazioa altuegia izan dela uste da, liposomen kontzentrazioarekin alderatuz: 1:28,5. Hori dela eta, P454-487k liposomak iragazkor bihurtu izana posible litzateke. Izan ere, honelako peptidoak kontzentrazio altuetan erabiliz gero, aktiboak izan daitezkeela eta bigeruza lipidikoa iragazkortsu dezaketela ikusi da (Voegelé et al., 2017). Horrek, liposoma zatiak filtroetan zehar pasatzea eragin lezake eta beraz, iragazitako laginetan lipidoari itsatsitako peptidoa neurtu izana. Azken finean, metodo honekin iragazi gabeko peptidoa kontsideratzen da peptido lotutzat eta horrek ere bere mugak ditu.

Hala frogatu dute oraintsu laborategian egindako aurretiazko entseguek, liposomak zunda fluoreszente batekin markatu eta filtrotik pasatako laginetan fluoreszentsia neurtu baita. Beraz, etorkizunean erabiliko den peptido eta liposomen kontzentrazioa egokitu nahi da, peptido

gutxiago jarriz, hau da, proteina osoarekin lan egiterakoan egiten den bezala, 1:1000 ratioa erabiliz esaterako. Horrela, esperotako moduan, kolesterol kontzentrazioa handitzeak lotura emendatzen duela frogatu beharko litzateke.

Bestalde, P454-487 peptidoak ACTk eragindako eritrozitoen lisia galarazi dezake (7. irudia). Horrexegatik, P454-487 peptidoak CRAC motiboaren bidez mintzeko kolesterolarekin elkarrekin duela pentsa daiteke, Brown eta kideek LtxA-rekin erakutsi duten moduan (Brown et al., 2016). Horrek ACTren eta peptidoaren artean lehia dagoela esan nahi du eta beraz, peptidoaren kontzentrazioa emendatzeak ACTk eragindako hemolisia murriztu dezakeela. Hori dela eta, P454-487 peptidoa ACTren aktibitateetako bat gutxienez inhibitzeko gai dela frogatu da, hau da, hemolisi-gaitasuna. Beraz, etorkizunean ACTren toxikotasuna gutxitzeko tresna interesgarria izan liteke.

Azkenik, aipatzekoa da, lan hau beste ikerketa-lan sakonago baten parte denez, entsegu gehigarriak egitea beharrezkoa dela. Esaterako, ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*, ingelesez) bidez, peptidoaren eta kolesterolaren arteko elkarrekintza kuantifika daiteke eta loturaren disoziazio konstantea kalkulatu daiteke. Bestalde, FT-IR (*Fourier-transform infrared spectroscopy*, ingelesez) peptidoaren egitura sekundarioa zehaztasunez deskribatzeko erabil daiteke. Adibidez, peptidoaren  $\alpha$ -helize eta  $\beta$ -orri portzentajeak determinatzeko baliagarria da. Gainera, peptidoak mintzean txertatzerakoan hartzen duen orientazioaren berri ere eman dezake. Horrenbestez, entsegu hauen bidez, peptido eta mintzaren arteko elkarrekintzaren inguruko ezaugarri gehiago ezagutzeko aukera dago.

## 6. ESKER ONAK

Lehenik eta behin, eskerrak eman nahi nizkioke Helena Ostolazari nire zuzendari izatea onartu izanagatik eta bere laborategiko kide izatea ahalbidetzeagatik. Eskerrak eman nahi nizkioke baita ere eskeinitako laguntzagatik eta nire lana zuzendu izanagatik. Bestalde, laborategi honetako kideak ere eskertu nahi nituzke; bereziki Jone Amuategi aipatu nahi nuke irakatsitako guztiagatik, bai laborategiko esperimenduei dagokienez bai eta lana berrikusteagatik ere. Azkenik, Rocio Alonso ere eskertu nahiko nuke, laborategian eskeinitako laguntzagatik.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Kilgore, P. E., Salim, A. M., Zervos, M. J., and Schmitt, H. J. (2016). Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clinical microbiology reviews*, 29(3), 449-486.
2. Marzouqi, I., Richmond, P., Fry, S., Wetherall, J., and Mukkur, T. (2010). Development of improved vaccines against whooping cough: current status. *Human vaccines*, 6(7), 543-553.
3. Argondizo-Correia, C., Rodrigues, A. K. S., and de Brito, C. A. (2019). Neonatal immunity to *Bordetella pertussis* infection and current prevention strategies. *Journal of Immunology Research*, 2019, 1-10.
4. Hoffman, C.L., Gonyar, L.A., Zacca, F., Sisti, F., Fernandez, J., Wong, T., Damron, F.H., and Hewlett, E.L. (2019). *Bordetella pertussis* can be motile and express flagellum-like structures. *MBio* 10(3), 00787-19.



