

eman ta zabal zazu

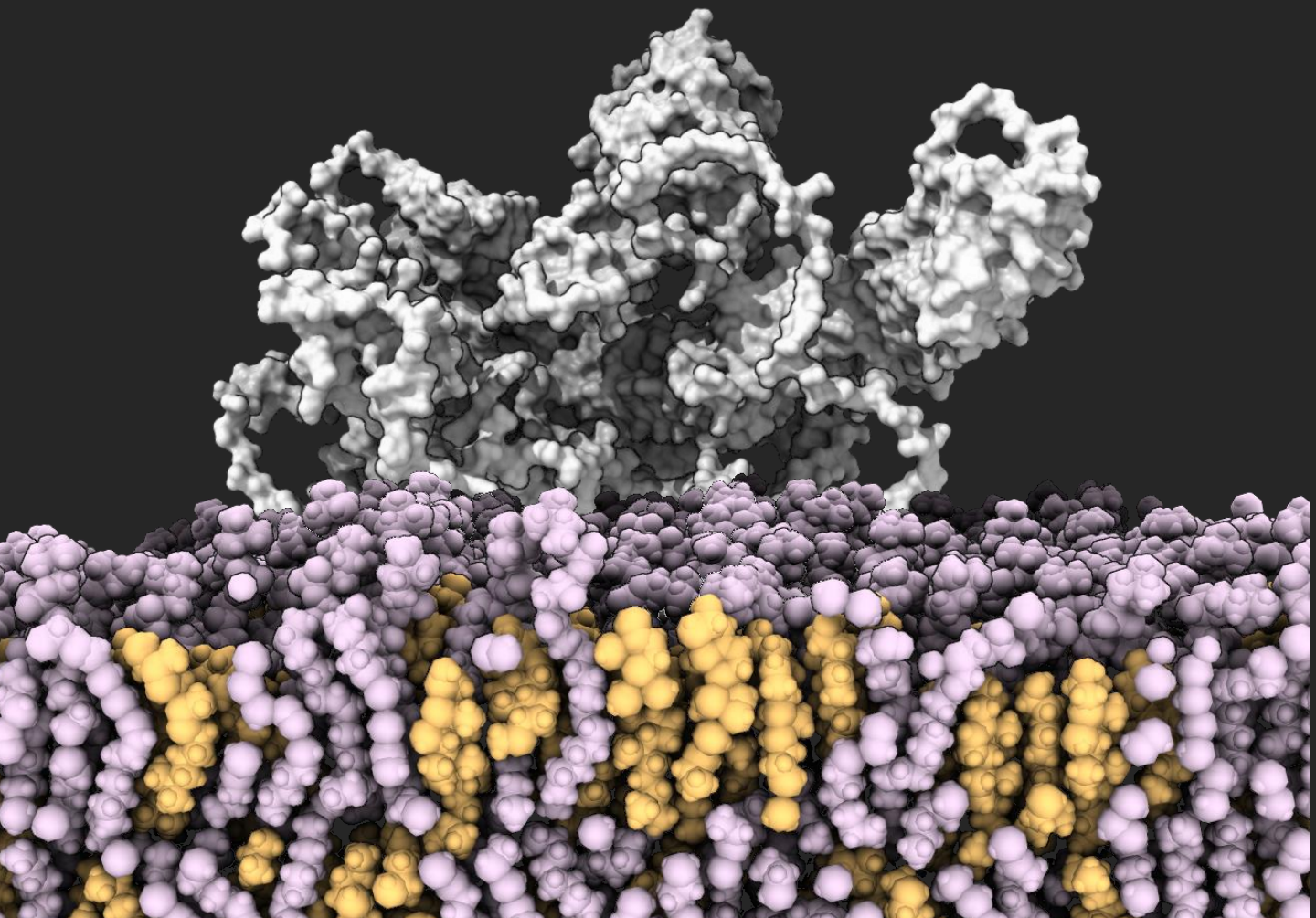


Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

*Bordetella* CyaA toxinaren  
eta kolesterolaren  
arteko ezagutza molekularra

Jone Amuategi Aulestiarte  
Doctoral Thesis 2024







*Amelia Basabe eta Jose Antonio Amuategi gogoan,*



Doktorego Tesia

***Bordetella* CyaA toxinaren  
eta kolesterolaren  
arteko ezagutza molekularra**

Jone Amuategi Aulestiarte  
2024

Zuzendaria: Helena Ostolaza Etxabe katedraduna

Biofisika Institutua (CSIC, UPV/EHU)  
Biokimika eta Biologia Molekularra Saila (UPV/EHU)



## ACKNOWLEDGEMENTS

The present thesis was performed at Biofisika Institute (CSIC, UPV/EHU) under the supervision of Prof. Helena Ostolaza Etxabe. The work was supported by the Basque Government (grant number IT1264-19 and IT1720-22) and the Spanish MINECO (grant number BFU2017–82758-P (AEI/FEDER, UE)). The author was a recipient of a predoctoral fellowship from the University of the Basque Country (UPV/EHU) and an EMBO Scientific Exchange Grant for a three-month stay in Prof. Gunnar von Heijne's lab at Biochemistry and Biophysics Department (Stockholm University, Sweden).

## AITORTZA

Tesi hau Biofisika Institutuan (CSIC, UPV/EHU) burutu da, Helena Ostolaza Etxabe katedradunaren gidaritzapean. Lanak Eusko Jaurlaritzaren (IT1264-19 eta IT1720-22 diru-laguntzak) eta Espainiako MINECO-ren (BFU2017–82758-P (AEI/FEDER, EB)) laguntza izan ditu. Autoreak Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) ikertzaile ez-doktoreen prestakuntzarako doktoratu aurreko laguntza eta EMBO Scientific Exchange Grant beka bat jaso ditu, Gunnar von Heijne katedradunaren laborategian, Biokimika eta Biofisika Sailean (Stockholmeko Unibertsitatea, Suedia) hiru hilabeteko egonaldia egiteko.





# AURKIBIDEA

LABURPENA .....	i
SUMMARY .....	ii
TAULEN ZERRENDA .....	vi
LABURDUREN ETA SINBOLOEN ZERRENDA .....	vii
1. SARRERA.....	1
1.1. MINTZ PLASMATIKOA: MINTZEKO TOXINEN ELKARGUNEA .....	2
1.1.1. Mintzeko lipidoak.....	3
1.1.1.1. Glizerofosfolipidoak eta esfingolipidoak .....	3
1.1.1.2. Esterolak .....	4
1.1.2. Mintzen heterogeneotasuna .....	5
1.2. <i>REPEAT-IN-TOXIN</i> (RTX) PROTEINA FAMILIA.....	8
1.2.1. RTX toxinen eta mintzaren arteko elkarrekintzaren ezaugarriak .....	12
1.2.1.1. Proteina-hartzaile espezifiko bidezko lotura .....	12
1.2.1.2. Proteina-hartzaile espezifikorik gabeko lotura .....	14
1.2.2. Kolesterolaren beharra RTX toxinen jardura zitolitiko/zitotoxikorako .....	16
1.2.2.1. RTX toxinen eta mintzeko kolesterolaren arteko lotura .....	17
1.2.2.2. CRAC/CARC motiboak RTX toxinen eta mintzeko kolesterolaren arteko elkarrekintzaren determinatzaile molekular posible gisa.....	19
1.3. ADENILATO ZIKLASA TOXINA (CyaA) .....	23
1.3.1. Egiturazko ezaugarriak .....	23
1.3.1.1 Adenilato ziklasa (AC) domeinua.....	24
1.3.1.2. Translokazio-eskualdea (TR).....	25
1.3.1.3. RTX domeinua.....	26
1.3.2. CyaA-k zelula ostalarietan eragindako efektuak .....	29

1.3.2.1. AC domeinuaren translokazioa eta AC aktibitatea.....	29
1.3.2.2. Aktibitate poro-eragilea .....	31
1.3.3. Kukutxeztula, gainditutako gaitz baten itzulera.....	32
2. HIPOTESIA ETA HELBURUAK .....	37
3. MATERIALAK ETA METODOAK .....	39
3.1. TOXINEN ADIERAZPENA ETA PURIFIKAZIOA .....	39
3.2. PEPTIDOEN EZAUGARRIAK .....	41
3.3. LIPIDOETAN OINARRITUTAKO SISTEMA EREDUAK .....	42
3.3.1. Besikulak prestatzeko erabili diren lipidoen propietateak .....	42
3.3.2. MLV-en prestatketa .....	44
3.3.2.1. LUV-en prestatketa .....	45
3.3.2.2. SUV-en prestatketa .....	45
3.3.2.3. Peptidoen errekonsituzioa mintzetan .....	46
3.3.3. Fosfolipido-kontzentrazioaren determinazioa .....	47
3.3.4. Besikulen tamainaren zehaztapena .....	47
3.3.5. Sakarosa gradiente bidezko besikulen flotazioa .....	48
3.3.5.1. CyaA-ren txertaketa konposizio desberdinetako besikuletan .....	49
3.3.5.2 CyaA proteina mutanteen txertaketa kolesteroldun besikuletan.....	49
3.3.5.3. CyaA eta kolesterolaren arteko lotura inhibitzea peptido sintetikoak erabiliz ...	49
3.4. ESPEKTROSKOPIA-TEKNIKAK.....	50
3.4.1. Askapen-saiakuntzak .....	50
3.4.1.1. Kolesterola erabiltzea CyaA-k eragindako besikulen iragazkortasuna inhibitzeko .....	51
3.4.1.2. Peptidoak erabiltzea CyaA-k eragindako besikulen iragazkortasuna oztopatzeko .....	51
3.4.2. Triptofanoaren intrintseko fluoreszentzia-espektroskopia.....	51

3.4.2.1. Triptofanoaren fluoreszentzia-titulazioak.....	52
3.4.2.2. Peptidoen partizioa mintzetan.....	53
3.4.3. Dikroismo zirkularreko espektroskopia (CD).....	55
3.4.4. Espektroskopia infragorria (IR).....	57
3.4.4.1. Fourier-en transformatutako espektroskopia infragorria (FTIR).....	58
3.4.4.2. Islapen total indargabetuko FTIR espektroskopia (ATR-FTIR).....	59
3.5. MIKROSKOPIA ELEKTRONIKOA.....	60
3.6. PROTEINA AKTIBITATEEN AZTERKETA.....	61
3.6.1. CyaA-ren jarduera hemolitikoa.....	61
3.6.1.1. Odol-laginak garbitzea eta estandarizatzea.....	61
3.6.1.2. Kolesterolak eragindako hemolisiaren inhibizioa.....	62
3.6.1.3. CyaA toxinak eragindako hemolisia oztopatzea LUV-ekin.....	62
3.6.1.4. CyaA WT eta mutanteekin eragindako hemolisi-zinetikak.....	63
3.6.1.5. CyaA-ren jarduera hemolitikoa blokeatzea peptido sintetikoak erabiliz.....	63
3.6.1.6. Peptido sintetikoekin eragindako hemolisi-saiakuntzak.....	63
3.6.2. cAMP kuantifikazioa J774A.1 makrofagoetan.....	64
3.6.2.1. J774A.1 makrofagoen hazkuntza.....	64
3.6.2.2. CyaA WT eta mutanteek eragindako cAMP ekoizpena.....	64
3.6.2.3. AC domeinuaren translokazioa inhibitzea peptido sintetikoak erabiliz.....	65
3.7. ANALISI BIOINFORMATIKOA.....	65
3.7.1. TM helizeen predikzioa CyaA-ren aminoazido-sekuentzian.....	65
3.7.2. CRAC/CARC motiboen identifikazioa eta sekuentzia anitzen lerrokatzea.....	66
3.8. GLIKOSILAZIO-SAIKUNTZA.....	67
3.8.1. Zelularik gabeko <i>in vitro</i> sistemak.....	67
3.8.2. DNA manipulazioak.....	69
3.8.2.1. DNA-ren PCR bidezko linearizazioa.....	70

3.8.3. <i>In vitro</i> transkripzio/itzulpen-erreakzioa.....	71
3.8.4. Endo H tratamendua .....	71
3.8.5. Analisia eta kuantifikazioa.....	72
4. POSSIBLE MOLECULAR DETERMINANTS FOR THE CHOLESTEROL DEPENDENCE OF THE BIOLOGICAL FUNCTIONS OF CyaA TOXIN.....	75
4.1. ABSTRACT.....	76
4.2. INTRODUCTION .....	76
4.3. RESULTS .....	77
4.3.1. Specificity in the interaction of CyaA with cholesterol.....	77
4.3.2. Identification of potential CRAC/CARC motifs in CyaA .....	81
4.3.3. Functional characterization of CARC <sup>415</sup> , CRAC <sup>485</sup> , CRAC <sup>521</sup> and CARC <sup>532</sup> motifs	86
4.3.3.1. Mutations in the putative CRAC/CARC motifs affect CyaA-induced hemolysis .....	87
4.3.3.2. Effect of mutations in putative CRAC/CARC motifs in the AC activity .....	88
4.3.3.3. Mutations in CRAC/CARC motifs do not alter CyaA binding to lipid bilayers	90
4.3.4. Early steps in the structural analysis of CyaA in lipid bilayers .....	91
4.4. DISCUSSION .....	92
4.5. SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	97
4.5.1. Supplementary tables .....	97
5. MEMBRANE-INTERACTING PROPERTIES OF A SYNTHETIC PEPTIDE DERIVED FROM THE TRANSLOCATION REGION OF CyaA TOXIN .....	103
5.1. ABSTRACT.....	104
5.2. INTRODUCTION .....	104
5.3. RESULTS .....	105
5.3.1. Cholesterol binding study of the P454–487 peptide .....	105
5.3.2. Membrane-partition of the P454–487 peptide .....	107

5.3.3. Conformation of P454–487 in a low-polarity medium.....	109
5.3.4. Conformational changes of P454–487 into cholesterol-containing lipid bilayers...	112
5.3.5. Conformations adopted by P454–487 <sup>F485A</sup> in cholesterol-containing bilayers.....	116
5.3.6. Membrane-insertion angle of the P454–487 peptide .....	118
5.3.7. Glycosylation mapping of helix h2 within the translocation region of CyaA .....	119
5.3.8. P454–487 blocks CyaA binding and inhibits toxin-induced activities.....	124
5.4. DISCUSSION .....	128
5.6. SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	134
5.6.1. Supplementary figures .....	134
5.6.2. Supplementary tables .....	135
6. EZTABAIDA OROKORRA ETA ONDORIOAK.....	139
ERREFERENTZIAK .....	143
ARGITALPENAK .....	187
ESKER EMATEA .....	189



# LABURPENA

Toxina poro-eragileen txertatzeari eta mihizatzeari buruzko ehunka ikerketa argitaratu dira, besteak beste, solugarriak diren proteinak mintzean integratutako egitura egonkor nola bihurtzen diren ulertzeko; batez ere, haien ekintza-mekanismoa ornodunen immunitate-sistemako zenbait proteinaren edo proteina amiloideen antzekoa delako.

Hainbat toxina poro-eragilek haien toxikotasuna modulatzeko mintzeko lipidoak erabiltzen dituzte eta hala, mintzean-zeharreko helizeak egonkortzen dituzte. Adibidez, mintzeko kolesterola funtsezkoa da bakterio patogenoek jariatutako zenbait RTX toxinaren ekintza-mekanismorako. Hain zuzen, gero eta RTX toxina gehiagok kolesterola ezagutzeko CRAC eta CARC motako motibo funtzionalak erabiltzen dituztela deskribatu da.

Besteak beste, mintzeko kolesterolak *Bordetella pertussis* kukutxeztularen bakterioak jariatutako adenilato ziklasa toxinaren (CyaA) jarduera zitotoxiko eta zitolitikoak modulatzeko ditu. Hala ere, oraindik ez zegoen argi kolesterolaren zuzeneko loturak edo esterol honek fosfolipido bigeruzaren egoera fisikoan dauzkan zeharkako ondorioek eragindakoa ote zen. Lan honetan, kolesterolak eta CyaA-k espezifikoki elkarreragiten dutela eta horrek toxinaren mintzeko lotura hobetzen duela argitu dugu. Izan ere, CyaA toxinaren aminoazido-sekuentziaren azterketak erakutsi zuenez, beste RTX toxina batzuek bezala, CRAC eta CARC motiboak ditu. Kolesterolarekiko sentikortasuna gutxienez mintzarekin elkarreragin dezaketen bi domeinutan (translokazio-eskualdea eta domeinu poro-eragilea) dauden kolesterola ezagutzeko lau motibok (CARC<sup>415</sup>, CRAC<sup>485</sup>, CRAC<sup>521</sup> eta CARC<sup>532</sup>) gutxienez ematen dutela proposatzen dugu. Gainera, peptido sintetiko bat erabiliz frogatu dugu motibo horietako bat, CRAC<sup>485</sup>, kolesterola CyaA-rekin lotzeaz arduratzen dela. Peptido horrek mintzekin elkarreragiteko dauzkan ezaugarriak ere aztertu ditugu. Garrantzitsua da nabarmentzea peptidoak ez duela zelula-lisirik eragiten CyaA-ren jarduera inhibitzen duen kontzentrazio-tartean. Horrenbestez, peptido hori erabiltzea metodo ez-toxiko baliagarria izan daiteke CyaA zelula ostalariei lotzea oztopatzeko eta CyaA-k eragindako zitotoxikotasuna murrizteko. Beraz, horrek esan nahi du etorkizunean *Bordetella* infekzioa kontrolatzeko erabil daitekeela klinikoki.



## SUMMARY

Insertion and assembly of pore-forming toxins have been subject of growing investigations to understand protein conversion from water-soluble forms to stable membrane-integrated structures, especially considering the resemblance of their mechanism of action to proteins of the vertebrate immune system, or to amyloid proteins.

A great variety of pore-forming toxins requires lipid-mediated stabilization of TM helices to modulate toxicity. For example, cumulative evidences show that membrane cholesterol is essential for the mechanism of action of several RTX toxins secreted by pathogenic bacteria. In fact, increasing number of RTX toxins present various functional cholesterol-recognition motifs of the CRAC and CARC type, which appears to be another common feature shared in the family.

Amongst others, it was documented that the cytotoxic and cytolytic activities of the adenylate cyclase toxin-hemolysin (CyaA) secreted by the whooping cough bacterium *Bordetella pertussis* are modulated by the membrane cholesterol concentration. Yet, it was still unclear whether this was due to direct binding to cholesterol, or to indirect effects of the sterol on the physical state of the phospholipid bilayer. We provide here an ample set of evidences clarifying that cholesterol enhances the membrane binding of CyaA, primarily due to preferential toxin-cholesterol interaction. Examination of the deduced amino acid sequence of CyaA revealed that, together with other RTX toxins, it contains putative CRAC and CARC motifs. We report herein that such cholesterol sensitivity is provided by at least four cholesterol-recognition motifs (CARC<sup>415</sup>, CRAC<sup>485</sup>, CRAC<sup>521</sup> and CARC<sup>532</sup>) in key membrane-interacting domains (the translocation region and pore-forming domain). Moreover, we use a synthetic peptide to demonstrate that one of those motifs, the CRAC<sup>485</sup>, is responsible for the cholesterol binding by CyaA and we establish the membrane-interacting characteristics of such peptide. Importantly, we show that the peptide does not itself exhibit lytic properties in the range of concentrations in which inhibits CyaA activity on cells, all of which allows affirming that the use of this peptide may represent a valid non-toxic method for blocking binding of CyaA to host cells and minimize Cya-induced cytotoxicity. Hence, this indicates that it may have a potential clinical applicability in controlling infection of *Bordetella*.

# IRUDIEN ZERRENDA

1.1 irudia. Ugaztunen zelula-mintza. ....	2
1.2 irudia. Glizerofosfolipidoen eta esfingolipidoen egitura orokorra.....	4
1.3 irudia. Kolesterolaren egitura kimikoa.....	5
1.4 irudia. Lipido bigeruza baten eskema sinplifikatua Ld, Lo eta So faseetan.....	6
1.5 irudia. RTX toxinen sintesia, itzulpen-osteko eraldaketa, jariaketa eta tolestea.....	9
1.6 irudia. Zenbait RTX toxinen egiturak.....	10
1.7 irudia. $\alpha_M\beta_2$ integrina heterodimerikoaren ektodomeinua.....	13
1.8 irudia. Gangliosidoen adibide batzuk.....	15
1.9 irudia. Kolesterolaren ezagutzarako/interakziorako aminoazido-adostasun motiboak.....	21
1.10 irudia. <i>B. pertussis</i> -en CyaA toxinen egitura-antolaketa.....	24
1.11 Irudia. AC domeinuaren kristal-egitura, CaM-ren C-muturreko domeinuari lotua.....	25
1.12 irudia. CyaA-ren translokazio-eskualdearen NMR egitura DPC mizeletan.....	26
1.13 irudia. CyaA-ren 500–706 hondarren TM helizeen topologia.....	26
1.14 irudia. CyaA-ren 751–1488 hondarren cryo-EM egitura.....	28
1.15 irudia. CyaA-ren zelula eukariotoak intoxikatzeko prozesua azal lezakeen eredu bat.....	31
1.16 irudia. <i>B. pertussis</i> -en birulentzia-faktoreak.....	33
3.1 irudia. Liposomen oinarriko egitura eta sailkapenaren irudikapen eskematikoa.....	42
3.2 irudia. DOPC-ren egitura.....	43
3.3 irudia. Kolesterolaren eta ergosterolaren arteko egitura-desberdintasunak.....	43
3.4 irudia. MLV-ak prestatzeko metodoa.....	44
3.5 irudia. DOPC/ERG LUV-en prestakuntza-protokoloa.....	45
3.6 irudia. Lipido-peptido formulazioak (LPF) eratzeko protokoloa.....	46
3.7 irudia. CyaA-ren mintz-txertaketaren analisia besikulen flotazioaren bidez.....	49
3.8 irudia. Agente litiko batek eragindako askapen-saiakuntzaren adierazpen eskematikoa.....	50
3.9 irudia. Fluoreszentiaren oinarriko printzipioak.....	52
3.10 irudia. CD erreferentzia-espektroak % 100 egitura sekundario bakoitzerako.....	56
3.11 irudia. ATR-FTIR neurketen oinarriko printzipioak.....	60
3.12 irudia. Hemolisi-saiakuntzaren marrazkia.....	63
3.13 irudia. Clustal Omega lerrokatzerako <sup>330</sup> erabilitako parametroak.....	67
3.14 irudia. Erribosomari lotutako Sec61 translokoia ER mintzean.....	68
3.15 irudia. Glikosilazio-patroiaren azterketak erakusten du helize jakin batek ER mintzean orientatzeko izan dezakeen joera.....	69
3.16 irudia. Diseinatutako konstruktuen irudikapen eskematikoa.....	70

## IRUDIEN ZERREDA

3.17 irudia. Endo H-ren jarduera erakusten duen irudi eskematikoa. Manosa zirkulu berdeekin eta GlcNAc karratu urdinekin adierazi dira. ....	71
Figure 4.1. Toxin association to liposomes.....	77
Figure 4.2. CyaA incubation with cholesterol in solution reduces toxin-induced vesicle permeabilization.....	79
Figure 4.3. CyaA incubation with cholesterol in solution reduces the lytic activity of the toxin on erythrocytes.....	80
Figure 4.4. Effect of CyaA incubation with liposomes on CyaA-induced maximum hemolysis. ....	81
Figure 4.5. Alignment of the translocation region of CyaA with other RTX toxins.....	84
Figure 4.6. Alignment of the hydrophobic domain of CyaA against other RTX toxins. ....	85
Figure 4.7. Location of different CRAC/CARC sites in the primary sequence of CyaA. ....	86
Figure 4.8. F/A substitutions in the putative CRAC/CARC motifs significantly affect the hemolytic activity of CyaA.....	88
Figure 4.9. Key F/A substitution in the putative CRAC motifs has significant impact in the cAMP elevation.....	89
Figure 4.10. Vesicle flotation analysis of mutant CyaA toxins. ....	90
Figure 4.11. Lipid vesicles decorated with CyaA. ....	91
Figure 4.12. Schematic model of the membrane topology for the h1-h2-HI-HII helices. ....	95
Figure 5.1. Amino acid sequence of the synthetic peptides used in this work.....	105
Figure 5.2. Tryptophan cholesterol titration spectra. ....	106
Figure 5.3. Analysis of the fluorescence intensity changes at the maximum wavelength (340 nm). .	107
Figure 5.4. P454–487 and P454–487 <sup>F485A</sup> membrane partition followed by fluorescence. ....	108
Figure 5.5. Structural analysis of P454–487 in a low polarity medium.....	111
Figure 5.6. Reconstitution of P454–487 in DOPC lipid bilayers.....	113
Figure 5.7. Conformations adopted by P454–487 as function of cholesterol content in membranes. .	114
Figure 5.8. 2D-COS-IR analysis of P454–487 <sup>F485A</sup> reconstituted in DOPC with increasing cholesterol concentrations. ....	118
Figure 5.9. Angle of insertion of the main conformations adopted by P454.....	119
Figure 5.10. Predicted protein structure for the constructs designed. ....	120
Figure 5.11. LepB membrane targeting efficiency of constructs containing h1 helix. ....	121
Figure 5.12. Maximum glycosylation efficiency of C5 glycan acceptor-site. ....	122
Figure 5.13. Degree of membrane integration of h1, h2 and HI helices analyzed by SDS-PAGE.....	122
Figure 5.14. Potential membrane association models.....	124
Figure 5.15. P454–487 peptide inhibits CyaA binding to DOPC/CHOL vesicles. ....	125
Figure 5.16. Incubation of DOPC/CHOL vesicles with P454–487 decrease CyaA-induced vesicle permeabilization.....	126

Figure 5.17. Hemolytic capacity of the P454–487 peptide and comparison with the full-length CyaA toxin. .... 126

Figure 5.18. P454–487 peptide blocks CyaA binding to erythrocytes and the subsequent toxin-induced lysis. .... 127

Figure 5.19. Incubation of P454–487 with J774A.1 macrophages inhibits toxin-induced cAMP production. .... 128

Figure 5.20. The use of a CRAC peptide to inhibit the cholesterol binding of a bacterial toxin. .... 133

Figure S.5.1. Structural analysis of P454–487<sup>F485A</sup> in a low polarity medium. .... 134

Figure S.5.2. Normalized FTIR spectrum of the amide I' region for the P454–487<sup>F485A</sup> peptide reconstituted in DOPC lipid bilayers. .... 135

# TAULEN ZERRENDA

1.1 taula. Zenbait RTX toxinek kolesterolarekiko duten afinitatea ( $K_D$ , $M$ ). .....	19
3.1 taula. Erabilitako peptidoei buruzko xehetasunak. ....	41
3.2 taula. Amida-I' banden esleipen arruntena $D_2O$ -n. ....	58
3.3 taula. Lan honetan erabili diren primerrak. ....	70
Table 4.1. Summary of CRAC/CARC motifs identified in several RTX toxins. ....	82
Table S.4.1. Putative CRAC motifs identified in the pore-forming domain of several RTX toxins. Central phenylalanine and tyrosine residues are highlighted in green and red, respectively. ....	97
Table S.4.2. Putative CARC motifs identified in the pore-forming domain of several RTX toxins. ... Central phenylalanine and tyrosine residues are highlighted in green and red, respectively. ....	99
Table 5.1. Membrane-partition of the P454–487 peptide and its variants. ....	109
Table 5.2. Secondary structure assignation for the main components of P454–487 decomposed spectra and the area percentages for each one (rounded off the nearest integer). ....	115
Table 5.3. Secondary structure assignation for the main components of the decomposed P454– 487 <sup>F485A</sup> spectra and the area percentages for each one of the components. ....	117
Table 5.4. $\Delta G_{pred}$ and $\Delta G_{app}$ free energies of TM insertion. ....	123
Table S.5.1. Membrane partitioning of P454–487 and its variants P454–487 <sup>F485A</sup> , P454–487 <sup>Scr</sup> and P454–484 in DOPC or DOPC:CHOL (1:1 molar ratio) LUVs. ....	135
Table S.5.2. ATR-FTIR data of the P454–487 peptide. ....	136
Table S.5.3. ATR-FTIR data of the P454–487 <sup>F485A</sup> peptide. ....	137

## LABURDUREN ETA SINBOLOEN ZERRENDA

2D-COS	Two-dimensional correlation spectroscopy / Bi-dimentsioko korrelazio espektroskopia
AC	Adenylate cyclase / Adenilato ziklasa
ACP	Acyl carrier protein / Proteina azilo garraiatzailea
ANTS	8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid, disodium salt / 8-aminonaftaleno-1,3,6-azido trisulfonikoa, disodio gatza
ATR	Attenuated total reflection / Islapen total indargabetua
CaM	Calmodulin / Kalmodulina
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate / Adenosina monofosfato ziklikoa
CD	Circular dichroism / Dikroismo zirkularra
CD11a/CD18	$\alpha_L\beta_2$ integrin / $\alpha_L\beta_2$ integrina
CD11b/CD18	$\alpha_M\beta_2$ integrin / $\alpha_M\beta_2$ integrina
CHOL	Cholesterol / Kolesterola
CM	Center of mass / Masa-zentroa
CRAC	Cholesterol recognition/interaction amino acid consensus / Kolesterolaren ezagutza/interakziorako aminoazido adostasuna
CRM	Canine rough microsomes / Txakur-pankreako mikrosoma pikortsuak
Cryo-EM	Cryogenic electron microscopy / Mikroskopia kriogeniko elektronikoa
CyaA	Adenylate cyclase toxin / Adenilato ziklasa toxina
D <sub>2</sub> O	Deuterated water / Ur deuteratua
DLS	Dynamic light scattering / Argiaren sakabanatze dinamikoa
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium / Dubelcco-k eraldatutako Eagle-ren Media
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine / 1,2-Dioleoil-sn-glizero-3-fosfokolina
DPX	P-xylene-bis-pyridinium bromide / P-xileno-bis-piridinio bromuroa

## LABURDUREN ETA SINBOLOEN ZERRENDA

DSC	Differential Scanning Calorimetry / Ekorketa diferentzialeko kalorimetria
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid / azido etilenodiaminotetrazetikoa
EHEC	enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> / <i>Escherichia coli</i> enterohemorragikoa
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EndoH	Endoglycosidase H / H endoglikosidasa
ER	Endoplasmic reticulum / Erretikulu endoplasmatikoa
EtOH	Ethanol / Etanola
FBS	Fetal bovine serum / Behi fetu gazura
FTIR	Fourier transformed infrared / Fourier-en transformatutako espektroskopia infragorria
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid / 4-(2-hidroxietyl)piperazina-1-azido etanosulfonikoa
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranoside / Isopropil-D-tiogalaktopiranosidoa
IR	Infrared / Infragorria
ITC	Isothermal Titration Calorimetry / Titulazio isotermikoko kalorimetria
Ld	Liquid disordered / Likido desordenatua
LepB	<i>E. coli</i> leader peptidase / <i>E. coli</i> -ren lider peptidasa
Lo	Liquid ordered / Likido ordenatua
LPF	Liposome-peptide formulation / Liposoma-peptido formulazioak
LUV	Large unilamellar vesicle / Lamela bakarreko besikula txikiak
MLV	Multilamellar vesicle / Lamela anitzeko besikulak
MSA	Multiple Sequence Alignment / Sekuentzia anitzen lerrokatzea
NMR	Nuclear Magnetic Resonance / Erresonantzia magnetiko nuklearra
OD	Optical density / Dentsitate optikoa
-OH	Hydroxyl group / Hidroxilo taldea

## LABURDUREN ETA SINBOLOEN ZERRENDA

ON	Over night / Gaeuz
Opti-MEM	Improved minimal essential medium / Hobetutako medio minimo esentziala
ORF	Open reading frame / Irakurtarau ireki
OST	Oligosaccharyl transferase / Oligosakaril transferasa
PC	Phosphatidylcholine / Fosfatidilkolina
PCR	Polymerase chain reaction / Polimerasaren kate erreakzioa
PDI	Polydispersity index / Polidispertsio-indizea
PE	Phosphatidylethanolamine / Fosfatidiletanolamina
PFT	Pore-forming toxin / Toxina poro-eragilea
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine / 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glizero-3-fosfokolina
PTM	Post-translational modifications / Itzulpen-osteko eraldaketa
Rho	Lissamine rhodamine B sulfonyl chloride / lisamina rodamina B sulfonil kloruroa
RD	Repeat domain / errepikapen domeinua
RBD	Receptor binding domain / Hartzaileari lotzeko domeinua
RT	Room temperature / Giro tenperatura
RTX	Repeat-in-toxin
SDS	Sodium dodecyl sulfate / sodio dodezil sulfatoa
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis / sodio dodezil sulfato poliakrilamida gel elektroforesia
SM	Sphingomyelin / Esfingomielina
So	Solid gel / Gel solido
SPR	Surface Plasmon Resonance / Gainazaleko plasmoi erresonantzia
SS	Secretion signal / Jariatze-seinale
SUV	Small Unilamellar Vesicle / Lamela bakarreko besikula txikiak




## LABURDUREN ETA SINBOLOEN ZERRENDA

T1SS	Type I secretion system / I motako jariatze-sistema
TFA	Trifluoroacetic acid / Azido trifluoroazetikoa
TFE	2,2,2-trifluoroethanol / 2,2,2-trifluoroetanola
Tm	Melting temperature / Fusio tenperatura
TM	Transmembrane / Mintzean zeharreko
TR	Translocation region / Translokazio-eskualdea
UPEC	Uropathogenic <i>E. coli</i> / <i>E. coli</i> uropatogenikoa
WT	Wild-type / basatia



# KAPITULUA



**1**

**Kapitulu honen jatorrizko bertsioa Helena Ostolaza Etxabek eta Jone Amuategi Aulestiartek argitaratu dute hemen:**

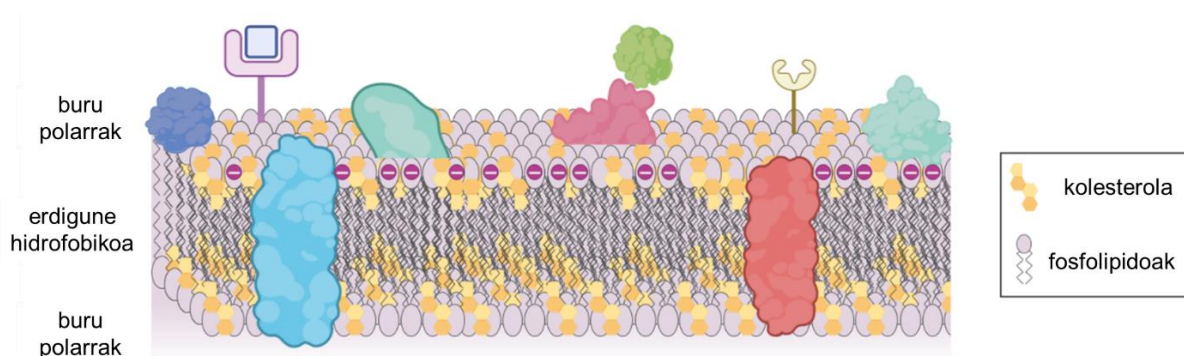
Ostolaza, H., & Amuategi, J. (2024). Membrane Interaction Characteristics of the RTX Toxins and the Cholesterol-Dependence of Their Cytolytic/Cytotoxic Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms25063131>

## 1. KAPITULUA: SARRERA

### 1.1. MINTZ PLASMATIKOA: MINTZEKO TOXINEN ELKARGUNEA

Mintz biologikoak dira zelularen funtzionamendu egokirako egiturarik funtsezkoenak, eta beraz, bizitzaren eboluzioari estuki loturik egon dira<sup>1</sup>. Mintzak zelulen osotasuna mantendu eta haien egitura egonkortzen duten aldamio sendo eta dinamikoak dira. Adibidez, mintz plasmaticoak (**1.1 irudia**) zelula barneko espazioa kanpoko ingurunetik bereizten du. Hala, zelula babesten eta mantenguzaien fluxua arautzen du, zelula barnera eta handik kanpo<sup>2</sup>. Ondorioz, mintza kaltetzeak zelularen heriotza eragin dezake<sup>3-5</sup>. Horrexegatik, mikroorganismo- eta bakterio-produktu askok, toxina poro-eragileek (ingelesez *pore-forming toxins*, PFT) esaterako<sup>6</sup>, mintzak erasotzen dituzte.

Mintz plasmatico eukariotoaren matrizea lipido anfilikoz<sup>7</sup> (glizerofosfolipido, esfingolipido eta esterolak) osatutako geruza bikoitz bat da eta fosfolipido bigeruzan esaten zaio. Mintzak espontaneoki sortzen dira, lipidoen isats hidrofobikoak elkartu, buru hidrofilikoei ingurune urtsuarekin elkarrengaitan dutenean<sup>2</sup>. Lipidoak, proteinak eta azukreak egitura horren funtsezko osagaiak dira. Mintzean zeharreko proteinek (ingelesez *transmembrane*, TM) nukleo hidrofobikoa zeharkatzen dute; eta proteina periferikoak edo beste biomolekula batzuk gainazal hidrofiliko kargatura lotzen dira<sup>8</sup>.



**1.1 irudia. Ugaztunen zelula-mintza.** Zenbait lipido- eta proteina-espeziek eratzen dute mintz plasmaticoaren osaera konplexua. Lipido anfilikoa (glizerofosfolipidoak, esfingolipidoak eta kolesterola) bigeruzan-itxurako egitura batean mihizatzen dira. TM proteinek nukleo hidrofobikoan txertatuta daude. Bestalde, proteina periferikoak edo beste biomolekula batzuk gainazal hidrofiliko kargatuarekin lotzen dira<sup>8</sup>. Mintzaren bolumenaren % 50 TM proteinek, proteina periferikoek eta lipidoek osatzen dute<sup>9,10</sup>. Azpimarratu behar da kolesterola ugaztunen zelulen funtsezko esterola dela<sup>11</sup>. BioRender erabiliz marraztuta.

1972an proposatutako Singer-Nicolson eredua<sup>12</sup> baliagarria izan den arren, 50 urte baino gehiago igaro ostean, zenbait ezaugarri gehitu zaizkio eta eredua eguneratu da<sup>9,10</sup>. Zelula-mintzaren osagaiak hainbat domeinutan funtzionatzen dutela deskribatu da<sup>13</sup>; domeinu horiek oreka termodinamikoan daude, ez dira uniformeak, ez aleatorioak eta kooperatiboak eta dinamikoak dira<sup>14</sup>. Horrez gain, mintz plasmatico ez da osagai estatiko eta autonomo bat,

baizik eta erabat integratutako egitura bat, zitoplasmari nahiz zelulaz kanpoko matrizeari lotua dagoena<sup>9</sup>.

Mintz gehienak asimetrikoak dira, bai alboetara, bai geruzen konposizio desberdinari dagokionez<sup>15</sup>. Mintz plasmaticoaren kanpo-geruza kolina duten lipidotan aberatsa da, hala nola fosfatidilkolina (ingelesez *phosphatidylcholine*, PC) eta esfingomielina (ingelesez *sphingomyelin*, SM); barne-geruza, berriz, fosfatidiletanolamina (ingelesez *phosphatidylethanolamine*, PE) eta fosfatidilserina (*phosphatidylserine*, PS) gisako glizerofosfolipidoetan aberastua dago. Barne-geruzan dauden beste fosfolipido batzuek, hala nola azido fosfatidikoak (ingelesez *phosphatidic acid*, PA), fosfatidilinositolak (ingelesez *phosphatidylinositol*, PI), fosfatidilinositol-4-fosfatoak (ingelesez *phosphatidylinositol-4-phosphate*, PIP) eta fosfatidilinositol-4,5-bifosfatoak (ingelesez *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*, PIP2), zelula barneko seinaleztapen-prozesuetan parte hartzen dute<sup>16</sup>.

### 1.1.1. Mintzeko lipidoak

#### 1.1.1.1. Glizerofosfolipidoak eta esfingolipidoak

Glizerolipidoak glizerofosfolipidotan eta glizeroglikolipidotan (landareetan, alga eukariotoetan eta zianobakterioetan daude<sup>17,18</sup>) sailka daitezke. Glizerofosfolipidoak (**1.2 irudia**) zelula eukariotoen mintzetan nagusi diren lipido estrukturalak dira (% 65 mol arte)<sup>19,20</sup>. PA glizerofosfolipido guztien egitura komuna da: bi gantz-azidori lotutako glizerol molekula batek (diazilglizerola, DAG) eta fosfato-talde batek osatzen dute. Glizerofosfolipidoaren arabera, fosfato-talde hori alkohol gehigarri batekin esterifikatzen da. Gantz-azido kateei dagokienez, aseak edo *cis*-asegabeak izan daitezke eta hainbat luzera izan ditzakete<sup>19</sup>.

Esfingolipidoak (**1.2 irudia**) ere lipido anfipatikoak dira eta N-azilatutako zenbait gantz-azido izan ditzakeen esfingosina daukate oinarrian<sup>21</sup>. Zeramidak hidroxilo (-OH) sinplearen bidez bereiz daitezke; SM fosforilkolina-hondarra du; eta zerebrosido eta gangliosido (**1.8 irudia**) deritzen glikoesfingolipidoek azukre bakarra edo zenbait oligosakarido (muturreko azido sialikoa<sup>22</sup>) dituzte, hurrenez hurren. Gantz-azidoaren kateak luzeak eta aseak (edo *trans*-asegabeak) izan ohi dira. Beraz, luzera bereko PC-ek baino zilindro handiagoak eta estuagoak sortzeko gai dira<sup>8</sup>.

## 1. KAPITULUA: SARRERA



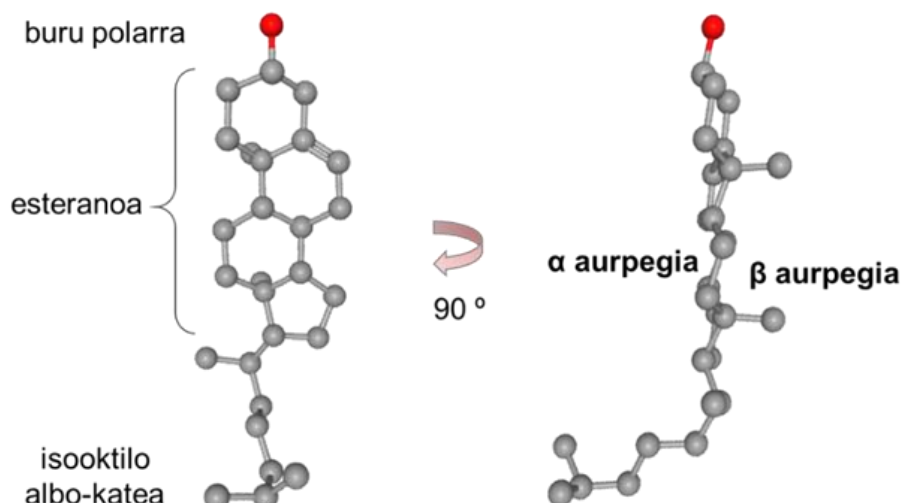
**1.2 irudia. Glizerofosfolipidoen eta esfingolipidoen egitura orokorra.** Glizerofosfolipidoek glizerol talde bat (berdea), *sn-1* posizioan gantz-azido ase bat eta *sn-2* posizioan gantz-azido asegabe bat (laranja), fosfato-talde bat (gorria) eta buru polarraren ordezkoa (X, beltza) dituzte. Esfingolipidoek esfingosina (2-amino-4-trans-octadezeno-1,3-diol) molekula dute oinarrian (magenta), gantz-azido saturatu bat (laranja) eta buru polarraren ordezkoa (X, beltza) dituzte. Molview.org-rekin marraztuta.

### 1.1.1.2. Esterolak

Zelula-mintzen matrizea fosfolipidoek eta esfingolipidoek osatzen badute ere, esterolak, oro har, kantitate handitan ageri dira (% 20–40)<sup>23</sup> animalien mintzetan (kolesterola, CHOL<sup>11</sup>), landareetan (estigmasterola, STIG<sup>24</sup>) eta legamietan (ergosterola, ERG<sup>25</sup>).

Kolesterolaren egitura eta glizerolipidoen eta esfingolipidoen egitura nahiko desberdinak dira<sup>11,19</sup>. Kolesterola esteranotik eratorritako molekula anfipatikoa da. Haren zati polarra hidroxilo talde bakar batera mugatzen da ( $3\beta$ -OH) eta bi hidrogeno-lotura mota sor ditzake (hartzailea eta emailea) mintzeko lipido edo proteina baten talde polarrarekin<sup>26</sup>. Kolesterolaren zati apolarra, era berean, bi aurpegiko egitura asimetrikoa du:  $\alpha$  aurpegi laua eta  $\beta$  aurpegi zimurra. Bigarrenak azalera nabarmen zimurragoa du, zenbait talde alifatiko baitaude (bi metilo talde eta muturreko isooktilo-katea) esteranoari lotuta (**1.3 irudia**).

Kolesterola mintz plasmaticoaren eraikuntzarako ezinbestekoa da eta haren osotasuna mantentzen eta jariakortasuna doitzen ditu, besteak beste<sup>27</sup>. Mintz jariakorretan lipido-ordena handitzeko ahalmena du, baina jariakortasunari eta difusioari eusten die. Horrez gain, iragazkortasun-muga txikia ezartzen du eta koherentzia mekaniko handia eskaintzen die mintzei. Alboetarako antolakuntzan<sup>23</sup> eta mintz-proteina batzuen homeodinamikan ere parte hartzen du. Izan ere, intrintseko proteinen funtzioa modula dezake, zuzeneko loturaren bidez edota mintzaren jariakortasunean eragindako zeharkako efektuen ondorioz<sup>28–33</sup>.



**1.3 irudia. Kolesterolaren egitura kimikoa.** Kolesterolak<sup>11,19</sup> (PubChem CID 5997) forma konikoa du eta bi zatitan bana daiteke. Alde batetik,  $-OH$  taldea lotuta duen 4 eraztuneko esterano-sistemak molekularen bolumen espazialaren % 50 betetzen du eta oso malgutasun txikia du; bestetik, isooktilo albo katea oso malgua da, eta beraz, konformazio ugari har ditzake mintz-proteinekin bat egiten duenean. Eskualde polarren ( $3\beta-OH$  taldea) eta apolarren (esterano eraztuna eta isooktilo alboko katea) konbinazioak izaera anfipatikoa ematen dio kolesterolari, eta horri esker, mintzeko beste osagai batzuekin (lipidoak eta proteinak) elkarrekintzak izan ditzake. Kolesterolaren ezaugarri estrukturaletako bat da esterano-eraztunaren planoari berez dagokion asimetria, aurpegi batean metiloa ordezkatzearen ondorioz.  $\alpha$  aurpegi leuna hidrogeno axialeko atomoz soilik osatuta dago, eta Van der Waals elkarrekintza faboragarriak eratu ditzake fosfolipidoen gantz-azido kateekin. Aitzitik,  $\beta$  aurpegi zimurreko metilo talde irtenek mintz-proteinekin elkarreaginean jardun dezaketeg.

### 1.1.2. Mintzen heterogeneotasuna

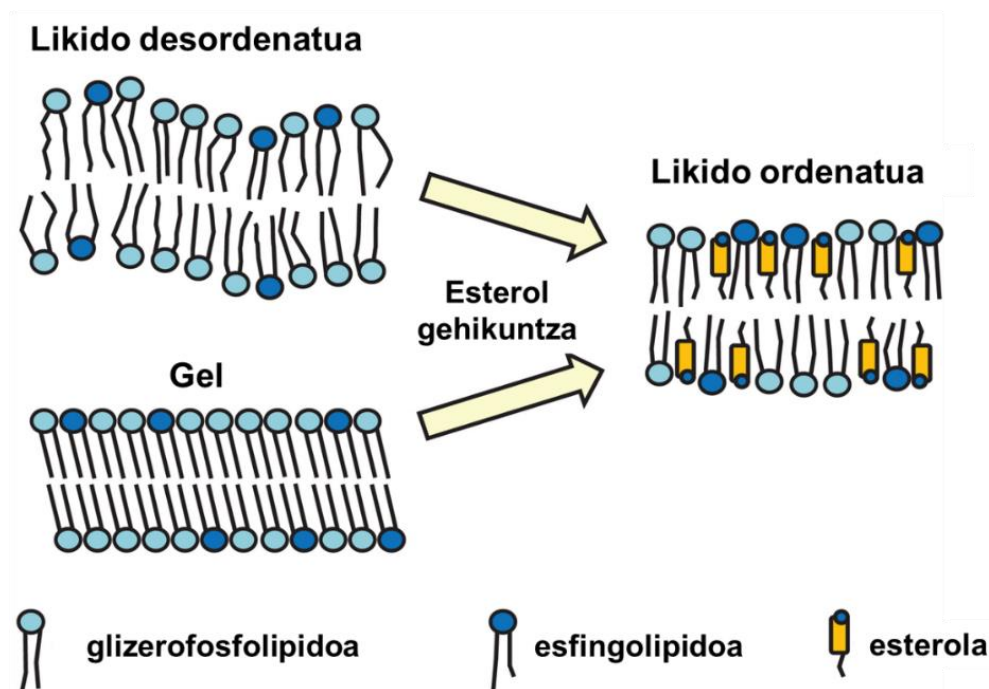
Biomintzak oso egitura dinamikoak dira, eta horietan lipidoek duten kokapena eta orientazioa etengabe aldatzen da (konformazio-aldaketak hidrokarbu-kateetan, lipidoen difusio laterala eta errotazionala edo *flip-flop* mugimenduak<sup>9,10</sup>).

Lipidoak ez dira beti modu uniformearen nahasten mintzean; haien geometria molekularren arabera, hainbat fase izan ditzakete (mizelak, fase lamelarrak, fase kubikoak edo alderantzizko fase hexagonalak)<sup>34,35</sup>. Mintzeko lipidoen forma haien buru polarraren azalera eraginkorraren eta haien zati hidrofobikoaren neurriaren arteko erlazioaren araberkoa da<sup>36</sup>. Forma horrek lipidoen kokapena baldintzatuko du eta kurbadura-fenomenoen arduraduna izango da<sup>37,38</sup>. PC edo PS gisako mintz-lipidoek, forma zilindrikoa dute; PE-k, berriz, forma konikoa du, eta kurbadura-tentsioa ezartzen die PC-z osatutako bigeruz lipidikoei. Fase lamelarrek, eskuarki, zilindro-formako lipidoak izan ohi dituzte eta fase ez-lamelarrek kono edo alderantzizko-kono itxurako lipidoak izaten dituzte<sup>34,35</sup>.