5. Chenal, A. (2018). An Introduction to the Toxins Special Issue on the Adenylate Cyclase Toxin. *Toxins*, 10(10), 386.
6. El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., and Leclerc, C. (2003). Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38514-38521.
7. Gross, M. K., Au, D. C., Smith, A. L., and Storm, D. R. (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(11), 4898-4902.
8. Masin, J., Osicka, R., Bumba, L., and Sebo, P. (2015). *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a unique combination of a pore-forming moiety with a cell-invading adenylate cyclase enzyme. *Pathogens and Disease*, 73(8), ftv075.
9. Ostolaza, H., Martín, C., González-Bullón, D., Uribe, K. B., and Etxaniz, A. (2017). Understanding the mechanism of translocation of adenylate cyclase toxin across biological membranes. *Toxins*, 9(10), 295.
10. Ladant, D., and Ullmann, A. (1999). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in microbiology*, 7(4), 172-176.
11. Subrini, O., Sotomayor-Pérez, A.-C., Hessel, A., Spiaczka-Karst, J., Selwa, E., Sapay, N., Veneziano, R., Pansieri, J., Chopineau, J., Ladant, D., and Chenal, A. (2013). Characterization of a Membrane-active Peptide from the *Bordetella pertussis* CyaA Toxin. *J. Biol. Chem.* 288(45), 32585–32598.
12. 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., and Lally, E.T. (2013). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin Utilizes a Cholesterol Recognition/Amino Acid Consensus Site for Membrane Association. *J.Biol. Chem.* 288(32), 23607–23621.
13. Vazquez, R. F., Maté, S. M., Bakás, L. S., Fernández, M. M., Malchiodi, E. L., and Herlax, V. S. (2014). Novel evidence for the specific interaction between cholesterol and  $\alpha$ -haemolysin of *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 458(3), 481-489.
14. Gonzalez Bullon, D., Uribe, K. B., Amuategi, J., Martín, C., and 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.
15. Amuategi, J., Alonso, R., & Ostolaza, H. (2021). The role of four cholesterol-recognition motifs localized between amino acid residues 400-550 in regulating translocation and lytic activity of Adenylate Cyclase Toxin. *bioRxiv*.
16. Fiske, C. H., and Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. biol. Chem.*, 66(2), 375-400.
17. Louw, A.I., and Visser, L. (1977). Kinetics of erythrocyte lysis by snake venom cardiotoxins. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 498(1), 143–153.
18. Fantini, J., and 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), 1-9.
19. Koufos, E., Chang, E. H., Rasti, E. S., Krueger, E., and Brown, A. C. (2016). Use of a cholesterol recognition amino acid consensus peptide to inhibit binding of a bacterial toxin to cholesterol. *Biochemistry*, 55(34), 4787-4797.
20. Brown, A. C., Koufos, E., Balashova, N. V., Boesze-Battaglia, K., & Lally, E. T. (2016). Inhibition of LtxA toxicity by blocking cholesterol binding with peptides. *Molecular oral microbiology*, 31(1), 94-105.
21. Karst, J.C., Barker, R., Devi, U., Swann, M.J., Davi, M., Roser, S.J., Ladant, D., and Chenal, A. (2012). Identification of a region that assists membrane insertion and translocation of the catalytic domain of *Bordetella pertussis* CyaA toxin. *J. Biol. Chem.* 287(12), 9200–9212.
22. Masin, J., Osickova, A., Sukova, A., Fiser, R., Halada, P., Bumba, L., Linhartova, I., Osicka, R., and Sebo, P. (2016). Negatively charged residues of the segment linking the enzyme and cytolysin moieties restrict the membrane-permeabilizing capacity of adenylate cyclase toxin. *Sci. Rep.* 6(1), 29137.
23. Voegelé, A., Subrini, O., Sapay, N., Ladant, D., and Chenal, A. (2017). Membrane-active properties of an amphitropic peptide from the CyaA toxin translocation region. *Toxins*, 9(11), 369.

## ERANSKINAK

1.eranskina. ACTren transmintz domeinuetan kolesterolaren ezagupenerako identifikatutako motiboak (CRAC eta CARC). Guztira, 8 motibo daude, mintzarekin elkarrekiten duten eskualdeetan kokatuta, *linker* edo lotura-eskualdean eta domeinu hidrofobikoan hain zuzen ere.

PATROIA	ESKUALDEA	AMINOAZIDOAK	SEKUENTZIA
[L/V]-X(1,5)-Y-X(1,5)-[R/K]	DOMEINU HIDROFOBIKOA	626-638	LVQQSHYADQLDK
		653-661	LLAQLYRDK
		721-728	LANDYARK
		732-741	LGGPQAYFEK
[L/V]-X(1,5)-F-X(1,5)-[R/K]	LINKER ESKUALDEA	481-487	LMTQFGR
	DOMEINU HIDROFOBIKOA	518-527	VSGFRGSSR
[R/K]-X(1,5)-F-X(1,5)-[L/V]	LINKER ESKUALDEA	413-420	RSFSLGEV
	DOMEINU HIDROFOBIKOA	527-534	RWAGGFGV