## 1. KAPITULUA: SARRERA

Biomintzen oinarritzko egitura lamelarra da eta osaera lipidikoaren arabera, ezaugarri uniformeak dituzten hainbat egoera fisiko izan ditzakete. Gel fasea eta fase jariakorrek mintz biologikoetan gerta daitezkeen muturreko bi egoera dira (**1.4 irudia**) eta fase trantsizio nagusia lipidoen hidrokarbuo kateen urtzearekin lotuta dago<sup>39</sup>. Fosfolipido espezie bakoitzak fusio-temperatura (ingelesez *melting temperature*,  $T_m$ ) bereizgarria du, eta hori hidrokarbuoen luzeraren, asegabetasunaren, kargaren eta buru-polarren araberakoa da<sup>40</sup>.  $T_m$ -tik behera, geruza lipidiko erabat hidratatuek fase ordenatu edo gel fasea ( $S_o$  or  $L_\beta$ ,  $L_\beta'$  eta  $P_\beta$ ), subgela ( $L_c'$ ) edo kuasikristalinoa ( $L_c$ )<sup>41</sup> hartzen dute<sup>42</sup>. Fase horietan guztietan, albo-difusioa oso txikia da, eta lipidoak oso ordenatuta daude, ia guztiak *trans* konformazioan daudelarik. Hala ere, desberdinak dira haien paketatze-dentsitatea, dinamika eta biraketa-ordena. Adibidez,  $S_o$  faseko lipidoek erabat zabalduak eta estu paketatutako gantz-azidoak dituzte, lipido-ur planoarekiko perpendikularki kokatuta daudenak;  $L_\beta'$  motako gel fasean, berriz, gantz-azidoak mintzaren planoarekiko inklinatzen dira<sup>43</sup>.  $T_m$  gainetik, geruza bikoitza fase desordenatuan edo jariakorrean dago ( $L_d$ ,  $L_\alpha$ ). Fase honetan, lipidoen difusio lateral eta errotazionala errazten da, gantz-azido kateak ausaz orientatzen dira, estuki paketatuta gabe<sup>44</sup>. Azkenik, likido ordenatu faseak ( $L_o$ )  $L_d$  eta  $S_o$  tarteko propietateak ditu: difusio laterala eta errotazionala  $L_d$  fasearen antzekoak dira, baina ordena konformazionala  $S_o$  fasearen antzekoa da<sup>45</sup>.



**1.4 irudia. Lipido bigeruza baten eskema sinplifikatua  $L_d$ ,  $L_o$  eta  $S_o$  faseetan.**  $L_d$  fase jariakorrean lipidoek paketatze irregularra izaten dute, eta asaldura eta alboko mugikortasuna areagotu egiten dira.  $T_m$  azpitik, lipido-bigeruzak gogor paketatzen dira solido antzeko fasean ( $S_o$ ) eta lipidoen alboko mugimendua eragozten da. Esterolak mintz ereduetan sartzen direnean, bigeruzek  $L_o$  fasea osatzen dute. Fase horretan, gantz-azidoak  $L_d$  fasean baino hurbilago paketatzen badira ere, baina alboko mugikortasunari eusten diote. Johnston eta kideengandik egokitua<sup>46</sup>.

$T_m$  desberdineko fosfolipidoen nahaste bitarretan, osagai bat maila baxuetan dagoenean, nahastea uniformea da, eta eskuarki, osagai nagusiak faboratutako fasean egoten da. Hala ere, osagai baten atalase-kontzentrazioaren ginetik, fase bereizketa kooperatiboa gertatzen da, eta gel fasea eta fase jariakorra batera existitu daitezke. Bi faseko sistema horietan, gel fasea  $T_m$  altuko lipidotan aberatsa da, eta fase jariakorra  $T_m$  baxuko lipidotan. Kasu horretan, temperatura altuek fase jariakorra bultzatzen dute, eta temperatura baxuek, berriz, gel fasea. Bi fase daudenean, fase bakoitzaren osaera lipidikoa ez da aldatzen<sup>47</sup>.

Glizerolipido biologikoek, oro har, oso  $T_m$  baxua izaten dute. Esaterako, glizerofosfolipido gehienak, hala nola PC *cis*-asegabeak, Ld fasean daude giro-tenperaturan (RT)<sup>19</sup>. Esfingolipidoak bezalako lipido aseak, ostera, So fasean daude<sup>21</sup>. Horrenbestez, zelula-mintzean fase-bereizketa gerta daitekeela iradoki da glizerolipido eta esfingolipido ugariko domeinuen artean (ziur aski fase jariakorraren eta gel fasearen artean, hurrenez hurren)<sup>47</sup>. Bitxia bada ere, kolesterola dagoenean, geruza bikoitzak Lo fasea har dezake (**1.4 irudia**). So fasean kolesterola gehitzeak paketamendua asaldatu eta lipidoen hidrokarburo kateen ordena murrizten du. Era berean, Ld fasean, kolesterolak erraztu egiten du hidrokarburo-kateen *trans* konformazioa<sup>45</sup>.

Ikerketa esperimentalen arabera, mintz eruedetan kolesterolak interakzio onuragarriagoa du SM-rekin PC-rekin baino<sup>48</sup>. PC-k duen kate *cis*-asegabearekin alderatuta<sup>28</sup>, SM-ren gantz-azido aseak eta esfingosinaren kate *trans*-asegabeak kolesterolarekin Van der Waals elkarreragin maximoa ezarri dezakete. Hala, mintzaren Ld fasearekin batera existitu daitezkeen Lo faseko SM/CHOL konplexu kondentsatuak eratzen dira<sup>49,50,51</sup>. Aipaturikoak *raft* nanodomeinu izenez ezagutzen dira<sup>52,51,53,54</sup>. Esterolen eta esfingolipidoen arteko lehentasunezko nahasketa aterki-efektuaren (ingelesez *umbrella effect*) ondorioz gertatzen da, esfingolipidoak esterola guztiz maskaritzen duelako<sup>55,56</sup>. Horrenbestez, kolesterolaren –OH taldeak esfingolipidoaren buru polarrarekin hidrogeno-lotura egonkortuko du. Alderdi estruktural hori garrantzitsua da, eskualde horietan zenbait proteina selektiboki sartzea edo baztertzea ahalbidetzen baitu, proteina-proteina eta lipido-proteina elkarrekintza erraztuz.

Azpimarratu behar da kolesterola *raft* delakoez gain<sup>53,57</sup>, mintz plasmaticoaren Ld fasean, PC moduko glizerofosfolipidoz aberastuta dagoena (% >50 mol<sup>28</sup>), ere agertzen dela<sup>58</sup>. PC-k, SM-k ez bezala, hidrogeno-loturen hartzaile gisa balio duten karbonilo-taldeak ditu, baina ez du SM-ren amino-taldea bezalako hidrogeno-loturako talde emailerik. Ondorioz, kolesterolaren eta PC-ren arteko lotura Van der Waals indar ahuletan eta hidrogeno-loturaren gaitasun mugatuan oinarritzen da.

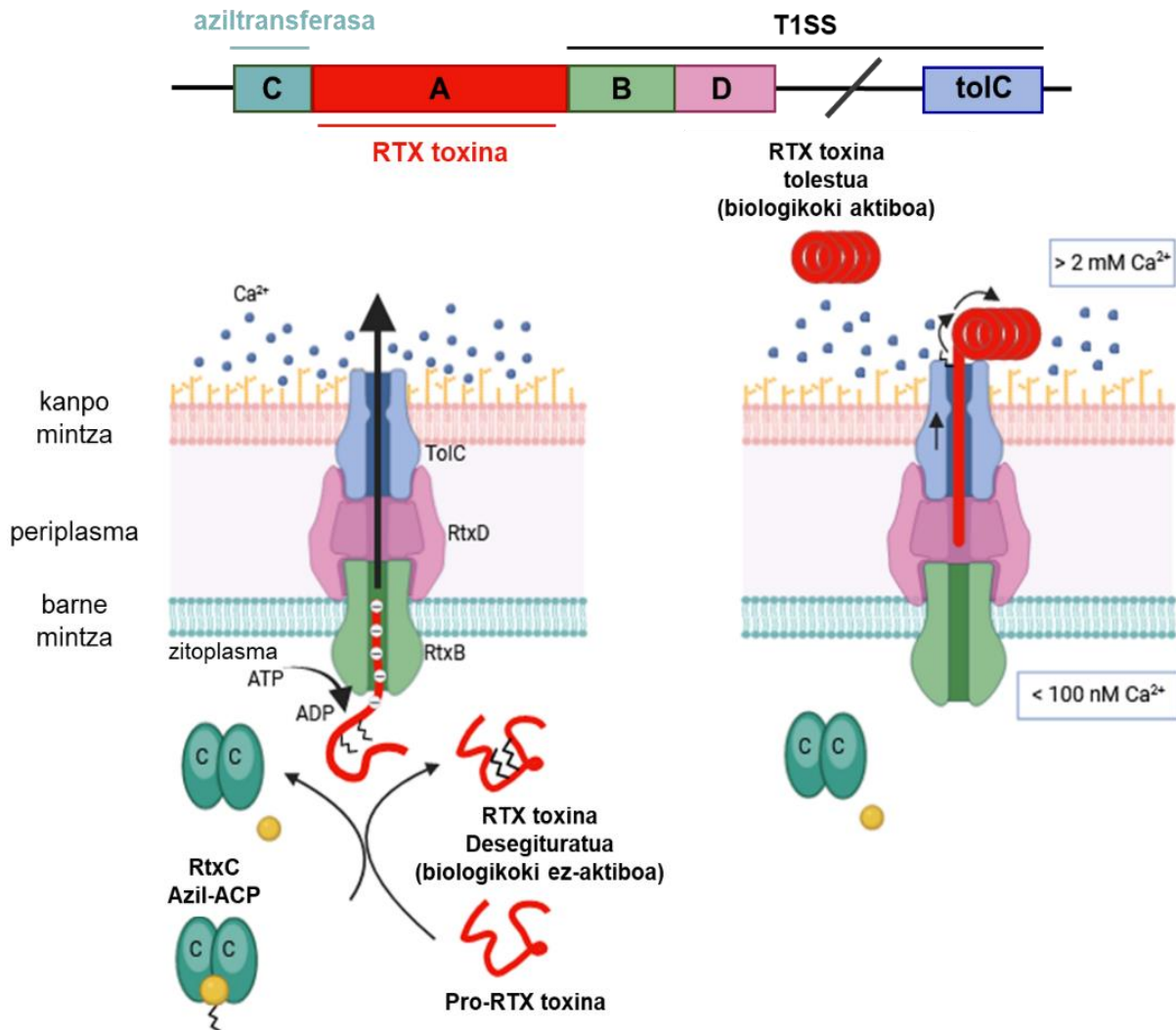
## 1. KAPITULUA: SARRERA

### 1.2. REPEAT-IN-TOXIN (RTX) PROTEINA FAMILIA

PFT-ak patogenizitateari lotutako era askotako exotoxinak dira<sup>6</sup>, eta mota guztietako organismo biziek jariatzen dituzte: bakterioek nahiz organismo handiagoek, besteak beste, landareek eta animaliek<sup>59</sup>. Proteina horiek zenbait itu-zelulatan “zulo” hidrofiliakoak sortzeko gaitasuna dute eta hala, solutuak (ura, ioiak edo beste biomolekula batzuk) igaro daitezke. Lan honetan, RTX (ingelesez *repeat-in-toxin*) familiari buruzko informazioa eguneratu dugu. Oso talde zabala da eta oraindik ezezaguna zentzu askotan<sup>60,61</sup>. Hemen, toxina horien eta mintzen arteko elkarreragina aztertu dugu eta haien jarduera zitotoxiko/zitolitikoak kolesterolarekiko duen menpekotasunean jarri dugu arreta.

RTX toxinak hainbat patogeno Gram-negatibok (*Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Kingella*, *Mannheimia*, *Moraxella*, *Morganella*, *Pasteurella*, *Proteus* eta *Vibrio*<sup>60,62</sup> generoek) jariatutako zitotoxina/zitolisina dira. Proteina handiak dira, ~100 eta 200 kDa arteko masa molekularrak dituzte (*Kingella kingae*-ren RtxA zitotoxina, 105 kDa; *Escherichia coli* uropatogenikoaren (UPEC)  $\alpha$ -hemolisina (HlyA), 110 kDa eta *Bordetella pertussis*-en adenilato ziklasa toxina (CyaA), 177 kDa) eta zisteina-hondarrik gabeko polipeptido-kate bakunak osatzen dituzte.

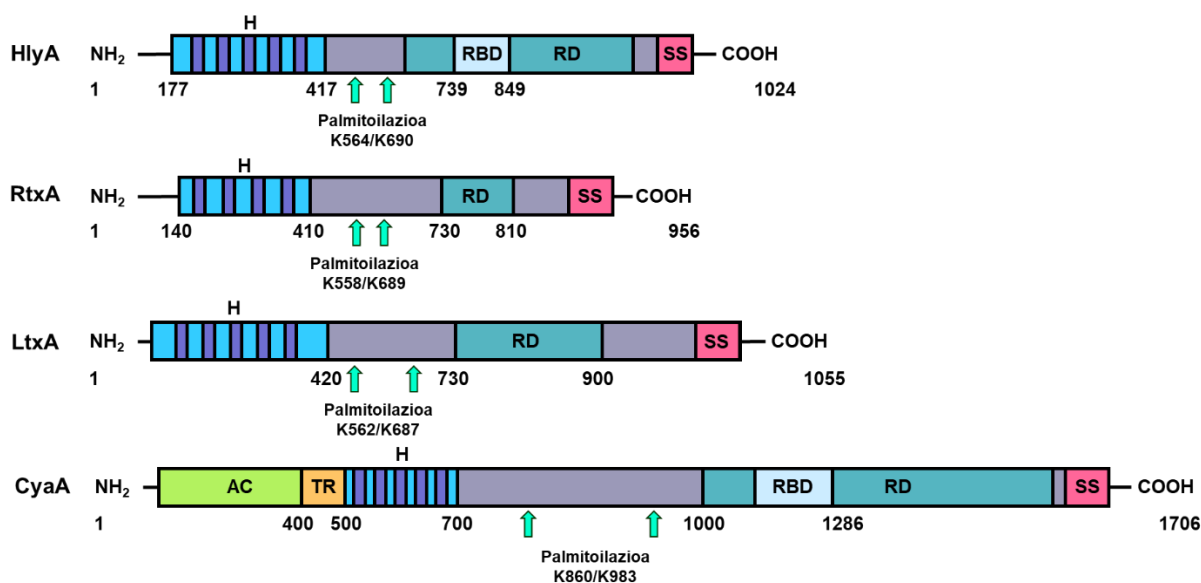
RTX toxinen sintesiaz, heltzeaz eta jariaketaz *rtxCABD* operoia arduratzen da<sup>60,61,63</sup>. A gene-produktua heldu gabeko protoxina bati (proRTX) dagokio eta bakterioaren zitosolean forma aktiboa hartzen du, kontserbatutako bi lisina-hondarrak itzulpen ostean azilatzen direnean. Gantz-azidoak C gene-produktuak kodetutako aziltransferasa espezifiko batek gehitzen ditu, proteina azilo garraiatzaileak (ingelesez *acyl carrier protein*, ACP) lagunduta<sup>64-69</sup>. Azilatutako RTX toxina heldua zuzenean garraiatzen da bakterioaren bi mintzak zeharkatuz, I motako jariatze-sistemaren (ingelesez *type I secretion system*, T1SS) bidez<sup>70</sup>. Sistema hori B eta D gene-produktuek eta bakterioaren kanpo-mintzean dagoen TolC-k osatzen dute<sup>71-75</sup> (**1.5 irudia**). Jariatzeko mekanismo orokor horren salbuespen txiki batzuk egon daitezke.



**1.5 irudia. RTX toxinen sintesia, itzulpen-osteko eraldaketa, jariaketa eta tolestea.** RtxB, RtxD eta TolC proteinez osatutako T1SS-ren itxurazko sinpletasuna gorabehera, makina hauek gai dira 800 kDa-tik gorako polipeptidoak jariatzeko, segundo gutxiren buruan. Etenik gabeko kanal estua ABC proteina-garraiatazaile batek osatzen du, proteina multimeriko bati konektatua dagoena, eta aldi berean, bakterioaren kanpo-mintzean dagoen proteina trimeriko bati lotzen zaiona. *rtx* operoia RTX proteinak kodetzen dituzten geneak eta gene laguntzaileak dauzka; gehienetan, operoi bakarraren barruan dauden 4 gene eta handik kanpo dagoen bosgarren gene bat. Operoia barruko geneak honako hauek lirateke: aziltransferasa kodetzen duen *rtxC* genea, itzulpen-osteko eraldaketa (ingelesez *post-translational modification*, PTM) bidez toxina aktibatzeaz arduratzen dena; toxina kodetzen duen *rtxA* genea; ABC garraiatazailea eta hura kanpo-mintzeko trimeroarekin lotzen duen proteina osagarria kodetzen duten *rtxB* eta *rtxD* geneak. Azkenik, bakterio-kromosomaren beste eskualde batean dagoen *tolC* geneak kanpo-geruzako jariatze-sistemaren azken osagaia kodetzen du<sup>62</sup>. ABC garraiatazaileak ATP hidrolisiaren bidez lortutako energia mekanikoa hornitzen du aldaketa konformazionalak egiteko, eta RTX blokeak jariatze-sisteman pixkanaka sartzea errazten du. Karga negatiboen mugimendu elektroforetikoa ere lagunduko luke bakterioaren barne-mintzeko potentzial negatiboaren bidez toxina jariatzen<sup>76</sup>. Kontserbatutako 50 bat hondarreko jariatze-seinale sekuentzia bat duten peptidoak baino ezin dira igaro T1SS-tik<sup>71</sup>. Biorender erabiliz marraztua.

## 1. KAPITULUA: SARRERA

RTX toxina bakoitzaren kate polipeptidiko heldua kontserbatutako lau eskualdez osatuta dago<sup>60-63</sup> (**1.6 irudia**). N-muturreko domeinu hidrofobikoa, zenbait TM helize putatibo dituen, garrantzitsua da RTX toxina zelula ostalariaren mintzean txertatu eta poroak eratzeko<sup>62,77-84</sup>. Domeinu hidrofobiko horren ondoan azilazio-eremua dago, luzera aldakorreko segmentu bat, kontserbatutako eta azilatutako lisina hondarrak dituen<sup>64-66</sup>. RTX toxina bakoitzaren C-muturreko zatian kaltzioa ( $\text{Ca}^{2+}$ ) lotzen da, horretarako tandemean errepikatutako 9-hondarreko motiboa erabiliz<sup>62,85</sup>. Horrexegatik, errepikapen domeinua (ingelesez *repeat domain*, RD) deritzo. Errepikapen horiek, hain zuzen, RTX proteina familiaren izen historikoaren arrazoia dira<sup>62</sup>. T1SS-k toxinen C-muturreko jariatze-seinale sekuentzia (ingelesez *secretion signal*, SS) ezagutuko du<sup>86-88</sup>. RTX motako toxinen antolaketa tipikoaren salbuespen bakarra *Bordetella CyaA* toxina da, non adenilato ziklasa (ingelesez *adenylate cyclase*, AC) domeinu katalitiko gehitzen baita eremu hidrofobikoaren N muturrean, translokazio-eskualde izeneko (ingelesez *translocation region*, TR) lotura eskualde espezifiko baten bidez<sup>60</sup>.



**1.6 irudia. Zenbait RTX toxinaren egiturak.** HlyA hemolisina, RTX familiaren prototipoa, UPEC birulentziaren kausa nagusia da<sup>89</sup>. RtxA zitotoxina *K. kingae*-k jariatzen du<sup>90</sup>. Patogeno inbasiboa da, eta sistema eskeletikoaren infekzioak, bakteriemia eta endokarditis infekziosoaren forma larriak eragiten ditu maiz. LtxA leukotoxina *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*<sup>91</sup> aho-patogenoak adierazten du. Adenilato ziklasa toxina (CyaA) *B. pertussis* kukutxeztularen bakterioak sortzen du<sup>92</sup>. RTX toxina gehienek arkitektura komuna dute: N-muturreko domeinu hidrofobikoa (H, urdin ilunez adierazitako segmentu helikoidalak dituen), errepikapen domeinua (RD, berde ilunean) eta C-muturreko jariatze-seinale sekuentzia (SS, gorria). Batzuek hartzaileari lotzeko eremu jakin bat dute (ingelesez *receptor binding domain*, RBD, urdin argia). Palmitoilazio tokiak (gezi turkesekin adierazita) deritzen barneko lisinei gantz-azidoak kobalentekei gehitzen zaizkie itzulpen ostean. Salbuespenak CyaA eta *Vibrio cholerae*-ren MARTX proteinak dira. Beste RTX toxina batzuek ez bezala, CyaA-k adenilato ziklasa domeinua (AC, berdea) eta translokazio-eskualdea (TR, laranja) ditu.

RTX toxinak, hasiera batean, protoxina inaktibo gisa adierazten dira eta itzulpen-osteko azilazioari esker heltzen dira<sup>60,65</sup>. Horretarako, 14-18 karbonoko gantz-azidoak gehitzen zaizkie domeinu hidrofobikoaren ostean kokatzen diren bi lisina hondarrei<sup>64-68</sup>. Gantz-azidoak, aseak, asegabeak eta hidroxilatuak izan daitezkeenak, kontserbatutako lisinen  $\epsilon$ -amino taldeei lotzen zaizkie lotura kobalenteen bidez<sup>65,68,93,94</sup>. RTX toxinek gantz-azido horiek behar dituzte zelula ostalarientzako zitotoxikoak izateko<sup>64,95</sup>, baina ez dago argi toxina horien ekintza-mekanismoan PTM-k zein paper jokatzeko duen. Bitxia bada ere, aktibazio hori ez da beharrezkoa RTX proteinak jariatzeko; izan ere, azilatu gabeko UPEC proHlyA eta HlyA, biak ala biak, oso modu eraginkorrean jariatzen dira<sup>96</sup>. Bi protoxina horiek bigeruzo lipidiko lauetan eratzen dituzten poroak askoz maiztasun txikiagoarekin sortzen dira; halere, toxina helduek sortutakoen antzeko propietateak dituzte<sup>97,98</sup>. Gainera, nahiko aktiboak dira liposoma biluziak iragazkor bihurtzeko<sup>99,100</sup>, honek iradokitzen du gantz-azidoak ez direla funtsezkoak toxina bigeruzo lipidikoan sartzeko. Alta, *B. pertussis* proCyaA-ren PTM erabakigarria da toxina tolestu eta bakterio-zelulatik kanpo egonkor mantentzeko<sup>101</sup>. Etorkizunean azilazioak beste RTX toxina batzuetan ere antzeko garrantzia izan dezakeela frogatu liteke.

Itzulpen-osteko aktibazioaz gain, jarduera biologikoa gauzatzeko, RTX toxinak zelulaz kanpoko ingurunean dauden  $\text{Ca}^{2+}$  ioien bidez aktibatu behar dira (**1.5 irudia**)<sup>76,102,103</sup>. Uste da bakterio-zitosolean errepikapen-domeinua desegituratuta dagoela<sup>104</sup> eta horri esker, toxina erraz pasa daitekeela T1SS makineriatik. Jariatutako toxinari  $\text{Ca}^{2+}$  gehitzen zaio errepikapen-domeinuko glizina eta aspartato ugariko nonapeptidoen errepikapenetan: G-G-X-G-X-D-X-U-X; X, edozein aminoazido izan daiteke, eta U, hondar hidrofobiko handi bat da (leuzina, isoleuzina, balina, fenilalanina edo tirozina)<sup>62,85</sup>. Hala, errepikapen-domeinuak  $\beta$ -bira tolesdura hartuko luke<sup>60-63,85,105,106</sup>, proteina tolestea eta konformazio funtzionala hartzea ahalbidetuz<sup>106-108</sup>.  $\text{Ca}^{2+}$ -ek eragindako konformazio-aldaketak funtsezkoak dira toxinak aktibatuzeko, eta beraz, RTX proteinek behar bezala jarduteko<sup>109</sup>.

Bakterio-barrutik askatutakoan, RTX toxinek, seguru asko, itu-zelularen mintzarekin elkarreaginean jardungo dute. Horren ondoren, domeinu poro-eragileko zenbait helize bigeruzo lipidikoan sartuko dira, poro hidrofobikoak sortuz<sup>78,83,84,110-112</sup>. Poro horiek eragindako kontrolik gabeko ioien fluxuak, itu-zelularen funtzioetan aldaketak eragiten ditu, eta azkenean, lisi zelularra<sup>60</sup>.

## 1. KAPITULUA: SARRERA

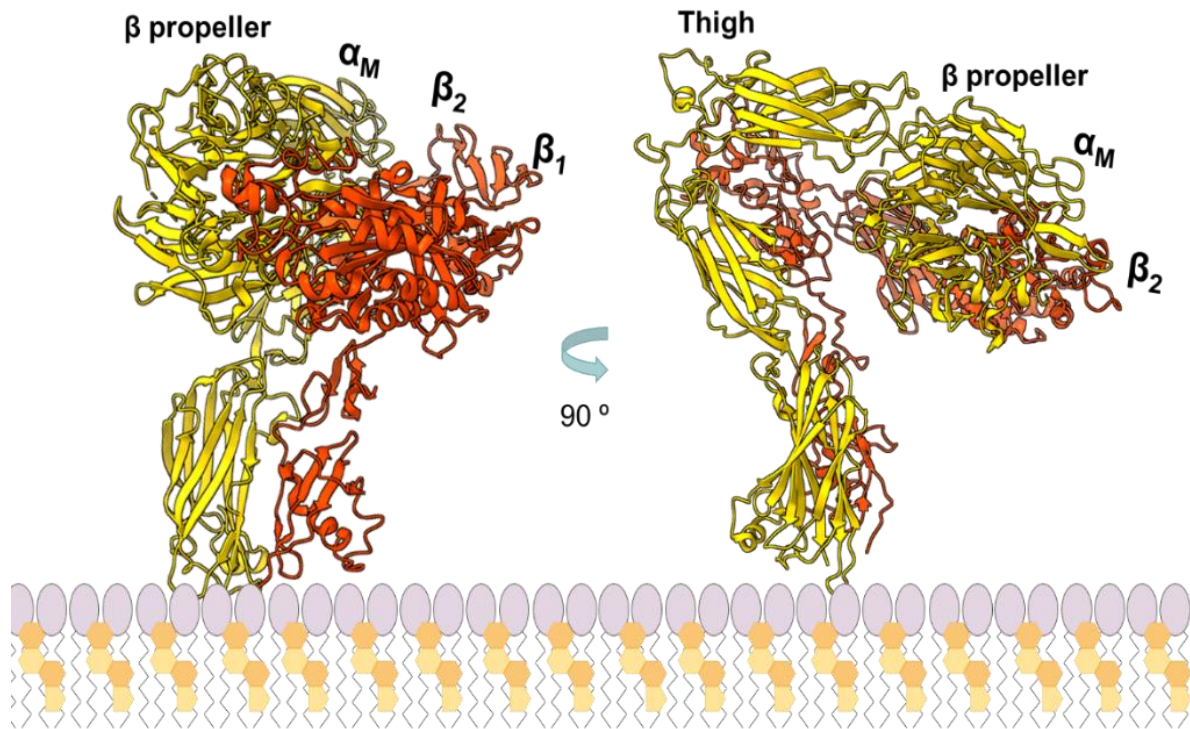
### 1.2.1. RTX toxinen eta mintzaren arteko elkarrekintzaren ezaugarriak

RTX toxinek itu-zelula desberdinekiko duten jarduera zitotoxiko erlatiboa aldakorra da<sup>53</sup>. Espezie- eta zelula-espezifikotasunean oinarrituta, historikoki bi taldetan banatu izan dira. Eritrozitoak lisatzeko gai diren hemolisinak hainbat espezieetatik isolatutako zelulentzat zitotoxikoak dira. Leukotoxinak, berriz, leukozitoetan adierazitako  $\beta_2$  integrina-hartzailearen bidez lotzen zaizkio itu-zelulari, eta beraz, espezie- eta zelula-espezifikotasuna dituzte<sup>60</sup>. Hala ere, txosten ugari erakutsi dutenez, ia edozein RTX toxina atxiki dakioke itu-zelularen mintzari proteina-hartzaile batekin afinitate handiko elkarrekintza ezarriz, baina baita proteina espezifikorik ez dagoenean ere<sup>60,113,114,115</sup>.

#### 1.2.1.1. Proteina-hartzaile espezifikoen bidezko lotura

RTX toxina batzuek leukozitoetan adierazitako  $\beta_2$  integrina familiako hainbat kide ezagutzen dituzte<sup>60,114,116</sup>. Esaterako, *A. actinomycetemcomitans* eta *Mannheimia haemolytica* direlakoek jariatutako LtxA<sup>117</sup> eta LktA<sup>118</sup> leukotoxinak, itu-zelulak adierazitako  $\alpha_1\beta_2$  integrinari (CD11a/CD18) batzen zaizkio<sup>115</sup>. Berrikiago, UPEC HlyA leukozitoen hartzaile berarekin elkartzen dela jakinarazi da<sup>116</sup>. *B. pertussis*-ek jariatutako CyaA toxina, aldiz, zelula mieloideekin elkartzen da  $\alpha_M\beta_2$  integrinaren bidez (CD11b/CD18)<sup>114</sup>. Horrez gain, *Actinobacillus pleuropneumoniae*-ren ApxIIIa toxina ere  $\beta_2$  integrinaren CD18 azpiunitatearekin lotzen da<sup>119</sup>. Proteina-hartzaile bati afinitate handiz lotzen direnez, toxina horiek kontzentrazio oso baxuetan eraginkorrak dira. Hala, itu-zeluletan efektu ez-litiko ugari eragiten dituzte: funtzio bakterizidak ekiditea, zitokina proinflamatorioen askatzea estimulatzea edo ezabatzea, seinaleztapen- eta proteolisi-kaskada batzuk modulatzeko, zelula-zikloaren geldialdia eragitea edota kaspasak aktibatzea, besteak beste<sup>120-127</sup>.

*B. pertussis* CyaA toxinarekin eta  $\alpha_M\beta_2$  hartzailearen arteko elkarrekintza sakonki aztertu da (**1.7 irudia**)<sup>128,129</sup>. Toxina horrek  $\alpha_M\beta_2$  integrina erabiltzen du zelula-hartzaile gisa makrofagoetan, neutrofiloetan, zelula dendritikoetan eta NK (ingelesez *natural killer*) zeluletan<sup>114</sup>. Berrikiago, eta mikroskopia elektroniko kriogenikoa (ingelesez *cryogenic electron microscopy*, cryo-EM) erabiliz,  $\alpha_M\beta_2$  integrinaren ektodomeinuari lotutako CyaA-ren zati bat (751–1488 hondarrak) ebatzi da 2.7 Å-ko bereizmenarekin (**1.14 irudia**)<sup>130</sup>. Egitura horrek erakutsi du CyaA-k interakzio ez-kanonikoa ezartzen duela  $\alpha_M$  azpiunitatearen buruarekin ( $\beta$ -helize eta thigh domeinuak) eta calf-2 domeinuarekin, kurbatutako  $\alpha_M\beta_2$  inaktiboarekiko espezifikoa dena.



**1.7 irudia.  $\alpha_M\beta_2$  integrina heterodimerikoaren ektodomeinua.** 2.7 Å-ko bereizmeneko egiturak  $\alpha_M$  azpiunitatea horiz erakusten du eta  $\beta_2$  azpiunitatea gorriz. Marrazkian zelula-mintza erakutsi da, fosfolipido-molekulak (purpura) eta kolesterol-molekulak (laranja) adieraziz. Goldsmith-ek eta kideek ebatzitako integrina-egituratik ateratako irudia (PDB ID: 7USL)<sup>130</sup>. ChimeraX erabili da irudikatzeke<sup>131</sup>.

Era berean, CyaA-k  $\alpha_M$  katigatzen du kaltzioa lotzeko domeinuko I-II eta II-III blokeak elkartzen dituzten L1 eta L2 lotura-eskualdeak erabiliz. Toxina integrinari batzean RTX domeinuko K860<sup>97</sup> eta K983<sup>95</sup> palmitoilazio-tokiak itu-zelularen mintzaren planoan kokatzen dira, lisinen albo kateak mintzerantz begira daudelarik. Horrek esan nahi du RTX toxinen azilazioak itu-mintzean zuzenean txertatzearekin zerikusia izan dezakeela. Deigarria da ikerketa honetan azilatu gabeko RTX domeinuaren zati bat erabili zela integrinari lotzeko<sup>130</sup>. Aitzitik, beste ikerketa batean frogatu zen azilazioa beharrezkoa zela toxinak CD11b adierazten zuten zelulekin elkarreagin produktibo eta estua izateko<sup>128</sup>. Gainera, jakina da gantz-azidoek domeinu hidrofobikoko eta azilazio-domeinuko segmentu apolarren egonkortzea eragiten dutela; beraz, CyaA-ren azilazioa funtsezkoa da proteinak konformazio aktiboa har dezan<sup>101</sup>.

A. *actinomycescomitans*-en LtxA toxinari dagokionez, Gainazaleko plasmoi erresonantzia (ingelesez *surface plasmon resonance*, SPR) bidez erakutsi zuten toxinak afinitate handia zuela CD11a eta CD18 azpiunitateen eremu zitosolikoekin; aldiz, CD11b eta CD11c azpiunitateen eremu zitoplasmaticoekin afinitatea nabarmen txikiagoa izan zen<sup>132</sup>. Berrikiago, U-937 zelula-liburutegi mutante batean egindako genoma osoko alboratu-gabeko hautapen positibo



## 1. KAPITULUA: SARRERA

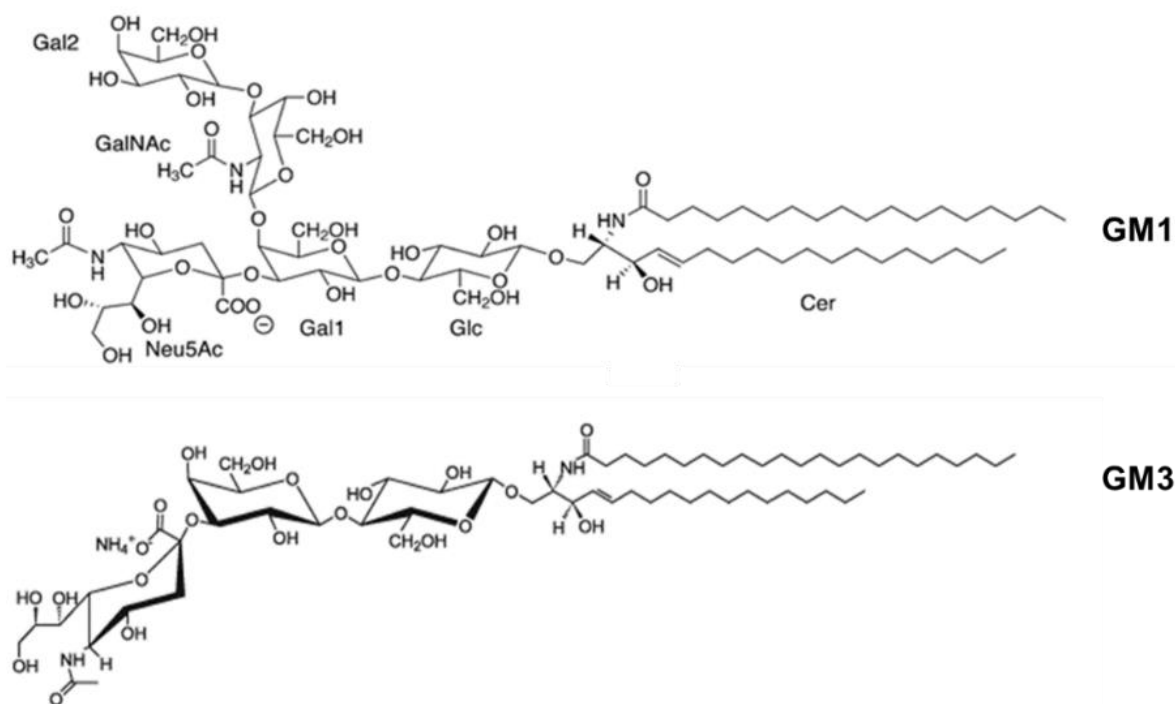
batek erakutsi zuen CD18 azpiunitatea bera beharrezkoa eta nahikoa dela UPEC HlyA-ren jarduera zitotoxikorako, eta lau alfa azpiunitateak, berriz, ez direla inola ere beharrezkoak<sup>133</sup>. Ikerketa lan berean frogatu zuten *A. actinomycetemcomitans*-en LtxA  $\beta_2$  integrinaren  $\beta$  azpiunitatearekin elkartzen dela. Puntu interesgarri bat da, *B. pertussis*-en CyaA-k ez bezala<sup>130</sup> beste RTX toxinen lotura-eremuek ez dutela blokeen arteko lotura eskualderik. Horri dagokionez, berriki ikusi da UPEC HlyA-ren RTX domeinua *B. pertussis*-en CyaA-ren RTX domeinuarekin trukatzek toxinen espezifikotasuna aldatzen duela, eta ondorioz,  $\alpha_L\beta_2$  hartzaileari lotzen zaiola  $\alpha_M\beta_2$  hartzaileari ordez<sup>134</sup>.

### 1.2.1.2. Proteina-hartzaile espezifikorik gabeko lotura

$\beta_2$  integrinarekin ezarritako afinitate handiko elkarrekintza espezifikoari esker, leukozitoak RTX toxinen itu-zelularik probableenak dira. Hala ere, dosi handiagoetan RTX toxina gehienak zitotoxikoak dira  $\beta_2$  integrinarik gabeko zeluletan ere. Horietako batzuk (HlyA, CyaA eta LtxA) proteinarik gabeko liposomekin eta lipido-bigeruza lauekin elkarreragiteko gai dira<sup>135-138</sup>. Horrez gain, zenbait RTX toxina fosfolipidoz soilik osotutako liposomei lotu eta horiek iragazkor bihurtzeko gai ere badira<sup>139-141</sup>.

Giza leukozitoak 100 aldiz sentikorrangoak dira UPEC HlyA-rekiko, maskuri- edo giltzurrun-zelula epitelialak baino<sup>133</sup>. Hala ere, kontzentrazio altuagoetan HlyA zitotoxikoa da giltzurrun-zelula horientzat, baita beste ostalari- eta zelula- mota askorentzat ere (eritrozito, granulozito, monozito, endotelio-zelula edo arratoi, hausnarkari eta primateen giltzurrun-zelula epitelialentzat)<sup>142-148</sup>. Era berean, kontzentrazio handietan *A. actinomycetemcomitans*-en LtxA eta *M. haemolytica*-ren LktA toxinen jarduera hemolitikoa ere hauteman daiteke eritrozitoetan<sup>113,149</sup>. Bestalde, *B. pertussis*-en CyaA kantitate handiek zelula epitelialak, fibroblastoak eta eritrozitoak intoxikatu ditzakete<sup>60</sup>; *K. kingae*-ren RtxA, berriz, zitotoxikoa da zelula sinobial, hezurretako osteosarkoma, arnas zelula epitelial eta ardien eritrozitoetarako<sup>150,151</sup>. Horrek guztiak iradokitzen du, beraz, RTX toxinek zelula-hartzailearekiko modu independentean ere jardun dezaketela zelula-mintzean. UPEC HlyA-ren eta bigeruza lipidikoaren arteko elkarreragina bi urratsetan gertatzen dela dirudi. Hasteko, indar elektrostatiokoekiko sentikorra den adsortzio-urrats itzulgarri bat dago, eta ondoren, mintzean txertatzeko urrats itzulezin bat<sup>152,153</sup>. RTX toxinen adsortzioa toxinekiko sentikorrak diren zeluletan nahiz toxinekiko erresistenteak diren zenbait zelulatan hauteman daiteke<sup>154</sup>. HlyA-ren errepikapen domeinu isolatuarekin egindako azterketek erakutsi dutenez, proteina mintzean adsorbatzen da mintz-interakzioaren lehen etapetan<sup>155</sup>.

Zenbait RTX toxinen kasuan, zelula-mintzarekin lotzeko toxinek glikosilatutako lipido edo proteinetan dauden glikanoekin elkarrekintzak ezartzen dituzte. Adibidez, *A. actinomycetemcomitans*-en LtxA eritrozitoekin lotzeko, zelula ostalarian dagoen osagaien batekin afinitate txikiko elkarrekintza bat zegoela deskribatu zen<sup>113</sup>. Garrantzitsua da nabarmentzea gangliosidoek eritrozitoetan hartzaile funtzional gisa jarduten dutela, baina ez leukozitoetan edo beste zelula batzuetan<sup>156</sup> (**1.8 irudia**). Gainera, iradoki zen azido sialiko hondarrak<sup>157</sup>, zelulen gainazaleko glikoproteina, glikolipido eta gangliosidoen parte direnak, gangliosidoen beharrezko osagaiak direla toxinak induzitutako zelula-lisirako<sup>156</sup>, berdin dio horiek  $\beta_2$  integrinei edo beste egitura batzuei lotuta egon<sup>158</sup>. Esaterako,  $\beta_2$  integrinarik gabeko zeluletan azido sialiko hondarrek LtxA-rentzat oso espezifikoak ez diren lotura-gune gisa jardun dezakete<sup>159</sup>.  $\beta_2$  integrina adierazten duten globulu zurien kasuan, pentsa daiteke integrina-molekulei lotutako sakarido batzuk garrantzitsuak izan daitezkeela LtxA-rekiko elkarrekintzan.



**1.8 irudia. Gangliosidoen adibide batzuk.** Azido sialiko (azido N-azetilneuraminikoa, Neu5Ac) bakarria duten GM1 (PubChem CID 20057297) eta GM3 (PubChem CID 9812294) gangliosidoen egitura kimikoaren adierazpen eskematikoa.

Hasierako zenbait txostenek ere adierazi zuten *B. pertussis*-en CyaA eta mintz zelularren arteko elkarrekintzan gangliosidoek parte hartzen zutela, baita integrina adierazten duten zeluletan ere<sup>159,160,161</sup>. Adibidez, frogatu zen GM1-ekin lotzen den kolera toxinen B azpiunitatea (ingelesez *cholera toxin subunit B*, CTB) CyaA-rekin lehiatzen dela GM1-en

## 1. KAPITULUA: SARRERA

lotura gune berdinari batzeko<sup>161</sup>. Bestalde, CyaA-ren batura jaitsi egin zen  $\alpha_M\beta_2$  adierazten duten hainbat zelulei muturreko azido sialiko hondarrak eta zelula-gainazaleko beste glikoproteina batzuk neuraminidasaz ezabatu zitzaizkienean<sup>159</sup>. CyaA lotura ia guztiz deuseztatu zen gainazaleko glikoproteinen N-motako oligosakaridoak kendu zirenean edota proteina sintetizatu berrien N-glikosilazioa oztopatu zenean<sup>159,162</sup>. Hala, autoreek ondorioztatu zuten  $\alpha_M\beta_2$  integrinaren N-glikosilazioa funtsezkoa dela CyaA-k integrina-hartzailea ezagutzeko eta haren ondorengo jarduera zitotoxikoetarako. Beraz, CyaA-k selektiboki hauteman ditzake integrinari loturiko oligosakaridoen N-motako azukre-hondarrak<sup>159</sup>. Bitxia bada ere, duela gutxi cryo-EM bidez ebatzi den konplexu tertziarioaren mapan (Fab M1F5-RTX751- $\alpha_M\beta_2$  ektodomeinua) ondo ebatzitako N-motako glikano ligatua agertzen da  $\alpha_M$  calf-2 domeinuko N1.059 posizioan. Glikanoaren erdiguneko fukosa hondarra RTX751 zatiko L1124 eta F1125 hondarren artean paketatuturik dago<sup>130</sup>. Lehenago frogatu zuten asparagina hondarrak bakarka glutaminaz ordezkaturik, CD11b azpiunitatearen 469, 692, 801, 900, 978, 1021 eta 1075 posizioetan, CyaA-ren lotura murrizten zutela. Gainera, CyaA-k eragindako itu zelula barneko adenosina monofosfato ziklikoaren (cAMP) ekoizpena murriztu egin zen integrina mutanteak adierazten zituzten zeluletan, CD11b azpiunitateko 469, 801, 978 eta 1075 posizioetan ordezkapenak egindakoan. Ebatzitako egiturak, ordea, ez du adierazten aipaturiko asparagina hondar horiekin elkarrekintzarik dagoenik eta horrek iradokitzen du glukano horiek ez liratekeela guztiz beharrezkoak izango CyaA  $\alpha_M\beta_2$  integrinarekin lotzeko.

Berriki argitaratutako lan baten arabera, *K. kingae*-ren RtxA toxinak zelula ostalariari lotzeko gainazalean dauden oligosakaridoak behar ditu (azido sialiko hondarrak eta zelula-gainazaleko glikoproteinen beste sakarido-unitate batzuk)<sup>163</sup>. Emaitza horien guztien ondorioz, hainbat autorek planteatu dute zenbait zelulatan RTX zitotoxinen hasierako lotura asegabea glikosilatutako osagaien bidez gerta daitekeela, hala nola glikoproteinak eta gangliosidoak erabiliz.

### 1.2.2. Kolesterolaren beharra RTX toxinen jarduera zitolitiko/zitotoxikorako

Mintzeko kolesterola hainbat RTX toxinen ekintza-mekanismorako funtsezkoa dela frogatu izan da<sup>135,138,150,164,165</sup>. Toxinen hartzaile espezifikoa den  $\beta_2$  integrina adierazten duten itu-zeluletan ere, toxina horiek kolesterolarekiko mendekotasuna erakutsi dute.

Esate baterako, *A. actinomycetemcomitans* LtxA-ren kasuan, zelula ostalariaren mintzetik kolesterola kentzeak nabarmen inhibitzen du toxinak Jurkat (Jn.9) eta THP-1 zelulak (monozito eta T linfozito zelula-lerroak, hurrenez hurren) hiltzeko duen gaitasuna<sup>166,167</sup>. Alta, mintz

plasmatikoa berriz kolesterolez bete ondoren, LtxA immunitate-zelula horiek kutsatzeko gai da<sup>107</sup>.

Era berean, J774A.1 makrofagoen mintz plasmatikoko kolesterol-edukia gutxitzeak nabarmen jaitsi zuen *B. pertussis* CyaA-ren translokazio ahalmena<sup>165</sup>. Askoz lehenago, liposoma barneko edukiaren askapena neurtuz, beste talde batek jakinarazi zuen kolesterolak nabarmen handitzen duela CyaA-k eragindako lisi zelularra, menpekotasuna dosiaren arabera izanik<sup>135</sup>. Berrikiago, gure taldeak azaldu zuen eritrozitoak kolesterol oxidasarekin tratatzeak nabarmen murrizten duela CyaA-k eragindako hemolisia, eta 1,2-Dioleoil-sn-glizero-3-fosfokolina (DOPC) puruz osatutako liposometan kolesterola gehitzeak handitu egiten duela CyaA-ren ahalmen litikoa<sup>168</sup>.

Mintzeko kolesterola kendu zaien eritrozitoak ere ez dira hain sentikorak UPEC HlyAren jardura hemolitikoarekiko<sup>169</sup>. Horrez gain, fosfolipido-bigeruzetan kolesterola gehitzeak toxina mintzean modu itzulezinean sartzea eragiten zuela eta horrek haren jardura litikoa areagotzen zuela frogatu zuten<sup>164</sup>.

Azkenik, kolesterola *K. kingae* RtxA-ren jardura zitotoxikorako ere garrantzitsua da<sup>150</sup>. Hortaz, baliteke RTX familiako toxinek kolesterola behar izatea mintzetan jardura egokia izan dezaten.

### 1.2.2.1. RTX toxinen eta mintzeko kolesterolaren arteko lotura

Proteinen eta kolesterolaren arteko elkarreraginen karakterizazioa zaila da, kolesterolak proteinen funtzioak modulatu dituelako zuzeneko loturaren bidez (i.e. espezifiko) edota zeharka (i.e. ez-espezifiko) mintzaren jariakortasuna aldatuz<sup>28-33</sup>.

Gero eta argitalpen gehiagok adierazi dute mintzeko kolesterola funtsezkoa dela zenbait RTX toxinen ekintza-mekanismoarako eta toxina horiek zuzenean elkarreragiten dutela kolesterolarekin<sup>138,150,164,166-168,170</sup>. Besteak beste, UPEC HlyA-k interakzio zuzena du kolesterolarekin, baina ez SM-rekin<sup>164</sup>. Era berean, *A. actinomycetemcomitans*-en LtxA toxinak ere kolesterola duten mintzekiko duen afinitatea, kolesterolik gabeko mintzekiko duena baino lau magnitude-ordena handiagoa da<sup>138</sup>. *K. kingae*-ren RtxA zitotoxinak kolesterolarekin espezifiki bat egiten duela ere iradoki zuten; izan ere, toxina kolesterolarekin aurreinkubatzeak nabarmen murriztu zuen toxinen eritrozitoak lisatzeko ahalmena<sup>150</sup>. Gainera, toxina honek geruza bakarreko besikula erraldoietara (ingelesez *giant unilamellar vesicles*, GUV) batzeko afinitate handia zuela ere hauteman zen, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glizero-3-fosfokolina (POPC) eta kolesterola (POPC:CHOL, 3:1 erlazio molarra)

## 1. KAPITULUA: SARRERA

erabiliz. Aldiz, POPC puruz osatutako GUV-ekiko lotura ahula izan zen. Azkenik, egileek erakutsi zuten toxina gai dela kolesterolarekin elkarreraginean aritzeko, mintzaren beste osagai batzuk edozein direla ere<sup>150</sup>.

RTX toxinek kolesterolarekin duten interakzio zuzenari dagokionez, bi gauza nabarmendu behar dira. Lehenik eta behin, orekako disoziazio-konstantearen ( $K_D$ ) balioak, batez ere SPR bidez zehaztu direnak, oso aldakorrek dira, magnitude-ordena  $10^{-5}$  M-tik  $10^{-12}$  M-ra aldatzen baita (**1.1 Taula**). Bigarren puntua da kolesterolarekin lotzeko zehaztutako oreka-konstanteen ( $K_d$ ) balioak txikiagoak direla (beraz, afinitate handiagoa) toxinek  $\beta_2$  integrina-hartzaile espezifikoa lotzeko zehaztutako  $K_d$  balioak baino.

*A. actinomycetemcomitans* LtxA-rentzat, eta SPR erabiliz, afinitate maximoa % 40 kolesterola zuten mintzekin lortu zen ( $K_D \sim 10^{-12}$  M); kolesterolik gabeko mintzekin alderatuz ( $K_D \sim 10^{-8}$  M) afinitatea lau magnitude-ordena baino handiagoa izan zen<sup>138</sup>. Titulazio isotermikoko kalorimetria (ingelesez *isothermal titration calorimetry*, ITC) erabiliz, talde berak LtxA eta POPC-ren arteko interakzioaren  $K_D$  balioa zehaztu zuen ( $8,75 \times 10^{-4}$  M). LtxA eta POPC/CHOL arteko interakziorako  $K_D$  balioa, berriz,  $2,31 \times 10^{-10}$  M izan zen, 6 magnitude-ordena faboragarriagoa zena. Konparazioz, SPR bidez zehaztutako LtxA eta  $\alpha_L$  eta  $\beta_2$  integrina-kateen eremu zitoplasmatikoen arteko  $K_d$  balioak, hauek izan ziren, hurrenez hurren:  $1,50 \times 10^{-8}$  M eta  $4,20 \times 10^{-9}$  M, eta beste integrina batzuen ( $\alpha_M$ ,  $\alpha_X$  eta  $\beta_3$  azpiunitateen) eremu zitoplasmatikoetarako,  $4,00 \times 10^{-7}$ ,  $1,80 \times 10^{-7}$  eta  $2,30 \times 10^{-7}$  M, hurrenez hurren<sup>171</sup>.

*K. kingae*-ren RtxA toxina eta POPC mintzen arteko  $K_D$ -a  $1,5 \times 10^{-9}$  M ingurukoa izan zen, eta kolesterola duten mintzekikoa (POPC/CHOL 3:1, erlazio molarra)  $1,71 \times 10^{-10}$  M<sup>150</sup>.

UPEC HlyAren kasuan,  $1,6 \times 10^{-5}$  M-ko  $K_D$  balioa zehaztu zen DOPC/CHOL (4:1 erlazio molarra) liposomekin elkarrekintzan aritzeko. Konparazioz, talde berak HlyA-glikoforina elkarrekintzak afinitate handiagoa ( $K_D = 6,1 \times 10^{-7}$  M) zuela zehaztu zuen HlyA-kolesterol interakzioak baino<sup>164</sup>. Glikoforina HlyA-ren afinitate handiko lotura-bikotea da eritrozitoetan<sup>172</sup>.

**1.1 taula. Zenbait RTX toxinek kolesterolarekiko duten afinitatea ( $K_D$ , M).**

RTX TOXINA	LIPIDO KONPOSIZIOA	$K_D$ (M)	NEURKETA METODOA	ERREFERENTZIA
<i>A. actinomycetemcomitans</i> LtxA	POPC/CHOL (3:2 erl. molarra)	$1,00 \times 10^{-12}$	SPR	Brown eta kideak <sup>138</sup>
	POPC/CHOL (3:2 erl. molarra)	$2,31 \times 10^{-10}$	ITC	Koufos eta kideak <sup>171</sup>
<i>K. kingae</i> RtxA	POPC/CHOL (3:1 erl. molarra)	$1,71 \times 10^{-10}$	SPR	Osickova eta kideak <sup>150</sup>
UPEC HlyA	DOPC/CHOL (4:1 erl. molarra)	$1,60 \times 10^{-5}$	SPR	Vazquez eta kideak <sup>164</sup>

### 1.2.2.2. CRAC/CARC motiboak RTX toxinen eta mintzeko kolesterolaren arteko elkarrekintzaren determinatzaile molekular posible gisa

Proteinen eta kolesterolaren arteko elkarreragina karakterizatzea zaila bada, interakzio horren determinatzaile molekular zehatzak deszifratzea are zailagoa da. Kolesterola ezagutzeko motiboek molekula-mailan zenbait RTX toxinen eta kolesterolaren arteko elkarrekintza zehaztu dezaketela adierazten duten ebidentziak daude<sup>138,150,164</sup>.

Mintzeko kolesterolari zuzenean lotzen zaizkion PFT-en kasuan, lotura egiteko erabil daitezkeen lipidoaren atomoak –OH taldera mugatzen dira, eta Ld fasean baino ezin dira erabili. Lo fasean, aterki-efektuaren ondorioz<sup>173,174</sup> esfingolipidoen talde polarrek erabat maskaritzen dute kolesterola. Beraz, probabilitate gutxi dago *raft*-ei elkartutako kolesterolaren –OH taldea proteina baten TM domeinuarekin edo zelulaz kanpoko proteina batekin lotzeko<sup>32,50</sup>. Esfingolipidoek, normalean, kolesterolaren  $\alpha$  aurpegiarekin elkarreragiten dute, eta  $\beta$  aurpegia erabilgarri uzten dute TM domeinuetarako. Aitzitik, PC/CHOL konplexuetan, kolesterolaren  $\alpha$  eta  $\beta$  aurpegiak erabilgarri daude TM domeinuekin elkarrekintzan aritzeko<sup>175</sup>. Gainera, kolesterolaren –OH taldea ez dago konplexuan murgilduta eta beraz, TM domeinuekin hidrogeno-loturak eratzeko erabil daiteke.

Mintzeko kolesterolarekin interakzio zuzena duten hainbat egitura proteiko dokumentatu dira, bai mintzeko proteina integraletan<sup>176</sup>, zein kolesterolarekin elkarreragiten duten hainbat bakterio-toxina<sup>177–179</sup> eta birus-proteinatan<sup>180–184</sup>. Bakterio- eta birus-proteinek kolesterolarekin elkarreragin zuzena izateak iradoki dezake motibo horiek zelula eukariotoen mintzak errekonozitzeko eboluzionatu izana.

Kolesterolari lotzen zaizkion motiboen artean CRAC, kolesterolaren ezagutzarako/interakziorako aminoazido-adostasuna, deritzona eta alderantzizko CARC motiboa dira sakonean aztertu direnak<sup>33,185,186</sup> (**1.9 irudia**). CRAC motiboa 5–13

## 1. KAPITULUA: SARRERA

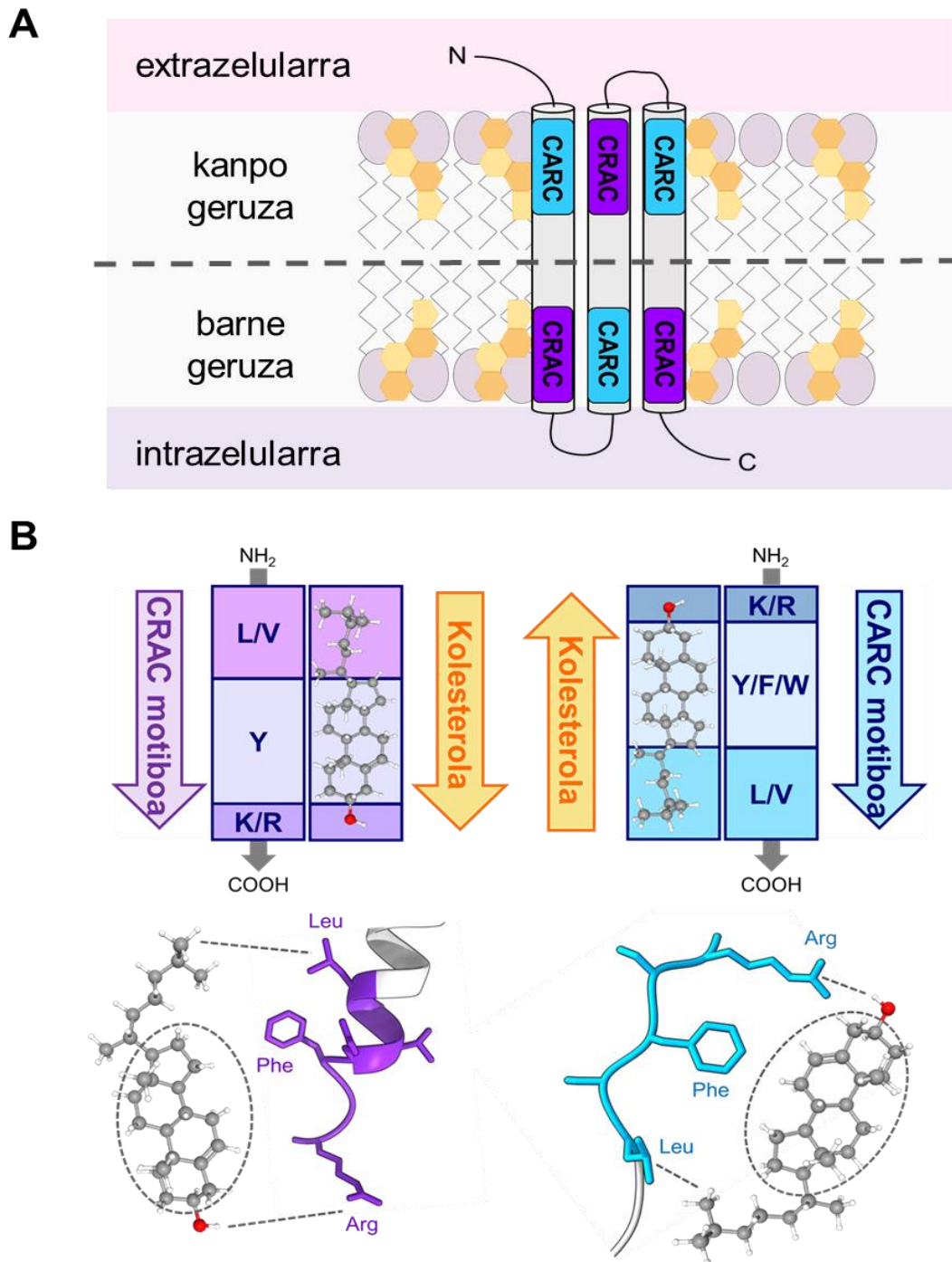
aminoazidoko segmentu lineal labur bat da, normalean TM helizeen amaieran egoten dena, eta oso arau biokimiko sinpleak betetzen dituena kolesterolarekin lotzeko. Honako algoritmo honen bidez definitzen da N-muturretik C-muturrera: leuzina edo balina hondar apolar adarkatua, ondoren, edozein 1–5 hondar dituen segmentu bat, **tirosina** hondar aromatikoa; jarraian, beste segmentu bat edozein 1–5 hondar dituen, eta azkenik, lisina edo arginina basiko bat ((L/V)-X<sub>1-5</sub>-(Y)-X<sub>1-5</sub>-(R/K))<sup>185</sup>. CARC motiboa, berriz, (R/K)-X<sub>1-5</sub>-(Y/F/W)-X<sub>1-5</sub>-(L/V)<sup>33</sup> patroiarri dagokio. CRAC motiboek ez bezala, CARC motiboek **tirosina, fenilalanina** edo **triptofanoa** onar ditzakete motiboen erdigunean<sup>187</sup> eta lisina edo arginina hondar polarrak N-muturrean kokatzen dira. Hala ere, bi motiboek antzeko antolamendua dute, eta beraz, CRAC-kolesterola elkarrekintzei aplikatzen zaizkien arau biokimikoak CARC guneentzat ere aplikatzen dira<sup>32,188–190</sup>.

Azken hamar urteetan, gero eta CRAC/CARC motibo gehiago identifikatu dira hainbat RTX toxinen egitura primarioan<sup>138,150,164,191</sup>. Lehenbizi, *A. actinomycetemcomitans* LtxA toxinen aminoazido sekuentziaren azterketak bi CRAC motibo identifikatu zituen<sup>138</sup>. Bata CRAC<sup>336</sup> gunea (<sup>333</sup>LEEYSKR<sup>339</sup>), domeinu poro-eragilean kokatzen da eta RTX toxinetan kontserbatuta dago, *B. pertussis*-en CyaA toxinan izan ezik; bestea, CRAC<sup>503</sup> gunea (<sup>501</sup>VDYLK<sup>505</sup>), domeinu hidrofobikotik gora kokatzen da eta LtxA-n bakarrik identifikatu da<sup>138</sup>. Bilaketa-algoritmoan CARC guneak ere sartzen badira, CRAC<sup>336</sup> motiboaren ostean dagoen CARC<sup>346</sup> gunea (<sup>340</sup>RFKFGYNGDSL<sup>351</sup>) ere aurreikus daiteke.

2014an, kolesterolari lotzeko 20 motibo (zazpi CRAC eta hamahiru CARC) identifikatu ziren UPEC HlyAren sekuentzia osoan. Horietatik, lau CRAC eta hiru CARC motibo HlyA-ren domeinu poro-eragilean daude<sup>164</sup>.

*K. kingae*-ren RtxA toxinen kasuan, kolesterolari lotzeko bost leku potentzial identifikatu ziren domeinu poro-eragilean edo haren ondoan (140–410 hondarrak)<sup>150</sup>. Horietako bi, CRAC<sup>54</sup> (<sup>48</sup>LTIPKDYEK<sup>58</sup>) eta CRAC<sup>352</sup> (<sup>349</sup>LAEYQR<sup>354</sup>) guneak dira, eta hiru CARC<sup>285</sup> (<sup>280</sup>KAISSYVL<sup>287</sup>), CARC<sup>343</sup> (<sup>340</sup>KFGYDGDLS<sup>348</sup>) eta CARC<sup>448</sup> (<sup>444</sup>RHAHYLERNL<sup>453</sup>).

2017an, bost CRAC motibo iragarri ziren *B. pertussis*-en CyaA toxinen domeinu poro-eragilean: CRAC<sup>632</sup> (<sup>627</sup>VQQSHYADQLDK<sup>638</sup>), CRAC<sup>658</sup> (LAQLYRDK), CRAC<sup>725</sup> (<sup>721</sup>LANDYARK<sup>728</sup>) eta CRAC<sup>738</sup> (<sup>732</sup>LGGPQAYFEK<sup>741</sup>) motiboak<sup>170</sup>.



**1.9 irudia. Kolesterolaren ezagutzarako/interakziorako aminoazido-adostasun motiboak.** (A) CRAC/CARC motiboen ispilu-topologia, hainbat TM domeinu ageri dira proteina beraren barruan. Lerro etenek mintzaren barnealdea eta kanpoaldea bereizten dituzte. Kolesterola garraiatzen duten proteina askok CRAC (L/V)-X<sub>1-5</sub>-(Y)-X<sub>1-5</sub>-(K/R) edo CARC (R/K)-X<sub>1-5</sub>-(Y/F/W)-X<sub>1-5</sub>-(L/V) motiboren bat dute mintzaren aldameneko eskualdean. (B) Kolesterol-molekularen eta CRAC/CARC motiboen aminoazido partikularren arteko elkarrekintzaren ilustrazio eskematikoa. CRAC/CHOL konplexuak buru-buru/isats-isats geometria paraleloa dauka<sup>190,192</sup>. N-muturreko leuzina edo balina hondar apolar adarkatuak isooktilo-kateari lotzen zaizkio Van der Waals interakzioen (Londonen indarrak) bidez; nahitaezko hondar aromatikoa (tirosina, fenilalanina edo triptofanoa) lau esterano eraztunetako batean pilatzen da (CH- $\pi$  pilaketa); eta C-muturreko lisina edo argina hondar polarrek kolesterolaren -OH taldearekin hidrogeno zubiak eratzen dituzte. Hondar aromatikoa gai dira kolesterolaren  $\alpha$  aurpegi leunean pilatzeko edo  $\beta$  aurpegi zimurtsutik ateratzen diren punta alifatikoen artean tartekatze. Haien kokapena X<sub>1-5</sub> lokailuen luzerak zehazten du<sup>190,192</sup>. Fantini eta kideengandik moldatua<sup>190</sup>.



## 1. KAPITULUA: SARRERA

Bi ebidentzia-lerro erabili dira nagusiki CRAC/CARC segmentuek funtzioarekin duten erlazioa frogatzeko. Batetik, motibo potentzial bat mutatzeko eta horrek proteinaren funtzioa eta/edo kolesterolarekin duen interakzioa aldatzen duen zehaztea. Estrategia alternatibo bat dagokion CRAC/CARC motiboa daukan peptido sintetiko bat erabiltzea da eta peptidoak kolesterolarekin elkarreraginean aritzeko gaitasunik ba ote duen aztertzea.

Adibidez, *A. actinomycetemcomitans*-en LtxA proteina osoaren CRAC mutanteak erabiliz (LtxA-Y336P eta LtxA-Y503P), Brownek eta kideek frogatu zuten identifikatutako bi CRAC motiboetatik CRAC<sup>336</sup> gunea bakarrik zela funtsezkoa toxinen zitotoxikotasunerako. Gainera, bi motibo horiei dagozkien peptido motzak aztertu zituzten SPR eta ekorketa bidezko kalorimetria diferentziala (ingelesez *differential scanning calorimetry*, DSC) erabiliz. Bi peptidoek kolesterola lotzen zutela jakinarazi zuten, baina CRAC<sup>336</sup> guneari dagokion peptidoak bakarrik inhibitzen zuen LtxA-kolesterol lotura eta hortaz, toxinak Jn.9 zelulak hiltzeko zeukan gaitasuna<sup>138</sup>. Autoreek ITC erabiliz  $5,05 \times 10^{-8}$  M-ko  $K_D$  balioak eman zituzten CRAC<sup>336</sup> peptidoaren eta POPC/CHOL (3:2 erlazio molarra) liposomen arteko elkarrekintzarako<sup>171</sup>.

UPEC HlyA-ren kasuan, bi peptido aztertu ziren, bata domeinu poro-eragilean kokatutako CARC<sup>347</sup> gunetik (<sup>341</sup>RFKKLGYDGDSLL<sup>353</sup>) eratorria, eta bestea azilatutako bi lisinen artean zegoen CRAC<sup>641</sup> gunetik (<sup>639</sup>VVYYDK<sup>644</sup>) eratorria<sup>193</sup>. Autoreek bi peptidoen eta lipido-konposizio desberdineko mintzen (POPC eta POPC/CHOL, 4:1 eta 2:1 erlazio molarra) arteko elkarrekintza aztertu zuten, SPR eta dinamika molekularreko (ingelesez *molecular dynamics*, MD) simulazio bidez. Bi peptidoek kolesterola duten mintzekin elkarreragiten dutela erakutsi zuten, baina CRAC<sup>641</sup> guneko peptidoak  $K_D$  balio txikiagoa izan zuen. Gainera, azken peptido hori bakarrik izan zen gai HlyA-k eragindako jarduera hemolitikoa inhibitzeko<sup>193</sup>.

2018an, Osickovak eta kolaboratzaileek *K. kingae* RtxA-ren eremu hidrofobikoan identifikatutako bost CRAC/CARC gunetako tirocina hondarrak (Y54, Y285, Y343, Y352 eta Y448) ordeztu zituzten fenilalaninarengatik. Autoreek erakutsi zuten Y54F, Y285F eta Y448F ordezkapenek ez zutela eragin nabarmenik izan toxinak eragindako eritrozitoen lisian. Aitzitik, Y343F eta Y352F ordezkapenek jarduera litikoa % ~50era jaitsi zuten RtxA basatiarekin (WT) alderatuz<sup>150</sup>.

Masin eta kolaboratzaileek argitaratutakoaren arabera, *B. pertussis*-en CyaA toxinan lau CRAC motibotako tirocina hondar zentralak (Y632, Y658, Y725 eta Y738) fenilalaninagatik ordezkatzeko ez zuen translokazioan ezta jarduera hemolitikoan eraginik izan<sup>170</sup>. Hala ere,

CyaA-k kolesterolarekiko duen mendekotasuna oraindik identifikatu gabeko CRAC/CARC motibo batzuekin lotuta egon liteke.

Azken batean, badirudi RTX familiako hainbat toxinek CRAC/CARC motiboak erabiltzen dituztela kolesterola zuzenean lotzeko determinatzaile molekular gisa. Hurrengo atalean, *B. pertussis*-en CyaA-ri, doktorego-tesi honetan aztertutako RTX familiako toxinari, buruzko informazioa eguneratu dugu.

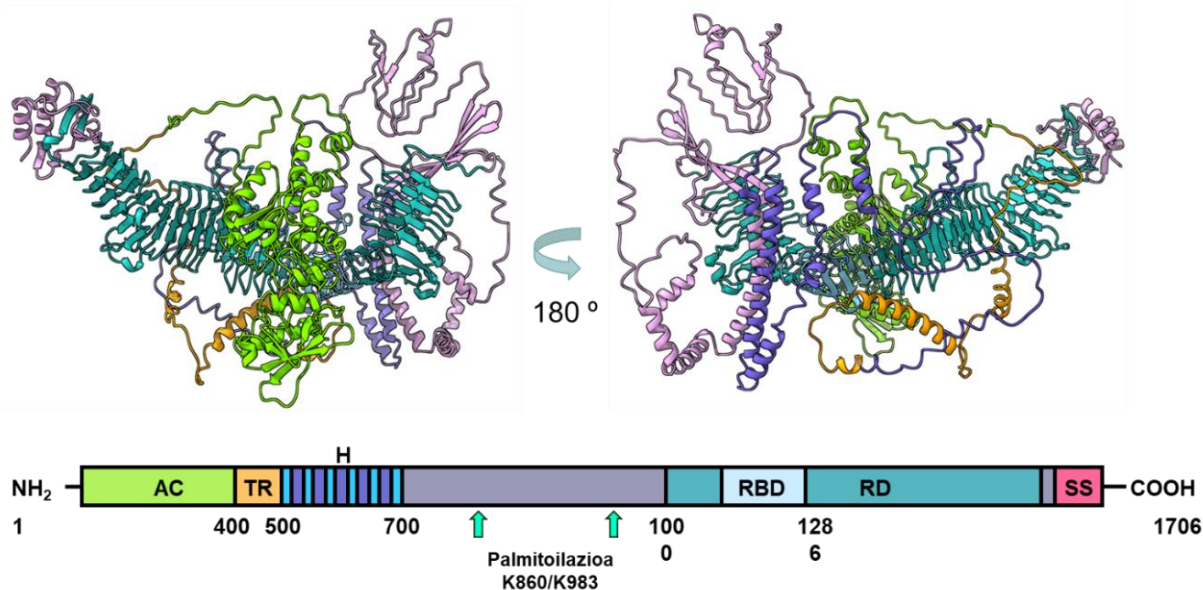
### 1.3. ADENILATO ZIKLASA TOXINA (CyaA)

CyaA *Bordetellae* patogenoek (*B. pertussis* eta estuki lotutako beste espezie batzuk) jariatutako adenilato ziklasa/hemolisina bifuntzionala da. Leukotoxina poro-eragile hau funtsezkoa da *B. pertussis*-en, kukutxeztularen bakterioaren, birulentziarako. CyaA 1706 aminoazidoz osatutako kate-polipeptidiko bakarra da eta garrantzitsua da bakterioak gizakien arnas traktua kolonizatzeko eta gaixotasuna finkatzeko<sup>194,195</sup>. Duela ia 50 urte aurkitu zuten *B. pertussis* hazkuntzen gainjalkinetan<sup>92</sup>, eta ondoren, kalmodulina eukariotikoaren (CaM)<sup>196</sup> bidez aktibatzen zela deskribatu zen. Zelula eukariotoak inbaditzeko gai da, eta erregulatu gabeko cAMP gehikuntza eragiten du itu-zelularen zitosolean<sup>120,197</sup>. Kromatografia-tekniken bidez purifikatu zen, eta proteina termolabiltzat hartu zen. 30 °C-an eta pH 7–8an adierazten du jarduera maximoa, eta magnesio-ioiak (Mg<sup>2+</sup>) behar ditu<sup>92</sup>. CyaA-ren ezaugarri estrukturalak, funtzionalak eta kimikoak jarraian deskribatu dira.

#### 1.3.1. Egiturazko ezaugarriak

RTX familiako beste kideekin alderatuz, CyaA-k egitura-homologia du<sup>198</sup>. Hala ere, baditu bere berezitasunak, jarduera independenteak dituzten bi domeinu baititu<sup>199,200</sup> (**1.10 irudia**). N-muturreko AC domeinuak zelula ostalariaren zitosoleko ATP cAMP bihurtzen du; C-muturreko gainerako hondarrak, berriz, domeinu poro-eragilearen parte dira (RTX domeinua)<sup>201</sup>. Ebidentzia horrek aditzera ematen du *cyaA* genea RTX toxina bat eta adenilato ziklasa bat kodetzen zituzten bi gene elkartzearen ondorioz sortu zela<sup>202</sup>.

## 1. KAPITULUA: SARRERA



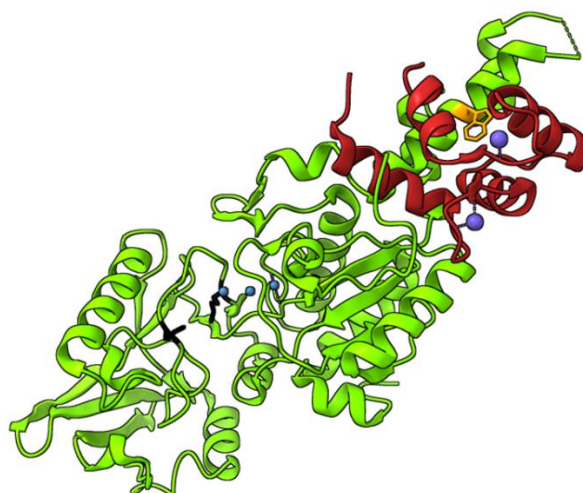
**1.10 irudia.** *B. pertussis*-en CyaA toxinarene egitura-antolaketa<sup>203</sup>. Toxinaren AF2 modelo<sup>204,205</sup> eta domeinuen adierazpen eskematikoa. Kolore-kodea **1.6 irudian** erabilitako berdina da. ChimeraX erabili da irudikatzen<sup>131</sup>.

### 1.3.1.1 Adenilato ziklasa (AC) domeinua

CyaA-ren N-muturrak, ~1–400 aminoazidoak, (~40 kDa) aktibitate entzimatikoa du (**1.11 irudia**) eta bi azpi-domeinuz (T25 eta T18) osatuta dago, *in vitro* lor daitezkeenak proteolisi partzialaren bidez<sup>206</sup>:

T25 (1–224 hondarrak): ATP lotzen duten proteina gehienetan dagoen G-X-X-X-G(A)-K-S adostasun-motiboa du. K58 eta K65 hondarren mutazioek (**1.11 irudia**, beltzez adierazia) toxinarene jardura katalitiko nabarmen murriztea eragiten dute. Beraz, hondar horiek zentro katalitikoaren parte direla uste da, baina beste batzuk ere egon daitezke inplikaturatuta<sup>207</sup>.

T18 (225–399 hondarrak): CaM lotzen duten  $\alpha$ -helize anfiptikoek osatzen dute azpidomeinu hori. Mutagenesi zuzenduak erakutsi zuenez, CaM lotzeko gunea W242 hondarretik gertu egon behar da (laranjaz), triptofano hori ordezkatzeko nabarmen murrizten baitu CaM-rekiko afinitatea<sup>208</sup>. Lau eskualde diskretu eta 49 hondar elkartzen dira CaM-rekin eta CaM inguratzen duten gatz-zubien, hidrogeno-loturen eta interakzio hidrofobikoen sarea osatzen dute. CaM-ren 41–70 hondarrak AC domeinuarekin kontaktu estuan daude. Lotura horrek zentro katalitiko dagoen *loop*-a egonkortzen du.



**1.11 Irudia. AC domeinuaren kristal-egitura, CaM-ren C-muturreko domeinuari lotua.** CyaA-ren AC domeinuaren egitura sekundarioa (1–364 hondarrak) berdez ageri da, eta CaM gorriz adierazi da  $\text{Ca}^{2+}$ -ri lotuta (esfera purpurak). W242 laranja eta K58 eta K65 beltzez adierazi dira. Elkarrekintza AC domeinuaren positiboki kargatutako gainazalaren bidez gertatzen da, CaM proteina azidoa baita (pI 4.1), metalentzako lau lotura-gunerekin.  $\text{Ca}^{2+}$ -en loturak 400 aldiz handitzen du AC domeinuarekiko afinitatea<sup>209</sup>. Hiru  $\text{Mg}^{2+}$ -k parte hartzen dute konplexuan. Guok eta lankideek ebatzitako kristal-egituratik eratorritako irudia (PDB ID: 1ZOT<sup>210</sup>). ChimeraX erabili da irudikatze<sup>131</sup>.

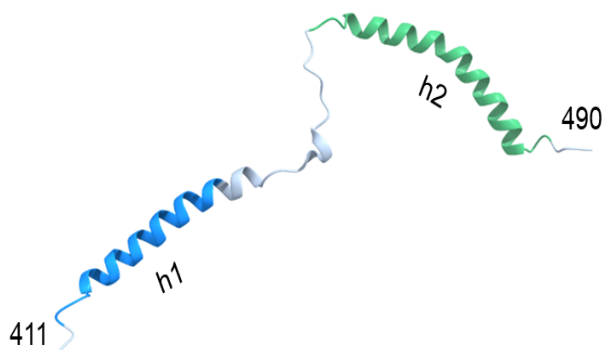
CaM-rekin elkartzeak gutxieneko konformazio-aldaketak eragiten ditu AC domeinuaren egitura sekundario eta tertziarioan, eta eragin handia du haren propietate hidrodinamikoetan. AC domeinu isolatua esferikoa eta hidratatua da, baina CaM-rekiko elkarrekintzak luzatu, trinkotu eta deshidratatu egiten du. Zelula barneko CaM-k bat egingo luke AC domeinuarekin, afinitate subnanomolarrarekin, eta hein handi batean, toxinen jarduera katalitikoa bultzatuko luke ( $K_{\text{cat}} > 2000\text{s}^{-1}$ )<sup>196</sup>.

### 1.3.1.2. Translokazio-eskualdea (TR)

AC eta RTX domeinuak lotzen, 400–500 hondarren artean, translokazio-eskualdea (TR) deritzona dago, AC domeinuaren mintzean zeharreko garraioan zuzenean inplikaturik dagoena<sup>211</sup>. 375–485 hondarrak kentzeak erabat ezabatu zuen toxinak itu-zelula barneko cAMP maila emendatzeko duen gaitasuna; aldiz, toxinak fenotipo “hiperhemolitikoa” erakutsi zuen<sup>212</sup>. Horrez gain, antigorputz monoklonal bat 373–399 aminoazidoen artean dagoen epitopoarekin elkartzeak ere inhibitu egin zuen AC domeinuaren translokazioa<sup>213</sup> eta hemolisi-jarduera hirukoitz edo lauhoitza eragin zuen<sup>212</sup>. Azkenik, translokazio-eskualdean dauden positiboki kargatutako hondarrek mintzaren ezegonkortzean eta AC domeinuaren translokazioan parte hartzen dutela dirudi<sup>214</sup>. 419–448 arteko karga neto negatibodun hondarrek, berriz, poroaren tamaina eta maiztasuna kontrolatzen dituzte<sup>214</sup>.

## 1. KAPITULUA: SARRERA

Erresonantzia magnetiko nuklear (ingelesez *nuclear magnetic resonance*, NMR) bidez zehaztu zen translokazio-eremua bi  $\alpha$ -helizek (h1 eta h2) osatzen dutela<sup>215</sup> (**1.12 irudia**); hala ere, orain arte ez zegoen argi bi helizeek mintzarekin elkarreragiten ote duten translokaziorako. Helize bakoitzari dagozkion bi peptido sintetiko erabiliz, talde batek frogatu zuen h2 simulatzen duen peptidoa (454–484 hondarrak) lipido anionikoak dituzten mintzekin baino ez dela lotzen, eta bigerua lipidikoarekiko planoan orientatutako  $\alpha$ -helize egitura hartzen duela<sup>216</sup>. Duela gutxi, h2 helizea AC domeinuaren translokazioan inplikaturatuta zegoela proposatu zen<sup>211,216</sup>.

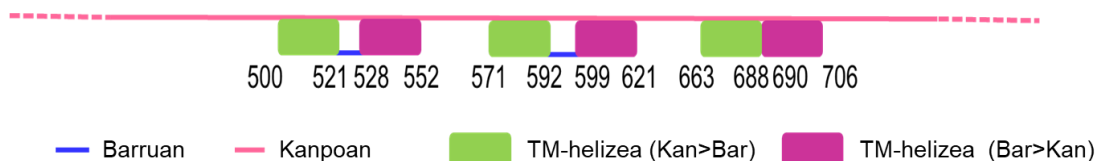


**1.12 irudia. CyaA-ren translokazio-eskualdearen NMR egitura DPC mizeletan**<sup>215</sup>. CyaA-ren 411–490 hondarrak irudikatatu dira, h1 eta h2 helizeak urdinez eta berdez koloreztatuz, hurrenez hurren. Irudia Sukova eta kideek argitaratutako NMR egitura (PDB ID: 6RFM)<sup>215</sup> erabiliz prestatu da, ChimeraX-n<sup>131</sup>.

### 1.3.1.3. RTX domeinua

RTX domeinua zenbait azpidomeinuk osatzen dute. AC domeinuaren translokazioaz eta toxinari fenotipo poro-eragilea emateaz arduratzen da<sup>211</sup>:

- Domeinu hidrofobikoa (H, 500–700 hondarrak): eskualde hori aminoazido hidrofobikotan aberatsa da. Hidrofobiko/anfipatikokoak diren bost TM  $\alpha$ -helize aurrean ziren bertan<sup>81</sup>: HI (502–522), HII (529–549), HIII (571–591), HIV (607–627) eta HV (678–698). Phillius algoritmoaren ([TOPCONS](#) zerbitzaria<sup>217</sup>) arabera, HI eta HII TM helizeek,  $N_{kan}-C_{bar}$  eta  $N_{bar}-C_{kan}$  topologiak jarraituko lituzkete, hurrenez hurren. Horrenbestez, HIII–HIV–HV helizeek  $N_{kan}-C_{bar}$ ,  $N_{bar}-C_{kan}$  eta  $N_{kan}-C_{bar}$  topologiak izango lituzkete, hurrenez hurren (**1.13 irudia**).

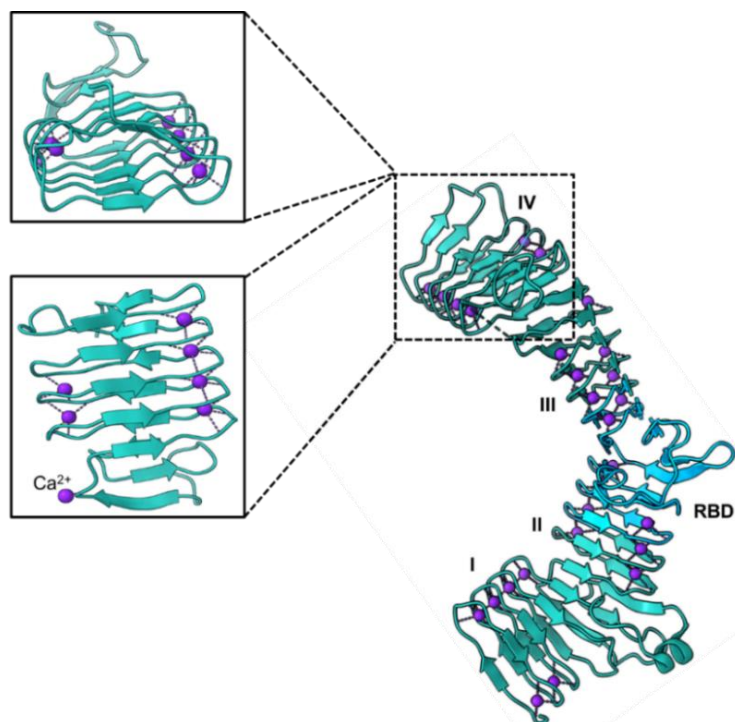


**1.13 irudia. CyaA-ren 500–706 hondarren TM helizeen topologia.** Phillius algoritmoak sei TM helize iragarri zituen: TM1 (500–521 hondarrak), TM2 (528–552 hondarrak), TM3 (571–592 hondarrak), TM4 (599–621 hondarrak), TM5 (663–688 hondarrak) eta TM6 (690–706 hondarrak). Predikzioarako [TOPCONS](#) zerbitzaria<sup>217</sup> erabili zen (20-02-24an atzitu).

Badirudi eremu hidrofobikoa CyaA-ren jarduera zitotoxikoan inplikatur dagoela, bai poroa eratuz<sup>218</sup>, bai mintza desegonkortuz<sup>219</sup>. Lehenik eta behin, eskualde horretako delezio-mutazioek toxinarekin jarduera poro-eragilea erabat murriztu zuten eritrozitoetan eta geruza artifizialeetan. Hori dela eta, hondar horiek poroaren eraikuntzan parte hartzen dutela ondorioztatu zen<sup>220,221</sup>. Beste ikerlan batzuen arabera, eskualde hori funtsezkoa izan daiteke translokaziorako eta poroaren eraikuntzarako<sup>82,83,222</sup>. Adibidez, badirudi HI, HII eta HIII helizeek CyaA-ren bi jardueretan eta poroaren katioikiko selektibitatean ere parte hartzen dutela<sup>81-83</sup>.

- Palmitoilazio tokiak (K860 eta K983): RTX familiako beste kide batzuek bezala, CyaA proteina ez-aktibo gisa sintetizatzen da (proCyaA)<sup>223</sup>, eta ondo funtzionatzeko azilatu egin behar da. Kasu horretan, CyaC aziltransferasak, CyaA-rekin batera adierazten denak<sup>67</sup>, K860 eta K963 hondarretara transferitzen ditu azido palmitikoak<sup>224,225</sup>, ACP-ren laguntzarekin<sup>226</sup>. K983 hondarraren palmitilazioa, luzera egokituko azilo kate bat gehituta, ezinbestekoa da domeinu poro-eragilea mintzean txertatzeko eta toxinak poroak eratzeko<sup>227</sup>. K860 hondarraren palmitilazioa itxuraz ez da hain garrantzitsua; alta, bi PTM-ak beharrezkoak dira toxinarekin jarduera hemolitikorako eta toxina zelula-mintzetara lotzeko<sup>97</sup>, baina ez AC domeinua translokatzeko<sup>81,225</sup>. Gainera, CyaA-k disoluzioan oligomeroak eratzeko duen gaitasuna, hemolisirako erabakigarria dena, azilazioaren menpe dago<sup>228</sup>.
- Errepikapen domeinua (RD, 1014–1612 hondarrak): eskualde horretan daude glizina eta aspartato ugariko taldeak, 40–45 tandem errepikapen osatzen dituztenak eta RTX familiaren bereizgarria direnak<sup>229</sup>. Errepikapen horiek elkarren segidako  $\beta$ -xafla egitura komuna dute, eskuinerantz biratzen den espirala osatuz, azkenik  $\beta$ -bira motibo paralelo bat eratzeko. Errepikapen bakoitzeko lehen sei aminoazidoak  $\text{Ca}^{2+}$  lotzeko biratzen dira, eta beste hirurek  $\beta$ -orri txiki bat osatzen dute<sup>230</sup>.  $\text{Ca}^{2+}$  ioiak bi laminen arteko itzulietan batzen dira; horrek esan nahi du nonapeptido motibo bakoitzak bi gune dituela katioia lotzeko<sup>85</sup>. **1.14 irudian** erakusten den bezala, CyaA-ren errepikapen domeinua bost bloketan banatzen da, ondorengo aminoazidoei dagozkienak: 1014–1087, 1138–1210, 1247–1352, 1377–1489 eta 1529–1612<sup>105</sup>. Errepikapen domeinuaren barruan, hartzailea lotzeko gunea (RBD, 1166–1286 aminoazidoak) dago eta toxina  $\alpha_M\beta_2$  integrinarekin elkartzeaz arduratzen da<sup>128</sup>.

## 1. KAPITULUA: SARRERA



**1.14 irudia. CyaA-ren 751–1488 hondarren cryo-EM egitura.** Errepikapen domeinuko lau blokeak kolore turkesaz irudikatu dira; RBD urdinez ageri da, eta  $\text{Ca}^{2+}$  esfera moreekin adierazi da. IV. blokearen goiko eta alboko bistak ere erakusten dira. Irudia Goldsmith eta kideek ebatzitako cryo-EM egituratik moldatu da (PDB ID: 7USL)<sup>130</sup>, ChimeraX<sup>131</sup> erabiliz.

Bakterio-zitosoleko  $[\text{Ca}^{2+}]$  baxuak toxina tolestea eragozten du<sup>104</sup>, eta negatiboki kargatutako hondarrek barne-aldarapen indar elektrostatiakoak sustatzen dituzte eta egitura-malgutasun handia ematen diote RTX domeinuari<sup>231</sup>. Beraz,  $\text{Ca}^{2+}$ -rik ez badago, eremu horrek egitura desordenatua, ezegonkorra eta oso hidratatua du. Tolestura jariaketaren ondoren gertatzen da,  $\text{Ca}^{2+}$  loturak errepikapen domeinuaren trinkotzea eta deshidratazioa eragiten dituzten, eta egitura sekundario eta tertziario egonkorak eratzen dituzten<sup>229,232,233</sup>. Horri esker, bakterio-mintzean dagoen  $\text{Ca}^{2+}$  gradientek zehazki doi dezake tolesteko-prozesua. Nahitaezkoa da V. blokeko C-muturreko tapoia egonkortzea, zeinaren sekuentzia ez baita gainerako blokeen berdina, egitura osoa  $\beta$ -xafletan egonkortzeko. Izan ere, egitura horietako hondar batzuen mutagenesiak tolestu gabeko toxina ez-aktiboak ekoizten ditu. V. blokea jariatu eta  $\text{Ca}^{2+}$ -ek egonkortzen dutenean, RTX eskualdeko gainerako beste blokeentzako nukleazio-puntu gisa balio du.  $\text{Ca}^{2+}$  ez da beharrezkoa toxinen oligomerizaziorako, baina bai mintz plasmaticoari lotzeko konformazio egokia emateko<sup>107</sup>.

- Jariatze-seinalea: CyaA-ren jariatze-mekanismoa UPEC HlyA-ren T1SS-en oso antzekoa da<sup>202</sup> (**1.5 irudia**), baina kasu honetan CyaBDE proteinek osatzen dute kanal trimerikoa<sup>235</sup>. Analogiaz, CyaB-k ABC garraiatzailearen funtzioa beteko luke.

Toxinaren 74 hondarreko jariatze-seinalea ezagutuko luke, eta polipeptidoa kanaletik zelulaz kanpoko ingurunera bideratuko luke<sup>236,237</sup>. Toxina zuzenean destolestuta garraiatzeak erraztu egiten du jariatze-seinalea ezagutzea eta toxina kanal estuan zehar pasatzea<sup>233</sup>. Jariatze-seinalea C-muturrean dagoenez, jariaketa norabidea polipeptidoaren C-muturretik N-muturrera gertatzen dela suposatzen da. Horrenbestez, errepikapen domeinuko V. blokea izango litzateke irteten lehena<sup>229</sup>.

### 1.3.2. CyaA-k zelula ostalarietan eragindako efektuak

CyaA-k itu-zeluletan eragindako zitotoxikotasuna zelularen zitosolean sortutako doitu gabeko cAMP mailaren eta poro-oligomerikoek eragindako plasma-mintzaren iragazkortasunaren ondorioz gertatzen da<sup>206</sup>. Toxina batez ere zelula fagozitiko mieloideetara zuzentzen da<sup>123,239</sup>, eta beraz, erantzun immunea aldatzeko gai da *B. pertussis* bakterioaren kolonizazioaren hasierako faseetan, organismo ostalariaren defentsak aldi baterako neutralizatuz<sup>194,195</sup>. Gaur egun, uste da CyaA-k itu-zeluletan eragindako efektu zitotoxikoak bi jarduera independenteen ondorio direla, eta biek batera ostalariaren defentsak ahultzen lagun dezaketela<sup>240,241</sup>.

#### 1.3.2.1. AC domeinuaren translokazioa eta AC aktibitatea

AC domeinuak cAMP maila altuak sortzen ditu itu-zelularen zitosolean, eta seinaleztapen zelularra asaldatzen du<sup>120,196</sup>. Domeinu hori itu-zelulen mitokondrioetan edota nukleoan kolokalizatuta aurkitu da eta badirudi zelula barneko ituak dituzten beste adenilato ziklasa batzuen antzera jardun dezakeela<sup>242</sup>. Hasieran, ikusi zen CyaA-k apoptosia eragiten zuela makrofagoetan<sup>123</sup>, mintz mitokondrialaren alterazioengatik eta ATP maila jaisteagatik (baina ez erabateko deplezioagatik)<sup>243</sup>. Horrez gain, CyaA-k T linfozitoen eta MAP kinasak adierazten dituzten beste zelula batzuen aktibazioa eta kimiotaxia ekiditen ditu; MAP kinasa A kinasak bideratutako jarduera immunosupresoreen itu izan ohi da<sup>244</sup>. Toxina hori gai da, halaber, zelulaz kanpoko neutrofilo tranpen eraketa inhibitzeko<sup>245</sup>. Neutrofilo horiek hainbat mikroorganismo immobilizatzen dituzte, ondoren ezabatzeko. Arnas ezstandaren inhibizioa ere eragiten du cAMP ekoizpenak<sup>246</sup>, erantzun immunea gutxituz. Gainera, CyaA gai da fagozitoen bakterizitate-funtzioak<sup>247</sup> eta neutrofiloek eragindako bakterio-fagozitosia gutxitzeko, *B. pertussis*-en hemaglutinina haritsuarekin lankidetzan<sup>248</sup>. *B. pertussis* bakterioaren inbasioak eragin kaltegarriak izan arren, badirudi organismo ostalariak CyaA-k eragindako efektu zitotoxikoak bere alde erabiltzen dituela berezko eta hartutako hantura-erantzunak aktibatuz. Adibidez, T<sub>h17</sub> zelulen produkzioa induzitzen du, zeinak funtsezkoak baitira hartutako erantzun immunean<sup>249</sup>.

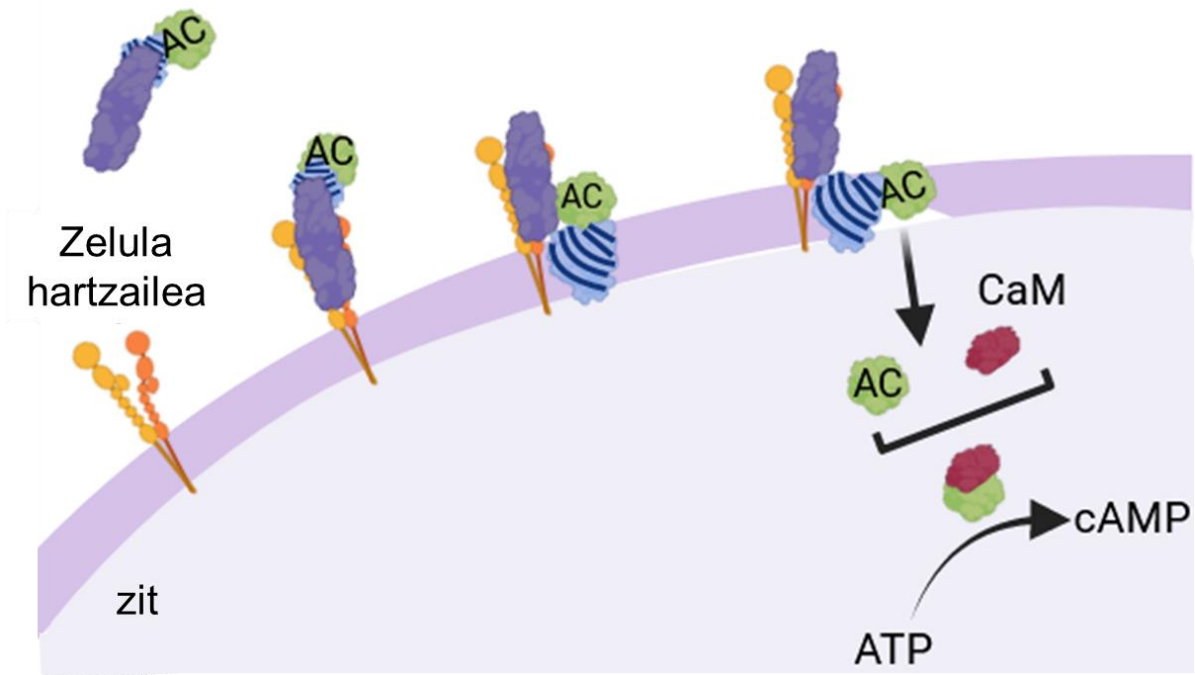


## 1. KAPITULUA: SARRERA

Proteina-toxina honek N-muturreko AC domeinu katalitikoa zuzenean garraiatzen du zelula ostalari eukariotoaren mintzean zehar<sup>250</sup>. Prozesu hori  $\alpha_M\beta_2$  hartzailearekiko independentea da<sup>194,203</sup> eta ez du endozitosi urratsik behar<sup>251</sup>. Mintz-potentzial negatibo batek zuzentzen duela dirudi, bai zeluletan<sup>252</sup>, bai mintz-ereduetan<sup>253</sup>. Gainera, prozesuak segundo gutxiko bizitzar-erdia duela, 15° C baino tenperatura altuagoak behar dituela<sup>230</sup> eta  $[Ca^{2+}]^{234}$  milimolarra behar duela dokumentatu da. Hala ere, mekanismo zehatza ez da oraindik deskribatu<sup>203</sup>.

Bide endozitikoaren inhibitzaileak erabiliz egindako azterketek iradoki zuten translokazio-prozesuaren aurretik ez zegoela toxinarek endozitosirik<sup>251</sup>. Ondoren, toxinarek C-muturrak mintzean poro bat sortzen duela ezarri zen, eta poro horretatik garraiatzen dela N-muturra. Hala ere, hipotesi hori baztertu egin zen CyaA-ren poroa ~40 kDa-ko polipeptido bat pasa ahal izateko estuegia dela (0,6-0,8 nm-ko diametroa) ezarri ondoren<sup>221,254</sup>.

Proposatutako translokazio-ereduetako bat makrofagoen intoxikazioan oinarritzen da<sup>165</sup> (**1.15 irudia**). Itu-fagozitoen integrina-hartzaileari lotu ondoren<sup>114,128</sup>, eskualde hidrofobikoa mintz plasmatikora ainguratu eta AC domeinua zitosolera garraiatzen dela iradoki zen<sup>255</sup>. Horretarako, CyaA-k translokazioko bitartekari bat eratuko luke, eta AC domeinuak berak parte hartuko luke kanal iragankor bat sortzen, zelula barnaranzko  $Ca^{2+}$  isuria ahalbidetuko lukeena<sup>256,257</sup>.  $Ca^{2+}$ -en fluxuak kalpaina aktibatuko luke eta honek talina ebakiko luke, toxina-hartzaile konplexua zitoeskeletotik askatzeko. Toxina-hartzaile konplexua, orduan, *raft* ingurunera mugituko litzateke, eta translokazioko azken urratsa esteroletan aberatsa den inguru horretan gertatuko litzateke. Beste ikerketa batean proposatu zuten, AC domeinua zelula ostalariaren zitosolera garraiatu ondoren, kalpainak CyaA polipeptidoa ebakiko luke, translokazio-eskualdeko lekuren batean, gutxi gorabehera 480 hondarraren inguruan, eta zelula ostalariaren zitosolean AC domeinu disolbagarria askatuko luke. Aldiz, hemolisina domeinua zelula ostalariaren mintzean txertatuta geratuko litzateke<sup>165</sup>.



**1.15 irudia. CyaA-ren zelula eukariotoak intoxikatzeko prozesua azal lezakeen eredu-tako bat<sup>165</sup>.** Tolestutako toxina zelularen hartzailearekin lotu daiteke (edo ez), eta poroak sortzen eta AC domeinua translokatzeko dituzte. CyaA domeinuen kolore-kodea **1.6 irudikoaren** antzekoa da. O'Brien eta kideengandik egokitua<sup>258</sup>. Biorender-en marraztua.

### 1.3.2.2. Aktibitate poro-eragilea

CyaA-k eraginkorki intoxika ditzake  $\beta_2$  integrinarik ez duten zelulak, hala nola eritrozitoak edo epitelio-zelulak, mintz plasmatikoko lipidoekin zuzeneko elkarrekintzaren bidez<sup>203</sup>. cAMP kontzentrazioa handitzeaz gain, CyaA-k jardura hemolitikoa du, mintza iragazkortzen duten katioiekiko poro selektiboak sortzeko gaitasuna duelako eta zelularen lisi osmotikoa eragin dezakeelako<sup>199,221,259</sup>. Beste toxina poro-eragile batzuekin analogia eginez, pentsa daiteke CyaA bidezko zelula-lisi osmotikora daraman prozesuak zenbait etapa dituela: mintzarekiko lotura (hartzaile espezifiko bidezkoa edo ez), geruza bikoitz lipidikoan txertatzea eta poro-egituraren mihiztatzea. Poroak eratzeko jarduerari eta sortutako poroen ezaugarriei buruzko ezagutza nahiko mugatua da, eta galdera asko, adb. poroen estekiometria erreala, mihiztadura-mekanismoa etab., behin betiko erantzunik gabe egon dira ia hiru hamarkadaz<sup>260</sup>.

AC domeinuaren translokazioa eta cAMP ekoizpena eritrozitoetan azkarra eta maximoa da 30–60 minutuan, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inguruko toxina-kontzentrazioetan. Aldiz, hemolisiak luzaro irauten du (orduak), 60 min baino gehiagoko lag fasearekin, baita 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  toxina-kontzentrazioekin ere<sup>254</sup>. Translokazio prozesuak eta poro-eraketak zenbait elementu estruktural dituzte amankomunean<sup>200</sup>, esaterako, domeinu hidrofobikoko  $\alpha$ -helizeak<sup>81–83</sup>. Horrexegatik, postulatu

## 1. KAPITULUA: SARRERA

zen domeinu katalitikoaren garraioa ekiditeak toxina-konformazio hobea eragiten zuela hemolisirako.

Denbora luzez, CyaA potentzia litiko txikiko hemolisina ahula dela pentsatu izan da, oso poro txikia eratzen duelako, UPEC HlyA-k edo *A. pleuropneumoniae* ApxI-ek eratutako poro handietatik (~2-3 nm) urrun<sup>84,261</sup>. Hala ere, CyaA poroen nanoeskalako irudiek erakutsi zuten ezen, diametro finkoa izan beharrean, toxina-kontzentrazioaren eta inkubazio-denboraren arabera, poro horiek zenbait nanometro zabaleko “zulo” handi baterantz eboluzionatu dezaketela, eta beraz, zitosoletik proteina txikien kanporatzea ahalbidetu dezaketela<sup>259</sup>. Poro horiek bezain handiak dira kolesterol-menpeko zitolisinek (ingelesez *cholesterol-dependent cytolysins*, CDC), O listeriolisinak edo O estreptolisinak esaterako, sortzen dituztenak eta  $\beta$ -egitura dutenak<sup>262,263</sup>. Irekidura horiek mekanismo lipidiko baten bidez eratu daitezke. Bai fosfolipido molekulek, bai proteina-segmentuek (seguruenik helikoidal eta anfipatikoak direnak) arkitektura heterogeneodun poroen paretak delineatzen laguntzen dute<sup>260</sup>.

CyaA toxinak itxura trinko eta egonkorra hartzen du soluzioan, ~14–15 nm batezbesteko diametroarekin<sup>264</sup>. Hala ere, mintzera lotu ondoren, disoluzioan daukan itxura konpaktutik gainazal lipidikoaren gainean daukan itxura ireki eta hedatura pasatuko litzateke<sup>259</sup>. Litekeena da hasierako loturaren eta monomeroaren irekieraren ondoren, proteinen eta lipidoen arteko interakzioak izatea, eta ondoren, toxina berrantolatzea, pixkanaka mintzean txertatzen joateko. Monomero-katearen pixkanakako barneratze horrek partikulak elkarrengana hurbildu ditzake, proteina-proteina elkarrekintzak errazteko. Estekiometria bereko unitateak bata bestearen atzetik gehituko lirateke, oligomerizazio-modu sekuentzialean<sup>265</sup>. Mikrobioen aurkako peptidoen edo poroa eratzen duten beste proteina batzuen antzera (adb. Bax proapoptotikoa edo aktinoporinen familia<sup>266–268</sup>), CyaA-k ere poroak eratu ditzake kontzertatu-gabeko bidezidorra erabiliz<sup>265</sup>. Monomero hidrosolubleak lehenik mintzari lotuko lirateke, segur aski azkar, eta oligomerizazioaren aurretik (edo aldi berean) txertatuko lirateke. Era berean, jakinarazi da UPEC HlyAren poroa ere handitu egiten dela denborarekin, tenperaturarekin eta toxina kontzentrazioarekin<sup>269</sup>, eta proteinaz eta lipidoz osatzen dela<sup>270</sup>.

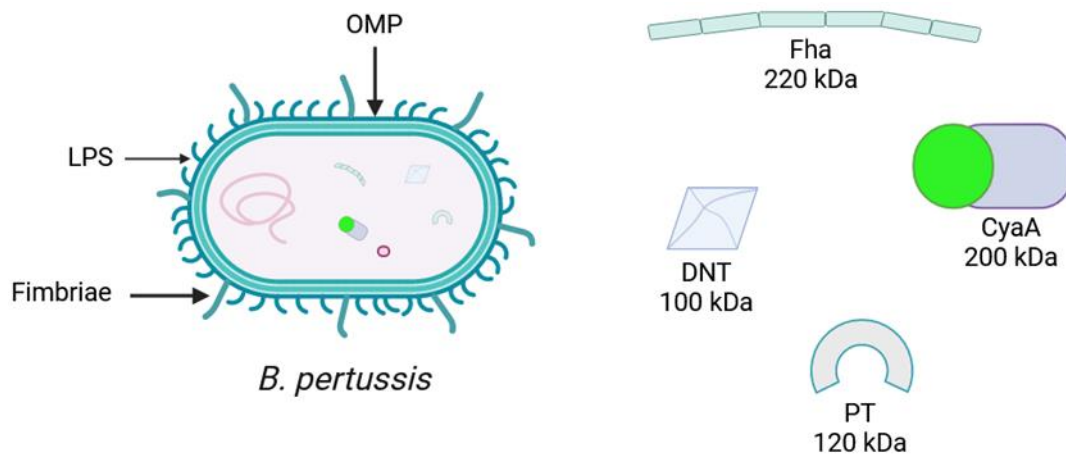
### 1.3.3. Kukutxeztula, gainditutako gaitz baten itzulera

CyaA *B. pertussis* kukutxeztularen kokobazilo Gram-negatiboek jariatzen dute<sup>92</sup>. Kukutxeztula edo kukurruku-eztula gizakien arnas bideetako gaixotasun akutu eta oso kutsakorra da<sup>195</sup>, eta hilgarria izan daiteke adibidez, urtebetetik beherako haurretan<sup>271</sup>. Eritasun horren ezaugarri dira agerpen kliniko ugari, besteak beste, bronkopneumonia, hipogluzemia, leukozitosis eta

eztul paroxisomala<sup>194</sup>. Eztula etapa goiztiar batean gaintu ez duten pazientek konplikazioak izan ditzakete, eta kukutxeztulagatik hiltzen diren pertsonen % 90 bigarren mailako pneumoniagatik hiltzen dira<sup>271</sup>.

*B. pertussis* giza patogeno hertsia da, animalia- edo ingurumen-erreseboriorik gabea<sup>272</sup>, eta aireko tantatxo bidez transmititzen da. Hamasei *Bordetella* espezie ezberdin identifikatu dira orain arte<sup>273</sup>, eta beste hiru baino ez dira lotu ugaztunen arnasketa-infekzioekin: *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* eta *B. holmesii*<sup>272,274</sup>.

Kukutxeztula nagusiki toxinekin lotuta dago<sup>194</sup>. Labur esanda, bakterioak arnas zelula epitelialei atxikitzen zaizkie, eta zenbait toxina sortzen dituzte, zilioak geldiarazten dituztenak eta arnas traktuaren hantura eragiten dutenak. Horrek biriketako jariakinen ezabatzea ekiditen du<sup>271</sup>. Gainera, pertussis-antigenoek linfositosa sustatzen dute baina kimiotaxia eragozten dute, eta horri esker, bakterioek ostalariaren defentsak saihesten dituzte. *Bordetella*-ren birulentzia-faktoreen artean (**1.16 irudia**)<sup>275</sup>, CyaA funtsezkoa da infekzioa garatzeko. Pertussis toxinarekin (PT) batera, eginkizun garrantzitsua du ostalariaren immunitate- eta hantura-erantzunak ekiditen eta modulatzeko<sup>194</sup>.



**1.16 irudia. *B. pertussis*-en birulentzia-faktoreak.** Kokoide- edo oboide-itxurako bakterio Gram-negatibo txikia da (gutxi gorabehera 0,8  $\mu\text{m}$  bider 0,4  $\mu\text{m}$ ). Derrigorrezko aerobioa da, kapsulatuta dago eta ez du esporarik sortzen. Biologikoki aktiboak diren antigeno eta egitura-osagai ugari daude gaixotasunaren garapenean. Atxikitze-faktoreek, hala nola hemaglutinina haritsuak (Fha) eta finbriek, bakterioei arnas traktuko zelula epitelialekin lotzen laguntzen diete. Trakeako zitotoxina (TC) zelula-paretako peptidoglikanotik askatutako zati bat da, eta arnas epitelio ziliatuaren paralisia eta suntsitzea eragiten du, gaixotasunaren bereizgarria dena<sup>276</sup>. Gainera, bakterioak hiru toxina proteiko nagusi sortzen ditu: pertussis toxina (PT), adenilato ziklasa toxina (CyaA) eta toxina dermonekrotikoa (DNT), zeinentzat ekintza molekularrak argitu baitira. Jakina da lehenengo bi toxinek sintoma kliniko batzuk eragiten dituztela eta/edo bakterio-infekzioa ezartzen laguntzen dutela. Aitzitik, DNT-k duen eginkizuna ez dago argi. Pertussis entzefalopatiaren agente etiologikoa izan daitekeela iradoki da, *B. pertussis* infekzioaren konplikazio larria<sup>277</sup>. Finger eta von Koenigengandik egokitua<sup>278</sup>.

## 1. KAPITULUA: SARRERA

Beste infekzio epidemiko larri batzuekin alderatuta, adb. baztanga edo polioa, kukutxeztularen historia nahiko modernoa da<sup>195</sup>. Guillaume de Baillouk XVI. mendean deskribatu zuen lehen agerraldia<sup>279</sup>. Hala ere, *B. pertussis* ez zen isolatu 1906 arte<sup>280</sup>, Bordetek eta Gengouk patogenoa isolatzeko balio izan zuen Bordet-Gengou (BG) izeneko medio berezia egitea lortu zutenean. Immunitatearekin lotutako aurkikuntza horri eta beste batzuei esker, Bordetek Medikuntza eta Fisiologiako Nobel saria irabazi zuen 1919an.

Txertoaren garapena bakterioa isolatu eta gutxira hasi zen<sup>281</sup>; izan ere, ordura arte erikortasun-eta heriotza-tasa handiak eragin zituen, bereziki bularreko haurretan. 1940–1950 hamarkadetan, zelula osoz egindako pertussis txertoen kanpaina zabalek epidemia kontrolatzen lagundu zuten. Gaixotasunaren kontrola osagai azelularrez egindako DtaP (difteria-tetano toxoide, pertussis txerto azelularra, adsorbatutako txertoa) pertussis txertoei esker mantendu zen<sup>195</sup>.

Nahiz eta gaur egun kukutxeztularen aurkako txertaketa-programa zabalen bidez gaixotasuna nahiko ondo kontrolatzen den, bistan da mundu osoan bakterioaren zirkulazioa ez dela asko murriztu<sup>195,281</sup>. Gaixotasuna askoz ere prebalenteagoa da osagai azelularrez egindako txertoak zelula osoz osatutakoa ordezkatu zuenetik, eta agerraldiak hiru-bost urtean behin erregistratzen dira. Horrez gain, ohikoa da txertoak gutxi erabiltzen diren eremuetan, eta diru-sarrera gutxiko herrialdeetako bularreko haurren heriotza-tasa % 4raino iritsi daiteke<sup>282</sup>. 2014. urtean, herrialde industrializatuetan, 5 urtetik beherako haurren artean ekidin zitezkeen gaixotasunen artean ohikoena zen kukutxeztula<sup>282</sup>. Mundu osoan 48,5 milioi kasu zenbatetsi dira, eta urteko heriotza-tasa ia 295.000 heriotzakoa da<sup>283</sup>. Beraz, kukutxeztulak osasun arazo garrantzitsua izaten jarraitzen du mundu osoko haurren artean. Azpimarratzekoa da Osakidetza-Euskal Osasun Zerbitzuak agerraldi bat iragarri zuela Gipuzkoan (Euskal Autonomia Erkidegoan) 2023ko ekainean.

Kukutxeztulari lotutako gizarte-karga (kostu medikoak eta galdutako lana) esanguratsua da (800–1950\$ nerabeek eta helduek<sup>284</sup>); hala ere, ondorio kezagarriena epidemiologikoa da<sup>195</sup>. Nerabeek eta helduek sintoma arinagoak dituzten arren, zenbait ikerketak frogatu zuten bakterioarentzako gordailu bat eskaintzen dutela eta partzialki immunizatutako haurrentzako transmisio-iturri nagusia direla<sup>195,271,282</sup>.

*Bordetella* spp.-en eta haiek eragindako gaixotasunen inguruan asko aurreratu da azken bi hamarkadetan. Egia da ezagunak diren birulentzia-faktoreei buruzko ikerketak nabarmen hobetu duela *Bordetella*-ren patogenesisia eta ostalariak infekzioaren aurrean duen erantzuna ulertzeko modua. Gainera, txerto berriak garatzen lagundu du. Hala ere, gaixotasuna berriro agertzeak areagotu egin du kukutxeztularen aurkako txertoaren eraginkortasuna murriztearen inguruko kezka<sup>285</sup>. *Bordetella*-ren proteina nagusien ikerketak arazo honi konponbidea eman diezaioke. Adibidez, hogeita hamar urte baino gehiago igaro ondoren, CyaA-k edo beste RTX toxina batzuek mintz plasmatikokoan sortzen dituzten poroen egituraren inguruan oso gutxi dakigu oraindik, eta CyaA poroetan zuzenean parte hartzen duten egitura-elementuen inguruko informazio zehatza falta da. Gainera, oraindik ez da zehaztu AC domeinua garraiatzeko mekanismo zehatza zein den. Beste proteina poro-eragile batzuen inguruan dakigunarekin alderatuz, oso gutxi dakigu RTX toxinen inguruan. Halere, oztopo izan beharrean, horrek talde desberdinei lan gogorra egitera bultzatu beharko lieke, egun batean, toxina horien sekretuak ezagutarazteko<sup>260</sup>.

# KAPITULUA



2

## HIPOTESIA ETA HELBURUAK

Doktorego-tesi honen helburua da kolesterolaren eta *Bordetella pertussis* bakterioak jariatutako adenilato ziklasa toxinare (CyaA) arteko elkarrekintza molekularra aztertzea, toxina hau kukutxeztula gaixotasunean eragiten duten birulentzia-faktore nagusietako bat baita. Lan honen hipotesia da toxinare eta mintzeko kolesterolaren arteko zuzeneko elkarreraginak toxina horren bi jarduera biologikoetarako behar den CyaA-ren egitura egonkortzen eta eraikitzen lagunduko lukeela. Toxinaren eta kolesterolaren arteko elkarrekintza ulertzeak, etorkizunean, CyaA zelula ostalariei lotzea blokeatzeko eta CyaA-k eragindako zitotoxikotasuna minimizatzeko estrategiak diseinatzea ahalbidetu dezake. Horretarako, helburu espezifiko hauek ezarri ziren:

1. Zehaztea ea CyaA-ren jarduera zitotoxiko eta zitolitikoek kolesterolarekiko duten mendekotasuna toxinare eta kolesterolaren arteko zuzeneko elkarrekintzaren ondorio den.
2. CyaA-ren kolesterolarekiko mendekotasun horren determinatzaile molekularrak aurkitzea.
3. CyaA-ren eta mintzaren arteko elkarreragina oztopatzeko moduak aztertzea.



# KAPITULUA



3

# MATERIALAK ETA METODOAK

## 3.1. TOXINEN ADIERAZPENA ETA PURIFIKAZIOA

Lan honetan zortzi CyaA proteina mutante diseinatu eta eraiki ditugu. Horretarako, aldez aurretik translokazio-eremuan eta eremu hidrofobikoan identifikatutako hainbat CRAC/CARC motiboetan mutazio bakarrak, bikoitzak, hirukoitzak eta laukoitzak sartu ditugu. Ondorengo proteina mutanteak erabili ditugu: CyaA-F415A, CyaA-F485A, CyaA-F521A, CyaA-F532A, CyaA-F415A-F485A, CyaA-F485A-F521A-F532A eta CyaA-F415A-F485A-F521A-F532A. *cyaA* genea DNA genomikotik anplifikatu zen, polimerasaren kate-erreakzioa (ingelesez *Polimerase Chain Reaction*, PCR) erabiliz. Ondoren, pET-15b plasmidoan (GenScript Biotech, Herbehereak) txertatu zen, *AsuII* eta *NcoI* errestrikzio entzimak erabiliz pME14 plasmidoa sortzeko. Agilent protokoloa jarraituz mutagenesi zuzendua erabili zen pME14 plasmidoan fenilalanina kodoiak alanina kodoiengatik aldatzeko. Azkenik, intsertudun plasmidoak sekuentziatu egin ziren, PCR-aren eta mutagenesiaren zehaztasuna baieztatzeko.

*E. coli* XL 1-Blue (Stratagene, Sigma-Aldrich, MO, AEB) anduia WT CyaA toxina eta toxina mutanteak ekoizteko erabili zen. WT CyaA-ren kasuan, bakterioak Peter Sebo katedradunak (Mikrobiologia Institutua, ASCR, Praga, Txekiar Errepublika) emandako pT7CACT1 plasmidoarekin transformatu ziren. Aldiz, CyaA toxina mutanteak adierazteko pME14 plasmidoa erabili zen.

Bakterioak transformatu, hautatu eta asetasunera iritsi arte hazi ziren gaez (ingelesez *overnight*, ON) Luria–Bertani (LB) medioan, 100 mg/l anpizilina eta irabiatze konstantea erabiliz, 37 °C-an Certomat BS-1 (Sartorius Stedim Biotech, Irlanda) inkubagailuan. Hurrengo egunean, bakterio hazkuntzak 30 aldiz diluitu ziren LB-an anpizilinarekin eta  $A_{600} = 0.6\text{--}0.8$  izan arte itxaron zen.

Proteinaren adierazpena 1 mM isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranosidoa (IPTG, Apollo Scientific, Erresuma Batua) gehituz induzitu zen, 37 °C-an irabiatuz 4 orduz. Proteinak purifikatzeko, Karstek eta lankideek deskribatutako metodoa<sup>286</sup> gure laborategira egokitu zen. Labor, zelula-hazkuntzak JLA 9100 errotorea erabiliz zentrifugatu ziren (Beckman Coulter, CA, AEB), 6.000x g (4 °C-an 15 min). Jalkinak 50 mM NaCl eta 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean berreseki ziren eta ondoren, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruroa (PMSF, Apollo Scientific, Erresuma Batua) eta EDTA gabeko koktel-konprimituak (Roche, Suitza) gehitu zitzaizkien. Jarraian laginak 150 Soniprep batean (Q Instruments Ltd, Irlanda) sonikatu ziren

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

12  $\mu$ A erabiliz (30 s piztuta, 20 s itzalita, 10 ziklo). Sonikatutako lagina JA-20 (Beckman Coulter, CA, AEB) errotorea erabiliz zentrifugatu zen, 26.000x g (4 °C-an 15 min). Proteina solugarriak kentzeko, jalkinak 50 mM NaCl eta 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean berreseki eta errotore berdina erabiliz zentrifugatu ziren 18.000x g-ra 4 °C-an, 18 minutuz. Inklusio-gorputzak desegiteko, jalkinak 50 mM NaCl, 8 M Urea eta 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean berreseki ziren. Solubilizatutako laginak 4 °C-an irabiatu ziren ON. Hurrengo egunean, laginak 23.000x g-tan zentrifugatu ziren errotore bera erabiliz, 4 °C-an 30 minutuz. Oraingoan, frakzio solugarria 150 mM-ra eraman zen 2 M NaCl ama-disoluzioa erabiliz. Lagin hori Q Sepharose Fast Flow erretxinarekin (GE Healthcare, IL, AEB) nahastu zen. Aldez aurretik erretxina 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 eta gero 150 mM NaCl, 8 M Urea eta 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailearekin nahastu zen (RT, 60 min). Inkubazio-aldia bukatutakoan, erretxina proteinarekin paketatu eta indargetzaile berarekin garbitu zen. Proteina 5 ml-ko frakziotan batu zen, 500 mM NaCl, 8 M Urea eta 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean. Proteinaren detekziorako, frakzioak SDS-PAGE desnaturalizazio-geletan kargatu eta Coomassie urdinez tindatu ziren.

Proteina purua lortzeko, lagina bigarren aldiz kargatu zen Q Sepharose Fast Flow erretxina berean. Horretarako, proteinadun frakzioak 8 M Urea eta 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean diluitu ziren NaCl 150 mM izan arte; izan ere, gatz-kontzentrazio txikiagoei esker, proteina erretxinarekin lotzen da. Erretxina aurrez 150 mM NaCl, 8 M Urea eta 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailearekin nahastu zen. Proteina kargatu ondoren, zutabea indargetzaile berarekin garbitu zen. Azkenik, proteina 2 ml-ko frakzioetan jaso zen, 500 mM NaCl, 8 M Urea eta 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean. Azkenik, proteina SDS-PAGE eta Coomassie tindaketa erabiliz detektatu zen.

Proteina gehien zuten frakzioak batu ziren, 1 M NaCl eta 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 erabiliz 5 aldiz diluitu eta iragazi ziren. Frakzio horiek errendimendu handiko HiLoad 16/10 (GE Healthcare, IL, AEB) zutabe hidrofobiko batean kargatu ziren. Erretxina aldez aurretik 1 M NaCl etag 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean jarri zen. Toxina kargatu ondoren, zutabea lehenengo indargetzaile berarekin garbitu zen, ondoren 50 mM Tris-HCl (MQ H<sub>2</sub>O-n), pH 8,0 eta azkenik % 50 isopropanol/MQ H<sub>2</sub>O (b/b) disoluzioa erabiliz. Azken garbiketa pausoa 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 erabiliz egin zen. Azkenik, toxina 1 ml-dun frakzioetan jaso zen 8 M urea, 2 mM azido etilendiaminotetraazetikoa (EDTA) eta 50 mM Tris-HCl (MQ H<sub>2</sub>O-tan), pH 8,0 erabiliz. Frakzioak SDS-PAGE eta Coomassie tindaketa bidez aztertu ziren. Kontzentrauen zeuden alikuotak batu eta laginaren kontzentrazioa DC Protein Assay bidez neurtu zen.

### 3.2. PEPTIDOEN EZAUGARRIAK

CyaA-ren translokazio-eskualdeko h2 helizea aztertzeke, zenbait peptido sintetizatu ziren. Lehenik eta behin, 454–487 hondarrak dauzkan, eta beraz, C-muturrean CRAC<sup>485</sup> motibo potentziala duen, WT P454–487 peptidoa aztertu zen. Ondoren, CRAC<sup>485</sup> motiboak kolesterola ezagutzeko gaitasunik ba ote duen aztertzeke, bi peptido mutante, P454–487<sup>F485A</sup> eta P454–487<sup>Scr</sup>, eta laburragoa den P454–484 peptidoa diseinatu genituen. Aldaera horiek guztiak CRAC<sup>485</sup> motibo osoa falta zuten: lehenak alanina bat du erdiko posizioan, fenilalaninaren ordeiz; bigarrenak, berriz, nahastutako CRAC motiboa du (ingelesez *scramble*, Scr); eta azkenak, C-muturreko FGR aminoazidoak falta ditu.

Peptidoen ama-disoluzioak prestatzeko, lehenbizi H<sub>2</sub>O-tan zuten solugarritasuna estimatu zen [PepCalc.com](http://PepCalc.com) (Innovagen AB, Suedia) zerbitzua erabiliz. Estimazio horiek pI balioa, kargatutako aminoazido kopurua eta peptidoaren luzera izaten dituzte kontuan. Peptido liofilizatuak etanoletan (EtOH) disolbatu ziren. Erabilitako peptidoei buruzko xehetasunak **3.1 taulan** jaso dira.

**3.1 taula. Erabilitako peptidoei buruzko xehetasunak.**

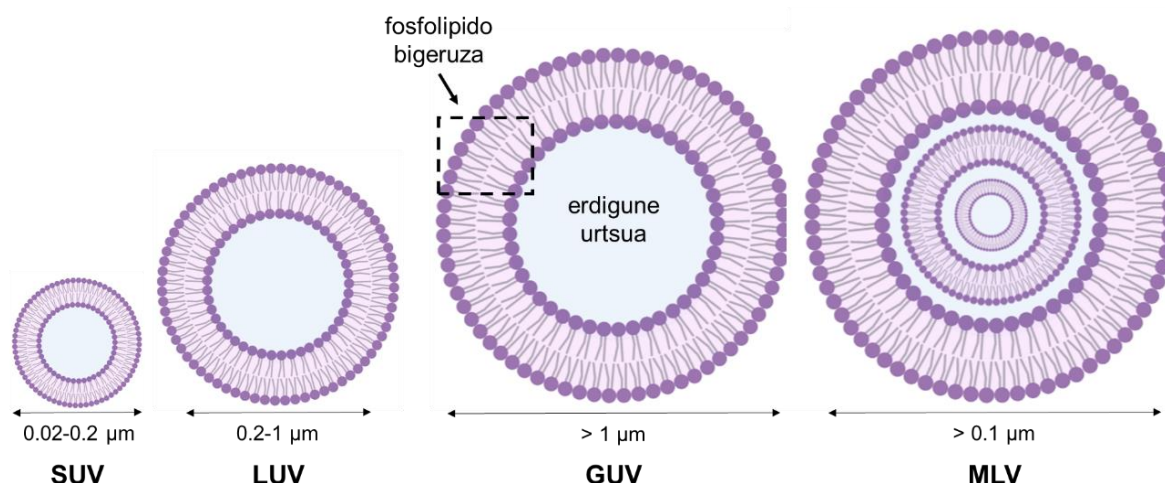
Izena	Mutazioa	Hondar kopurua	Mw (g/mol)	pI	z	Solugarritasuna H <sub>2</sub> O-n	Biltegitratzea
P454–484	-	31	3.268	14	+2,2e	txikia	EtOH
P454–487	-	34	3.628	14	+3,2e	txikia	EtOH
P454–487 <sup>F485A</sup>	F485A	34	3.552	14	+3,2e	txikia	EtOH
P454–487 <sup>Scr</sup>	481-487 nahasia	34	3.628	14	+3,2e	txikia	EtOH

Peptido sintetiko guztiak Genosphere Biotechnologies-i (Frantzia) erosi zitzaizkion, eta haien purutasuna (% 99) eta konposizioa alderantzizko faseko HPLC eta MALDIen masa-espektrometriaren bidez kontrolatu ziren. Peptidoek N-muturrean daude azetilo-talde bat eta C-muturrean amida-talde bat dituzte.

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

#### 3.3. LIPIDOETAN OINARRITUTAKO SISTEMA EREDUAK

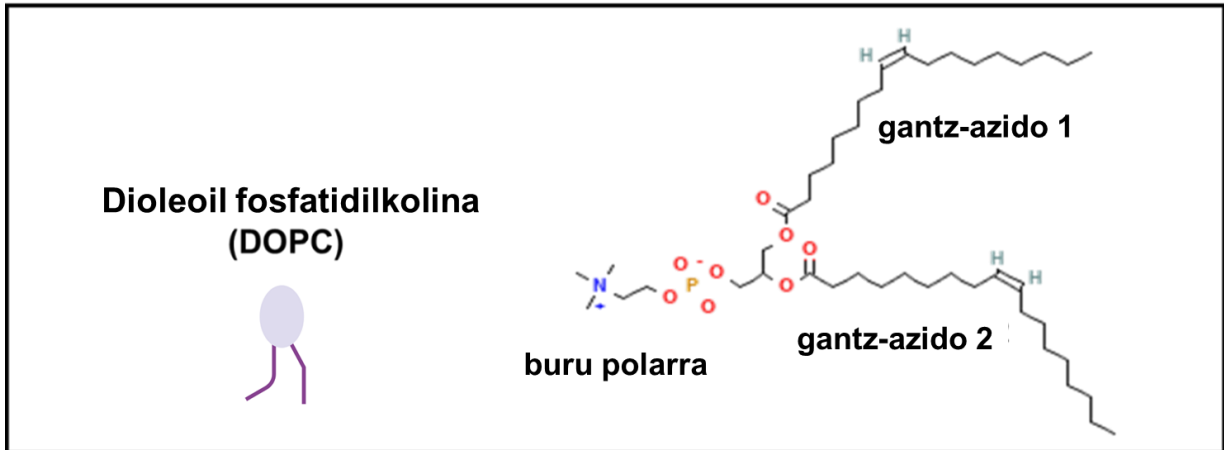
Mintz biologikoak oso sistema konplexuak dira eta konplexutasun horrek zaildu egiten du mintzaren osagai bakoitzaren propietateak eta portaera aztertzea. Beraz, nahiz eta mintz biologikoen bertsio oso sinplifikatuak izan, eta lortutako emaitzak ezin diren zuzenean sistema konplexuagoetara estrapolatu, mintzen inguruko ikerketak askotan sistema ereduetan oinarritzen dira. Lipidoetan oinarritutako sistema ereduak tamaina eta lamela-kopuruaren arabera sailka daitezke. Adibidez, lamela bakarreko besikulak geruza bikoitz lipidiko bakar batez osatuta daude (lipido bakar batez edo horien nahasketaz osatua), eta esfera bat osatzen dute. **3.1 irudian** ikus daitekeen bezala, hiru talde handitan sailka daitezke: lamela bakarreko besikula erraldoiak (ingelesez *giant unilamellar vesicles*, *GUV*), lamela bakarreko besikula handiak (ingelesez *large unilamellar vesicles*, *LUV*) eta lamela bakarreko besikula txikiak (ingelesez *small unilamellar vesicles*, *SUV*). Lamela bakarreko zenbait besikulak diametro desberdineko lamela anitzeko besikulak (*Multilamellar Vesicles*, *MLV*) eratzen dituzte. Kasu horretan, ur-geruza fin batek bereizten ditu lamelak.



**3.1 irudia. Liposomen oinarritutako egitura eta sailkapenaren irudikapen eskematikoa.** Irudian lipido-besikulak lamelartasunaren (unilamelarra eta multilamelarra) eta tamainaren arabera sailkatu dira (SUV 0.02–2 µm, LUV 0.2–1 µm eta GUV >1 µm). BioRender-en marraztutako irudia.

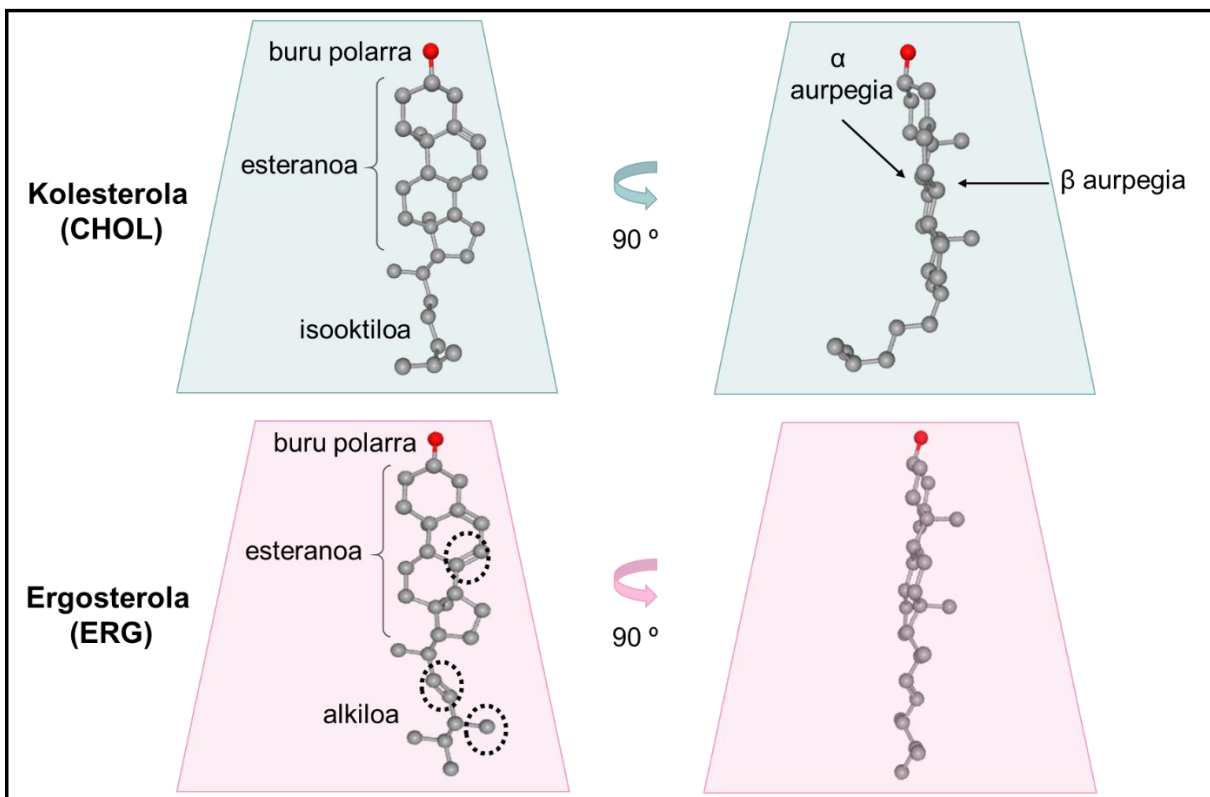
##### 3.3.1. Besikulak prestatzeko erabili diren lipidoen propietateak

DOPC purudun bigeruzak erabili ziren zelula mintzeko Ld *bulk* fase lipidikoa imitatzeko. **3.2 irudian** ikus daitekeenez, DOPC kate luzeko (18:1c9) azido oleiko asegabeak *sn-1* eta *sn-2* posizioetan txertatuta dituen PC bat da. Bere trantsizio tenperatura  $-16,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  da<sup>287</sup>. Sarri erabiltzen da, bakarrik edo beste osagai batzuekin, mizelak, liposomak eta bestelako mintz artifizialak sortzeko.



**3.2 irudia. DOPC-ren egitura.** Glizerol talde bat (beltzez), bi gantz-azido asegabe (azido oleikoak), fosfato taldea (laranjaz) eta kolina talde polarra (urdinez) (PubChem CID 6437081).

Kolesterolak eta haren antzeko ergosterolak antolamendu eta kondentsazio efektuak dituzte lipido-bigeruzetan<sup>23,288–290</sup>. Lan honetan, DOPC:CHOL (1:1 erlazio molarra) nahasteak erabili dira Lo faseko<sup>45</sup> SM/CHOL konplexuak *raft* nanodomeinuak<sup>51,291</sup> imitatzen. Azkenik, DOPC/CHOL eta DOPC/ERG zuten nahasteak (3:1 erlazio molarra), Ld motako fase bakarra adierazteko erabili ziren. **3.3 irudian** ageri dira egitura-desberdintasunak.



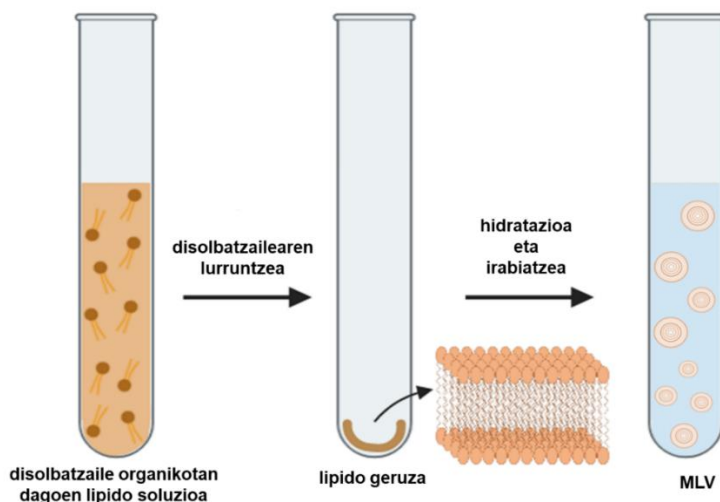
**3.3 irudia. Kolesterolaren eta ergosterolaren arteko egitura-desberdintasunak.** Ergosterolak (PubChem CID 444679) lotura bikoitz gehigarri bat dauka esteroide nukleoko eraztun batean eta lotura bikoitz bat eta metilo talde gehigarri bat dauzka alkilo albo-katean<sup>292</sup>.

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

#### 3.3.2. MLV-en prestaketa

Lipido-besikulak edo liposomak ur-disoluzio bat kapsulatzen duten bigeruzaz osatutako egitura lipidikoak dira. Berez sortzen dira lipido molekula anfifiliko zilindrikoak ur-disoluzioetan diluitzen direnean. Tratamenduaren arabera, lamela bat edo gehiago izan ditzakete.

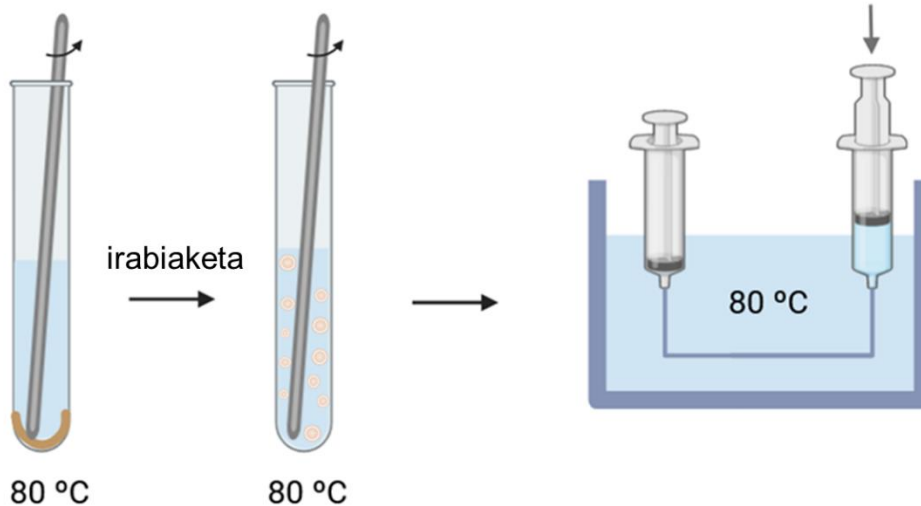
MLV-ak prestatzea da liposomak ekoizteko metodorik sinpleena eta azkarrena (**3.4 irudia**) Labur-labur, lipidoak Avanti Polar Lipids, Inc.-i (AL, AEB) erosi zitzaizkion. Amdisoluzioak kloroformo:metanoletan ( $\text{CHCl}_3$ :MetOH) (2:1 b/b) prestatu ziren. Lipidonahasteak zituzten alikuotak nitrogeno-gasaren ( $\text{N}_2$ ) fluxu konstantea erabiliz lehortu ziren. Disolbatzaile organikoen aztarnak 120 minutuko huts-ponpaketa bidez kendu ziren. Lipido filmak  $\sim 50^\circ\text{C}$ -ra zegoen 150 mM NaCl eta 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean berreseki eta 10 izozte- eta urtze-ziklo burutu ziren.



**3.4 irudia. MLV-ak prestatzeko metodoa.** Disolbatzaile organikoa lurrundu egin zen, eta gainerako geruza lipidiko lehorra ur-disoluzio batekin hidratatu zen, MLV-ak eratzeko. BioRender-en marraztutako irudia, ez dago eskalan.

Hala ere, fase-trantsizio tenperatura altua daukaten edo disolbatzeko zailtasunak dituzten lipidoz osatutako nahasketetan, DOPC:ERG (3:1 erlazio molarra) adb., lehortze- eta hidratazio-urratsak zertxobait desberdinak izan ziren (**3.6 irudia**). Zenbait muga metodologiko daude ergosterola fosfolipido asegabeekin nahastean, eta zailtasuna proportzionala da lotura-bikoitz kopuruarekiko<sup>293</sup>. Ergosterolaren solugarritasun muga fosfolipido bigeruzetan % 30–35 mol<sup>294</sup> da, hain zuzen, kontzentrazio altuagoetan kristal monoasegabeak eratzten ditu. DOPC:ERG (3:1 erlazio molarra) LUV-ak prestatzeko, lehenik, lipido lehorra huts ponpan utzi zen ON. Hidrataziorako,  $80^\circ\text{C}$ -an zegoen indargetzailea gehitu zen, apurka-apurka eta lagina

beirazko hagaxka batekin irabiatuz. Azkenik, disoluzio homogeneo bat lortzeko, besikulak 80 °C-an sartuta zegoen hodi estu batetik (0,5 mm-ko barne-diametroa, 10 cm-ko luzera) pasarazi ziren 100 aldiz, bi xiringa erabiliz.



**3.5 irudia. DOPC/ERG LUV-en prestakuntza-protokoloa.** Hidratazorako, 80 °C-an zegoen indargetzailea gehitu zen, apurka-apurka eta lagina beirazko hagaxka batekin irabiatuz. Azkenik, disoluzio homogeneo bat lortzeko, besikulak 80 °C-an sartuta zegoen hodi estu batetik (0,5 mm-ko barne-diametroa, 10 cm-ko luzera) pasarazi ziren 100 aldiz, bi xiringa erabiliz. BioRender-en marraztutako irudia, ez dago eskalan.

#### 3.3.2.1. LUV-en prestaketa

LUV-ak mintz sistema eredu gisa erabili izan dira askotan, tamaina dela eta, SUV-ek baino kurbadura-estres txikiagoa dutelako. Oro har, zenbait lipido espezie dituzten LUV-ak prestatzen direnean, bi monogeruzen artean lipido banaketa homogeneoa lortzen da.

LUV-ak estrusio mekanikoko metodoari jarraituz prestatu ziren Lipex estrusio-makina batekin (Avanti Polar Lipids, Inc., AL, AEB)<sup>295</sup>. MLV laginak 100 nm-ko poro-tamainako bi polikarbonatozko mintz metaturen artetik (Whatman polikarbonatozko mintz-iragazkiak, 0,1 µm, GE Healthcare, IL, AEB) pasarazi ziren LUV-ak sortzeko.

#### 3.3.2.2. SUV-en prestaketa

Lan honetan, 0,5 % mol Rho-PE zuten DOPC:CHOL (1:1 erlazio molarra) konposiziodun SUV-ak CyaA zuten proteoliposomak prestatzeko erabili ziren, ondoren cryo-EM bidez neurtzeko. Gainberotzea eta laginen degradazioa saihesteko, **3.2.2 protokoloan** deskribatu bezala prestatutako MLV-ak bainuan sonikatu (RT, 60 min) eta 15 izozte-urtze ziklo egin zitzaizkien SUV-ak sortzeko.

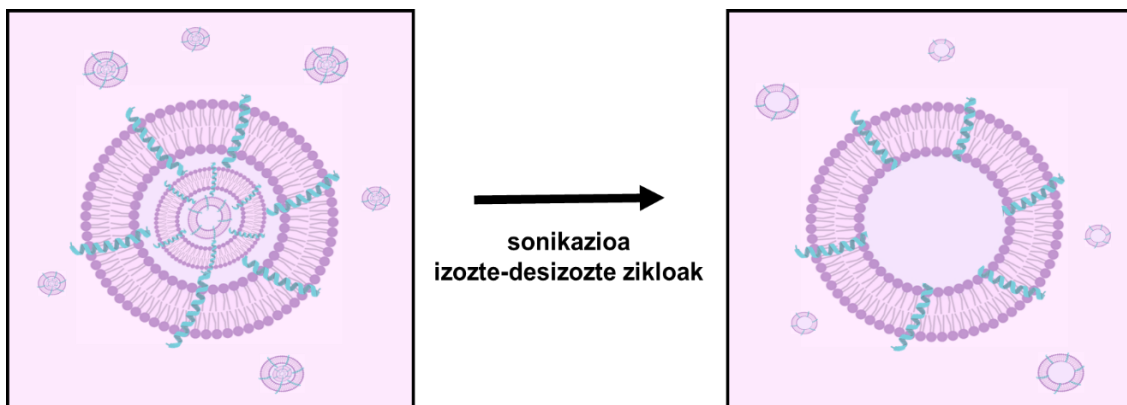


### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

#### 3.3.2.3. Peptidoen errekonsituizioa mintzetan

Mintzeko proteinen azterketa burutzea oso zaila izan daiteke, oro har, ur disoluzioan agregatzeko joera izaten baitute. Horrexegatik, hain zuzen ere, proteina horiek mintz ereduetan txertatzeak haien jatorrizko ingurunearen antzeko medio batean aztertzeak balio du. Lan honetan, lipido-peptido formulazioak prestatu ditugu Torralba eta kideek<sup>296</sup> garatutako protokoloa jarraituz.

Peptidoen errekonstituzio metodoak peptido eta lipido disoluzio homogeen bat oinarri hartuta, polipeptido ia guztia liposomekin lotuta egotea ziurtatzen du. Lehenbizi, alde aurretik disolbatzaile organikotan prestatutako lipido eta peptido kantitate egokiak nahastu ziren. Erabilitako peptido kontzentrazioa 2 mg/ml izan zen (peptido:lipido erlazio molarra 1:50). Disolbatzaile organikoaren azterketa kentzeko, nahasketa N<sub>2</sub> korrante baten azpian lehortu zen, eta ondoren 120 minutuko huts-ponpaketa egin zen. Jarraian, peptidodun besikulak sortzeko, film lipidiko lehorrak 50 °C-an zegoen 150 mM NaCl eta 20 mM HEPES-NaOH, pH 7,4 indargetzailea erabiliz hidratatu ziren. Geruza bakarreko besikulak sortzeko, MLV-ak bainuan sonikatu ziren (RT, 60 min) eta 15 izozte-urtze-ziklo egin ziren (**3.6 irudia**). Azkenik, laginak liofilizatu egin ziren.



**3.6 irudia. Lipido-peptido formulazioak (LPF) eratzeko protokoloa.** Lipido eta peptidoak modu homogeen nahasi (1:50 peptido:lipido erlazio molarra) eta lehortu ziren, disolbatzaile organikoak desagerrarazteko. LPF-ak eratzeko, film lehorrak 150 mM NaCl eta 20 mM HEPES-NaOH, pH 7,4 indargetzailean berreseki ziren, 50 °C-an. Ondoren, laginak sonikatu ziren (60 min, RT) ur-bainuan. Azkenik, 15 izozte-urtze ziklo egin eta lagin guztiak liofilizatu ziren. BioRender-en marraztutako irudia, ez dago eskalan.

DOPC eta DOPC/CHOL nahastedun (9:1, 3:1, 2:1 eta 1:1 erlazio molarrak) besikulak prestatu ziren. LPF-ez gain, lipidorik gabeko bi lagin prestatu ziren. Bata, lehortu eta indargetzaile

urtsuan berresakitako peptidoari dagokio; bigarrena, aldiz, % 25 (b/b) 2,2,2-trifluoroetanolarekin (TFE,) nahastu, lehortu eta indargetzailean disolbatutako peptidoari.

#### 3.3.3. Fosfolipido-kontzentrazioaren determinazioa

Liposoma-esekiduretan zegoen fosfolipidoen kontzentrazioa zehazteko fosforo ez-organikoa neurtu zen<sup>297</sup>, Fiske-Subbarow metodo kolorimetrikoa erabiliz. Horretarako, temperatura altuetan gertatzen den fosfolipidoen hidrolisia gauzatu zen. Fosfato libreak zenbait errektibo espezifikoekin erreakzionatzean sortutako produktu koloreztatua neurtu zen, hasierako fosfato kontzentrazioaren arabera dena.

Alde batetik, gure laginetan zegoen lipido kontzentrazio zehatza lortzeko,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  erabiliz kalibratio-zuzena eraiki zen. Fosfolipidoen hidrolisirako, laginak 500  $\mu\text{l}$  (% 70 b/b) azido perklorikorekin ( $\text{HClO}_4$ ) nahastu eta 45 minutuz inkubatu ziren 205 °C-tan. Inkubazio-aldia bukatutakoan, laginak hoztu ziren (RT), eta 4 ml amonio heptamolibdato disoluzio (2,2 g/l  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  eta 143 ml/l azido sulfuriko (% 95–98 (b/b)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,)) eta 500  $\mu\text{l}$  (% 10 (b/b)) azido askorbiko gehitu ziren. Fosfato-taldeek molibdatoarekin erreakzionatzen dute lehenik eta azido askorbikoarekin gero, eta produktu horixka bat sortzen dute. Hodiak 10 minutuz irakin ondoren, laginek urdin kolorea hartzen dute, hasierako fosforo-kantitatearen arabera. Lagina hoztu ondoren, xurgapena neurtu zen 812 nm-ra. Laginen fosfolipido-kontzentrazioa lortzeko, estandarren absorbantzia vs. fosforo-kontzentrazioa irudikatu eta lerro zuzen batera doitu zen. Laginaren fosforo-kontzentrazioa kalkulatzeko, laginen xurgapen balioak eta kalibratio-zuzenean ordezkatu ziren.

#### 3.3.4. Besikulen tamainaren zehaztapena

Argiaren sakabanatze dinamikoa (ingelesez *dynamic light scattering*, DLS) esekiduretako partikulen tamaina estimatzeko teknika zehatza da. Horretarako, partikulen mugimendu Browndarreen oinarritzen da. Hau da, likido batean, partikula txikiak handiak baino azkarrago mugitzen dira eta beraz, partikulen abiadura neurtuz gero, erradio hidrodinamikoa ( $R_h$ ) kalkulatu daiteke, Stokes-Einsteinen ekuazioa erabiliz:

$$D = \frac{K_B \cdot T}{6 \pi \cdot \rho \cdot R_h}, \quad (3.1 \text{ Ek.})$$

non D difusio-koefizientea baita,  $K_B$  Boltzmann-en konstantea, T temperatura eta  $\rho$  ingurunearen biskositatea. DLS-ak lagin-bolumen txiki batean, denboran zehar banatutako argi-fluktuazioetatik erauzten du informazioa. Argi sorta batek partikulen esekidura bat

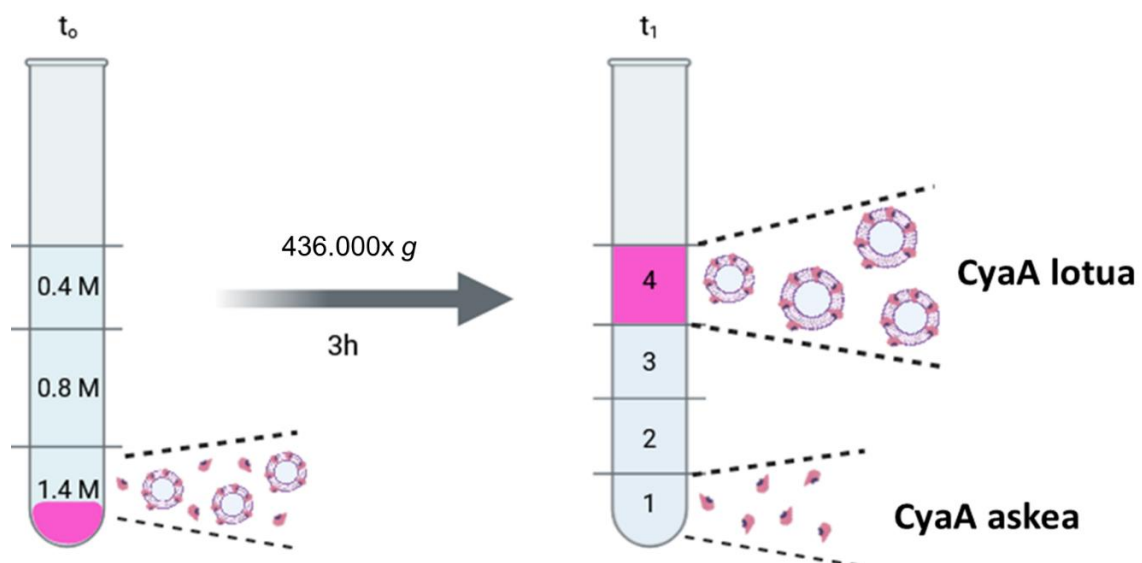
### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

zeharkatzen duenean barreiatutako argi intentsitateak neurtzen dira. Horretarako, laser izpiarekiko perpendikularki kokatuta dagoen fotomultiplikatzailer batek sakabanatutako argia detektatzen du. Detektatutako argi intentsitate horiek korrelazio-funtzio bat ematen dute eta zenbait algoritmo erabiliz, esekidurako partikulen tamainaren arabera banaketa estimatu daiteke. Horrez gain, polidispersio-indizeak (PDI, 0–1) partikulen tamaina homogeneoa den ala ez adierazten du. Esate baterako, soluzio homogeneoei zerotik hurbil dauden balioak dagozkie.

Tesi honetan buruturiko DLS neurketak, Malvern Zeta-Sizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Erresuma Batua) aparatuan egin dira 0.6 nm eta 6  $\mu\text{m}$  bitarteko tamainetarako detekzio heinarekin eta 5 mW-eko He-Ne laser izpiarekin ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ).

#### 3.3.5. Sakarosa gradiente bidezko besikulen flotazioa

Proteoliposomen flotazioak proteina bat mintzari modu eraginkorrean lotu zaion frogatzeko balio du (**3.7 irudia**). Besikulen flotazio-entseguak<sup>298</sup> % 0,5 mol Rodamina-PE (Rho-PE, Avanti Polar Lipids, Inc., AL, AEB) duten liposomekin egin ziren, sakarosa-gradienteetan. Lagin bakoitzeko 125  $\mu\text{l}$  doitu zitzaion 1,4 M-eko sakarosa-kontzentrazioari, 300  $\mu\text{l}$ -ko bolumenean. Ondoren, sakarosa 0,8 M eta 0,5 M zituzten 400  $\mu\text{l}$  eta 300  $\mu\text{l}$ -ko bi geruza gainjarri ziren, hurrenez hurren. Gradientea 436.000x g-ra zentrifugatu zen 4 °C-an, 180 minutuz, TLA 120.2 errotorean (Beckman Coulter, CA, AEB). Zentrifugazioaren ondoren, 250  $\mu\text{l}$ -ko lau frakzio jaso ziren. Hodei atxikitako materiala 250  $\mu\text{l}$  % 1 (b/b) SDS beroarekin (100 °C) garbitu eta bosgarren frakzioan jaso zen.



**3.7 irudia. CyaA-ren mintz-txertaketaren analisia besikulen flotazioaren bidez.** Proteoliposomak sakarosa-gradientean ( $t_0$ ) kargatu eta 436.000x  $g$ -ra zentrifugatu ziren 180 minutuz. Dentsitate desberdineko lau frakzio jaso ziren ( $t_1$ ) eta jarraian, 100°C-an zegoen SDS % 1-ean (b/b) gehitu zen hodie atxikitako materiala 5. frakzioan jasotzeko. LUV-ak (proteinadunak nahizgabeak) 4. frakzioan egongo lirateke. Bestalde, proteina askea 1. eta 5. frakzioetan egongo litzateke. BioRender-en marraztutako irudia.

Frakzio guztiak % 8,5 Bis-Tris SDS-PAGE geletan kargatu ziren eta Coomassie urdinez tindatu ziren proteina detektatu ahal izateko. Liposomak Rho-PE fluoreszentsia neurtuz monitorizatu ziren ( $\lambda_{ex} = 560 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 570\text{--}640 \text{ nm}$ ).

Geletako banden dentsitometria ImageJ softwarea<sup>299</sup> (NIH, MD, AEB) erabiliz egin zen. Besikulei lotutako proteina-ehunekoa (%) kalkulatzeko, 3. eta 4. frakzioetan neurtutako banda-intentsitatea frakzio guztietan neurtutako banden intentsitateen baturarekiko erlatibizatu zen. Besikulekin batera flotatutako proteina-ehunekoa ez gainestimatzeko, liposomarik gabeko proteina askea kargatu zen sakarosa gradientean. 3. eta 4. frakzioan atzemandako proteina-ehunekoa (% ~10) kendu zitzaion esperimentuan neurtutako lotura-ehunekoari.

#### *3.3.5.1. CyaA-ren txertaketa konposizio desberdinetako besikuletan*

Laburtuz, 750 nM CyaA eta % 0,5 mol Rho-PE-rekin markatutako LUV-ak (DOPC, DOPC:CHOL (3:1 eta 1:1 erlazio molarra) edo DOPC:ERG (3:1 erlazio molarra) inkubatu ziren (1:2.000 proteina-lipido erlazio molarra), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> eta 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 indargetzailean, 37 °C-an, 30 minutuz. Jarraian sakarosa gradientea prestatu zen, besikulei lotutako eta lotu gabeko proteina askea ultrazentrifugazioz bereizteko (**3.3.5 protokoloa** jarraituz). Gutxienez hiru esperimenteren arteko batezbestekoak eta desbideraketa estandarrak kalkulatu ziren.

#### *3.3.5.2 CyaA proteina mutanteen txertaketa kolesteroldun besikuletan*

CyaA toxina mutanteek % 0,5 mol Rho-PE-rekin markatutako DOPC eta DOPC:CHOL (1:1 erlazio molarra) konposizioko besikuletara batzeko duten gaitasuna zehaztu zen **3.3.5.1 protokoloan** deskribatu bezala. Gutxienez hiru esperimenteren arteko batezbestekoak eta desbideraketa estandarrak kalkulatu ziren.

#### *3.3.5.3. CyaA eta kolesterolaren arteko lotura inhibitzea peptido sintetikoak erabiliz*

5  $\mu\text{M}$  peptido eta % 0,5 Rho-PE-rekin markatutako DOPC:CHOL (1:1 erlazio molarra) liposomak elkarrekin inkubatu ziren 25 °C-an, 10 minutuz. Jarraian, 750 nM CyaA gehitu zen, proteina:lipido arteko erlazio molarra 1:2.000 izanik, eta 37 °C-an inkubatu zen 30 minutuz. Laginak sakarosa gradientean kargatu ziren eta lotutako proteina-ehunekoak **3.3.5**

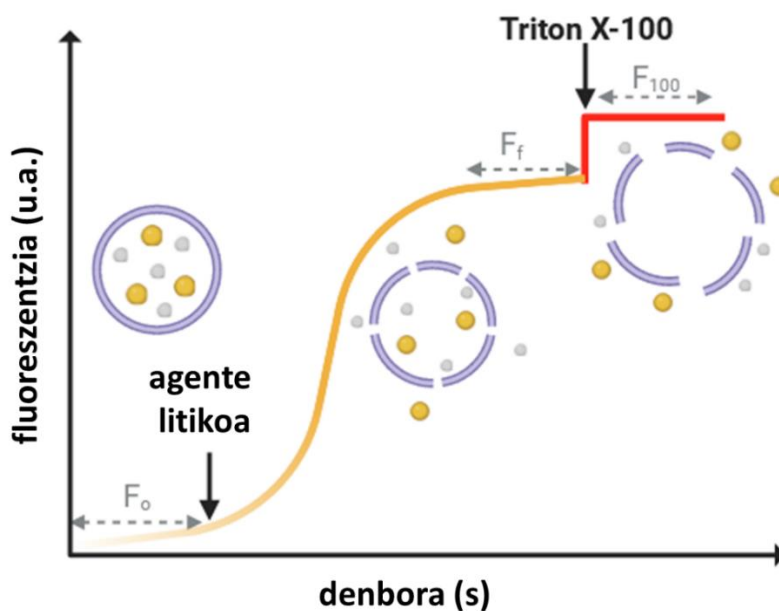
### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

**protokoloan** deskribatu bezala kalkulatu ziren. Gutxienez hiru esperimenteren arteko batezbestekoak eta desbideraketa estandarrak kalkulatu ziren.

#### 3.4. ESPEKTROSKOPIA-TEKNIKAK

##### 3.4.1. Askapen-saiakuntzak

Entsegu honetan liposomen barruan kapsulatutako edukien askapena aztertu zen. Horretarako, barruan ANTS koloratzaile polianionikoa (8-aminonaftaleno-1,3,6-azido trisulfonikoa, gatz disodikoa) eta DPX amatatzaile kationikoa (p-xileno-bis-piridinio bromuroa) (Thermo Fisher Scientific, MA, AEB)<sup>300</sup> zituzten liposomak prestatu ziren. Laburbilduz, bi molekula horiek batera kapsulatzen direnean, DPX-k ahuldu egiten du ANTS-ren fluoreszentsia. Hala ere, agente litiko bat gehitzeak besikulak iragazkortuko lituzke, eta ANTS eta DPX molekulak kanpo mediora askatuko liriateke. ANTS eta DPX medioan barreiatzean, fluoreszentsia-emisioa handitu egiten da (**3.8 irudia**).



**3.8 irudia. Agente litiko batek eragindako askapen-saiakuntzaren adierazpen eskematikoa.** DPX kapsulatuak ANTS-ren fluoreszentsia amatatzen du. Hala ere, agente litiko bat gehitzeak besikulak iragazkor bihurtuko lituzke, ANTS eta DPX molekulak ingurunean askatuz. Diluzio-efektua fluoreszentsia-igorpenaren handitze gisa neurtuko litzateke. BioRender-en marraztutako irudia.

DOPC eta DOPC:CHOL (1:1 erlazio molarra) konposiziodun liposomak 70 mM NaCl, 12,5 mM ANTS, 45 mM DPX eta 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean prestatu ziren, **3.3.2.1 atalean** zehaztu bezala. Kapsulatu-gabeko koloratzaile eta amatatzaileak ezabatzeke, lagina Sephadex G-75 PD-10 erretxina-zutabe batetik pasatu eta 150 mM NaCl eta 20 mM Tris-HCl,

pH 8,0 indargetzailean jaso zen. Lipidoen kontzentrazioa eta besikulen tamaina **3.3.3** eta **3.3.4 ataletan** deskribatzen den moduan zehaztu ziren.

Askapen-zinetikak 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> eta 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean burutu ziren, 37 °C-an eta 30 minutuz. Bai kitzikapen- bai emisio-monokromagailuak 5 nm-tan finkatu ziren eta ANTS-ren fluoreszentsia FluoroLog-3 espektrofluorimetroarekin (Horiba, Japonia) erregistratu zen ( $\lambda_{ex} = 355$  nm;  $\lambda_{em} = 520$  nm) 30 minutuz eta etengabe irabiatuz. Askapen-ehunekoak honela kalkulatu ziren :

$$Askapena (\%) = \frac{(F_f - F_0)}{(F_{100} - F_0)} \times 100, \quad (3.2 \text{ Ek.})$$

non  $F_0$ ,  $F_f$  eta  $F_{100}$  fluoreszentsia-intentsitateak izan baitziren, ezer gehitu aurretik, toxina gehitu ondoren eta Triton X-100 xaboa gehitu ondoren. Zinetika hasi eta hurrengo 60 segundoetan gehitu zen toxina; % 0,1 (b/b) Triton X-100, berriz, azken 60 segundoetan gehitu zen.

#### *3.4.1.1. Kolesterola erabiltzea CyaA-k eragindako besikulen iragazkortasuna inhibitzeko*

200 nM CyaA inkubatu ziren 0, 0,2 eta 2  $\mu$ M kolesterol kontzentrazioekin (aldeztatik aurretik EtOH-n disolbatua), 10 minutuz. Kontrolei dagokienez, proteina inhibizio entseguan erabilitako EtOH bolumen berdinarekin inkubatu ziren. Ondoren, nahasketa hori ANTS/DPX molekular betetako 100  $\mu$ M DOPC eta DOPC:CHOL (1:1 erlazio molarra) konposizioko LUV-ei gehitu zitzaion. Fluoreszentsia-datuak 30 minutuz jaso ziren (**3.4.1 protokoloa**).

#### *3.4.1.2. Peptidoak erabiltzea CyaA-k eragindako besikulen iragazkortasuna oztopatzeko*

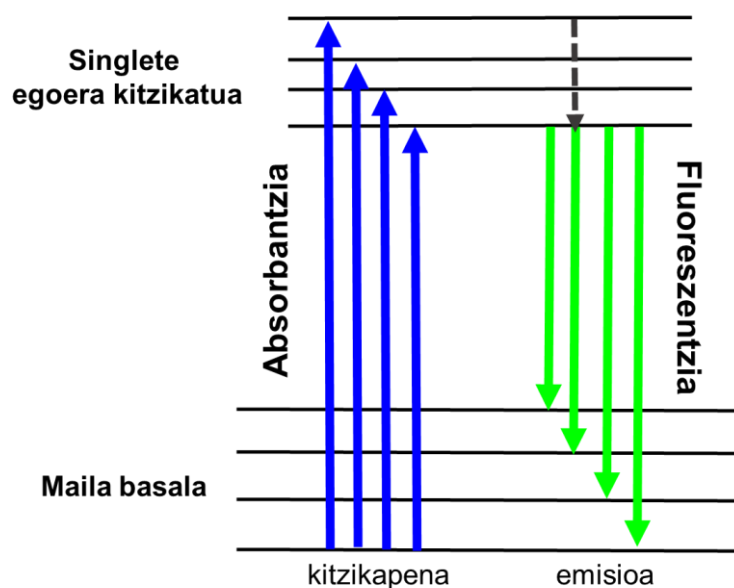
100  $\mu$ M DOPC eta DOPC:CHOL (erlazio molarra 1:1) LUV eta 1  $\mu$ M peptido inkubatu ziren 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> eta 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean, 25 °C-an 10 minutuz. Kontrolei dagokienez, LUV-ak inhibizio entseguan erabilitako EtOH bolumen berdinarekin inkubatu ziren. Jarraian, 50 nM CyaA gehitu ziren eta beste inkubazio bat egin zen 30 minutuz 37 °C-an. Askapen-zinetika **3.4.1 protokoloan** deskribatu bezala neurtu zen.

### **3.4.2. Triptofanoaren intrintseko fluoreszentsia-espektroskopia**

Fluoreszentsia-espektroskopiak molekular energia-maila handiago batera kitzikatu ondoren igorritako argiaren uhin-kantitatea eta luzera neurtzen ditu. Ia fluoreszentsia guztia kitzikapen elektronikoaren maila baxuenean gertatzen da, egoera kitzikatuan dauden molekulek elkarren artean talka egitean, bibrazio-energiaren zati bat galdu eta egoera kitzikatuko bibrazio-mailarik baxuenera itzultzen baitira. Kitzikapen mailatik maila basalera pasatzeko, soluzioan dauden

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

molekulek bide ez-erradiatiboen bidez galdu ohi dute energia, besteak beste, argia igorritz, eta egoera basalera itzultzen dira<sup>301,302</sup> (**3.9 irudia**).



**3.9 irudia. Fluoreszentziaren oinarriko printzipioak.** Argi-izpi erasotzaileak molekula bat bibrazio-energiaren egoera handiago bat edo batzuk hartzera bultzatzen dezake, egoera kitzikatuaren daudenak barne. Molekula horiek beste molekula batzuekin talka egitean, bibrazio-energiaren zati bat galdu egiten da egoera kitzikatuko bibrazio-mailarik baxuenera itzuli arte. Azkenik, kitzikatutako egoeratik maila basalera igarotzean fotoiak igortzen dira uhin-luzera konkretuetan. Uhin-luzera hori elektroiek maila basalera itzultzean betetzen duen bibrazio-egoeraren arabera da<sup>303</sup>. Beraz, fotoien emisio-intentsitatea uhin-luzeraren arabera aldatzen da, eta igorritako argiak argi-izpi erasotzaileak baino uhin-luzera handiagoa du<sup>302</sup>.

Proteinen biokimikan, fluoreszentzia-espektroskopia proteinen (des)tolesdura, konformazio-aldaketa, lotura eta elkarrekintzak monitorizatzeko erabiltzen da. Esate baterako, ohikoa da aminoazido aromatikoaren, hala nola triptofanoaren, tirosinaren edota fenilalaninaren, kitzikapenetik sortzen den proteinen fluoreszentzia intrintsekoa neurtzea<sup>301,304</sup>. Triptofanoaren fluoreszentzia emisioa da gehien neurtzen dena; izan ere, proteinek, oro har, triptofano gutxiago dituzte tirosina eta fenilalanina hondarrak baino, eta, beraz, informazio lokal espezifikoak lor daitezke triptofanoa modu selektiboan kitzikatuz ( $\lambda_{ex} \geq 295 \text{ nm}$ )<sup>301</sup>. Triptofanoaren kitzikatutako egoeraren dipolo-momentua nahiko handia denez ( $\sim 6 \text{ D}$ )<sup>305</sup>, emisio-energia oso sentikorra da tokiko ingurune polaritate-aldaketekiko, eta, hortaz, ligando lotura zehazteko besteko sentikorra da<sup>301</sup>.

#### 3.4.2.1. Triptofanoaren fluoreszentzia-titulazioak

Kolesterola eta peptidoen arteko lotura afinitatea zehazteko, Fluorolog-3 espektrofluorimetroa (Horiba, Japonia) erabili zen, 25 °C-an zegoen Peltier-termostatoa zeukana. 295 nm-ko uhin-

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

luzeran kitzikatu ziren laginak eta emisioa 300–400 nm artean jaso zen, 5 nm-ko kitzikapen- eta emisio-zirrikituak erabiliz. Kolesterolarekin nahastutako eta kolesterolik gabeko (0–1  $\mu\text{M}$ ) 10  $\mu\text{M}$  peptidoren fluoreszentsia emisio-espektroak neurtu ziren 150 mM NaCl, % 0,004 Tween-20 eta 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailea erabiliz. Gutxienez hiru neurketaren batezbestekoa eta desbideraketa estandarra erabili dira.

Alde batetik, argiaren sakabanaketa zuzentzeko, lagin bakoitzeko fluoreszentsia espektroei zegokien kolesterol kontzentrazioaren espektroa kendu zitzaien. Horrez gain, diluzio efektua zuzentzeko kontrolak egin ziren, 10  $\mu\text{M}$  peptidoren gainean disolbatzailea gehitu zen eta laginei zegokien fluoreszentsia intentsitateak diluzio faktore bakoitzarekin biderkatu ziren. 340 nm-ko fluoreszentsia intentsitate erlatiboak ( $F_0/F_i$ )<sub>340 nm</sub> kalkulatu ziren,  $F_0$  eta  $F_i$  kolesterolik gabeko eta kolesterol kontzentrazio bakoitzarekin inkubatutako peptidoaren fluoreszentsia intentsitateak izanik.

#### 3.4.2.2. Peptidoen partizioa mintzetan

Triptofanoa erreportari gisa erabil daiteke, haren ingurumen-aldaketa jarraituz proteina edo peptido baten mintzeko partizioa neurtu baitaiteke<sup>306</sup>. Saiakuntza honetan, 10  $\mu\text{M}$  peptidoren gainean 0–2 mM DOPC eta DOPC:CHOL (1:1 erlazio molarra) LUV gehitu ziren. Fluoreszentsia-titulazioak FluoroLog-3 espektrofluometroarekin (Horiba, Japonia) neurtu ziren, 25 °C-an zegoen Peltier zelula-euskarri termostatudunarekin. Peptidoak 150 mM NaCl eta 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean disolbatu ziren. 295 nm-ko kitzikapen uhin-luzera erabili zen eta emisioa 310–400 nm artean erregistratu zen, 5 nm-ko kitzikapen- eta emisio-zirrikituak erabiliz. **3.4.2.1 atalean** zehaztu bezala zuzendutako espektroetatik 330 nm eta 370 nm-ko uhin-luzeran neurtutako fluoreszentsia-intentsitateen arteko erlazioa ( $F_{330}/F_{370}$ ) kalkulatu zen. Gutxienez hiru esperimenteren arteko batezbestekoa eta desbideraketa estandarrak irudikatu dira.

Triptofanoaren fluoreszentsia intrintsekoaren aldaketak peptidoen disoluziotik mintzerako partizio energia aztertzeko erabili ziren<sup>307,308</sup>. Frakzio molarraren partizio-koefizientea ( $K_x$ ), mintzean eta soluzioan dauden peptido-kontzentrazioen arteko proportzio gisa definitzen da:

$$K_x = \frac{[P]_{bil}/[L]}{[P]_{water}/[W]} \quad (3.3 \text{ Ek.})$$

Gure baldintzetan  $L \gg P_L$  eta  $W \gg P_W$  denez,  $K_x$  honela kalkula daiteke:



### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

$$K_x = \frac{P_L}{P_W} \cdot \frac{[W]}{[L]}, \quad (3.4 \text{ Ek.})$$

non  $P_w$  eta  $P_L$  ur-fasean eta lipido-fasean dagoen peptidoari dagozkion, hurrenez hurren;  $W$  eta  $L$  uraren eta lipidoaren kontzentrazio molarrek dira, hurrenez hurren<sup>309</sup>. Partizio esperimentuetan uraren kontzentrazio molarra beti da  $W = 55.5 \text{ M} \gg [P]_{\text{ura}} (25 \text{ }^\circ\text{C-an})$ .

Peptidoaren partizioa lipido fasean ondoko frakzioaren bidez adierazi daiteke (3.5 Ek.):

$$f_{PL} = \frac{P_L}{P_T} = \frac{1}{1 + \left(\frac{W}{LK_x}\right)^n}, \quad (3.5 \text{ Ek.})$$

non  $n$  Hill-en koefizientea den kooperatibitate kasuetan eta  $P_T = P_w + P_L$ .  $K_x$  estimatzeko datu esperimentalei **3.6 ekuazioa** doitu zitzaien. Horretarako, lehenbizi  $F_{330}/F_{370}$  erlazio erlatiboak kalkulatu ziren:

$$F_{330/370} \text{ erl.} = \frac{(F_i - F_0)_{330/370}}{(F_s - F_0)_{330/370}}, \quad (3.6 \text{ Ek.})$$

non  $F_0$  soluzioan dagoen peptidoari dagokion  $F_{330}/F_{370}$  fluoreszentsia erlazioa den,  $F_i$  liposoma-kontzentrazio espezifiko bakoitzari dagokiona, eta  $F_s$  saturatutako liposoma kontzentrazioari (2 mM) dagokiona. Azkenik GraphPad Prism 8.3.0 softwarean (GraphPad Software, La Jolla, CA, AEB) karratu txikiaren kurben doikuntza ez-linealaren prozedura erabili zen.

Partizio-koefizientea eta itxurazko disoziazio-konstantea erlazionatuta daude:

$$W = K_x \cdot K_D \quad (3.7 \text{ Ek.})$$

Partizio-koefizientea kalkulatu ostean, peptidoa uretik mintzera transferitzeko energia aske estandarra ( $\Delta G$ , kcal/mol) estimatu zen:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln(K_x), \quad (3.8 \text{ Ek.})$$

non  $R = 1.98 \times 10^{-3} \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$  eta  $T$  temperatura den Kelvinetan.

Azkenik, datuak masa-zentro espektrala (ingelesez *center of mass*, CM) kalkulatu<sup>306</sup> ere aztertu ziren. CM-k espektratu osoaren batezbesteko uhin-luzerari buruzko informazioa ematen du, eta emisio-espektraren forma- eta zabalera-aldaketekiko sentikorra da<sup>310,311</sup>. CM W458 hondarraren ingurunea zein den aztertzeko erabili da. Horretarako informazioa espektraren 310–400 nm tartetik jaso da<sup>310,311</sup>. Honela kalkulatu zen<sup>306</sup>:

$$CM = \frac{\sum_1^n I_i \cdot \lambda_i}{\sum_1^n I_i}, \quad (3.9 \text{ Ek.})$$

non  $I_i \lambda_i$  uhin-luzeran neurtutako fluoreszentszia intentsitatea den.

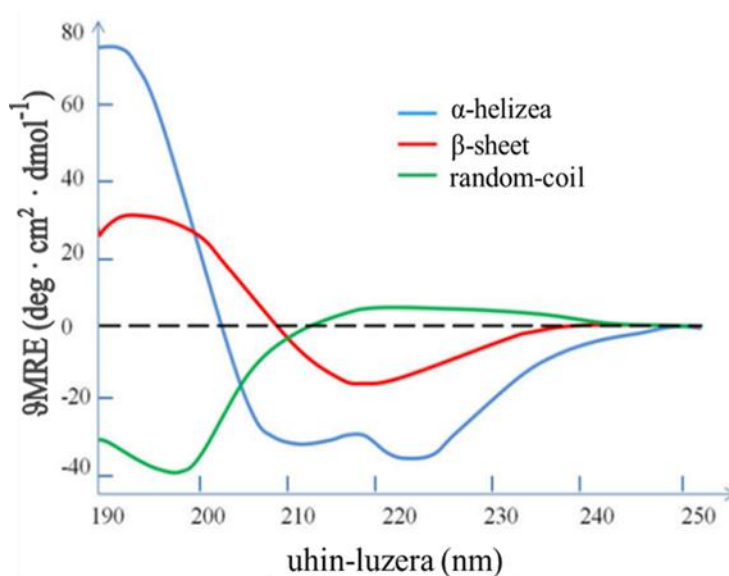
#### 3.4.3. Dikroismo zirkularreko espektroskopia (CD)

Dikroismo zirkularreko espektroskopia (ingelesez *circular dichroism spectroscopy*, CD) oso metodo azkarra eta sentikorra da disoluzioan dagoen proteina baten egitura sekundario eta tertziarioa aztertzeko, baita biomolekulen konformazioan eta egonkortasunean gertatzen diren aldaketak ikertzeko ere<sup>312,313</sup>. CD argiaren absortzioan oinarritzen da; izan ere, kromoforo batek ingurune asimetriko batean zirkularki eskuinerantza eta ezkererantza polarizatutako argiaren arteko absortzio diferentzia neurtzen du<sup>312</sup>. Absortzio diferentzia eliptikotasun molarreko unitateak erabiliz adierazi daiteke ( $\theta_{\text{MRE}}$ , deg·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>). Esan bezala, CD absortzioari lotuta dagoenez, kromoforoek kiralak izan behar dute edo ingurune asimetrikoan egon behar dute CD seinalea sortzeko. Esate baterako, proteina-kromoforoen artean lotura peptidikoa da CD-aren urruneko UV seinaleari (250 nm-tik behera, 220–190 nm arteko absorbantziekin) ekarpen handiena egiten diona. Hala ere, amida taldeak edota tirosinaren, triptofanoaren, histidinaren eta metioninaren albo kateen ekarpena ere egon daiteke uhin-luzera hauetan. Horrez gain, absortzioaren ondoriozko trantsizio elektronikoen uhin-luzera eta intentsitatea elektroiek espazioan duten kokapenaren arabera izango da, eta honek, proteinaren egituraren inguruko informazioa eskainiko du.

Proteinetan egitura sekundarioa duten motiboek CD urruneko UV espektroak ematen dituzte (**3.10 irudia**). Adibidez,  $\alpha$ -helizedun proteinek 222 nm-ko eta 208 nm-ko banda negatiboak dituzte, eta 193 nm-ko banda positiboa.  $\beta$ -orri antiparaleloek 218 nm-ko banda negatiboa eta 195 nm-ko banda positiboa dituzte. Azkenik, proteina desordenatuek ohiko *random-coil* espektroa dute, 210 nm-ko eliptikotasun baxuarekin eta 195 nm inguruko banda negatibo indartsuarekin. Teknika honen abantaila nagusiak neurketetan behar den molekula kopuru txikia eta datuen analisi sinplea dira. Bestalde, proteinek soluzioan egon behar dute eta hori muga izan daiteke mintz-proteinak haien jatorrizko ingurunean aztertu nahi badira.

Lan honetan, peptidoen egitura sekundarioa aztertu da alde batetik mintz-lipidikoak imitatzen dituen ingurune apolar batean (TFE) eta bestetik, liposometan. Neurketak Peltier bidez kontrolatutako Jasco J-810eko espektropolarimetriko batean egin ziren. Aparatua sarri kalibratzen da azido (1 S)-(+)-10-camforsulfoniko, amonio-gatzarekin.

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK



**3.10 irudia. CD erreferentzia-espektraok % 100 egitura sekundario bakoitzerako.**  $\alpha$ -helizedun proteinek (lerro urdina) 222 nm-ko eta 208 nm-ko banda negatiboak dituzte, eta 193 nm-ko banda positiboa.  $\beta$ -orri antiparaleloek (lerro gorria) 218 nm-ko banda negatiboa eta 195 nm-ko banda positiboa dituzte. Proteina desordenatuek (lerro berdea) *random coil*-aren ohiko espektra dute, 210 nm-ko eliptikotasun baxuarekin eta 195 nm inguruko banda negatibo indartsuarekin<sup>313</sup>. Wei eta kideengandik egokitua<sup>314</sup>.

100  $\mu$ M peptido 150 mM eta 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean jarri zen, % 0, 2,5, 10 eta 25 (b/b) TFE-rekin. 200–260 nm-ko CD espektraok 1 mm-ko kuartzo-gelaxka batean neurtu ziren, 25 °C-an. Datuak 1 nm-ko banda-zabalerarekin jaso ziren, 100 nm/min-ko abiaduran, eta lagin bakoitzeko 40 neurketaren batezbestekoak egin ziren. Datuak prozesatzeko lehenbizi disolbatzailearen espektraori zegozkion datuak kendu ziren. Hondarren batezbesteko eliptikotasuna (ingelesez *mean residue elipcity*,  $\vartheta_{MRE}$  (deg·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>)) kalkulatu zen:

$$\vartheta_{MRE} = \frac{MRW \cdot \varepsilon}{10 \cdot C \cdot l}, \quad (3.10 \text{ Ek.})$$

non erregistratutako eliptikotasun-seinalea ( $\varepsilon$ , deg), peptido kontzentrazioa (C, g/ml) eta kubetaren luzera (l, cm) baitira.

Azkenik, **3.11 ekuazioak** hondarren batezbesteko pisua definitzen du, (ingelesez *mean residue weight*, MRW (g/mol)):

$$MRW = \frac{M_w}{(\text{amino azido kopurua} - 1)} \quad (3.11 \text{ Ek.})$$

#### 3.4.4. Espektroskopia infragorria (IR)

Espektroskopia infragorria (IR) materiak xurgatutako erradiazio elektromagnetikoan oinarritzen da eta lotura kimikoen mende dago. Molekula organikoek  $10.000\text{--}100\text{ cm}^{-1}$  arteko IR erradiazioa xurgatzen dute, eta bibrazio-energia bihurtzen dute. Absortzio uhin-luzera atomoen masa erlatiboaren, indar konstantearen eta loturen geometriaren arabera da.

IR datu estrukturalen karakterizaziorako, identifikaziorako eta kuantifikaziorako oso teknika fidagarria da<sup>315</sup>. Adibidez, oso erabilgarria izan daiteke mintzeko proteinen egitura eta orientazioa zehazteko<sup>316</sup>. Gainera, aldi berean mintz-biologikoetan dauden lipido eta proteinak aztertze balio du, perturbazioaren bat eragin dezakeen zunda exogenorik sartu gabe. IR-ren uhin-luzera luzea denez, argiaren sakabanatze-arazoak ia ez dira existitzen. Horri esker, agregatutako materialak edo mintz-zati handiak ikertu daitezke<sup>315</sup>. Beste teknika espektroskopiko batzuek ez bezala, lipido-besikulek ez dute neurketen bereizmena edo sentikortasuna mugatzen, eta, beraz, mintz-proteinak ingurune naturalean aztertze aukera ematen du. IR espektroskopiari esker, zenbait egoeratan (solidoak, likidoak eta gasak barne) dauden materialak aztertu daitezke. Metodo honek peptido edo proteina baten osagaien egitura sekundarioari dagozkion elementuak era globalean azaltze balio du.

Proteina-egitura aztertzeke, lotura peptidikoaren bidez xurgatutako IR irradiazioaren ondoriozko xurgatze-bandak aztertzen dira, amida-banda deritzenak. Amida maiztasunak egitura desberdinekiko sentikorrak diren arren, amida-I banda da proteinen konformazioa zehazteko gehien erabiltzen den bibrazio-modua. Banda hori  $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$  artean dago, eta azpibanda desberdinen gainjartzeak osatzen du. Azpibanda horietako bakoitza peptidoak hartutako egitura sekundario bati dagokio. Hainbat prozedura matematiko aplikatzen dira (Fourier-en transformatua) bandaren osagai bakoitzaren posizioa zehazteko.

Peptidoekin lan egitean, maiztasun bakoitza egitura sekundario jakin batekin lotzeko, aurrez lortutako kalkulu teorikoak edo bereizmen handiko hiru dimentsioko egiturak erabiltzen dira. H<sub>2</sub>O-ren absortzio banda proteinen amida-I bandarekin gainjarri daitekeenez, lagina ur deuteratuan (D<sub>2</sub>O) neur daiteke. D<sub>2</sub>O-ri dagokion banda eta amida-I´ izenez ezagutzen da. **3.2 taulan** ageri dira amida-I´ osagaien ohiko esleipenak.

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

#### 3.2 taula. Amida-I' banden esleipen arruntena D<sub>2</sub>O-n.

Esleipen-balioak ez dira finkoak; balio-tarte bat dago peptidoen ingurunearen arabera dena.

Batezbesteko maiztasunak (cm <sup>-1</sup> )	Esleitutako egitura
1622/1685	zabaldutako kateak/destolestua
1630	helize-solbatatua
1640	<i>random coil</i>
1655	α-helizea
1660	3 <sub>10</sub> -helizea
1675	β-birak

Igor de la Arada Dk.-arekin (Biofisika Institutoa, CSIC-UPV/EHU, Leioa, Espainia) lankidetzan, IR teknika peptidoek ur-disoluzioan eta mintzetan hartutako egitura sekundarioa zehazteko erabili da.

#### 3.4.4.1. Fourier-en transformaturako espektroskopia infragorria (FTIR)

FTIR proteinen egitura sekundarioa ikertzeko metodo erabilgarria da. CD-arekin eta fluoreszentiarekin alderatuta, FTIR askoz sentikorragoa da β- edota *random coil* egiturak hautemateko.

Labur-labur, LPF-ak **3.3.1.3 protokoloan** deskribatu bezala prestatu ziren, 2 mg/ml peptido eta 1:50 peptido:lipido erlazio molarra erabiliz. Jarraian, laginak liofilizatu eta D<sub>2</sub>O-n disolbatu ziren. Kaltzio fluorurozko (CaF<sub>2</sub>) bi leihoen (BioCell, BioTools Inc., IL, AEB) artean jarri zen 25 µl-ko lagina. Espektroak Thermo Nicolet Nexus 5700 (Thermo Fisher Scientific, MA, AEB) espektrofotometroan erregistratu ziren, merkurio-kadmio-telurio detektagailu integratua eta Peltier temperatura kontrolagailua (TempCon, BioTools Inc., IL, AEB) zeuzkana. Lagin bakoitzeko 100 espektro jaso ziren, 2 cm<sup>-1</sup> bereizmen nominalarekin. Gutxienez hiru lagin neurtu dira, haien arteko batezbestekoa eta desbideraketa estandarra kalkulatzeko.

Datuen analisia burutu aurretik, disolbatzailearen eta peptido komertzialetan egon zitezteen azido trifluoroazetiko (ingelesez *trifluoroacetic acid*, TFA) arrastoen ekarpena kendu zen jatorrizko espektroetatik, espektroen arteko konparazio fidagarria egin ahal izateko. Datuen tratamendua eta jatorrizko bandaren deskonposizioa beste nonbaiten deskribatu dira<sup>317</sup>. Laburbilduz, banda kopurua eta horien kokapena espektroaren dekonboluziotik eta Fourier-en transformaturatik lortu ziren (banda-zabalera = 18 eta k = 2). Doikuntza-prozedura hasi aurretik, erreferentzia-puntua kendu zen eta hasierako altuerak jatorrizko espektroaren % 90ean finkatu ziren hegaletako eta intentsitate altueneko bandetarako, eta % 70ean gainerako osagaietarako. Bi etapatako iterazio-prozesua burutu zen i) osagaien banda-posizioa finkatu zen (hori da

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

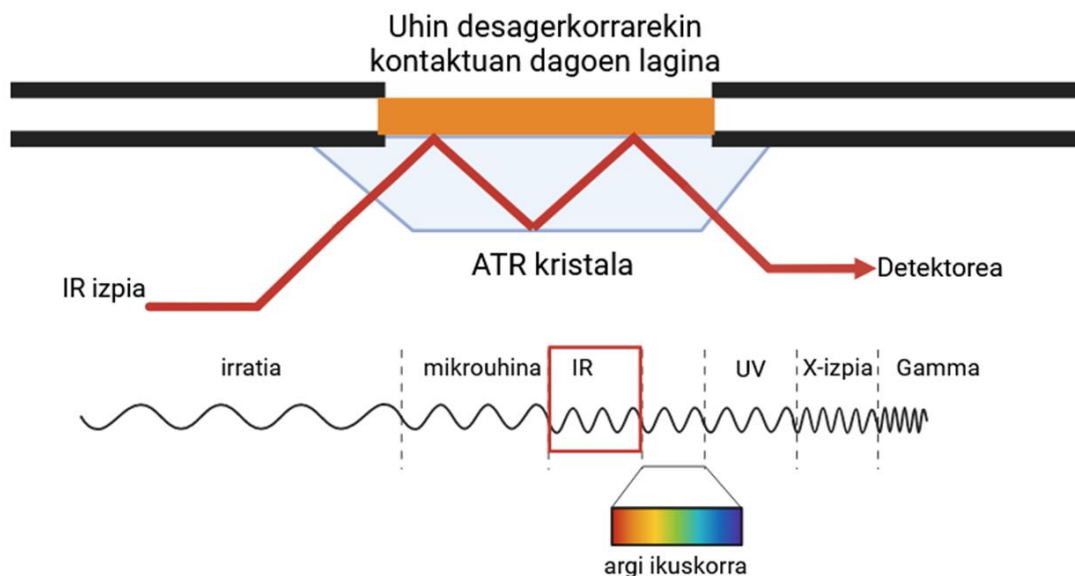
kurbaren doikuntzari aplikatzen zaion errestrikzio bakarra), zabalera eta altuerak amaierako balioetara hurbiltzeko aukera emanez, baina Fourier-en transformatuaren dekonboluzio-espektroetatik lortutako banden posizioa aldatu gabe; ii) aurreko (posizio finkoko) kurba-doikuntza parametroak oinarri hartuta, ezarritako errestrikzioak ezabatu eta banda-posizioei (baita zabalera eta altuerari ere) mugitzen utzi zitzaien. Bandaren formarako funtzio Gaussiarra erabili zen. Hala, amida-I' bandaren kokapenari, azalera-ehunekoari eta banda-zabalerari buruzko informazioa lortu zen. Banden deskonposizioa CURVEFIT erabiliz egin zen, SpectraCalc (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, AEB) exekutatuaz. Doikuntzaren emaitza begiz ebaluatu zen, birmoldatutako kurba orokorra jatorrizko espektroan gainjarriz eta banden azken posizioak ez direla  $2\text{cm}^{-1}$  (eskuratutako espektroen erresoluzioa) baino gehiago mugitzen egiaztatuz. Prozedura honen bidez, emaitza errepikakorra eta doitasun matematikoa ziurtazen dira, lortutako parametroekin kurba artifizial bat eraikiz eta berriro prozedura bera errepikatuz. Banda kopurua estutze-prozeduren arabera finkatu zen. Banda desberdinen xurgapen-koefiziente molarra antzekotzat hartu zen ( $\pm\%$  3ko errorea).

2-dimentsioko korrelazio espektroskopia (ingelesez *two-dimensional correlation spectroscopy*, 2D-COS-IR) mapak eraikitzeko, kolesterol-edukia erabili zen espektro-fluktuazioak eragin eta peptidoen egitura sekundarioan espektro-aldaketa dinamikorik zegoen detektatzeko. Bi dimentsioko espektro sinkrono eta asinkronoen irudikapena beste nonbait deskribatu da<sup>318</sup>.

#### 3.4.4.2. Islapen total indargabetuko FTIR espektroskopia (ATR-FTIR)

ATR-FTIR (ingelesez *Attenuated Total Reflection*) espektroskopia mintz-proteinen eta mintzari lotutako peptidoen egitura eta antolaketa aztertzeko erabiltzen da biologikoki garrantzitsuak diren bigeruzaren ereduetan (**3.11 irudia**). Teknika sinple honi esker, peptido baten mintzeko orientazioa eta egitura sekundarioa zehaztu daiteke. Sarri erabiltzen da guztiz barne-islaturako IR izpi sorta batean gertatzen diren aldaketak neurtzeko, izpia laginarekin kontaktuan jartzen denean<sup>315</sup>. Ikerketa andana batean erabili da mintzei lotutako peptido hidrofobikoen eta proteinen egitura eta orientazioa zehazteko. Besteak beste, *de-novo* diseinatutako peptidoak, peptido natiboak edota hainbat hartzailearen TM domeinuetatik eratorritako peptidoak erabili dira<sup>315</sup>.

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK



**3.11 irudia. ATR-FTIR neurketen oinarrizko printzipioak.** Izpi infragorria angelu jakin batekin igortzen da errefrakzio-indize altua duen kristal optikoki dentsu batera. Barne-islapen horrek uhin desagerkor bat sortzen du, kristalaren gainazaletik ebakitze-puntuarekin kontaktuan dagoen laginera hedatzen dena. Shairengandik<sup>315</sup> moldatua, BioRender erabiliz.

ATR-FTIR xurgapen-espektroak perpendikularki eta paraleloki polarizatutako argia erabiliz neurtu ziren Bruker Tensor 27 espektrofotometroan (Bruker MA, AEB), merkurio-kadmio-telurio plaka-detektagailu batekin ekipatua, BioATRCell II mikro-ATR unitatea erabiliz. Germaniozko (Ge) ATR kristalaren gainazalean peptido eta lipidodun nahastearen 20  $\mu\text{l}$  gehitu eta lehortu zen, 5 orduz aire lehorra IR ganberatik pasaraziz. Espektroak lortzeko, polarizatutako ispilua (Pike Technologies, WI, AEB)  $0^\circ$ -ra eta  $90^\circ$ -ra doitu zen, hala, lipido normalarekiko paraleloa eta perpendikularra zen izpi erasotzailea sortu zen. Baldintza bakoitzean  $2\text{ cm}^{-1}$ -ko bereizmena zuten 100 IR espektro jaso ziren, eta batezbestekoa kalkulatu zen. Amida-I' loturaren xurgapen-zatidura dikroikoa kalkulatzeko argi erasotzaile paraleloa ( $0^\circ$ ) vs. perpendikularra ( $90^\circ$ ) mintz normalarekiko erlatibizatu ziren eta peptidoaren orientazioa kalkulatzeko erabili zen<sup>319-321</sup>. Gutxienez hiru lagin neurtu dira, haien arteko batezbestekoa eta desbideraketa estandarra kalkulatzeko.

### 3.5. MIKROSKOPIA ELEKTRONIKOA

Mikroskopia elektronikoek (EM) mikroskopia optikoek baino ebazpen-ahalmen handiagoa dute. Elektroien uhin-luzera fotoien uhin-luzera baino 10.000 aldiz txikiagoa denez, bereizmen-ahalmena handiagoa da. Oro har, EM-ek tentsio altuko elektro-sorta bat igortzen dute tungstenozko harizpi bat erabilita elektro-iturri gisa. 100 kV–1.000 kV arteko azelerazio-tentsioa aplikatzen da elektroiak tungsteno-harizpiaren eta anodoaren artean mugitzeko.

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

Elektroiak laginetik pasatzen direnean, laginaren lodieraren eta errefrakzio-indizearen arabera sakabanatzen dira. EM-rako laginek, alde batetik, erradiazioak eta hutsak eragindako kalteak murrizteko eta bestetik, kontrastea handitzeko tratamendua behar dute. Lagina tratatzeko teknikarik erabilienak tindatze negatiboa eta izoztea dira. cryoEM-erako lagina etano likidoan sartzen da eta momentuan izozten da, kristalezkoa ez den beirazko izotza eratuz.

Lan honetan aurkeztutako cryo-EM neurketak Igor Tascón Dk.-rekin (Biofisika Institutoa, CSIC-UPV/EHU, Leioa, Espainia) lankidetzan egin dira. Laburki, CyaA eta SUV-ak 1:1.000 proteina:lipido erlazio molarrean inkubatu ziren 37 °C-n, 30 minutuz. SUV-ak **3.3.2.2 protokoloan** zehaztu bezala prestatu ziren. Lagina 10 aldiz kontzentratu zen ultrazentrifugazioz, 436.000x g-tan, 4 °C-an 30 minutuz. Jarraian, QUANTIFOIL® R 3.5/1 200 kobrezko sareari (3,5 µm-ko zulo-diametroa/1 µm-ko tartea eta 4,5 µm-ko maiztasuna) (SPT Labtech, Erresuma Batua) distira-deskarga (ingelesez *glow discharge*) egin zitzaion 0,36 mbar-eko hutsean, 1,5 minutuz. Ondoren, laginaren 4 µL aplikatu ziren sarean eta alde batetik lehortu zen 1,9 s-an Leica EM GP2 izozkailuan (Leica Microsystems, Alemania), % 94ko hezetasunarekin. Sareak berehala etano likidoan sartu eta nitrogeno likidoan biltegitatu ziren.

Cryo-EM irudiak Isaac Santos Dk.-ak atera zituen CIC bioGUNE-ko Mikroskopia Elektronikoko eta Makromolekulen Kristalografiako Plataforman (Bizkaiko Zientzia eta Teknologia Parkea, Derio, Espainia). Neurketak JEM-2200FS/CR transmisio-mikroskopio elektronikoan (JEOL, Japonia) egin ziren, K2 elektroi detektagailu batekin (GATAN, Erresuma Batua), 200 kV-eko eremu-emisioko pistola batekin (FEG) eta zutabe barneko omega energia filtro batekin ekipatua zegoena.

### 3.6. PROTEINA AKTIBITATEEN AZTERKETA

#### 3.6.1. CyaA-ren jarduera hemolitikoa

Eritrozito-lisia, toxina poro-eragileen aktibitatea ikertzeko erabili izan da<sup>220,322–324</sup>. Lan honetan,  $\alpha\text{M}\beta_2$  integrinarik gabeko ardi-eritrozitoak erabili ziren itu-zelula ez-mieloide eredu gisa.

##### 3.6.1.1. Odol-laginak garbitzea eta estandarizatzea

Ardi-odola (Pronadisa, Espainia) bi aldiz garbitu zen uretan % 0,9 (b/b) zen NaCl-rekin. Lagina zentrifugatu egin zen 2.100x g-tan (4 °C, 10 min). Zentrifugazioaren ondoren, gainjalkina kendu eta jalkina 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> eta 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean berreseki zen. Pare bat garbiketa gehiago egin ziren gainjalkina garden bihurtu zen arte.



### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

Zinetika hemolitikorako, aldeztu aurretik garbitutako eritrozito-esekidura estandarizatu egin zen, odola indargetzaile berean diluituz  $A_{700\text{nm}} = 1,2 (5 \times 10^8 \text{ zelula/ml})$  izan arte.

Hemolisi-saiakuntzetarako, berriz, aldeztu aurretik garbitutako eritrozito-suspentsioa estandarizatu zen. Horretarako, 37.5  $\mu\text{l}$  eritrozito-esekidura nahastu zen 3 ml  $\text{H}_2\text{O}$  disoluzioan,  $A_{412\text{nm}} = 0.6$  izateko eta  $5 \times 10^8$  zelula/ml kontzentrazioa lortzeko.

#### 3.6.1.2. Kolesterolak eragindako hemolisiaren inhibizioa

Lan honetan, argi dispersioan oinarritutako entsegu espektrofotometriko bat burutu da. Egoera onean dagoen eritrozito-suspentsio batek bere tamaina eta formagatik, argia barreiatzen du. Baina, PFT-ren bat gehitu eta eritrozitoak lisatuz gero, uhertasuna jaitsiko da<sup>325</sup>.

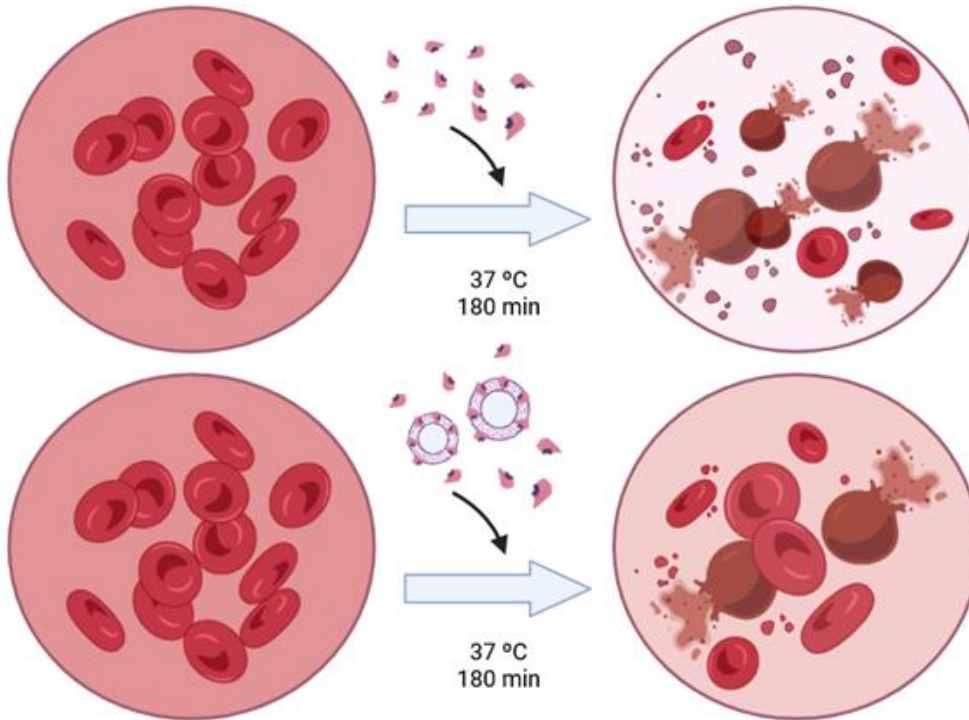
Eritrozitoak garbitu eta estandarizatu egin ziren lehenbizi, **3.6.1.1 protokoloan** deskribatzen den bezala. 100 nM CyaA eta 0–25  $\mu\text{M}$  kolesterol inkubatu ziren (RT, 30 min). Jarraian beste inkubazio bat egin zen CyaA-kolesterol nahastea eritrozitoei gehituz eta etengabe irabiatuz (37 °C, 180 min). Kontrolei dagokienez, eritrozitoak inhibizio entseguan erabilitako EtOH bolumen berdinarekin inkubatu ziren. Zinetika neurtzeko 200  $\mu\text{l}$  lagin zituzten 96 putzudun plaka lauak erabili ziren eta eritrozito-esekiduraren absorbantziaren jaitiera neurtu zen minuturo 700 nm-tan. Zinetika Synergy HTX (BioTek Instruments, Inc, VT, AEB) 96 putzuko plaka irakurgailu batean monitorizatu zen. Gutxienez hiru esperimentu independente neurtu ziren bakoitzean triplikatuak eginez (n=9).

Hemolisiaren % 0 indargetzailean berreskitako eritrozitoen absorbantziari dagokio. Aldiz, eritrozito-lisi totala (hemolisiaren % 100) Triton X-100 % 0,1 (b/b) detergentedun eritrozito lisatuei dagokie. Hemolisi-ehunekoak **3.13 ekuazioarekin** kalkulatu ziren:

$$\text{Hemolisia (\%)} = \frac{(Abs_{700\text{nm}} \% 0 - Abs_{700\text{nm}} \text{ lagina})}{(Abs_{700\text{nm}} \% 0 - Abs_{700\text{nm}} \% 100)} \times 100 \quad (3.13 \text{ Ek.})$$

#### 3.6.1.3. CyaA toxinak eragindako hemolisia oztopatzea LUV-ekin

100 nM CyaA 0–1000  $\mu\text{M}$  LUV-ekin inkubatu zen etengabe irabiatuz (37°C, 15 min). Erabilitako LUV konposizioak ondokoak dira: DOPC, DOPC/ERG eta DOPC/CHOL (3:1 erlazio molarra). Jarraian, CyaA-LUV nahastea aldeztu aurretik garbitu eta estandarizatutako (**3.6.1.1 protokoloa**) eritrozito-suspentsioari gehitu zitzaion. Ondoren, beste inkubatzeko bat egin zen etengabe irabiatuz (37 °C, 180 min) (**3.12 irudia**). Uhertasunaren galera **3.6.1.2 protokoloa** jarraituz neurtu zen.



**3.12 irudia. Hemolisi-saiakuntzaren marrazkia.** CyaA konposizio desberdinetako LUV-ekin inkubatu da lehenik, eta ondoren eritrozitoekin bigarren inkubazioa burutu da. Lehian oinarritutako esperimendu honetan, CyaA liposometara lotuz gero ezin izango da eritrozitoen mintzera lotu haiek zulatzeko. BioRender-en marraztua.

#### *3.6.1.4. CyaA WT eta mutanteekin egindako hemolisi-zinetikak*

Eritrozitoak **3.6.1.1 protokoloan** deskribatzen den bezala garbitu eta estandarizatu ziren. 50 nM toxina  $5 \times 10^8$  zelula/ml zen eritrozito-suspentsioarekin inkubatu zen (37 °C, 180 min). Uhertasunaren galera **3.6.1.2 protokoloan** zehaztu bezala neurtu zen.

#### *3.6.1.5. CyaA-ren jarduera hemolitikoa blokeatzea peptido sintetikoak erabiliz*

Aldez aurretik garbitu eta estandarizatuko eritrozitoak (**3.6.1.1 protokoloa**) 0–5.000 nM peptidorekin inkubatu ziren 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> eta 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean, 4 °C-an 15 minutuz. Laginei 50 nM CyaA gehitu eta jarraian hemolisi zinetikak neurtu ziren 700nm-tan (37°C, 180 min) (**3.6.1.2 protokoloa**).

#### *3.6.1.6. Peptido sintetikoekin egindako hemolisi-saiakuntzak*

96 putzuko plaka konikoetan proteinen edo peptidoaren diluzio seriatuak prestatu ziren 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> eta 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 indargetzailean. Gainean  $5 \times 10^8$  zelula/ml-ko dentsitateko eritrozito-bolumena gehitu zitzairen (estandarizazioaren xehetasunak **3.6.1.1 protokoloan** adierazi dira). Nahasketa 180 minutuz inkubatu zen, etengabe irabiatuz,

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

37 °C-an. Jarraian, plakak zentrifugatu ziren (950x g, 4 °C, 5 min) eritrozito ez-lisatuak hauspeatzeko, eta gainjalkinaren absorbantzia neurtu zen 412 nm-tan 96 Synergy HTX plaka-irakurgailuan (BioTek Instruments, Inc, VT, AEB). Hemolisiaren ehunekoa **3.14. ekuazioaren** bidez kalkulatu zen:

$$Hemolisia (\%) = \frac{(Abs_{412nm} \text{ lagina} - Abs_{412nm} \%0)}{(Abs_{412nm} \%100 - Abs_{412nm} \%0)} \times 100 \quad (3.14. \text{ Ek.})$$

Hemolisiaren % 0 indargetzailean inkubatutako eritrozitoei dagokie; hemolisiaren % 100 berriz, eritrozito-esekidurari Triton X-100 (% 0,1) gehituta kalkulatu zen.

#### 3.6.2. cAMP kuantifikazioa J774A.1 makrofagoetan

Purifikatutako CyaA-ren translokazio aktibitatea aztertzeko, toxinak eragindako zelula hostalari barneko cAMP ekoizpena kuantifikatu zen<sup>165,256,257</sup>  $\alpha_M\beta_2$  integrina-hartzailea adierazten duten sagu-makrofagoetan.

##### 3.6.2.1. J774A.1 makrofagoen hazkuntza

J774A.1 makrofagoak (ATC, TIB-67 zenbakia) erabili dira fagozito mieloide eredu gisa. 1968. urtean ezarri ziren<sup>326</sup>, sagu-linfoma histiozitikoetatik (*Mus musculus*) eratorritako monozito-makrofagoak dira. 3. konplementu hartzailea (ingelesez *complement receptor 3*, CR3), hau da CD11b/CD18 heterodimeroa, eta afinitate handiko IgG1-entzako Fc hartzailea (Fc $\gamma$ R1) adierazten dituzte. Era berean, J774A.1 zelulak antigorputzen mendeko fagozitosian aktiboak dira, zitolisi txikia dute eta liozima kantitate handiak sintetizatzen dituzte, baita 1 $\beta$  interleuzina (IL1 $\beta$ ) ere. Azkenik, populazioa bikoizteko epea 17 ordu ingurukoa da.

J774A.1 makrofagoak 37 °C-an hazi ziren % 90 hezetasuna eta 5% CO<sub>2</sub> zuen atmosferan, Dubelcco-k eraldatutako Eagle medioan (ingelesez *Dubelcco's Modified Eagle Medium*, DMEM, Sigma-Aldrich, MO, AEB). Medioa osatzeko ondokoa gehitu zitzaion: bero bidez inaktibatutako % 10 (b/b) behi-fetu gazura (ingelesez *Fetal Bovine Serum*, FBS, Thermo Fisher Scientific, MA, AEB), 6 mM L-glutamina (Thermo Fisher Scientific, MA, AEB), % 0,2 (b/b) MycoZap Prophylactic (Lonza, Suitza) eta Penizilina-Estreptomizina (Sigma-Aldrich, MO, AEB) (100 U/ml eta 100 g/mL, hurrenez hurren).

##### 3.6.2.2. CyaA WT eta mutanteek eragindako cAMP ekoizpena

J774A.1 makrofagoetan sintetizatutako zelula-barneko cAMP kantitatea zehazteko, zelulak 96 putzuko plakan hazi ziren 40.000 zelula/putzu izan arte. Hazkuntza-medioa Gibco™ Opti-

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

MEM™ (Thermo Fisher Scientific, MA, AEB) medio minimoagatik aldatu eta zelulak 37 °C-an inkubatu zen, 60 minutuz. Medio Minimo Esentzial hobetu honek (ingelesez *Minimal Essential Medium*, MEM) % 50-n murriztutako FBS kantitatea du eta beraz, zelulak medio honetan jarritakoan haien hazkuntza-tasa eta morfologia ez dira aldatzen. Inkubazio-aldia bukatutakoan, zelulak 0–200 ng/ml CyaA toxinarekin (WT nahiz mutante) tratatu ziren (37 °C, 30 min).

Plaka 600x g-tan zentrifugatu zen (4 °C, 10 min) zelulak sedimentatzeko; jarraian, gainjalkina kendu eta zelulak lisatzeko 0,1 M HCl eta % 0,3 (b/b) Triton X-100 gehitu zen (RT, 10 min). Zelulak lisatu ondoren, plaka berriro zentrifugatu zen 600x g-tan 10 minutuz. Oraingoan, gainjalkina jaso eta cAMP kontzentrazioa neurtu zen direct cAMP ELISA (ingelesez *enzyme-linked immunosorbent assay*) (Enzo Lifesciences, NY, AEB) kita erabiliz. Aipaturikoa lehia oinarritutako immunoentsegu entzimatico kolorimetricoa da. Kit honek cAMP kontzentrazioa kuantifikatzeko balio du eta horretarako, absorbantzia 405 nm-tan neurtzen da. Horrez gain, cAMP kontzentrazioa putzu bakoitzeko zelula kopuruarekiko estandarizatu ahal izateko, putzu bakoitzeko proteina kontzentrazio totala kuantifikatu zen BCA (Thermo Fisher Scientific, MA, AEB) erabiliz. Emaitzak zelula-barneko proteina (mg) bakoitzeko cAMP (pmol) unitateetan adierazi dira.

#### 3.6.2.3. AC domeinuaren translokazioa inhibitzea peptido sintetikoak erabiliz

J774A.1 zelulak lehenbizi 0–7,5 µM-ko peptidorekin inkubatu ziren (4 °C, 10 min) eta jarraian 200 ng/ml CyaA gehitu zen (RT, 30 min). 40.000 zelula/putzu kontzentrazioa zuten laginen zelula barneko cAMP ekoizpena zehaztu zen, **3.6.2.2 protokoloan** deskribatzen den moduan zehaztu zen, 96 putzuko plaketan.

## 3.7. ANALISI BIOINFORMATIKOA

### 3.7.1. TM helizeen predikzioa CyaA-ren aminoazido-sekuentzian

Lehenik eta behin, CyaA-ren aminoazido-sekuentzia deskargatu (P0DKX7 UniProt kodea) eta [ΔG predicition server](#)<sup>327,328</sup> zerbitzuan proteina osoaren analisia burutu genuen, TM α-helize posibleak identifikatzeko (17-03-23an atzitua). Zerbitzu honi esker, dagokion sekuentzia bat, Sec61 translokoiaren bidez, erretikulu endoplasmaticoaren (ER) mintzean txertatzeko itxurazko energia ( $\Delta G_{\text{pred}}$ ) aurrean daiteke. Printzipioz,  $\Delta G_{\text{pred}}$  balio negatiboak adierazten du Sec61-ek sekuentzia hori TM helize gisa onartu dezakeela eta mintzean integratua izan daitekeela. Bestalde,  $\Delta G_{\text{pred}}$  balio positiboak ez du esan nahi ezinbestean TM txertaketarik ez

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

dagoenik. Predikzioak emaitza esperimentaletan oinarritzen dira<sup>327,328</sup>. Horietan, 19 hondarreko luzeradun sekuentziak adierazi eta sistematikoki probatu dira, haien TM txertaketa *in vitro* saiakuntza baten bidez neurtzeko. Emaitza horietatik abiatuta, eredu kuantitatibo bat garatu zen, segmentuaren luzera eta aminoazido bakoitzaren kokapenaren kontuan hartzen dituen.

Halaber, helize posible horien topologia aurreikusteko, [TOPCONS](#) tresna-informatikoa<sup>217,329</sup> (27-12-23an atzitua) erabili zen. TM  $\alpha$ -helize potentzial baten aminoazido-sekuentzian oinarrituz, emaitzak mintza zeharkatzen duten hondarrak zein diren eta horien mintzarekiko orientazioa zein den zehazten du. Topologia iragartzeko bost algoritmo desberdinen emaitzak uztartzen dira: OCTOPUS, Philius, PolyPhobius, SCAMPI (sekuentzia anitzeko modua) eta SPOCTOPUS. Bost iragarpen horiek ezkutuko Markov eredu (ingelesez *Hidden Markov Model*, HMM) elikatzeko erabiltzen dira. Eredu horrek proteinari buruzko adostasun-iragarpena eta fidagarritasun-puntuazioa (sekuentzian zehar erabilitako metodoen arteko akordioan oinarritua) ematen ditu. Gainera,  $\Delta G$ -eskala 19 aminoazidoetako bakoitzak sekuentziaren posizio bakoitzean daukan mintz-txertaketaren  $\Delta G$  balioa auresateko erabiltzen da<sup>327</sup>. Zerbitzari honek eraginkortasunez bereiz ditzake TM proteinak direnak eta ez direnak, eta sekuentzietan seinale-peptido potentzialik dagoen hauteman dezake.

#### 3.7.2. CRAC/CARC motiboen identifikazioa eta sekuentzia anitzen lerrokatzea

13 RTX toxinatan CRAC/CARC motiboak identifikatzeko, lehenik, honako toxina hauen aminoazido-sekuentziak deskargatu genituen: EhxA (*E. enterohemorragikoa* (EHEC), UniProt A0A2P0WL51), LktA (*M. haemolytica*, UniProt P16535), PILktA (*Mannheimia varigena*, UniProt W0Q9Z2), PaxA (*Pasteurella aerogenes*, UniProt Q9RCG8), MmxA (*Morganella morganii*, UniProt A0A2C5TL69), HlyA (UPEC, UniProt Q8G9Z4), CyaA (*B. pertussis*, UniProt P0DKX7), LtxA (*A. actinomycetemcomitans*, UniProt P16462), *A. pleuropneumoniae*-ren ApxIA (UniProt P55128), ApxIIA (UniProt Q5XUT6) eta ApxIIIA (UniProt A0A0A0QUL1), MbxA (*Moraxella bovis*, UniProt A7XER5) eta RtxA (*K. kingae*, UniProt A1YKW7).

Toxina horien aminoazido sekuentzietan CRAC ((L/V)-X<sub>1,5</sub>-(Y/F)-X<sub>1,5</sub>-(R/K)) edota alderantzizko CARC ((R/K)-X<sub>1,5</sub>-(Y/F)-X<sub>1,5</sub>-(L/V)) patroiak bilatu ziren [EMBOSS fuzzpro](#) zerbitzua erabiliz (Alan Bleasby, EBI, Cambridge, UK), 20-02-24an atzitua. Horrez gain, homologoak izan zitezkeen CRAC/CARC motiboak identifikatzeko, [Clustal Omega](#)<sup>330</sup> sekuentzia anitzeko lerrokatzea (ingelesez *multiple sequence alignment*, MSA) egin genuen

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

(EMBL-EBI, Cambridge, UK), 23-10-16an atzitua (**3.13 irudia**). Lerrokatzea CyaA-ren translokazio-eskualdeko eta eremu hidrofobikoko sekuentzietara mugatu zen. Ondoren, emaitzak [ESPrpt 3.0](#)<sup>331</sup> softwarearekin (Patrice Gouet eta Xavier Robert, Mikrobiologia Molekularreko eta Biokimika Estrukturalako Laborategia, CNRS/Lyongo Unibertsitatea, Frantzia) irudikatu ziren (23-10-16an atzitua).

STEP 2 - Set your parameters

OUTPUT FORMAT  
ClustalW with character counts

DEALIGN INPUT SEQUENCES	MBED-LIKE CLUSTERING GUIDE-TREE	MBED-LIKE CLUSTERING ITERATION	NUMBER of COMBINED ITERATIONS
no	yes	yes	default(0)
MAX GUIDE TREE ITERATIONS	MAX HMM ITERATIONS	DISTANCE MATRIX	GUIDE TREE
default	default	no	yes

ORDER  
aligned

**3. 13 irudia. Clustal Omega lerrokatzerako<sup>330</sup> erabilitako parametroak.**

### 3.8. GLIKOSILAZIO-SAIKUNTZA

#### 3.8.1. Zelularik gabeko *in vitro* sistemak

Zelularik gabeko proteinak adierazteko sistema eukariotoek, proteinak adierazi eta ER mintzean zehar translokatzeko gai den gutxieneko sistemak adb., zelula bizien prozesu konplexuetan dauden aldagai kopurua murrizteko balio dute. Hala, prozesu horietan giltzarri diren xehetasunak uler genitzake<sup>332-334</sup>.

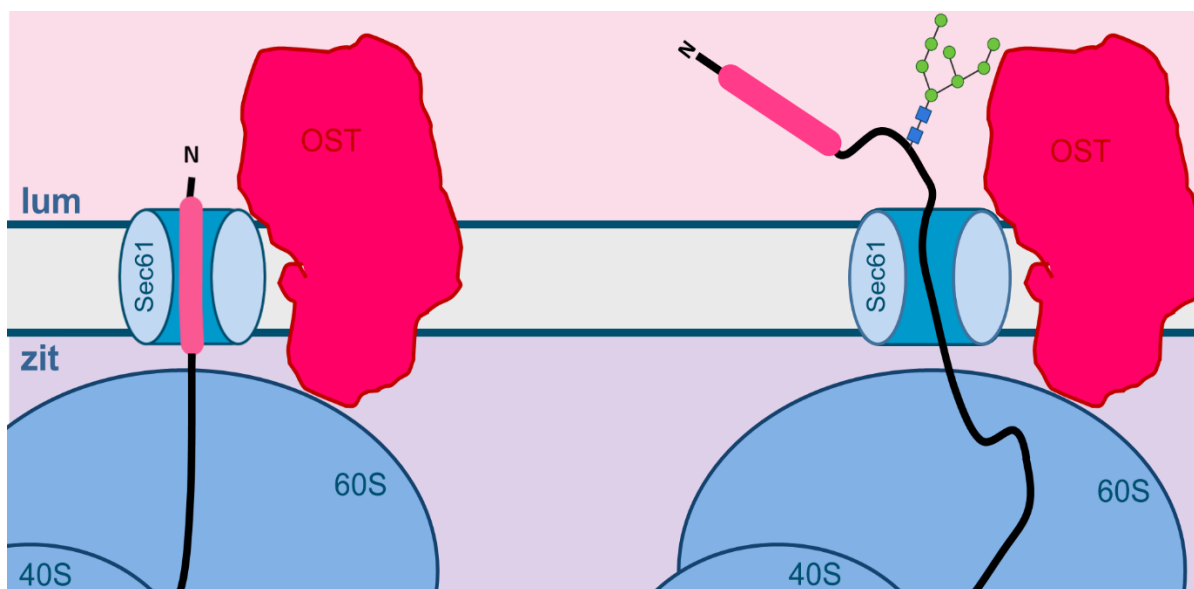
Zelula eukariotorik gabeko adierazpen sistemarik erabiliena untxiaren erretikulozito-sistema lisatutik eratorri da<sup>335,336</sup>. Erretikulozitoak heldu-gabeko eritrozitoak dira, hemoglobinaz beteta daude eta nukleoa eta DNA genomikoa galdu dituzte jada. mRNA maila baxua dute eta estraktua prestatzean suntsitu egiten da. Horri esker, proteinen adierazpen basala baxu mantentzen da<sup>337,338</sup>. Gaur egun, erretikulozitoen lisatua proteina-adierazpen egokia bermatzen duen produktu komertzial, sendo eta erreproduzigarria da.

Sintetizatu berri den proteinari aminoazido erradiomarkatuak (adibidez, <sup>35</sup>S-metionina) gehituz gero, intereseko proteina modu espezifiko eta sentikorrean detekta daiteke. Gainera, sistema honi ER mintzak gehitzen bazaizkio, proteinen translokazioa aztertzeke erabil daiteke (**3.14 irudia**). Txakur-pankreako mikrosoma pikortsuek (ingelesez *canine pancreatic rough microsomes*, CRM) ER pikortsudun xafla oso paketatutako dituzte<sup>339,340</sup> eta proteinak jariatzeke oso espezializatuta daude<sup>341</sup>. Beraz, isolatutako ER pikortsudun mintz horiek mintz-besikula

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

gisa erabil daitezke *in vitro* azterketetarako. Proteinak translokatzeko, mintz-proteinak txertatzeko, N-motako glikosilaziorako eta proteinak prozesatzeko beste funtzio batzuetarako prestatuta daude, eta hamaika azterketatan erabili dira<sup>342</sup>.

N-X-S/T patroidun glikosilazio guneak (X edozein aminoazido izanik, prolina salbu) proteinen mintzeko txertaketa-erreportari gisa erabil daitezke. Intereseko segmentuaren aurretik eta ondoren zenbait glikosilazio-gune sar daitezke, eta N-glikosilazio patroiak erakutsiko luke helize jakin batek TM topologia hartzen duen ala ez. Adibidez, intereseko segmentua ER-ren lumenera translokaturako balitz, oligosakariltransferasa (OST) entzimak azukre bat (Glc3Man9GlcNAc2) erantsiko lioke glikosilazio guneko asparaginari. Azukre bakoitzak ~2,5 kDa-ko masa gehitzen dio proteinari, eta, beraz, peptido jakin batek ER mintzean orientatzeko daukan joera <sup>35</sup>S-metioninarekin markatutako banda elektroforetikoen migrazioa zenbatetsiz argitu daiteke.

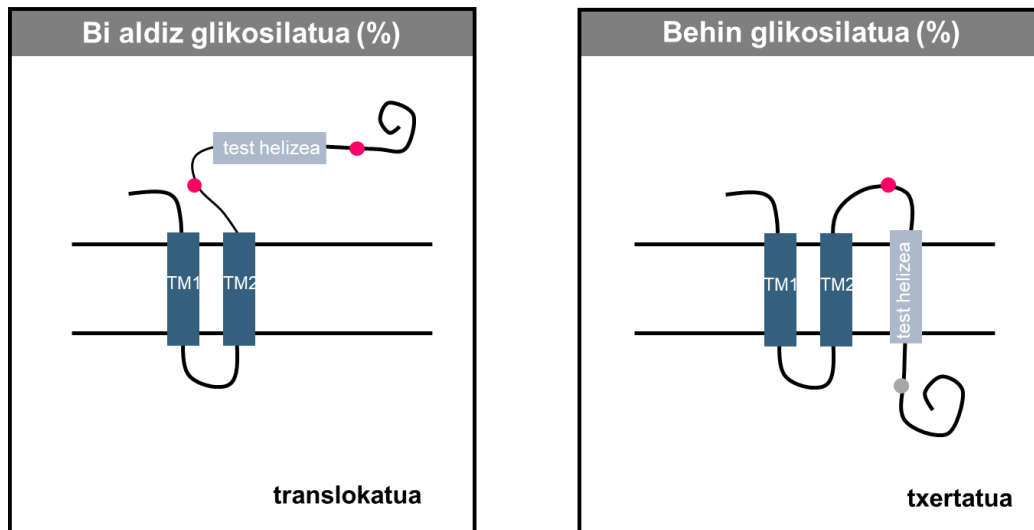


**3.14 irudia. Erribosomari lotutako Sec61 translokoia ER mintzean.** Sec61 translokoia ER-aren mintzean kokatzen da, eta jariatutako proteinei translokatzeko eta mintz-proteinei mintzean integratzen laguntzen die<sup>343</sup>. ER lumeneko OST entzimak 2,5 kDa tamainako azukreak gehitzen dizkio N-X-S/T glikosilazio guneko asparaginari. BioRender-en marraztua.

Lan honetan, intereseko sekuentziak *E. coli* lider peptidasaren<sup>344</sup> (LepB) C-muturreko lumen-domeinuaren (P2) baitan klonatu ziren. 323 hondarreko entzima hori funtsezkoa da behin plasma-mintza zeharkatu ondoren, esportatutako proteinen amino-muturreko lider-peptidoak kentzeko, eta ezinbestekoa izan da proteinen mintz-txertaketaren eta jariapenaren inguruko zalantzak argitzeko<sup>345</sup>.

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

LepB peptidasak mintza bi aldiz zeharkatzen du, P2 domeinua periplasman duelarrik<sup>345</sup> (**3.15 irudia**). Testatu nahi ziren helizeak P2 domeinuan sartu ziren, LepB-ren TM segmentuen ostean, eta horrela, proteina mintzean zehazki txertatzen zela bermatu zen.



**3.15 irudia. Glikosilazio-patroiaren azterketak erakusten du helize jakin batek ER mintzean orientatzeko izan dezakeen joera.** LepB peptidasa aldazio-proteina gisa erabili da eta intereseko helizeak haren P2 domeinuan, bi TM segmentuen ondoren, sartu dira<sup>345</sup>.

Ikerketa-lan honetan, akoplatutako transkripzio eta itzulpen nahaste bat erabili zen, peptidoek, erribosomaren tuneletik atera ahala, mikrosoma-mintzetan integratzeko zuten gaitasuna zehazteko<sup>327,328,346</sup>. Aztertutako helizeak CyaA-ren domeinu poro-eragilearen<sup>81</sup> (HI) eta translokazio-eskualdearen<sup>215</sup> (h1 eta h2) parte dira.

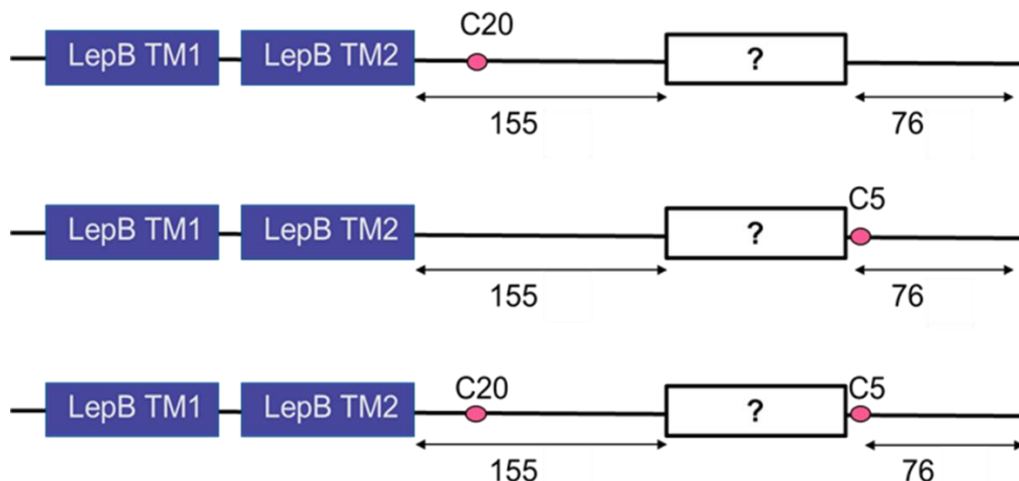
#### 3.8.2. DNA manipulazioak

*E. coli* bakterioaren lider-peptidasaren *lepB* genea pGEM1 bektorean azpiklonatu zen<sup>328,346-348</sup>. Helize bakunak LepB<sup>344</sup> proteina-ereduan sartu ziren, N-glikosilaziorako gunen baten edo biren artean. Plasmidoa Ismael Mingarro katedradunak (Valentziako Unibertsitatea, Valentzia, Espainia) bidali zigun.

Helize bakoitzaren topologia zehatza deszifratzeko **3.16 irudian** adierazitako hainbat konstruktua diseinatu dira. Mutante guztiak Sanger-en sekuentziazio bidez berretsi ziren, T7 promotoreari zegokion haslea erabiliz.



### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK



**3.16 irudia.** Diseinatutako konstruktuen irudikapen eskematikoa. LepB-ren bi TM segmentuak lauki urdinez adierazi dira. Testatu beharreko helizeak, berriz, lauki zuriz marraztu dira. Puntu gorriek, aurreko helizetik zenbatzen hasita dauden, N-glikosilaziorako guneak erakusten dituzte<sup>349,350</sup>.

#### 3.8.2.1. DNA-ren PCR bidezko linearizazioa

Intereseko konstruktuak zituzten pGEM1 plasmido-bektoreak (~1 ng) erabili ziren intereseko sekuentziak PCR bidez amplifikatu eta linearizatzeko. Erreakzio-kontzentrazioak hauek izan ziren: hasle bakoitzaren 0,5  $\mu$ M, dNTP bakoitzaren 200  $\mu$ M eta 0,02 U/ $\mu$ l Q5 polimerasa (NEB, MA, AEB ).

Aurreranzko (ingelesez *forward*) haslean zintzilikako sekuentzia (ingelesez *overhang*) gehitu zen T7 promotorea, itzulpen eukariotoa hasteko Kozak-en sekuentzia eta hasiera-kodoia (ATG) PCR produktu linealetan sartzeko (**3.3 taula**). Alderantzizko haslea irakurtarau irekiaren (ingelesez *open reading frame*, ORF) C-muturreko zatiari zegokion eta 2 amaiera kodoi (TAA-TAG) gehitu ziren bata bestearen atzetik.

#### 3.3 taula. Lan honetan erabili diren primerrak.

Aurreranzko hasleak zintzilikako sekuentzia bat zeukan txertatuta (letra xeheez). T7 promotorea turkesaz, Kozak-en sekuentzia berdez eta hasiera-kodoia beltzez adierazi dira. Alderantzizko haslea ORF-aren C-muturreko zatiari zegokion (grisez) eta 2 amaiera kodoi (TAA-TAG) gehitu ziren, bata bestearen atzetik.

Norantz	Oligonukleotidoak
Aurrera (5'-3')	atagta <b>taatacgcactcactata</b> ggaaacc <b>accatgC</b> CGAATATGGCGAATATGTTTGCCCTGATT CTGG
Atzera (3'-5')	<b>AGTCGCATTGGCGGCATCCATTAATAG</b>

Anplifikazioa Mastercycler Gradient Thermocycler (Eppendorf, Alemania) batean egin zen. Lehenbizi, hasierako desnaturalizazio-urrats bat egin zen (98 °C, 1 min); ondoren, 20 ziklo

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

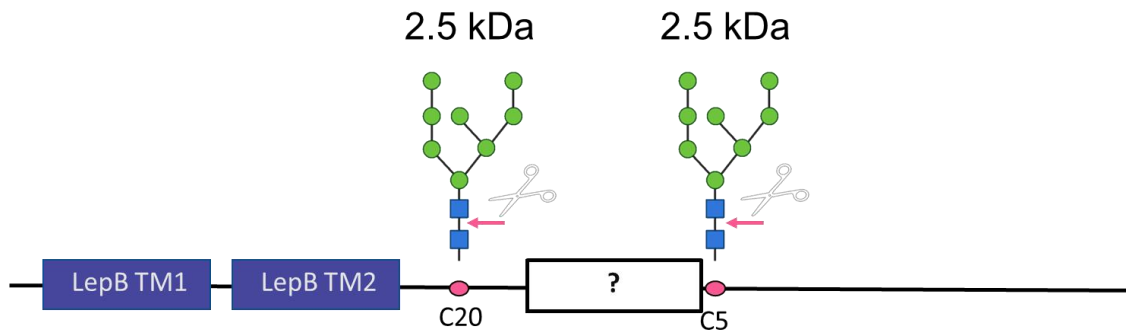
egin ziren: desnaturalizazio-urrats bat (98 °C, 20 s); hibridatze-urrats bat (63 °C, 30 s); eta luzatze-urratsa (72 °C, 4 min). Jarraian, bukaerako luzatze-fase bat egin zen (72°C, 5 min). DNA agarosa-elektroforesiaren ondoren, PCR produktuak GeneJET PCR Purification kita (Thermo Fisher Scientific, Lituania) erabiliz purifikatu ziren. Ondoren, DNA kontzentrazioa kuantifikatu zen.

#### 3.8.3. *In vitro* transkripzio/itzulpen-erreakzioa

Erretikulozito-lisatua duen 5 µl Tn® T7 Quick for PCR DNA kita (Promega, WI, AEB) ~100 ng DNA linealarekin, 0,3 µl txakur-pankreako mikrosomarekin<sup>351</sup> eta 0,5 µl <sup>35</sup>S-metioninarekin (~5 µCi) osatu zen. Erreakzioa 30 °C-an burutu zen, etengabe irabiatuz. 90 minutu pasatakoan karga-indargetzailea gehitu zitzaion erreakzioa geldiarazteko<sup>328,346</sup>.

#### 3.8.4. Endo H tratamendua

OST-ak katalizatutako N-motako glikosilazioa frogatzeko, laginak Endo H-rekin tratatu ziren, aurretik deskribatu bezala<sup>346</sup>. H<sub>f</sub> endoglikosidasa (New England Biolabs, MA, AEB) birkonbinatutako fusio-proteina bat da, endoglikosidasa H eta maltosari loturiko proteina dauzkana. N-glikosilaziodun proteinetan manosen eta zenbait oligosakarido hibridoren kitobiosa-nukleoa moztu du. Beraz, proteinen glikosilazio guztiak kentzeko erabiltzen da (3.17. irudia).



**3.17 irudia. Endo H-ren jarduera erakusten duen irudi eskematikoa.** Manosa zirkulu berdeekin eta GlcNAc karratu urdinekin adierazi dira.

Proteinaren adierazpena **3.8.3 atalean** deskribatzen den moduan egin zen. Ondoren, 2 µl 50 mM sodio azetatoa (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>, pH 6,0), 1 µl entzima eta karga-indargetzailea nahasi ziren laginarekin (37 °C, 30 min). Nahasketa hori zuzenean kargatu zen SDS-PAGE getetan.

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK

#### 3.8.5. Analisia eta kuantifikazioa

Itzulpen-produktuak % 12 Bis-Tris Akrilamida SDS-PAGE gel bidez aztertu ziren. Gelak lehortu eta autorradiografiako film batean jarri ziren, filmak Fuji FLA-9000 fosforimager (GE Healthcare, IL, AEB) batean ikusteko, Image Reader FLA-9000/Multi Gauge V 3.0 softwarea erabiliz. Proteinen mintzeko txertatze-maila zehazteko, kale bakoitzaren dimentsio bakarreko intentsitate-profil bat sortu zen ImageJ softwarean<sup>299</sup> (NIH, MD, AEB). Azkenik, EasyQuant doitze-programa multi-Gaussiarra erabili zen profileko banda proteiko glikosilatuei zegozkien kurbaren azpiko azalerak kalkulatzeko.

Segmentu jakin baten mintzeko txertatze-maila ( $p$  balioa) kalkulatzeko, glikosilazio-gune bakarra (C5) zuten konstruktuen kuantifikazioa hartu zen oinarri.  $p$  balioak kalkulatzeko, glikosilatu gabeko banda proteikoen kurba azpiko azalera, banda proteiko guztien azaleraren baturarekin zatitu zen:

$$p = \frac{f_{0g}}{f_{0g} + f_{1g}} \quad (3.15. \text{ Ek.})$$

Datuak mintzaren forma integratuen eta integratugabeen arteko itxurazko oreka-konstante gisa ere adieraz daitezke ( $K_{app}$ ):

$$K_{app} = \frac{f_{0g}}{f_{1g}} \quad (3.16. \text{ Ek.})$$

Adierazpen horrek ez du esan nahi proteinen mintzetako integrazio-prozesuak benetako oreka termodinamikoa islatzen duenik; hala ere, erabilgarria da emaitzak itxurazko energia libre ( $\Delta G_{app}$ ) bihurtzeko eta datu biofisikoekin zuzenean konparatzeko<sup>328</sup>:

$$\Delta G_{app} = -R \cdot T \cdot \ln K_{app} \quad (3.17. \text{ Ek.})$$

Balio guztiak gutxienez hiru esperimentu independenteren batezbesteko gisa kalkulatu ziren.

### 3. KAPITULUA: MATERIALAK ETA METODOAK



CHAPTER



**4**

# POSSIBLE MOLECULAR DETERMINANTS FOR THE CHOLESTEROL DEPENDENCE OF THE BIOLOGICAL FUNCTIONS OF CyaA TOXIN

The results presented in this chapter have been published in:

**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), Article 15. <https://doi.org/10.3390/ijms23158703>

Ostolaza, H., & **Amuategi, J.** (2024). Membrane Interaction Characteristics of the RTX Toxins and the Cholesterol-Dependence of Their Cytolytic/Cytotoxic Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms250631>

### 4.1. ABSTRACT

Binding of soluble CyaA monomers to the plasma membrane of target cells and conversion into membrane-integrated proteins are the first and last step for CyaA translocation and lytic activities. Yet, the molecular determinants in the protein or the target membrane that govern this conversion to an active toxin form are poorly understood. It was previously reported that both CyaA cytotoxic and cytolytic activities depend on membrane cholesterol. Here, we show that, indeed, this toxin specifically interacts with membrane cholesterol. In addition, we find four cholesterol-binding motifs located in two membrane-interacting domains, which are essential for both toxin activities. We hypothesize that the direct CyaA-cholesterol interaction through those four motifs drives insertion and stabilizes the TM topology of several helical elements that ultimately build the required structure for AC delivery and pore formation. The requirement for lipid-mediated stabilization of TM helices appears to be a unifying mechanism to modulate toxicity in PFTs. Particularly, cumulative evidences show that membrane cholesterol is essential for the mechanism of action of several RTX toxins. In fact, more and more RTX toxins present various functional cholesterol-recognition motifs, which appears to be another common feature shared in the family.

### 4.2. INTRODUCTION

Similar to other RTX toxins<sup>135,147,161</sup>, CyaA also depends on membrane cholesterol to exert its biological activities. It was first documented that reducing cholesterol amount yielded a significant decrease in the translocation capacity<sup>8</sup> and that the presence of this sterol substantially increases the rate of CyaA-induced membrane lysis<sup>132</sup>. More recently, we found that membrane cholesterol enhances the lytic ability of CyaA on erythrocytes and artificial lipid bilayers, by stimulating toxin insertion and oligomerization<sup>168</sup>.

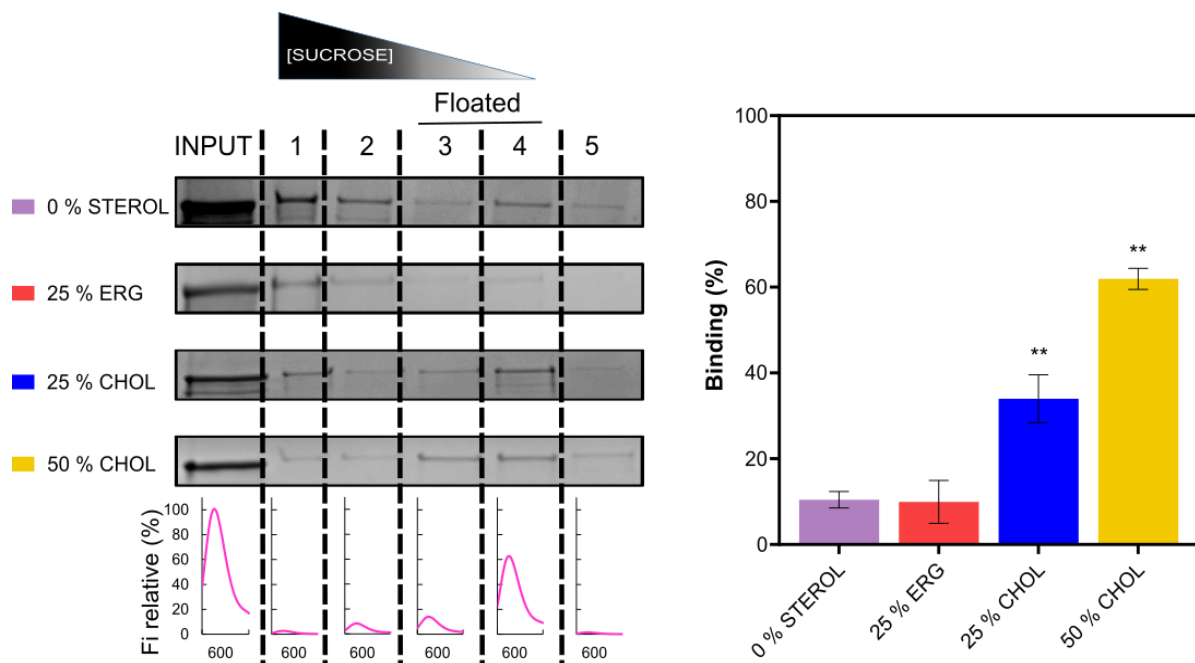
Cholesterol seems to promote the irreversible insertion of UPEC HlyA into phospholipid bilayers as well, leading to an increased lytic activity<sup>152</sup>. Moreover, other four RTX toxins (*A. actinomycetemcomitans* LtxA, UPEC HlyA, *A. pleuropneumoniae* ApxIA and *K. kingae* RtxA) were previously shown to specifically bind cholesterol<sup>138,150,164,170</sup>, suggesting that this might be another common identity sign shared by RTX family members. Here, we decided to investigate whether the cholesterol dependence of CyaA activities is due to direct, specific binding to membrane cholesterol, and to explore the possible molecular determinants.

## 4.3. RESULTS

### 4.3.1. Specificity in the interaction of CyaA with cholesterol

To verify whether the cholesterol dependence of the lytic and translocation activities of CyaA is due to direct binding of the toxin to membrane cholesterol, and not, to indirect effects of the sterol on the physical state of the phospholipid bilayer, we performed different experiments.

First, we quantified CyaA binding to liposomes of different compositions following **protocol 3.3.5.1**. As illustrated in **Fig. 4.1**, binding of CyaA was notably greater in presence of cholesterol relative to the pure DOPC. The figure shows, indeed, that for the same initial toxin input, the relative intensity of the protein bands that float together with LUVs is higher (~40% and ~60%, respectively) in DOPC/CHOL vesicles, containing 25% or 50% mole cholesterol.



**Figure 4.1. Toxin association to liposomes.** CyaA was incubated with LUVs composed of pure DOPC or DOPC/STEROL (25% mole ERG or CHOL, and 50% mole CHOL) at 37 °C for 30 min (protein-to-lipid mole ratio, 1:2000). Samples were then submitted to ultracentrifugation in sucrose gradient. The presence of the protein in the floated and non-floated fractions of the gradient and in the original sample (INPUT) was revealed by Coomassie Blue analysis, after SDS-PAGE separation. Binding was quantified by densitometry. Fluorescence emission spectra reveal the presence of vesicles labelled with Rho-PE in the collected fractions. Data presented in bar graphs correspond to the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Multiple comparison test was performed vs. pure DOPC-containing samples and statistical differences were based on Welch t-test. (\*\* if  $p < 0.005$ ).

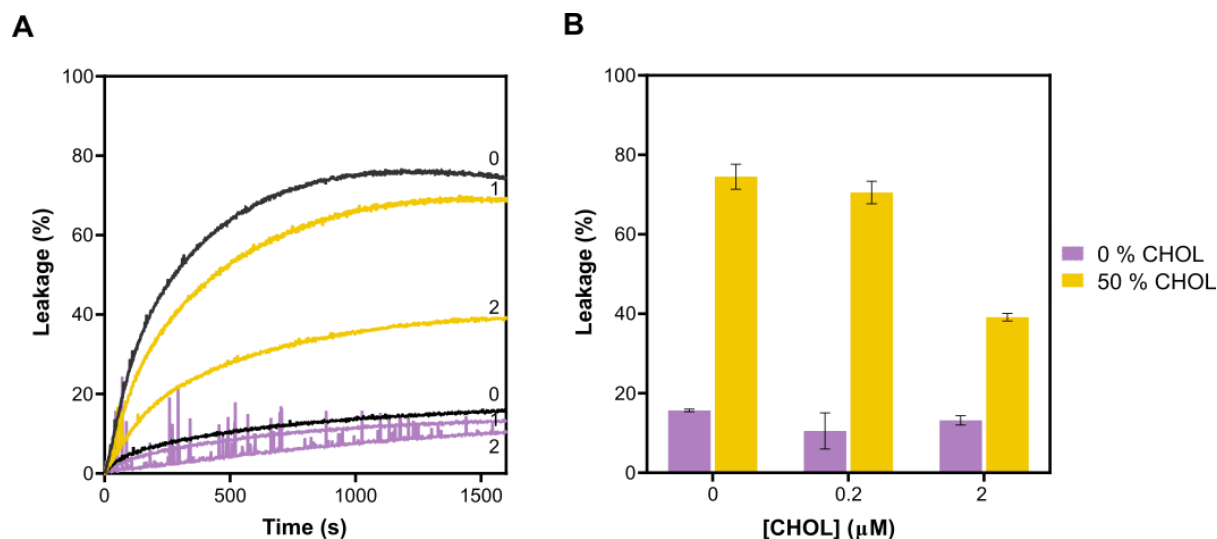
Pure DOPC vesicles represent the fluid L<sub>d</sub> bulk phase of the cell membrane; while mixtures containing 50% of cholesterol adopt a single L<sub>o</sub> phase, with tightly packed lipids and greater thickness<sup>45</sup>, mimicking the so-called lipid rafts<sup>51,289</sup>. DOPC/CHOL mixtures are completely



miscible in all proportions up to the solubility limit of cholesterol (66% mole in PC bilayers)<sup>352</sup>. Therefore, the formulations used in these assays may have a single Ld or Lo phase and do not segregate into different lipid phases<sup>51</sup> (see **section 1.1.2**). Hence, the indirect effects of cholesterol as inducer of phase segregation can be excluded as effector of the increased CyaA binding to cholesterol-containing vesicles.

Finally, the binding of CyaA to pure DOPC and DOPC/ERG vesicles was of 10%, suggesting that ergosterol, an analogue of cholesterol, could not reproduce the same effect. Cholesterol<sup>11</sup> and ergosterol<sup>25</sup> show similar functions and structure; however, ergosterol differs in having an additional double bond in a ring of the steroid nucleus and a double bond and an extra methyl group in the alkyl side chain<sup>292</sup> (**Fig. 3.3**). Even less information is available on the effects of ergosterol on unsaturated phospholipid membranes<sup>353,354</sup>, it has been reported that both sterols have ordering and condensing effects on saturated lipids<sup>293,355,356</sup>. For instance, they are both crucial in the formation and function of ordered domains, such as the Lo phase<sup>23,288-290</sup>. Hence, from these results, it is very tempting to speculate that CyaA might directly interact with cholesterol to favor toxin binding to lipid vesicles, but not with the analogue ergosterol.

In another set of experiments, CyaA was first incubated with cholesterol in solution, and then added to vesicles composed of pure DOPC or DOPC/CHOL (**protocol 3.4.1.1**). Data depicted in **Fig. 4.2** show a decrease in the extent and rate of the toxin-induced permeabilization of DOPC/CHOL vesicles. 2  $\mu$ M cholesterol was enough to decrease the leakage percentage  $\sim$ 50% compared to the control. On the contrary, incubating the toxin with cholesterol in solution barely affected the CyaA-induced permeabilization of DOPC vesicles, which was of  $\sim$ 20% in all cases.

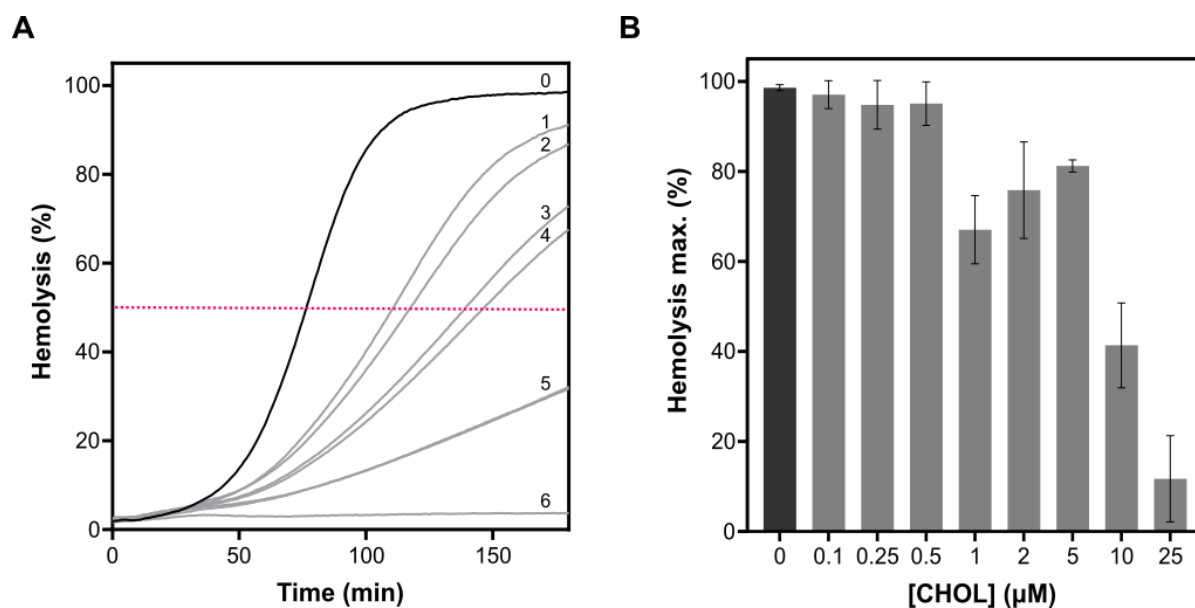


**Figure 4.2. CyaA incubation with cholesterol in solution reduces toxin-induced vesicle permeabilization.** (A) Representative leakage kinetics. 200 nM CyaA was incubated with 0–2  $\mu\text{M}$  cholesterol in solution for 30 min and the mixture was added onto 100  $\mu\text{M}$  lipid vesicles containing pure DOPC (purple) or DOPC/CHOL (1:1 molar ratio) (yellow). Leakage kinetics were measured for 30 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ . 0–2 numbers represent increasing cholesterol concentrations. (B) Maximum vesicle permeabilization calculated for each lipid composition and cholesterol dose. Data presented correspond to the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments with triplicates ( $n = 9$ ).

Similarly, **Fig. 4.3** shows that a previous incubation of CyaA with cholesterol in solution (**protocol 3.6.1.2**), reduced the toxin-induced erythrocyte lysis. Both the rate and extent of the kinetics decreased upon cholesterol concentration increase, with notable inhibitory effect for  $>5$   $\mu\text{M}$  cholesterol. The time required to lyse 50% of erythrocytes ( $t_{1/2}$ ) augmented together with cholesterol concentration, indicating that the kinetics were slower.

The maximum hemolysis yield also diminished together with cholesterol concentration augmentation. Interestingly, incubating CyaA with  $>5$   $\mu\text{M}$  cholesterol almost abrogated the toxin-induced hemolysis. Together, all these data suggest that CyaA might recognize and directly bind to membrane cholesterol.

This idea was reinforced by another experiment in which CyaA was first incubated with liposomes composed of pure DOPC or DOPC/STEROL (25% ERG or 25% CHOL), at three different final lipid concentrations, and then assayed for hemolysis (**protocol 3.6.1.3**). The rationale of the experiment is that the more toxin is bound first to liposomes, the less will remain unbound to bind to erythrocytes, and so the lower will be the hemolysis observed.

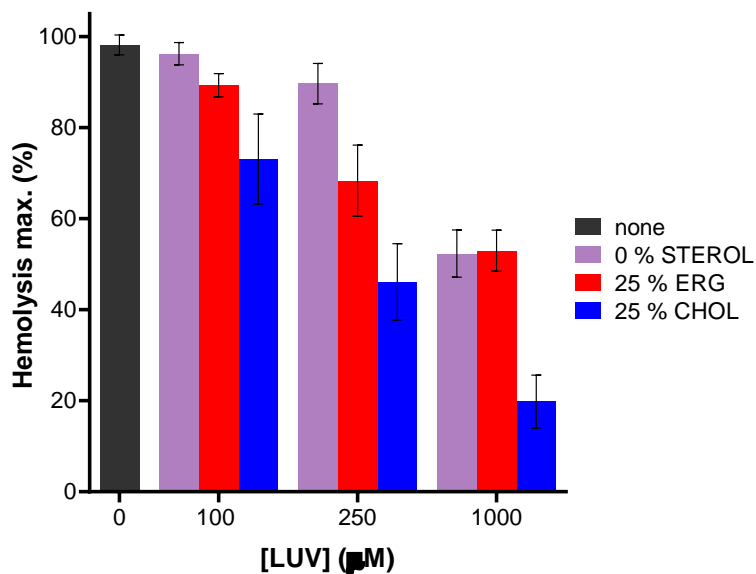


**Figure 4.3. CyaA incubation with cholesterol in solution reduces the lytic activity of the toxin on erythrocytes.** (A) Representative hemolytic kinetics. 100 nM CyaA was incubated at 25 °C for 30 min in the presence of 0–25 μM cholesterol in solution. Erythrocytes were added and 180 min hemolytic kinetics were measured at 37 °C. Increasing numbers (0–6) illustrate increasing cholesterol concentrations and the red dash line highlights the point in which each curve reaches 50% of hemolysis. (B) Maximum hemolysis extent percentages calculated for each cholesterol concentration used are shown in bar graphs. Data presented correspond to the mean ± SD of at least three independent experiments with triplicates (n = 9).

As illustrated in **Fig. 4.4**, increasing LUV concentration reduced the extent of CyaA-induced hemolysis in all cases. However, cholesterol containing LUVs were the most effective in binding CyaA molecules, since this incubation yielded the lower percentage of lytic capacity (~20% for 1000 μM liposomes).

It is also shown that the reduction in hemolysis induced by the presence of ergosterol in the liposomes was very similar to the induced by the pure DOPC vesicles (50% hemolysis). Hence, this evidence suggests that more CyaA would bind irreversibly to the cholesterol-containing vesicles, and thus, less free toxin would be available to bind and lyse erythrocytes.

Summing up, these results demonstrated that inhibiting the binding of the toxin to membrane cholesterol diminishes CyaA hemolytic activity on erythrocytes. Importantly, this was consistent with the similar lower CyaA binding to cholesterol-free liposomes (**Fig. 4.1**).



**Figure 4.4.** Effect of CyaA incubation with liposomes on CyaA-induced maximum hemolysis. 100 nM CyaA was incubated with 0–1000 µM DOPC (purple), DOPC/ERG (red) and DOPC/CHOL (blue) liposomes at 3:1 molar ratio, and 180 min hemolytic kinetics were measured. Maximum hemolytic percentages represented in the figure correspond to the mean  $\pm$  SE of at least three independent experiments with triplicates ( $n = 9$ ).

#### 4.3.2. Identification of potential CRAC/CARC motifs in CyaA

Numerous studies indicate that membrane cholesterol is essential for the mechanism of action of several RTX toxins that interact specifically with this sterol<sup>138,150,164,166–168,170</sup>. Interestingly, the last ten years, a variable number of both CRAC and CARC motifs has been documented in the primary structure of an increasing number of RTX toxins<sup>138,150,164</sup>.

In the herein presented study, we searched for CRAC ((L/V)-X<sub>1,5</sub>-(Y/F)-X<sub>1,5</sub>-(R/K)) and CARC patterns ((R/K)-X<sub>1,5</sub>-(Y/F)-X<sub>1,5</sub>-(L/V)) that contained either tyrosine or phenylalanine in the central position, in the sequences of 13 distinct RTX toxins<sup>60</sup> (**protocol 3.7.2**). As seen in **Table 4.1**, the analysis revealed that each toxin harbors at least 25 putative cholesterol-binding motifs throughout the full-length sequence. A summary of the putative motifs identified in the pore-forming domain of these toxins is displayed in **Table S.4.2** and **Table S.4.3**.

Using basic bioinformatics programs, it can be responded to the question of to what extent the functional CRAC/CARC motifs identified in the RTX toxin family are conserved and relevant for the action mechanisms. We have run Clustal Omega program<sup>357</sup> (detailed in **protocol 3.7.2**), a popular software for alignment of multiple protein sequences (MSA), for these toxins.

## CHAPTER 4: INTERACTION BETWEEN CyaA AND CHOLESTEROL

**Table 4.1. Summary of CRAC/CARC motifs identified in several RTX toxins.**

Searching input algorithms used were (L/V)-X<sub>1-5</sub>-(Y/F)-X<sub>1-5</sub>-(K/R) for CRAC (purple) and (K/R)-X<sub>1-5</sub>-(Y/F)-X<sub>1-5</sub>-(L/V) for CARC (blue) motifs, respectively. The name of the bacteria and RTX toxins, together with the number of residues of each protein and cholesterol-recognition motifs are shown.

BACTERIUM	RTX TOXIN	No RESIDUES	CRAC MOTIFS	CARC MOTIFS	TOTAL No CRAC/CARC MOTIFS
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC)	EhxA	997	16	15	31
<i>Mannheimia haemolytica</i>	LktA	953	15	13	28
<i>Manheimia varigena</i>	PILktA	953	21	16	37
<i>Pasteurella aerogenes</i>	PaxA	1049	19	21	40
<i>Morganella morganii</i>	MmxA	1024	13	15	28
Uropathogenic <i>E. coli</i> (UPEC)	HlyA	1023	13	13	26
<i>Bordetella pertussis</i>	CyaA	1706	22	18	40
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	LtxA	1055	24	20	44
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	ApxIA	1022	18	16	34
	ApxIIA	956	16	16	32
	ApxIIIA	1052	22	19	41
<i>Moraxella bovis</i>	MbxA	927	25	18	43
<i>Kingella kingae</i>	RtxA	956	12	14	26

We have mainly examined residues 353–759 of CyaA, corresponding to two membrane-interacting regions: the translocation region (Fig. 4.5) and the hydrophobic domain (Fig. 4.6). These regions have been directly implicated in both toxin activities<sup>81,82,110,214,222</sup> and harbor

several predicted amphipathic/hydrophobic  $\alpha$ -helices<sup>81,215</sup> that seem to be involved in membrane insertion. So far, it is unknown whether all these helical elements insert spontaneously into the membrane or whether their embedding into the lipid bilayer may require assistance from membrane lipids, such as cholesterol.

The MSA analysis confirms that the CRAC<sup>336</sup> motif firstly identified in *A. actinomycetemcomitans* LtxA<sup>138</sup> is highly conserved among several RTX toxins, including HlyA, LktA, ApxIA, ApxIIA, MbxA, EhxA, MmxA and RtxA, but not in *B. pertussis* CyaA (**Fig. 4.6**). Besides, the CARC<sup>346</sup> motif, which is immediately posterior to the CRAC<sup>336</sup> site, is also conserved in most of these RTX toxins, except in *B. pertussis* CyaA, *P. aerogenes* PaxA and *A. pleuropneumoniae* ApxIIIa. Intriguingly, CyaA only harbors the CRAC<sup>658</sup> motif, which aligns with the putative CRAC<sup>336</sup> site of LtxA. On the contrary, the CARC<sup>355</sup> site present in both PaxA and ApxIIIa only aligns with the CARC<sup>346</sup> of LtxA. Importantly, this highly conserved adjacent CRAC-CARC motif has been functionally characterized for *K. kingae* RtxA<sup>150</sup>, UPEC HlyA<sup>193</sup> and *A. actinomycetemcomitans* LtxA<sup>138</sup>.

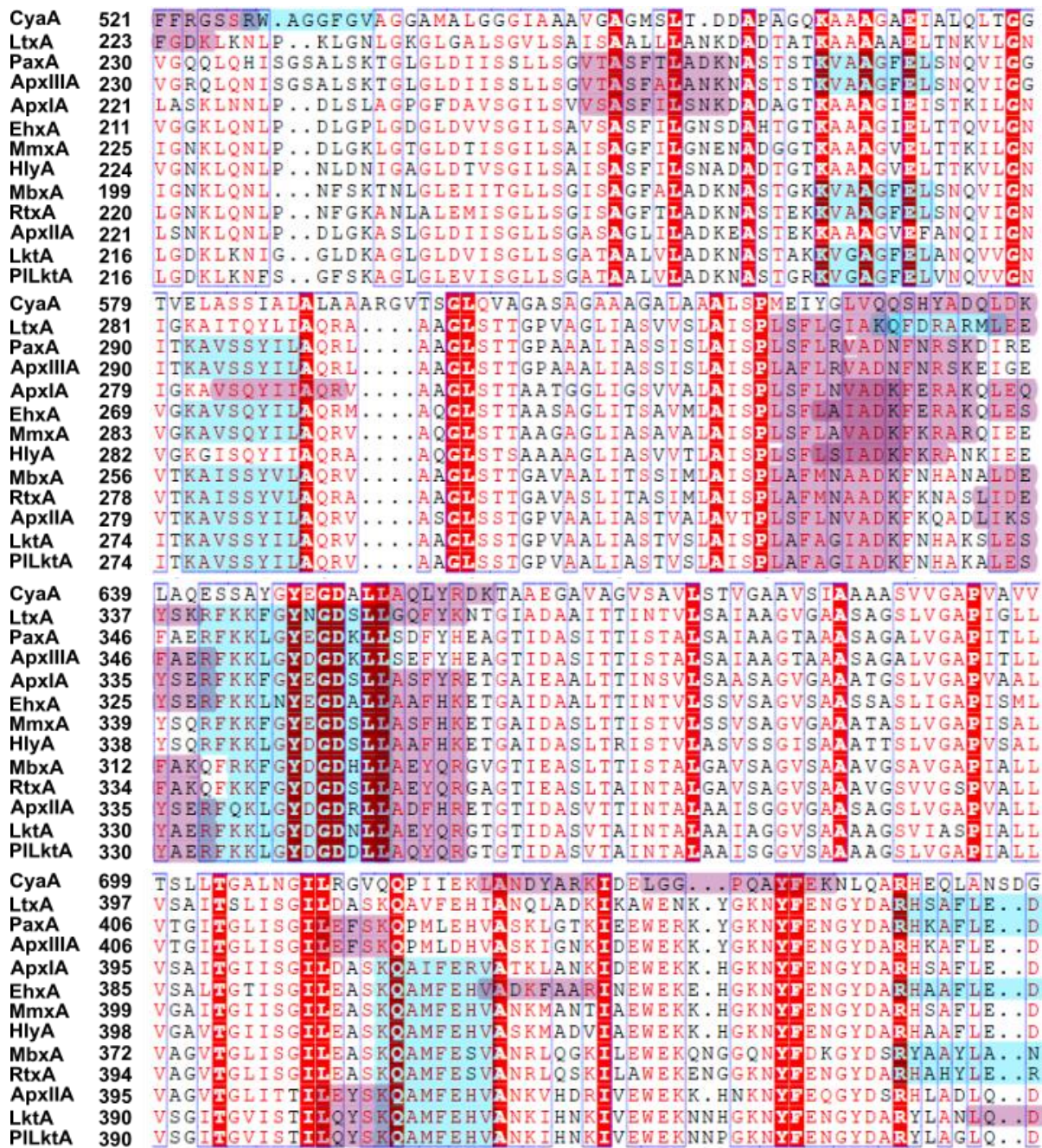
Moreover, our exploration reveals new potential CRAC/CARC sites that contain phenylalanine in the central position. For instance, a new putative CRAC site was detected between residues 319–326 of *A. actinomycetemcomitans* LtxA, which is highly conserved in all these RTX toxins except from *B. pertussis* CyaA. In addition, a potential CARC site comprising residues 280–287 of *K. kingae* RtxA was found to be present in all the other family members, except CyaA, HlyA, LtxA and ApxIA. Finally, the CARC motif located between residues 409–416 of RtxA aligned with all the other toxins except CyaA, LtxA, PaxA and ApxIIIa.

It should be remarked that none of the putative motifs identified in the pore-forming domain of *B. pertussis* CyaA (CARC<sup>404</sup>, CARC<sup>415</sup>, CRAC<sup>485</sup>, CRAC<sup>521</sup>, CARC<sup>532</sup>, CRAC<sup>632</sup>, CRAC<sup>658</sup>, CRAC<sup>725</sup> and CRAC<sup>738</sup>) is conserved in the rest of the family. Out of these nine putative motifs, CRAC<sup>632</sup>, CRAC<sup>658</sup>, CRAC<sup>725</sup> and CRAC<sup>738</sup> have been examined before. Authors reported that rather than being part of CRAC motifs, the aromatic side chains of Y632, Y658, Y725 and Y738 play a structural role in  $\alpha$ -helical segments that are involved in CyaA activities<sup>170</sup>.

## CHAPTER 4: INTERACTION BETWEEN CyaA AND CHOLESTEROL

CyaA	353	AGKSLFDDGLGAAPGV	PSGRSKFSPDVLETVPASP	.....GLRRPS	LGAVERQ			
LtxA	103	.....	ERGLTLFAPQLDKW	IQGNK..HLSNSVGS	TGNLTKAIDKVQSV			
PaxA	114	.....	ERGLTLFAPQLDKFLQ	QHS..KISNVVGS	SSTGDTVNKLAKSQAI			
ApxIIIA	114	.....	ERGLTLFAPQLDQFLQ	HS..KISNVVGS	SSTGDAVSKLAKSQTI			
ApxIA	101	.....	ERGIALFAPQFDKLLN	KNQ..KLSKSLG	GSSEALGQRLNKTQTA			
EhxA	90	.....	ERCVAIFAPQLDKLLQ	KYQ..KVGSKIG	GTAENVGNNLGKAGTV			
MmxA	104	.....	ERGIAIFAPQLDKLMQ	KHQ..NIGNKLG	GSAENLGNNLSKAGGV			
HlyA	104	.....	ERCVTIFAPQLDKLLQ	KYQ..KAGNKL	GSAENIGDNLGKAGSV			
MbxA	81	.....	QTGIAISATKLEKFLQ	KHSTNKLAKGL	DS.VENIDRKLGKASN			
RtxA	102	.....	QTCVAVSAKLDLQLQ	KYSSQLAKSLG	SANIDSKLTKTNHI			
ApxIIA	105	.....	DRGIVLFAPQLDNL	LKKNP..KIGNTL	GSAESISQNIKANTV			
LktA	102	.....	ERGIVLSAPQIDKLLQ	K..T..KAGQAL	GSAESIVQNAKAKTV			
PILktA	102	.....	ERGIVLSAPQLDKLLQ	K..Y..KISKAP	GSAENVAKNLGNAQTL			
CyaA	401	DSGYDSL	DGVGSR	SFSL	LGEVSDMAAVEAAE	LEMTRQVLHAGARQDDA	EPGVSGA	SAHWGQ
LtxA	144	LGTLQAF	LNTAFS	GMDL	DA.....	LIKARQ..NG..KNV	TDVQLAKA	.....
PaxA	156	ISGVQSV	LGSVLAGI	NLNE	.....	AIISG.....	GSELELAKA	.....
ApxIIIA	156	ISGIQSV	LGTVLAGI	NLNE	.....	AIISG.....	GSELELAEA	.....
ApxIA	143	LSALQSF	LGTAIAGM	LDS	.....	LLRRRR..NG..EDV	SGSELAKA	.....
EhxA	132	LSALQNF	TGIALSGM	LDE	.....	LLRKQR..EG..EDIS	QNDIAKS	.....
MmxA	146	LSTLQNF	LGIALLSM	LDD	.....	LLKKQH..KG..EDV	SNELAKA	.....
HlyA	146	LSTFQNF	LGTALSSM	KIDE	.....	LIKQK..SG..GNV	SSELAKA	.....
MbxA	124	LSTLSSF	LGTALAGI	ELDS	.....	LIKKG.....	DAAPDALAKA	.....
RtxA	145	LSTLSSF	LGTALAGM	LDS	.....	LVKQG.....	DASATDLAKA	.....
ApxIIA	146	LGGIQS	ILGSVLSG	VNLNE	.....	LLQNK.....	DPNQLELAKA	.....
LktA	142	LSGIQS	ILGSVLAGM	LDE	.....	ALQNN.....	SNQHALAKA	.....
PILktA	142	LSGIQS	ILGSVLAGM	LDE	.....	ILKNK.....	GSELELAKA	.....
CyaA	461	RALQGAQA	VAAAQR	LVHAI	ALMTQFGRAGSTNT	PQEAASLSAAV	FGLCEASS	SAVAETVSG
LtxA	182	.....	SLNLINE	LIGTI	SSITN	.....	NVDTFSKQLNKL	CEALGQVK.HFGS
PaxA	189	.....	GVDLASE	LVGNIA	KGTA	.....	TIEAFSEQIQNF	GKLVQNAK.GLGG
ApxIIIA	189	.....	GVSLEASE	LVSNIA	KGTT	.....	TIDAFITTIQIQNF	GKLVENAK.GLGG
ApxIA	181	.....	GVDLAAQ	LVDNIA	SATG	.....	TVDAFAEQLGKLG	CNALSNTRLSG
EhxA	170	.....	SIELINQ	LVDTV	SSINS	.....	TVDSFSEQLNQL	CSPFLSSKPR.LSS
MmxA	184	.....	SIELINQ	LVDTA	ASVNN	.....	NIDAFSEQINKL	GGLSNTK.HLKG
HlyA	184	.....	SIELINQ	LVDTA	ASLN	.....	NVNSFSQQLNKL	GSVLSNTK.HLNG
MbxA	158	.....	SIDLIN	EIIGNL	SQSTQ	.....	TIEAFSSQLAKL	CSTISQAK.GFSN
RtxA	179	.....	SLDLIN	ELVNNI	SNVQ	.....	SIEAFSEQLGRL	GAAISQTK.GLSG
ApxIIA	180	.....	GLELTNE	LVGNIA	SSVQ	.....	TVDAFAEQISKL	GSHLQNVK.GLGG
LktA	175	.....	GLELTNS	LIENIA	NSVK	.....	TLDEFGEQISQF	CSKLQNIK.GLGT
PILktA	175	.....	GLDLINS	LIENIA	NSLQ	.....	TFDTFADKINQF	CSKLQNVK.GLGA

**Figure 4.5. Alignment of the translocation region of CyaA with other RTX toxins.** MSA was performed with Clustal Omega software<sup>357</sup> and plotted with ESPrnt 3.0<sup>331</sup>. The name of the toxin and the number of the corresponding residues of the primary sequence are shown in the left side. CRAC motifs are depicted in purple and CARC motifs in blue. The strictly conserved glycine residues are highlighted with a red frame.

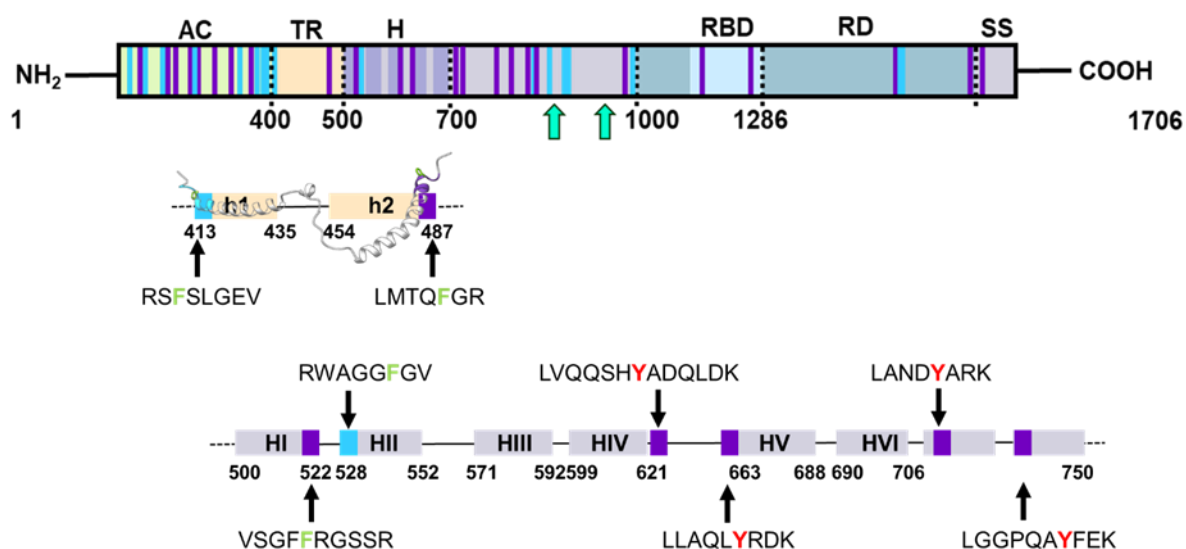


**Figure 4.6. Alignment of the hydrophobic domain of CyaA against other RTX toxins.** MSA was performed with Clustal Omega software<sup>357</sup> and plotted with ESPrpt 3.0<sup>331</sup>. The name of the toxin and the number of the corresponding residues are shown in the left side. CRAC and CARC motifs are underlined in purple and blue, respectively. The strictly conserved alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, glutamine, glycine, isoleucine, leucine, lysine, proline, threonine and tyrosine residues are highlighted with a red frame.



4.3.3. Functional characterization of CARC<sup>415</sup>, CRAC<sup>485</sup>, CRAC<sup>521</sup> and CARC<sup>532</sup> motifs

The simple identification of a putative CRAC/CARC motif in a primary protein sequence is not sufficient to understand the relationship between a given protein and the sterol<sup>185</sup>. In this work, we have functionally characterized four putative cholesterol-recognition sites that have not been examined yet: CARC<sup>415</sup>, CRAC<sup>485</sup>, CRAC<sup>521</sup> and CARC<sup>532</sup>, which are located adjacent to four predicted  $\alpha$ -helical segments that are believed to interact with membranes<sup>81,215</sup> (Fig. 4.7).



**Figure 4.7. Location of different CRAC/CARC sites in the primary sequence of CyaA.** Nine out of the forty distinct motifs identified in CyaA were located in two membrane interacting regions, constituted by several  $\alpha$ -helices. The helical segments corresponding to the translocation region were redrawn from the NMR structure solved by Sukova and colleagues (PDB ID: 6RFM)<sup>215</sup>; the helical segments belonging to the hydrophobic domain have been predicted with the Phillius algorithm<sup>217</sup>. The color code of CyaA domains is similar to that of Fig. 1.10. CRAC and CARC motifs are depicted in purple and blue, respectively. The central phenylalanine and tyrosine residues are highlighted in green and red, respectively.

To test the relationship of those CRAC/CARC segments with function, we introduced F/A substitutions in the full-length toxin, and determined whether they altered protein function and/or interaction with cholesterol. We constructed the following mutant toxins: CyaA-F415A, CyaA-F485A, CyaA-F521A, CyaA-F532A, CyaA-F415A-F485A, CyaA-F521A-F532A, CyaA-F485A-F521A-F532A and CyaA-F415A-F485A-F521A-F532A.

#### 4.3.3.1. Mutations in the putative CRAC/CARC motifs affect CyaA-induced hemolysis

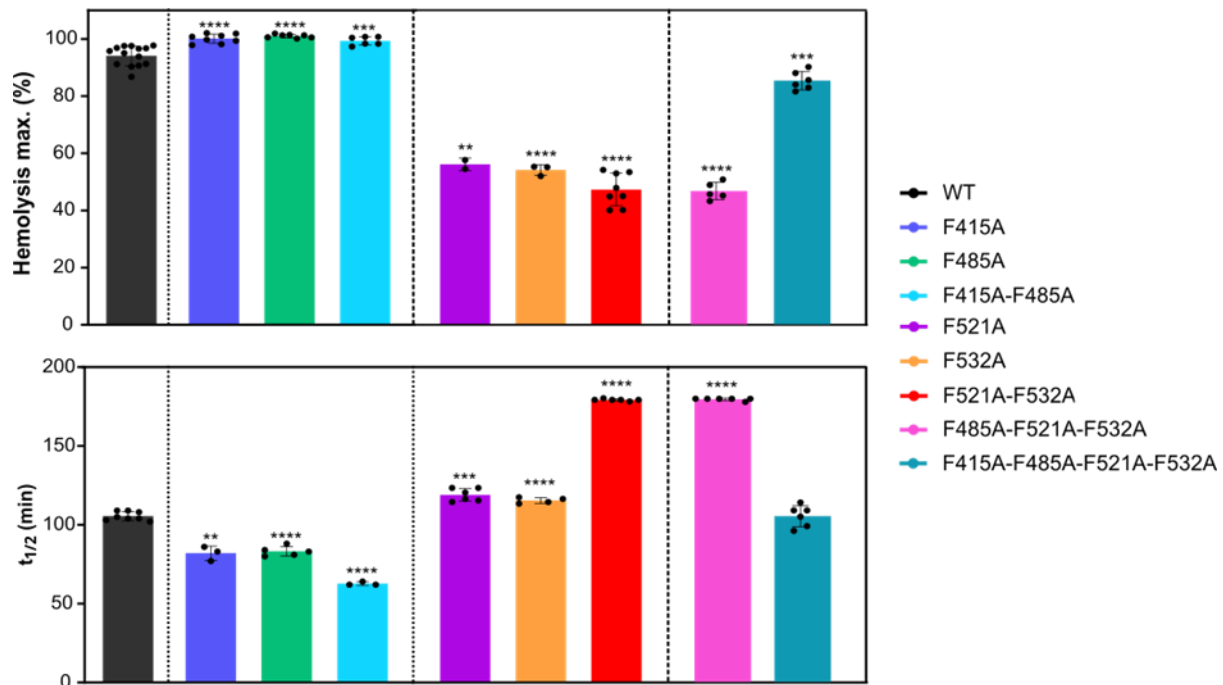
We have examined the effect of such mutations firstly on the toxin-induced hemolysis (**protocol 3.6.1.4**). Maximum hemolysis data at 180 min and  $t_{1/2}$  values are depicted in **Fig. 4.8**. As observed in the figure, the F/A substitutions had different effects depending on the location of the CRAC/CARC sites in the CyaA structure.

First, substitutions in the CARC<sup>415</sup> and CRAC<sup>485</sup> motifs in the translocation region (left subpanel) led to a faster and slightly greater lytic activity of the respective mutant toxins (F415A, dark blue; F485A, green and F415A-F485A, light blue). Importantly, the double mutant F415A-F485A showed a significantly faster kinetic, reflected in the lower  $t_{1/2}$  values, compared to the single mutants, suggesting that those mutations had additional effect. In sum, preventing the interaction of CARC<sup>415</sup> and CRAC<sup>485</sup> motifs with membrane cholesterol slightly augmented the extent of toxin-induced hemolysis and considerably increased the rate of the hemolytic kinetics.

On the contrary, the substitutions in the respective CRAC<sup>521</sup> and CARC<sup>532</sup> motifs in the hydrophobic domain (central subpanels) induced a prominent inhibitory effect on the lytic activity of the mutant toxins. In addition, the double mutation F521A-F532A (red) reduced approximately to the half the maximum hemolysis percentage with respect to the WT (black). This reduction was similar to the observed for the single F521A (purple) and F532A (orange) mutations, indicating that the double mutation had no additive effect, and suggesting that it is enough the loss of one of both cholesterol-binding sites at the hydrophobic domain to hinder the formation of CyaA pores. Yet, the double mutation substantially reduced the rate of permeabilization as observed in the significant increase of  $t_{1/2}$  values. Our results demonstrate that cholesterol recognition through the CRAC<sup>521</sup> and CARC<sup>532</sup> motifs is involved and necessary for the lytic activity of CyaA.

Finally, mutations affecting both domains (right subpanel) showed opposite effects. The triple mutant F485A-F521A-F532A (magenta) showed an impaired hemolytic activity similar to the double F521A-F532A mutant. On the contrary, the quadruple mutant F415A-F485A-F521A-F532A (turquoise) recovered the hemolytic activity, almost like the WT. It seems, thus, that F415A mutation, or the combination of both F415A and F485A, have stronger impact than F485A itself on recovering the lytic activity that has been impaired by the F521A-F532A substitutions.

Data presented here suggests that mutations affecting cholesterol-binding sites located in the translocation region fasten the lytic ability of CyaA, whereas modifications at the hydrophobic domain block the hemolytic capacity showing additive effect.



**Figure 4.8.** F/A substitutions in the putative CRAC/CARC motifs significantly affect the hemolytic activity of CyaA. Maximum hemolytic percentages (top) and  $t_{1/2}$  of the CyaA-induced hemolysis (bottom) are shown. 50 nM WT CyaA or mutant toxins were incubated with erythrocytes at 37 °C for 180 min. Data represented correspond to the mean  $\pm$  SE from at least three experiments performed independently with triplicates (n=9). One-way ANOVA (Brown–Forsythe and Welch test) with Dunnett’s T3 multiple comparison test was used to determine whether there is a significant difference between the mean values of our independent groups (\*\*\*)  $p < 0.001$  and \*\*\*\* if  $p < 0.0001$ .

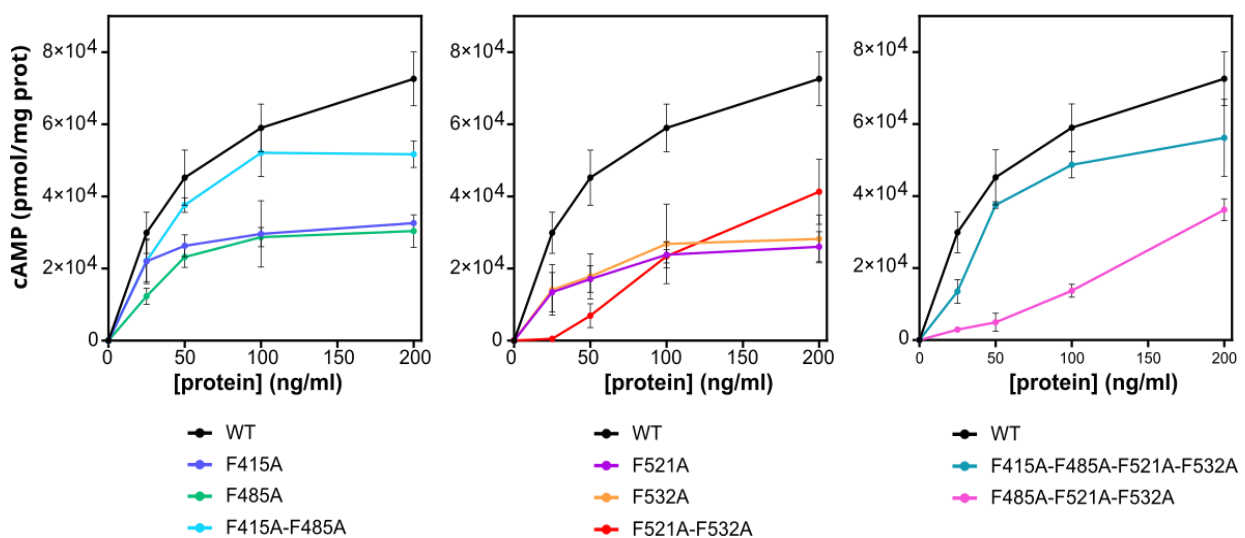
#### 4.3.3.2. Effect of mutations in putative CRAC/CARC motifs in the AC activity

To assess the capacity of the mutant CyaA variants to penetrate host cells, we quantified intracellular cAMP production in J774A.1 macrophages as detailed in **protocol 3.6.2.2 (Fig. 4.9)**.

As seen in the left subpanel, F415A (blue) and F485A (green) mutations caused a similar inhibitory effect on the cAMP production in a toxin concentration-range between 25–200 ng/mL. In both cases, AC domain delivery was reduced to the half compared to the WT (black). The double F415A-F485A mutation (light blue) also inhibited the production of intracellular cAMP; however, the decrease in cAMP synthesis was not as prominent as with single mutants.

On the contrary, F521A, F532A and F521A-F532A mutant toxins caused a greater and similar inhibition. It should be noted that at low toxin concentrations (< 50 ng/ml) the inhibition is total for the double mutant, indicating that the effect of those mutations might be additive.

Finally, the triple F485A-F521A-F532A (magenta) and quadruple F415A-F485A-F521A-F532A (turquoise) mutants presented in the right subpanel displayed opposite behaviors. Related to what was described in **section 4.3.3.1**, F485A-F521A-F532A and F521A-F532A mutants showed identical cAMP production curves; whereas the curves corresponding to F415A-F485A-F521A-F532A and F415A-F485A mutants were similar to each other. In the case of the last two, the inhibitory effect of the mutations on cAMP production was more subtle.



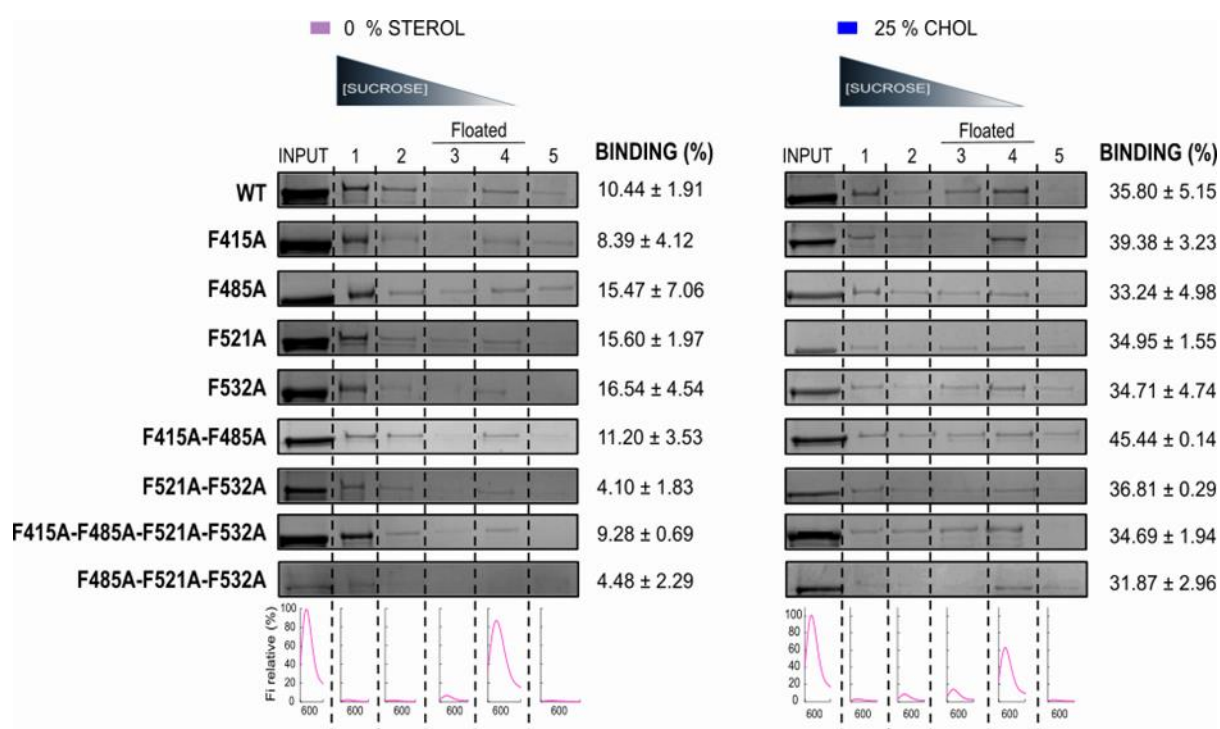
**Figure 4.9. Key F/A substitution in the putative CRAC motifs has significant impact in the cAMP elevation.** AC domain delivery was measured in J774A.1 macrophages by determining the intracellular concentration of cAMP (pmol) generated per total amount of protein (mg). Data represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments with triplicates (n=9).

Our results indicated that interaction with cholesterol through the CARC<sup>415</sup>, CRAC<sup>485</sup>, CRAC<sup>521</sup> and CARC<sup>532</sup> motifs is necessary and instrumental to translocate the AC domain into the target cells and suggests that both the translocation region and the pore-forming domain must be properly inserted into the membrane for AC delivery.

## 4.3.3.3. Mutations in CRAC/CARC motifs do not alter CyaA binding to lipid bilayers

To determine whether such mutations had any effect on the toxin binding to lipid bilayers, we performed a control experiment (**protocol 3.3.5.2**).

Data represented in **Fig. 4.10** indicate that the binding percentage was similar for all the mutant toxins relative to the intact CyaA. ~10% toxin was bound to pure DOPC, whereas ~40% to DOPC/CHOL vesicles. Therefore, we confirm that the reduced lytic activity caused by F521A and F532A mutations was not due to a lower protein binding. Similarly, we could discard a greater binding as possible cause of the observed increment in the hemolysis percentage observed for the F415A and F485A mutant toxins. These data suggests that CyaA association is mediated likely by multiple binding sites, which may be more than the explored four motifs, and so that individually, none of the mutated CRAC/CARC sites avoided overall CyaA binding to the membrane.

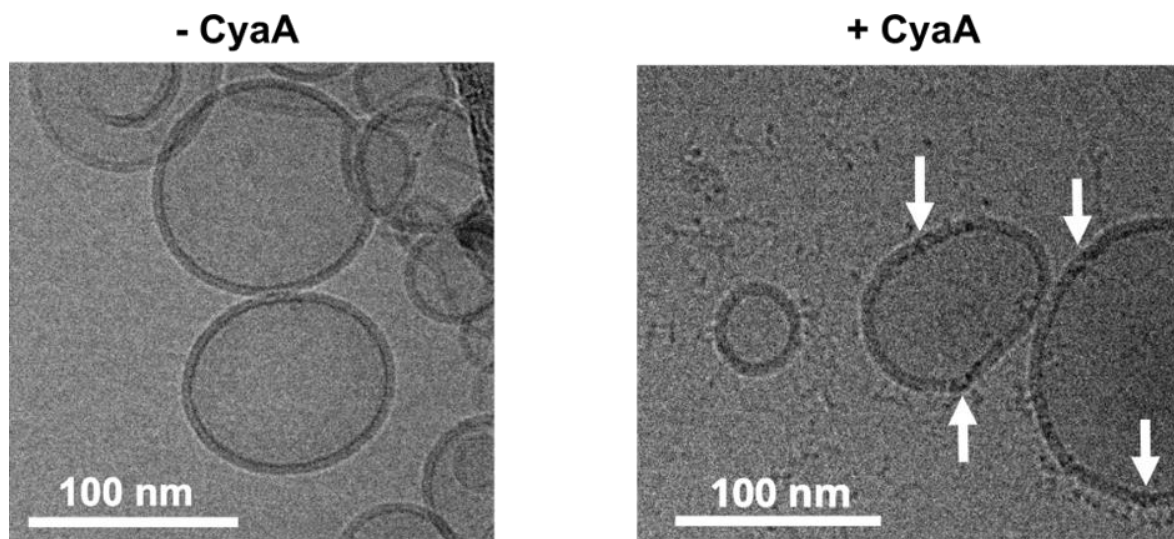


**Figure 4.10. Vesicle flotation analysis of mutant CyaA toxins.** Incorporation of CyaA to pure DOPC and DOPC/CHOL (1:1 molar ratio) vesicles was verified after ultracentrifugation in a sucrose gradient (protein-to-lipid mole ratio, 1:2000). The presence of the protein in the floated and non-floated fractions of the gradient and in the original sample (INPUT) was revealed by Coomassie Blue analysis after SDS-PAGE separation. Rho-PE fluorescence emission spectra reveal the presence of vesicles in the collected fractions. Binding (%) data correspond to the mean of at least three independent experiments ± SE.

#### 4.3.4. Early steps in the structural analysis of CyaA in lipid bilayers

The crystal structure of the AC domain of CyaA was solved 20 years ago<sup>210</sup>, and more recently, the structure of the translocation region and the repeat domain have been revealed by NMR<sup>215</sup> and cryo-EM<sup>130</sup>, respectively. However, solving a high-resolution 3D structure of the membrane-interacting CyaA is still one of the long-standing gaps in the field.

Reconstituting CyaA in liposomes for cryo-EM data acquisition may represent a valuable approach to solve the 3D structure of the toxin in lipid bilayers. In collaboration with Dr. Igor Tascón, we show some preliminary cryo-EM images of CyaA decorating lipid vesicles (**protocol 3.5**) (**Fig. 4.11**). The representative image in the left shows nude DOPC/CHOL liposomes (SUVs) while the right side image displays membrane associated protein molecules (indicated with white arrows).



**Figure 4.11. Lipid vesicles decorated with CyaA.** Cryo-EM images of DOPC/CHOL (1:1 molar ratio) SUVs without (left) and with CyaA (right). Cryo-EM images were obtained by Dr. Isaac Santos in a JEM-2200FS/CR transmission electron microscope (JEOL, Japan), equipped with a K2 direct electron detector device (GATAN, UK), equipped with a 200 kV field emission gun (FEG) and an omega in-column energy filter at the Electron Microscopy and Macromolecular Crystallography Platforms in CIC bioGUNE (Bizkaia Science & Technology Park, Derio, Spain).

We show here that CyaA can be reconstituted into lipid bilayers and visualized by cryo-EM. Yet, these are very early steps. Sample optimization (homogeneity, adequate particle concentration, similar vesicle size, etc.) would be required for single particle picking and data processing. We hope these results may encourage others to one day solve the structure of the full-length toxin in lipid membranes.

#### 4.4. DISCUSSION

Insertion and assembly of PFTs have been the subject of hundreds of investigations to understand protein conversion from water-soluble forms to stable membrane-integrated structures<sup>358–361</sup>, especially considering the resemblance of their mechanism of action to proteins of the vertebrate immune system, or to amyloid proteins<sup>362,363</sup>.

Cholesterol, an essential component of the plasma membrane of eukaryotic cells, has been reported to have a pivotal role in facilitating structural rearrangements of proteins upon association with the lipid bilayer<sup>188</sup>. Particularly, cholesterol has been reported to modulate the biological functions of *B. pertussis* CyaA toxin in host cells<sup>165,168</sup>. Yet, it was still unclear whether this was due to direct binding to cholesterol, or to indirect effects attributed to the modification of membrane properties, involving lateral segregation of lipids and consequent formation of nanodomains. Here, we clarify that cholesterol promotes the membrane binding of CyaA, primarily due to specific toxin-sterol interaction<sup>191</sup>.

First, we show that CyaA preferentially binds to cholesterol-containing liposomes and that the interaction is not enhanced by the indirect effects of cholesterol as inducer of phase segregation. The solubility limit of cholesterol in PC bilayers was reported to be 66% mole<sup>352</sup>. Flanagan and colleagues later measured by steady-state anisotropy of diphenylhexatriene (DPH) that liposomes containing DOPC/CHOL mixtures (30–55% cholesterol) presented low anisotropy and hence, had a L<sub>d</sub> phase and did not segregate into different phases at those molar ratios<sup>364</sup>. Consequently, the DOPC/CHOL mixtures utilized here, containing 25% or 50% mole cholesterol, are completely miscible and have a single L<sub>d</sub> or L<sub>o</sub> phase<sup>51</sup>. Furthermore, the fact that membrane cholesterol, but not ergosterol, enhanced toxin binding suggests a specific interaction between CyaA and cholesterol (**section 4.3.1**).

Other four RTX toxins have been previously shown to specifically bind cholesterol as well<sup>138,150,164,170</sup>. Some of them, such as *A. actinomycetemcomitans* LtxA<sup>138</sup>, *K. kingae* RtxA<sup>150</sup> and UPEC HlyA<sup>193</sup>, display functional cholesterol CRAC sites in their primary sequences. Here, we explore 13 toxins of the RTX family and broaden the search algorithm to include motifs containing phenylalanine in the central position (CRAC (L/V)-X<sub>1,5</sub>-(Y/F)-X<sub>1,5</sub>-(R/K) and CARC (L/V)-X<sub>1,5</sub>-(Y/F)-X<sub>1,5</sub>-(R/K)). We find at least a total number of 25 putative CRAC/CARC sites in each toxin.

We further analyze to what extent those motifs were conserved in the family and relevant for the action mechanisms (**section 4.3.2**). The high number of functional cholesterol-recognition

sites found in the pore-forming domain of these RTX toxins suggests that this segment (residues ~300–400) might be a kind of “hot spot”, harboring several conserved cholesterol-binding sites. Given that various hydrophobic/amphipathic  $\alpha$ -helices can be predicted in this region, which supposedly insert into the membrane, it is very tempting to speculate that cholesterol recognition through those sites may be essential for the proper productive insertion of those helices into the membrane. This would help explain why these toxins depend on cholesterol to be cytotoxic for their target cells, a feature that appears to be commonly shared in the family<sup>365</sup>.

Regarding *B. pertussis* CyaA, we identify the CARC<sup>404</sup>, CARC<sup>415</sup>, CRAC<sup>485</sup>, CRAC<sup>521</sup>, CARC<sup>532</sup>, CRAC<sup>632</sup>, CRAC<sup>658</sup>, CRAC<sup>725</sup> and CRAC<sup>738</sup> sites in the translocation region and pore-forming domain. In 2017, Masin and colleagues reported that CRAC<sup>632</sup>, CRAC<sup>658</sup>, CRAC<sup>725</sup> and CRAC<sup>738</sup> sites rather than being part of CRAC motifs, play a structural role in  $\alpha$ -helical segments that are involved in CyaA activities<sup>170</sup>. Therefore, here we explored the other putative CARC<sup>415</sup>, CRAC<sup>485</sup>, CRAC<sup>521</sup> and CARC<sup>532</sup> motifs, using F/A substitutions in the full-length toxin.

We show that F/A mutations in CARC<sup>415</sup> and CRAC<sup>485</sup> motifs within the translocation region, inhibit cAMP production, but, on the contrary, enhance the rate and extent of hemolysis<sup>191</sup>. Dissociating effects of F415A and F485A substitutions, are consistent with a previous study showing that a monoclonal antibody 3D1, which binds to an epitope (amino acids 373-399) at the distal end of the catalytic domain, blocks AC delivery and causes an increase in the hemolytic activity of three to four folds<sup>212</sup>. In parallel, mutations affecting CRAC<sup>521</sup> and CARC<sup>532</sup> sites in the hydrophobic domain decrease both AC domain transport and hemolysis<sup>191</sup>. Together these results reveal the existence of four functional cholesterol-binding motifs in key membrane-interacting domains of CyaA, which may be molecular determinants of cholesterol binding, thereby explaining the cholesterol-dependence of CyaA cytotoxicity (**section 4.3.3**).

Regarding the conservation of CRAC/CARC sites in RTX toxins, *B. pertussis* CyaA toxin seems to be a kind of *rara avis* in the family context. We find that none of the four functional CRAC/CARC motifs described here are conserved in the rest of the toxins analyzed (**section 4.3.2**). This may not be so strange in the end, given that this segment is involved in the AC domain transport, a function that does not exist in the other family members, and therefore, could be exclusive to CyaA as believed. But more remarkable is perhaps the fact that none of the other six CRAC/CARC sites identified in the pore-forming domain<sup>170</sup> are conserved in the



rest of the RTX toxin family either. The exact meaning of the no conservation of the CRAC/CARC motifs in the CyaA sequence, and whether it may be related or not with different structural elements or different mechanisms involved in the insertion of the pore-forming domain of CyaA within the target cell membrane, is yet unknown.

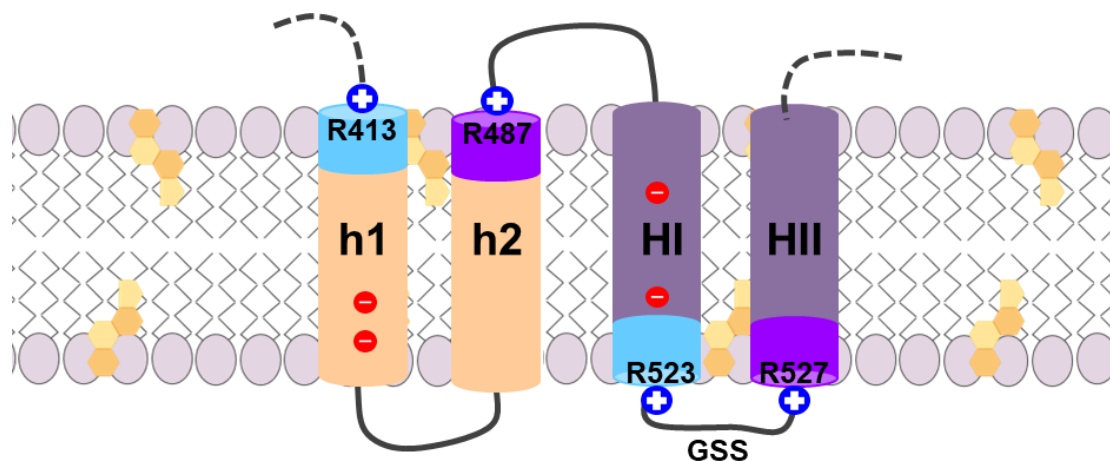
Up to now, it was unclear whether the insertion of these helices into the lipid bilayer is a thermodynamically spontaneous process or requires assistance from membrane lipid components. Neither was clear, which the exact topology of these helices is in the active CyaA form. Computer-assisted analysis of TM helices using common prediction programs and abundant mutational data<sup>83,110,222</sup> converge on predicting an intramembrane location of the hydrophobic HII helix, whereas predictions for HI helix are not unanimous. HI is amphipathic and presents two negatively charged glutamine residues (E<sup>509</sup> and E<sup>516</sup>) in the middle of its sequence, which could impose an energetic penalty, making TM insertion of HI helix less favorable. The Philius algorithm ([TOPCONS](#) server)<sup>217</sup> predicts HI and HII to be both TM, HI inserting with N<sub>out</sub>-C<sub>in</sub> topology and HII with N<sub>in</sub>-C<sub>out</sub> topology. According to the prediction, the C-terminal CRAC<sup>521</sup> of HI and the N-terminal CARC<sup>532</sup> of HII would be placed in a membrane environment, both facing the cytosolic side of the plasma membrane, and five residues R<sup>523</sup>GSSR<sup>527</sup> connecting both helices, would be outside the membrane (see **Fig. 4.12**).

According to the CRAC algorithm, the side chains of hydrophobic residues (i.e. leucine and valine) can intercalate with the aliphatic chains of the rough face of cholesterol<sup>188</sup> and the positively charged arginine residues would locate their long non-polar aliphatic side chain within the apolar membrane, and the basic positively charged group emerging at the interface<sup>366</sup>. Our data showing that F521A and F532A substitutions cause a potent inhibition of the CyaA activity (**Figs. 4.8** and **4.9**, central subpanels) are fully consistent with the notion that F521 and F532 may be buried within the membrane and participate in cholesterol binding. These data, hence, provide experimental support to the aforementioned Philius prediction and suggest that binding to membrane cholesterol through the CRAC<sup>521</sup> and CARC<sup>532</sup> motifs may be involved in the stabilization of HI and HII within the lipid bilayer to confer the adequate membrane topology for both CyaA activities.

The translocation region of CyaA was recently reported to be necessary for AC domain translocation<sup>211-213</sup>. However, so far, it was not clear whether both h1 and h2 interact with the membrane for translocation or only h2<sup>216</sup>. Our results with F415A, F485A and F415A-F485A mutants (**Figs. 4.8** and **4.9**, left subpanels), which are consistent with a previously published study<sup>212</sup>, suggest that in the cholesterol-rich eukaryotic plasma membrane, binding to

cholesterol through the CARC<sup>415</sup> and CRAC<sup>485</sup> motifs drives h1 and h2 to embed into the membrane, and further, that this insertion is essential for AC translocation. By contrast, our data seems to disagree with the view that only h2 interacts with the membrane. The apparent discrepancy may be due to that none of the two peptides employed in the study mentioned above contained in their sequence the CARC<sup>415</sup> and CRAC<sup>485</sup> sites<sup>216</sup>.

Having established the membrane topology of HI and HII helices and considering that the results obtained with CARC<sup>415</sup> and CRAC<sup>485</sup> mutants support an intramembrane insertion of h1 and h2 helices, the topology of these last two helices can be delineated. h2 would insert with N<sub>in</sub>-C<sub>out</sub> orientation and h1 with N<sub>out</sub>-C<sub>in</sub> orientation. In this case, the CARC<sup>415</sup> and CRAC<sup>485</sup> motifs would be both facing the extracellular side, binding to cholesterol molecules in the exofacial side of the membrane. The TM topology of the h1-h2-HI-HII  $\alpha$ -helices, as proposed here is schematically depicted in **Fig. 4.12**.



**Figure 4.12. Schematic model of the membrane topology for the h1-h2-HI-HII helices.** The membrane topology for the h1, h2 (translocation region) and HI-HII (hydrophobic domain) helices is proposed here. HI and HII would adopt N<sub>out</sub>-C<sub>in</sub> and N<sub>in</sub>-C<sub>out</sub> topology, respectively. h1 and h2 topology would be N<sub>out</sub>-C<sub>in</sub> and N<sub>in</sub>-C<sub>out</sub> respectively. In this case, CARC<sup>415</sup> and CRAC<sup>485</sup> motifs would be facing the extracellular side and h1 and h2 would bind cholesterol in the exofacial side of the membrane. The four cholesterol-binding sites identified in this study, the CRAC<sup>415</sup> and CRAC<sup>532</sup> motifs (purple) and the CARC<sup>485</sup> and CARC<sup>521</sup> motifs (blue) are highlighted. Arginine residues (blue positive charges) and glutamic acid (red negative charges) cited in the text have been included. A cartoon representation of the cell membrane with phospholipid (purple) and cholesterol molecules (orange-colored pentahexagonal figures) has been included as well.

## CHAPTER 4: INTERACTION BETWEEN CyaA AND CHOLESTEROL

Lipid-mediated stabilization of TM helices appears to be a unifying mechanism to modulate toxicity in PFTs<sup>324</sup>. This study provides a paradigm for the basis of cholesterol dependence for other pore-forming RTX toxins whose mechanism is enhanced by the presence of membrane cholesterol. In sum, it appears that several members of the RTX family use of cholesterol recognition motifs of the CRAC/CARC type to directly bind this sterol in the target membrane.

We believe our contribution adds new relevant insights to a field with scarce structural and mechanistic information and may thus inspire other investigators to raise new questions that can pave the way for understanding the mechanisms of cytotoxicity by CyaA and other RTX toxins, and hopefully to have a 3D structure of CyaA on lipid bilayers.

## 4.5. SUPPLEMENTARY MATERIAL

## 4.5.1. Supplementary tables

**Table S.4.1. Putative CRAC motifs identified in the pore-forming domain of several RTX toxins.**  
Central phenylalanine and tyrosine residues are highlighted in green and red, respectively.

MOTIF	ORGANISM	RTX TOXIN	RESIDUES	SEQUENCE
<b>CRAC</b>	EHEC	EhxA	407–414	VADK <b>F</b> AA <b>R</b>
			339–345	LLAA <b>F</b> HK
			322–331	LES <b>Y</b> SER <b>F</b> KK
			310–320	LAIADK <b>F</b> ERAK
			307–315	LS <b>F</b> LAIADK
			273–281	VSQ <b>Y</b> IL <b>A</b> QR
	<i>M. haemolytica</i>	LktA	401–405	LQ <b>Y</b> SK
			344–350	LLAE <b>Y</b> QR
			327–336	LES <b>Y</b> AER <b>F</b> KK
			312–320	LA <b>F</b> AGIADK
			278–286	VSS <b>Y</b> IL <b>A</b> QR
	<i>M. varigena</i>	PILktA	401–405	LQ <b>Y</b> SK
			344–350	LLAQ <b>Y</b> QR
			327–336	LES <b>Y</b> AER <b>F</b> KK
			312–320	LA <b>F</b> AGIADK
			278–286	VSS <b>Y</b> IL <b>A</b> QR
			220–228	LKN <b>F</b> SG <b>F</b> SK
	<i>P. aerogenes</i>	PaxA	417–421	LE <b>F</b> SK
			353–359	LG <b>Y</b> EGDK
			331–341	LRVADN <b>F</b> NR <b>S</b> K
			328–332	LS <b>F</b> LR
			294–302	VSS <b>Y</b> IL <b>A</b> QR
			259–268	VTAS <b>F</b> TLADK
			124–133	LDK <b>F</b> LQ <b>Q</b> HSK
			117–126	LTL <b>F</b> APQLDK
	<i>M. morgani</i>	MmxA	453–462	LEDN <b>F</b> KLLSK
			324–334	LAVADK <b>F</b> KRAR
			321–329	LS <b>F</b> LAVADK
			287–295	VSQ <b>Y</b> IL <b>A</b> QR
	UPEC	HlyA	459–464	LSQ <b>Y</b> NK
352–358			LLAA <b>F</b> HK	
323–334			LSIADK <b>F</b> KRANK	
320–328			LS <b>F</b> LSIADK	
198–210			LNNVNS <b>F</b> SQQLNK	
117–127			LLQ <b>Y</b> QKAGNK	
<i>B. pertussis</i>	CyaA	732–741	LGGPQA <b>Y</b> FEK	
		721–728	LAND <b>Y</b> ARK	
		653–661	LLAQL <b>Y</b> RDK	
		626–638	LVQQSH <b>Y</b> ADQLDK	
		518–527	VSG <b>F</b> RGSSR	

## CHAPTER 4: INTERACTION BETWEEN CyaA AND CHOLESTEROL

	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<b>LtxA</b>	481–487	LMTQ <b>F</b> GR
			455–464	LKL <b>F</b> NELREK
			351–357	LLGQ <b>F</b> YK
			334–343	LEE <b>Y</b> SKRFKK
			322–332	LGI <b>A</b> KQ <b>F</b> DRAR
			319–326	LS <b>F</b> LGI <b>A</b> K
			217–228	VKH <b>F</b> GS <b>F</b> GDKLK
			214–226	LGQ <b>V</b> KH <b>F</b> GS <b>F</b> GDK
			200–209	VDT <b>F</b> SKQLNK
	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<b>ApxIA</b>	455–461	LLS <b>Q</b> <b>Y</b> NK
			349–355	LLAS <b>F</b> <b>Y</b> R
			332–341	LE <b>Q</b> <b>Y</b> SER <b>F</b> KK
			320–330	LNV <b>A</b> D <b>K</b> <b>F</b> ER <b>A</b> K
			317–325	LS <b>F</b> LN <b>V</b> AD <b>K</b>
			283–291	VS <b>Q</b> <b>Y</b> I <b>A</b> QR
			247–257	VVS <b>A</b> S <b>F</b> IL <b>S</b> NK
			199–208	VDA <b>F</b> AE <b>Q</b> L <b>G</b> K
			106–117	LFAP <b>Q</b> <b>F</b> D <b>K</b> LLNK
		<b>ApxIIA</b>	449–461	LQDN <b>M</b> <b>K</b> <b>F</b> LINLNK
			406–410	LE <b>Y</b> SK
			349–355	LLAD <b>F</b> H <b>R</b>
			342–348	LG <b>Y</b> D <b>G</b> D <b>R</b>
			331–341	LI <b>K</b> S <b>Y</b> SER <b>F</b> Q <b>K</b>
			314–325	VTPL <b>S</b> <b>F</b> LN <b>V</b> AD <b>K</b>
			283–291	VSS <b>Y</b> IL <b>A</b> QR
			195–207	VQTVDA <b>F</b> AE <b>Q</b> IS <b>K</b>
			101–106	LG <b>F</b> T <b>D</b> R
		<b>ApxIIIA</b>	417–421	LE <b>F</b> SK
			353–359	LG <b>Y</b> D <b>G</b> D <b>K</b>
			331–341	LRVAD <b>N</b> <b>F</b> N <b>R</b> SK
			328–332	LA <b>F</b> L <b>R</b>
			294–302	VSS <b>Y</b> IL <b>A</b> QR
			259–268	VTAS <b>F</b> AL <b>A</b> N <b>K</b>
	124–133		LD <b>Q</b> <b>F</b> L <b>Q</b> K <b>H</b> SK	
<i>M. bovis</i>	<b>MbxA</b>	427–439	LANN <b>L</b> <b>K</b> <b>F</b> LSELNK	
		326–332	LLAE <b>Y</b> QR	
		309–318	LDE <b>F</b> AK <b>Q</b> FR <b>K</b>	
		294–302	LAF <b>M</b> NA <b>A</b> D <b>K</b>	
		203–210	LQNL <b>N</b> <b>F</b> SK	
<i>K. kingae</i>	<b>RtxA</b>	348–354	LLAE <b>Y</b> QR	
		330–340	LIDE <b>F</b> AK <b>Q</b> F <b>K</b> K	
		316–324	LAF <b>M</b> NA <b>A</b> D <b>K</b>	
		224–232	LQNL <b>P</b> <b>N</b> <b>F</b> G <b>K</b>	
		194–206	VQSIE <b>A</b> <b>F</b> SE <b>Q</b> L <b>G</b> R	

**Table S.4.2. Putative CARC motifs identified in the pore-forming domain of several RTX toxins.**  
Central phenylalanine and tyrosine residues are highlighted in green and red, respectively.

MOTIF	ORGANISM	RTX TOXIN	RESIDUES	SEQUENCE
<b>CARC</b>	EHEC	EhxA	434–443	RHAA <b>F</b> LED <b>S</b> L
			400–407	KQAM <b>F</b> EHV
			328–340	RFK <b>K</b> L <b>N</b> YEGD <b>A</b> LL
			271–278	KAVSQ <b>Y</b> IL
			102–110	KLLQ <b>K</b> YQ <b>K</b> V
	<i>M. haemolytica</i>	LktA	405–412	KQAM <b>F</b> EHV
			333–345	RFK <b>K</b> L <b>G</b> YDGD <b>N</b> LL
			276–287	KAVSS <b>Y</b> IL <b>A</b> Q <b>R</b> V
			259–270	KVGAG <b>F</b> EL <b>A</b> NQ <b>V</b>
	<i>M. varigena</i>	PILktA	405–412	KQAM <b>F</b> EHV
			333–345	RFK <b>K</b> L <b>G</b> YDGD <b>D</b> LL
			276–287	KAVSS <b>Y</b> IL <b>A</b> Q <b>R</b> V
			258–270	RKVGAG <b>F</b> EL <b>V</b> NQ <b>V</b>
			221–231	KNFSG <b>F</b> SK <b>A</b> GL
			199–207	KIN <b>Q</b> <b>F</b> GS <b>K</b> L
	<i>P. aerogenes</i>	PaxA	455–464	RHKA <b>F</b> LED <b>S</b> L
			349–361	RFK <b>K</b> L <b>G</b> YEGD <b>K</b> LL
			344–353	REFAER <b>F</b> <b>K</b> KL
			292–303	KAVSS <b>Y</b> IL <b>A</b> Q <b>R</b> L
			275–286	KVAAG <b>F</b> EL <b>S</b> NQ <b>V</b>
			115–124	RGL <b>T</b> L <b>F</b> AP <b>Q</b> L
	<i>M. morgani</i>	MmxA	458–469	KLLSK <b>Y</b> SEE <b>Y</b> SV
			414–421	KQAM <b>F</b> EHV
			342–354	RFK <b>K</b> F <b>G</b> YEGD <b>S</b> LL
			285–296	KAVSQ <b>Y</b> IL <b>A</b> Q <b>R</b> V
			105–114	RGIA <b>I</b> <b>F</b> AP <b>Q</b> L
	UPEC	HlyA	457–468	KIL <b>S</b> Q <b>Y</b> N <b>K</b> E <b>Y</b> SV
			413–420	KQAM <b>F</b> EHV
			341–353	RFK <b>K</b> L <b>G</b> YDGD <b>S</b> LL
			105–114	RGV <b>T</b> I <b>F</b> AP <b>Q</b> L
<i>B. pertussis</i>	CyaA	527–534	RWAGG <b>F</b> GV	
		413–420	RS <b>F</b> SL <b>G</b> EV	
		399–410	RQDSG <b>Y</b> DSL <b>D</b> GV	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	LtxA	456–461	KL <b>F</b> N <b>L</b>	
		446–455	RHSA <b>F</b> LED <b>S</b> L	
		340–352	RFK <b>K</b> F <b>G</b> Y <b>N</b> GD <b>S</b> LL	
		326–334	K <b>Q</b> <b>F</b> DR <b>A</b> R <b>M</b> L	
		218–227	KH <b>F</b> GS <b>F</b> GD <b>K</b> L	
	ApxA	461–469	KE <b>Y</b> S <b>V</b> ER <b>V</b> V	
		410–417	K <b>Q</b> A <b>I</b> <b>F</b> ER <b>V</b>	
		338–350	RFK <b>K</b> F <b>G</b> YEGD <b>S</b> LL	

CHAPTER 4: INTERACTION BETWEEN CyaA AND CHOLESTEROL

	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<b>ApxIIA</b>	281–292	KAVSQYIIAQRV
			410–417	KQAMFEHV
			338–350	RFQKLGVDGDRLL
			333–342	KYSYSERFQKL
			281–292	KAVSSYILAQRV
		<b>ApxIIIA</b>	352–360	KLGYDGDKL
			349–361	RFKKLGYDGDKLL
			292–303	KAVSSYILAQRLL
			275–286	KVAAGFELSNQV
			115–124	RGLTLFAPQL
	<i>M. bovis</i>	<b>MbxA</b>	422–431	RYAAYLANNL
			417–427	KGYDSRYAAYL
			387–394	KQAMFESV
			317–327	RKFGYDGDHLL
			258–269	KAISSYVLAQRV
240–252			KKVAAGFELSNQV	
202–213			KLQNLNFSKTNL	
<i>K. kingae</i>	<b>RtxA</b>	444–453	RHAHYLERNL	
		409–416	KQAMFESV	
		339–349	KKFGYDGDSSL	
		280–287	KAISSYVL	
		262–274	KKVAAGFELSNQV	





CHAPTER



**5**

## MEMBRANE-INTERACTING PROPERTIES OF A SYNTHETIC PEPTIDE DERIVED FROM THE TRANSLOCATION REGION OF CyaA TOXIN

**The results presented in this chapter have been published in:**

**Amuategi, J.**, Alonso, R., de la Arada, I., & Ostolaza, H. (2023). Membrane-penetrating peptide from the translocation region of *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin prevents toxin cytotoxicity on target cells (p. 2023.04.18.537300). *bioRxiv*.  
<https://doi.org/10.1101/2023.04.18.537300>

### 5.1. ABSTRACT

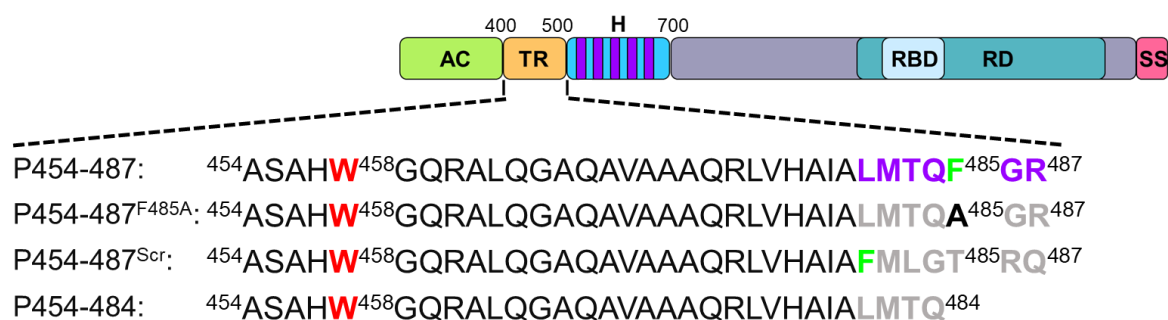
Using different biophysical approaches, we have explored here the membrane-interacting properties of an amphipathic peptide, P454–487, corresponding to residues 454–487 of CyaA containing the C-terminal CRAC<sup>485</sup> motif. Moreover, we explored whether this peptide is capable of binding to membrane cholesterol and consequently blocking CyaA toxicity on cells. To that end, we have analyzed the conformation and orientation adopted by this peptide upon reconstitution into lipid bilayers. We report that P454–487 inserts into DOPC vesicles adopting  $\alpha$ -helical structure partially penetrating into the bilayer in a tilted orientation. We show further that P454–487 is cholesterol-sensitive, experimenting a conformational change that critically depends on the presence of the central F485 residue in the CRAC motif. Finally, we find that P454–487 is not itself lytic, but outcompetes with the full-length toxin for membrane binding and inhibits both pore formation and AC domain translocation. Thus, we anticipate that such peptide may have a potential clinical applicability in controlling infection of *B. pertussis*.

### 5.2. INTRODUCTION

Several bacterial toxins, including toxins from the RTX family, carry CRAC and CARC sites to recognize cholesterol<sup>138,150,164</sup>, suggesting that the interaction with the sterol may be conserved in this toxin family. Binding to cholesterol is often an essential initial step in the mechanism of these pathogens, as toxins transit from the aqueous extracellular environment to the hydrophobic membrane core. Thus, disrupting this recognition process represents a possible method of inhibiting bacterial pathogenesis.

We recently found that the interaction between CyaA and cholesterol is highly specific, requiring both an intact CRAC sequence and a specific sterol structure. Importantly, the disruption of this interaction was sufficient to hinder toxicity<sup>192</sup>. In this chapter, we have explored the molecular recognition of cholesterol by the synthetic peptide, P454–487, that corresponds to residues 454–487 of CyaA primary structure. The synthetic peptide P454–487 contains the CRAC<sup>485</sup> (<sup>481</sup>LMTQFGR<sup>487</sup>) motif at its C-terminus, which is involved in cholesterol recognition by the full-length toxin<sup>192</sup>.

The principal aim of the study was to explore the membrane-interacting characteristics of P454–487, and particularly, the implication of the CRAC<sup>485</sup> motif in membrane association. To that end, we synthesized various mutant peptides. P454–487<sup>F485A</sup> with F/A substitution at position 485; P454–487<sup>Scr</sup> with the scrambled CRAC<sup>485</sup> motif, and the short P454–484 peptide corresponding to residues 454–484 (**Fig. 5.1**).



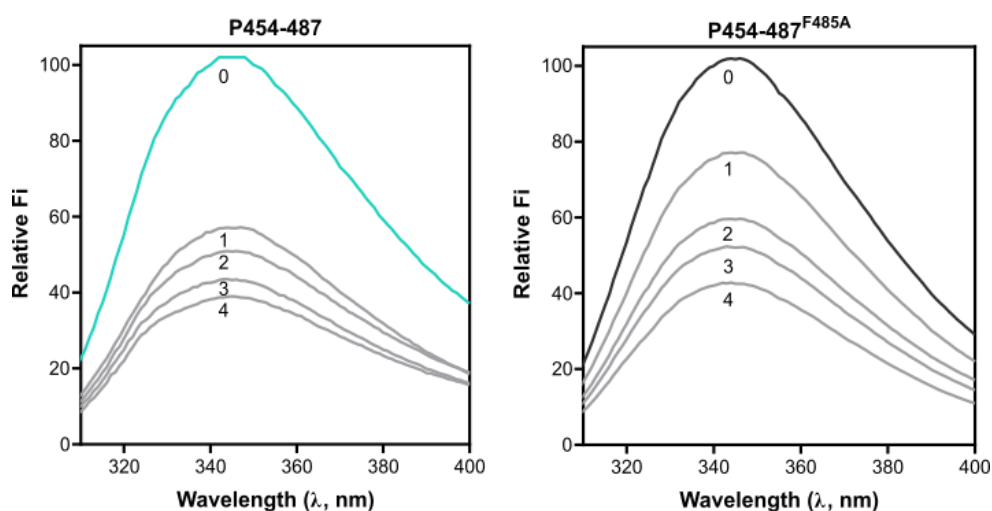
**Figure 5.1. Amino acid sequence of the synthetic peptides used in this work.** P454–487 corresponds to residues located within 454 and 487 of CyaA primary structure. At the C-terminal end, it has a CRAC motif (purple) with a central aromatic residue, F485 (green). The following mutant peptides were also employed: P454–487<sup>F485A</sup> with F/A substitution at position 485 (black); the P454–487<sup>Scr</sup> peptide with the scrambled CRAC<sup>485</sup> motif (<sup>481</sup>FMLGT<sup>485</sup>RQ<sup>487</sup>), and the short P454–484, corresponding to residues located within 454 and 484. All these peptides contain a single tryptophan at position 458, which is labelled in red. The color code of CyaA domains is similar to that of **Fig. 1.10**.

## 5.3. RESULTS

### 5.3.1. Cholesterol binding study of the P454–487 peptide

We have investigated the ability of P454–487 to bind cholesterol and examined whether the presence of the CRAC<sup>485</sup> motif could affect this interaction. To that end, first, we analyzed the intrinsic fluorescence of the unique tryptophan at position 458 in the presence of cholesterol in solution. Tryptophan fluorescence emission dipole is highly sensitive and hence, its location could be easily discernable between hydrophobic and hydrophilic environments<sup>301</sup>. The fact that this peptide contains a single tryptophan facilitates to directly obtain information about the solvent exposure, and thus, the structural integrity of the environment surrounding the W458 residue. The overall character of the fluorescence emission spectra of WT P454–487 and its variants were assessed by exciting at 295 nm and observing fluorescence emission intensities from 310 to 400 nm, in buffer with increasing cholesterol concentrations.

Subtracted tryptophan emission spectra shown in **Fig. 5.2**, demonstrated that W458 fluorescence was reduced upon cholesterol addition. Strikingly, the decrease in fluorescence was more prominent in the WT peptide than in the P454–487<sup>F485A</sup> mutant.

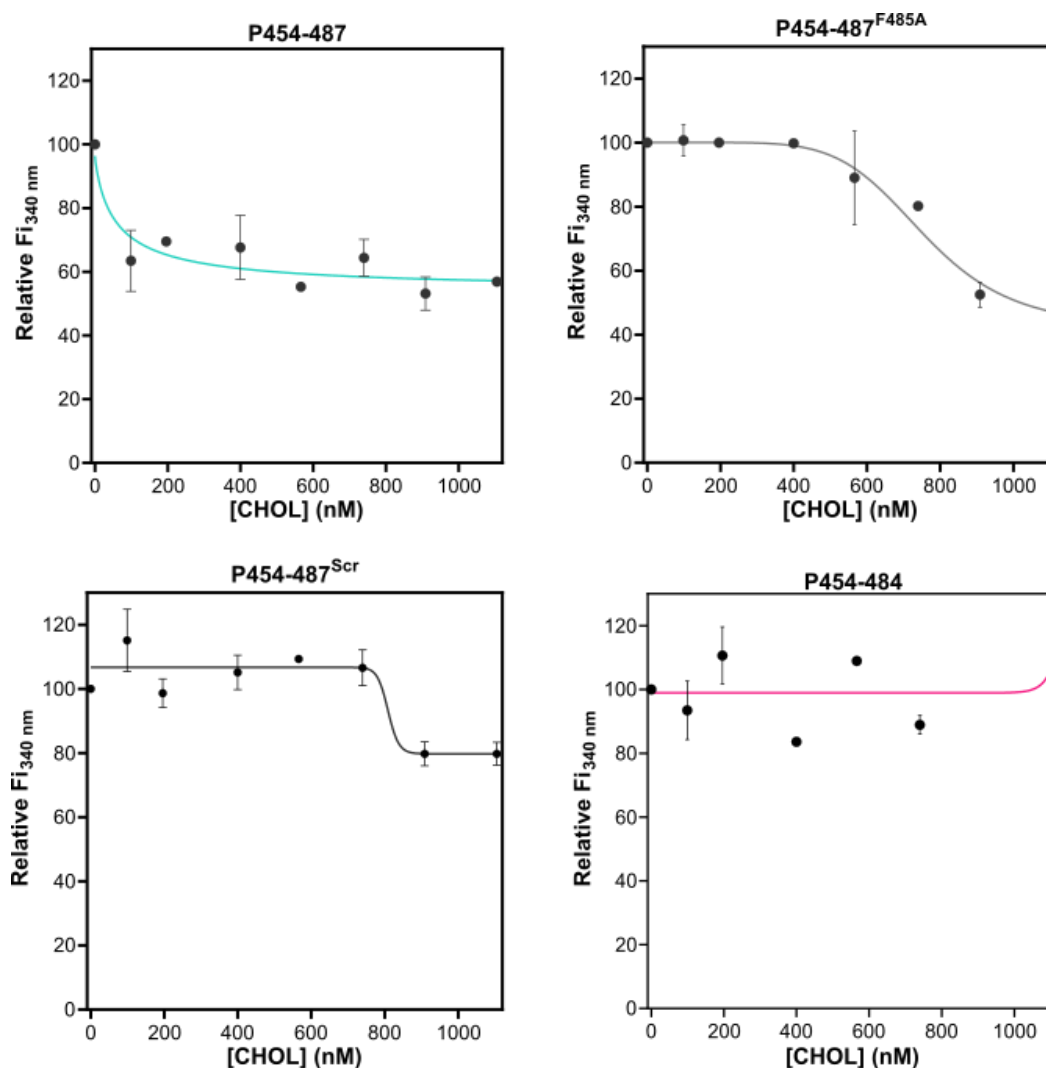


**Figure 5.2. Tryptophan cholesterol titration spectra.** Representative relative spectra of tryptophan fluorescence titrations recorded between 310–400 nm correspond to 10  $\mu$ M P454–487 (left subpanel) and P454–487<sup>F485A</sup> (right subpanel) synthetic peptides with 0–600 nM cholesterol in solution. The green and gray lines (number 0) display the fluorescence spectra of the peptides in solution. Increasing numbers (1–4) represent increasing cholesterol concentrations (100–600 nM, respectively). Fluorescence spectra were corrected for light scattering, by subtracting the corresponding spectra of cholesterol at similar final concentrations.

Tryptophan intensity changes were also analyzed by following the corrected relative fluorescence intensity at the maximum wavelength (Relative  $F_{i340\text{ nm}}$ ) (**Fig. 5.3**), as detailed in **protocol 3.4.2.1**. A single wavelength, 340 nm, was chosen because it shows a large intensity change upon cholesterol addition.

The fluorescence intensity of P454–487 sharply decreased (40% reduction) with the lowest cholesterol concentration used (100 nM, line number 1), whereas the mutant peptides did not respond to such sterol concentration. The emission of P454–487<sup>F485A</sup> and P454–487<sup>Scr</sup> only decreased with high sterol doses (< 700 nM). Finally, no variation was observed in the fluorescence intensity values of P454–484.

In sum, the presence of cholesterol decreases the tryptophan emission fluorescence of P454–487, which could be attributed to changes in the environment of W458 and consequently, to peptide-cholesterol binding. Results obtained with the mutant peptides suggest that the CRAC<sup>485</sup> motif may be implicated in cholesterol recognition.



**Figure 5.3. Analysis of the fluorescence intensity changes at the maximum wavelength (340 nm).** Corrected relative fluorescence intensities of 10  $\mu\text{M}$  P454–487, P454–487<sup>F485A</sup>, P454–487<sup>Scr</sup> and P454–484 peptides at 340 nm vs. increasing cholesterol concentrations (0–1  $\mu\text{M}$ ). Average values  $\pm$  SD of at least three independent experiments are displayed. Data analysis was done as detailed in **protocol 3.4.2.1**.

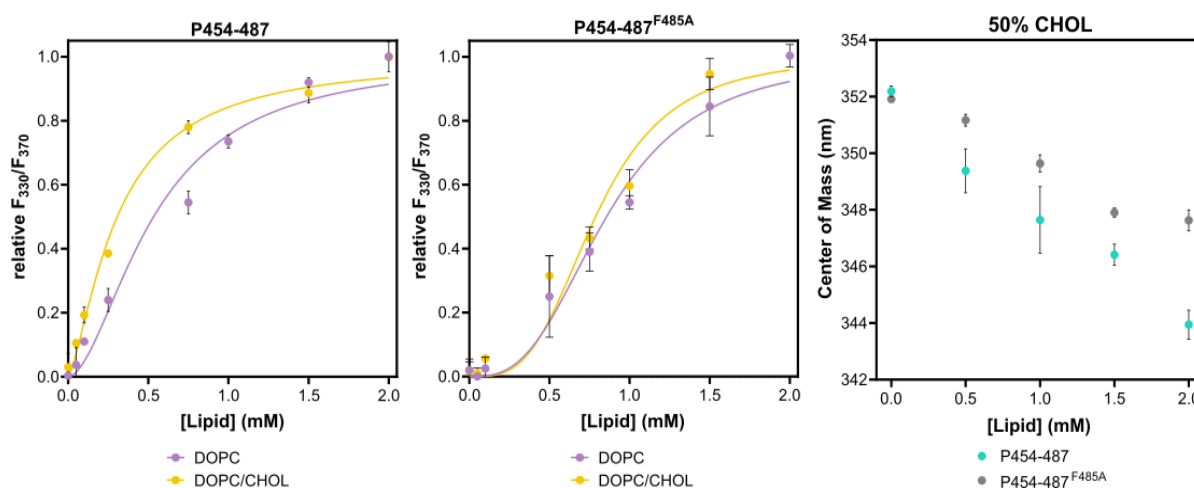
### 5.3.2. Membrane-partition of the P454–487 peptide

Tryptophan fluorescence provides a powerful tool for studying protein structure and function, especially membrane-active proteins and peptides with vesicular unilamellar model membranes<sup>308</sup>. It is indeed one of the most commonly used methods to monitor peptide insertion into the hydrophobic core of membranes.

Here, we have investigated the WT P454–487, and the mutant P454–487<sup>F485A</sup>, P454–484 and P454–487<sup>Scr</sup> peptides to evaluate whether they were capable of interacting with lipid membranes, and if so, whether cholesterol had any effect on membrane association. For that purpose, we titrated the peptides in solution with increasing concentrations of neutral LUVs

made of pure DOPC or DOPC/CHOL at 1:1 molar ratio. We examined the partition from solution to the membrane of these peptides, by measuring tryptophan intrinsic fluorescence. The widths and peak positions of the W458 spectra were used to evaluate the membrane penetration of these peptides<sup>308</sup>, for example, following the ratio of tryptophan fluorescence ( $F_{330}/F_{370}$ ) and CM values (**Fig. 5.4**), calculated as detailed in **protocol 3.4.2.2**. The spectral CM provides wavelength-averaged information from the entire spectrum and is sensitive to shape and width changes<sup>306,310,311</sup>.

Intrinsic tryptophan fluorescence reports changes in the local environment of W458 during the membrane insertion of P454–487, which are more prominent in the presence of cholesterol-containing liposomes. For instance, CM values obtained at each peptide-to-lipid ratio (**Fig. 5.4, right subpanel**) revealed a prominent shift ( $\sim 8$  nm) of the P454–487 spectra to lower wavelengths. On the contrary, the spectral shift of the P454–487<sup>F485A</sup> mutant was more subtle ( $\sim 4$  nm).



**Figure 5.4. P454–487 and P454–487<sup>F485A</sup> membrane partition followed by fluorescence.** We titrated (0–2 mM) neutral LUVs made of pure DOPC or DOPC/CHOL (1:1 molar ratio) onto 10  $\mu$ M peptide in solution. The relative ratio of fluorescence intensity at 330 nm and 370 nm as a function of lipid concentration are shown for P454–487 (left subpanel) and P454–487<sup>F485A</sup> (central subpanel). The relative fluorescence intensity ratios were fitted as described under **protocol 3.4.2.2**, providing the dissociation constant ( $K_D$ ) and Hill number, reported in **Table 5.1**. Right subpanel shows CM analysis of P454–487 and P454–487<sup>F485A</sup>.

The decrease in CM wavelengths can be accompanied by an increase in the tryptophan fluorescence ratio ( $F_{330}/F_{370}$ ), which can be interpreted as a blue shift or displacement of the spectra to the left, and consequently, as an increase in hydrophobicity around the tryptophan W458 site<sup>303,367</sup>. The analysis of the  $F_{330}/F_{370}$  ratio was used to estimate  $K_D$  (M) and Hill coefficient (h) of the membrane partition for each peptide (**Table 5.1**), as detailed in **protocol**

**3.4.2.2.**  $K_D$  values (DOPC  $6.20 \times 10^{-4}$  M vs. DOPC/CHOL  $3.10 \times 10^{-4}$  M) demonstrate that the lipid composition, indeed, affects the membrane partitioning of the P454–487 peptide, which interacts with higher affinity with DOPC/CHOL vesicles. On the contrary, the short P454–484 peptide partitions similarly in both types of LUVs (DOPC  $6.30 \times 10^{-4}$  M vs. DOPC/CHOL  $5.80 \times 10^{-4}$  M). Interestingly, P454–484 and P454–487<sup>Scr</sup> show identical  $K_D$  values ( $5.80 \times 10^{-4}$  M and  $5.40 \times 10^{-4}$  M) for DOPC/CHOL membrane partitioning, which are distinct to the values obtained with the WT peptide in DOPC/CHOL liposomes, but similar to the values obtained in DOPC. In sum, these results suggest that the CRAC<sup>485</sup> site may be involved in the interaction of P454–487 and membrane cholesterol.

**Table 5.1. Membrane-partition of the P454–487 peptide and its variants.**

Dissociation constant values ( $K_D$ , M) and Hill coefficients ( $h$ )<sup>368</sup> were obtained fitting the experimental data to **Eq. 3.6**, for each peptide/lipid combination.

	PEPTIDE	DOPC	DOPC/CHOL
<b><math>K_D</math> (M)</b>	P454–487	$6.20 \times 10^{-4}$	$3.10 \times 10^{-4}$
	P454–487 <sup>F485A</sup>	$8.60 \times 10^{-4}$	$7.90 \times 10^{-4}$
	P454–487 <sup>Scr</sup>	$2.90 \times 10^{-4}$	$5.40 \times 10^{-4}$
	P454–484	$6.30 \times 10^{-4}$	$5.80 \times 10^{-4}$
<b>Hill coefficient (h)</b>	P454–487	2.10	1.42
	P454–487 <sup>F485A</sup>	2.93	2.92
	P454–487 <sup>Scr</sup>	1.13	1.44
	P454–484	2.36	1.36

Finally, the partition coefficient,  $K_x$ , and the water-to-bilayer mole-fraction free energies of transfer,  $\Delta G$  (kcal/mol), for peptides into LUVs were determined from the tryptophan intrinsic fluorescence curves, as detailed under **protocol 3.4.2.2**<sup>307</sup> (**Table S.5.1**). The partition coefficients ( $K_x$ ) of P454–487 for DOPC and DOPC/CHOL vesicles estimated from the titration curves (**Fig. 5.4 left and central subpanels**) are  $8.95 \times 10^4$  ( $\Delta G = -6.73$  kcal/mol) and  $1.79 \times 10^5$  ( $\Delta G = -7.14$  kcal/mol), respectively. For the mutant P454–487<sup>F485A</sup> the estimated  $K_x$  values were  $6.48 \times 10^4$  ( $\Delta G = -6.54$  kcal/mol, DOPC) and  $7.21 \times 10^4$  ( $\Delta G = -6.60$  kcal/mol, DOPC/CHOL).

### 5.3.3. Conformation of P454–487 in a low-polarity medium

Membrane-binding peptides and membrane-binding domains of proteins frequently change structure when they move from hydrophilic to hydrophobic environments. In collaboration

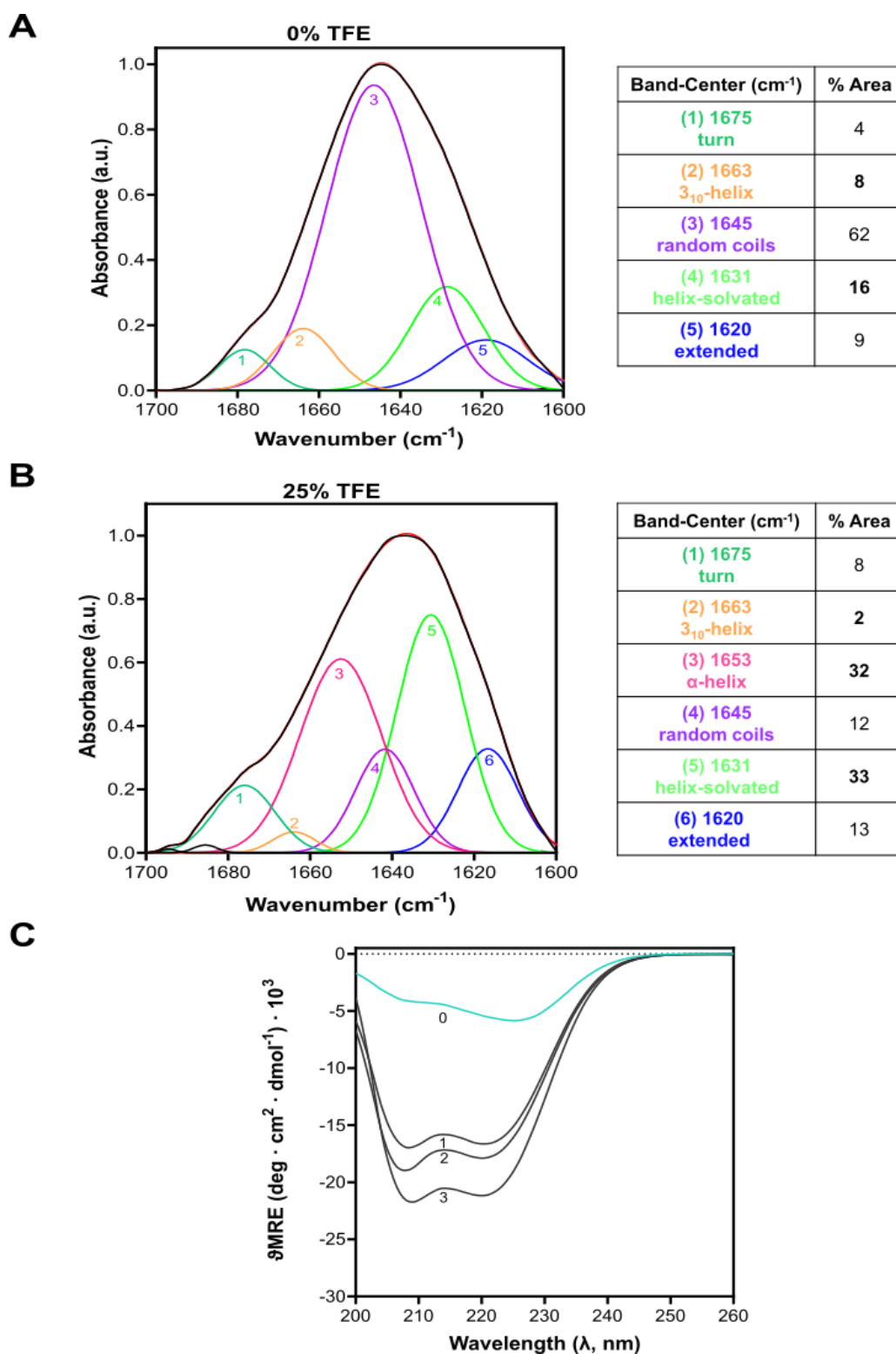


with Dr. Igor de la Arada (Biofisika Institute, CSIC-UPV/EHU, Leioa, Spain), the IR technique has been used to determine the secondary structure adopted by peptides in aqueous solution and after their reconstitution in lipid vesicles.

Before establishing the membrane-bound conformations of the P454–487 peptide, we analyzed by IR and CD the secondary structure adopted in TFE, a medium that mimics the low-polarity of lipid bilayers<sup>369–371</sup> (see **protocols 3.4.3** and **3.4.4.1**). **Fig. 5.5** displays the experimental FTIR spectra of P454–487 in buffer (**subpanel A**) and in 25% (v/v) TFE (**subpanel B**).

As observed in **subpanel A**, turn/coil structures seemed to dominate the spectra of the peptide in solution (ca. 60%). The band centered at  $1645\text{ cm}^{-1}$  and  $1675\text{ cm}^{-1}$  were ascribed to random coil structures and turns, respectively. Moreover, the CD spectra presented in **subpanel C**, obtained for P454–487 with increasing TFE content (0–25% v/v), shows that upon decreasing the polarity of the medium, the helical tendency of the peptide increased. Matching those results, the band decomposition of IR spectra obtained in 25% (v/v) TFE identified a majority of amide-I' vibrational modes arising from helical conformers, with bands centered at  $1663\text{ cm}^{-1}$  ( $3_{10}$ -helix),  $1653\text{ cm}^{-1}$  ( $\alpha$ -helix) and  $1631\text{ cm}^{-1}$  (helix-solvated)<sup>317,372,373</sup> amounting to ca. 65% of the total band area (**subpanel B**). Besides, the contribution of turn/coil structures was reduced to 20%. It is known that partial solvation of  $\alpha$ -helical structures can give rise to low frequency bands centered at ca.  $1635\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$  because of the cross-hydrogen bonds that can be formed with water<sup>372,373</sup>. Thus, we have attributed the P454–487 absorption mode at  $1635\text{ cm}^{-1}$  to a fraction of the helical structure not buried in the membrane, i.e., exposed to solvent and/or in contact with interfacial polar moieties.

In parallel, we established by IR and CD the secondary structure of the mutant P454–487<sup>F485A</sup> peptide in buffer and with increasing TFE concentrations (**Fig. S.5.1**). The band decomposition of IR spectra obtained in buffer (**subpanel A**) identified that the turn/coil conformers amounted to ca. 45% of the total band area, whereas the helical conformers amounted to 35%. Importantly, the contribution of the band corresponding to the pure  $\alpha$ -helix ( $1653\text{ cm}^{-1}$ ) was ca. 15%. On the contrary, the CD spectra (**subpanel C**) revealed that the peptide acquired mostly helical conformations. In line with this evidence, the band decomposition of IR spectra obtained in 25% (v/v) TFE of P454–487<sup>F485A</sup> (**subpanel B**) demonstrated that the components attributable to helical conformers amounted to ca. 60% of the total band area, whereas components associated to disordered conformations remained ca. 30%. In consequence, the overall secondary structure of both peptides was very similar in this nonpolar medium.



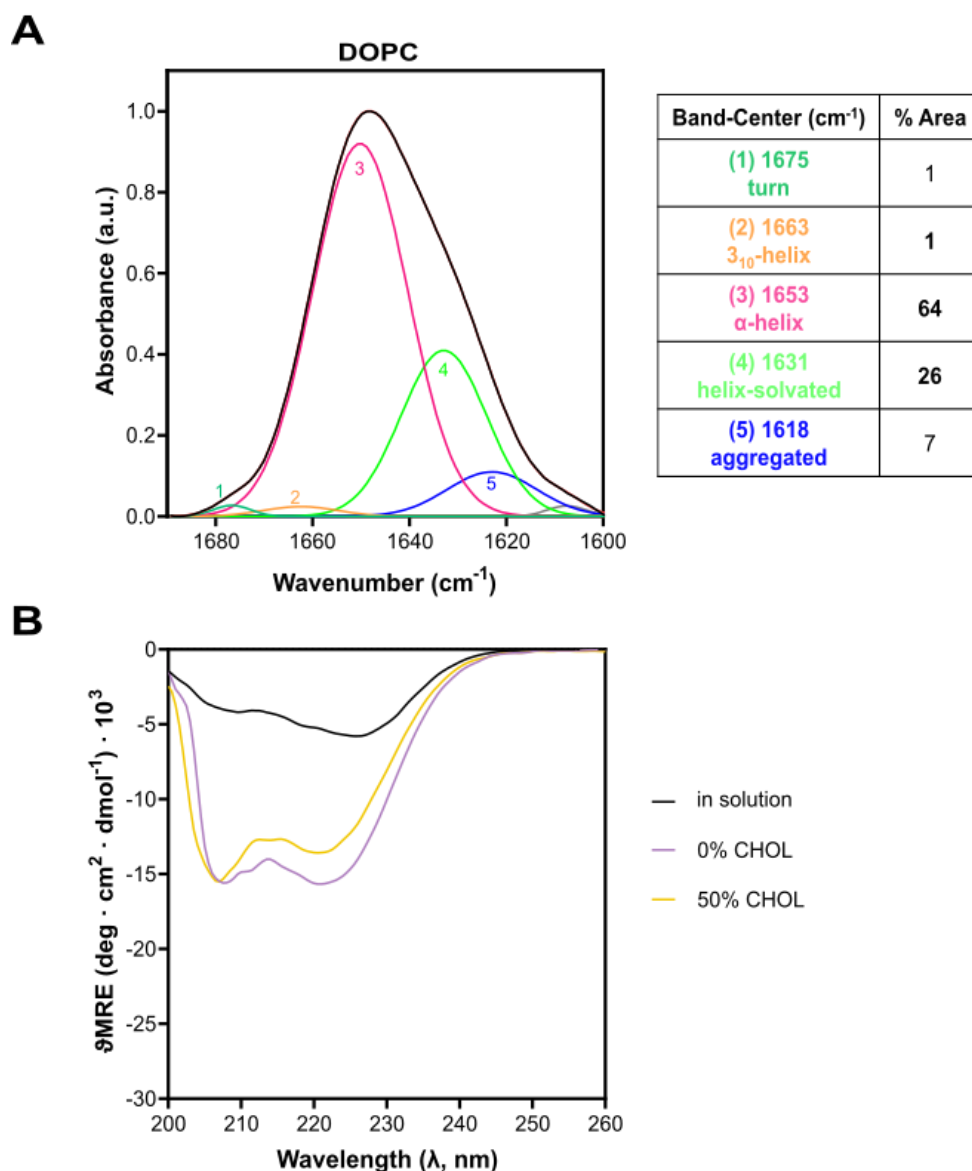
**Figure 5.5. Structural analysis of P454–487 in a low polarity medium.** (A) Normalized FTIR spectrum of the amide I' region for the P454–487 peptide obtained in buffer. (B) Normalized FTIR spectrum of the amide I' region for the P454–487 peptide obtained in 25% (v/v) TFE. The absorption band was decomposed into different components. The original spectrum (red) and the sum of the band components (black) are superimposed and indistinguishable. The inset displays the secondary structure assignment for the main components (bands labelled with numbers 1–6) and the area percentages (rounded off to the nearest integer). (C) CD spectra obtained for P454–487 at 25 °C in the presence of increasing concentrations of TFE (0–25% v/v) labelled with ascending numbers (0–3).

### 5.3.4. Conformational changes of P454–487 into cholesterol-containing lipid bilayers

We next investigated whether the addition of lipid membranes induced conformational changes in the peptide structure, and whether the lipid composition, particularly, the presence of cholesterol, could have any differential effect on the peptide conformation. For that purpose, we combine CD (see **protocol 3.4.3**), conventional IR and 2D-COS-IR spectroscopy (see **protocol 3.4.4.1**), to analyze the secondary structure adopted by the P454–487 peptide upon reconstitution into lipid bilayers (**Fig. 5.6**).

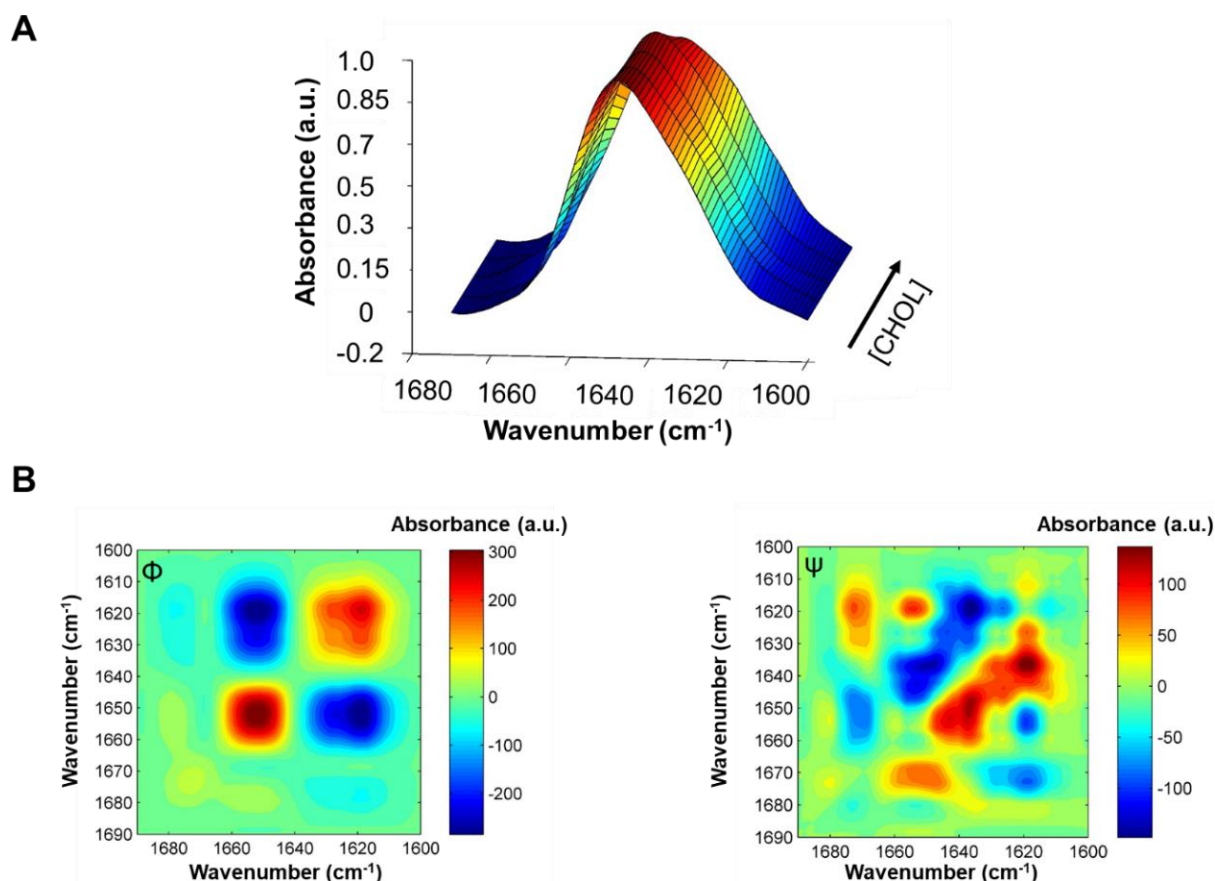
Both the analysis of the CD spectra and of the amide I' bands of the peptide show that the partition of the P454–487 peptide from the aqueous phase to the membrane environment was characterized by a prominent increase of the helical conformations (25% in solution *vs.* 90% in DOPC). On the contrary, random coil conformations disappeared (62% *vs.* 0%) upon insertion of the peptide into the lipid bilayer. The amide I' region of the IR spectrum of the peptide in solution displayed a prominent band centered at  $1645\text{ cm}^{-1}$  (random coil), which accounted about the 62% of the total conformers. In contrast, upon peptide reconstitution in DOPC bilayers, predominant helical conformers amounted to ca. 90% (64%  $\alpha$ -helix and 26% helix-solvated). Besides, in comparison with the absorption band components measured in 25 % (v/v) TFE (**Fig. 5.5B**), the contribution of turns ( $1675\text{ cm}^{-1}$ ) and random coils ( $1645\text{ cm}^{-1}$ ) decreased in DOPC bilayers, whereas the amide I' band became overall much narrower. These spectral variations reflect a reduction in the conformational space accessible to the P454–487 peptide chain upon reconstitution in the DOPC lipid bilayers, consistent with the majority of the membrane-associated peptide adopting a canonical  $\alpha$ -helical conformation.

Thereafter, we studied the conformation of the P454–487<sup>F485A</sup> peptide in DOPC bilayers (**Fig. S.5.2**). As shown in the figure, almost the 100% of the mutant peptide was helical in these conditions. Importantly, a fraction of the helix was exposed to the solvent (ca. 36%), a proportion that resulted greater than the determined for the native peptide reconstituted in liposomes of the same lipid composition.



**Figure 5.6. Reconstitution of P454–487 in DOPC lipid bilayers.** (A) Normalized FTIR spectrum of the amide I' region for the P454–487 peptide reconstituted in DOPC lipid bilayers (peptide-to-lipid ratio, 1:50). The absorption band was decomposed into different components. The original spectrum (red) and the sum of the band components (black) are superimposed and indistinguishable. The inset displays the secondary structure assignment for the main components (bands labelled with numbers 1 to 5) and the area percentages (rounded off to the nearest integer). (C) CD spectra obtained for P454–487 at 25 °C in the presence of DOPC (violet) and DOPC/CHOL (1:1 molar ratio) (orange) liposomes (peptide-to-lipid ratio, 1:20).

To address whether the presence of cholesterol could have any differential effect on the P454–487 peptide conformation, we analyzed the conformation adopted by the peptide in membranes containing increasing cholesterol concentrations as detailed in **protocol 3.4.4.1**. **Fig. 5.7** displays the series of IR spectra as a function of cholesterol content in membranes and **Table 5.2** summarizes the secondary structure assignment for the main components and the area percentages.



**Figure 5.7. Conformations adopted by P454–487 as function of cholesterol content in membranes.** (A) Normalized 3D FTIR spectra of the amide I' region of P454–487 reconstituted in DOPC bilayers with increasing cholesterol concentrations (0–50% mole) (peptide-to-lipid ratio, 1:50). (B) 2D-COS-IR analysis of the IR spectra obtained for the P454–487 reconstituted in DOPC with increasing cholesterol concentrations. Synchronous ( $\Phi$ , left) and asynchronous ( $\psi$ , right) correlation map contours of the IR spectra obtained with increasing cholesterol concentrations are shown. Red peaks correspond to positive correlations and blue peaks to negative ones.

As shown in **Table 5.2**, incorporation of low cholesterol concentrations (10–25% mole) into the DOPC bilayers induced only modest changes in the conformation of the peptide, causing a 6% increment of the  $\alpha$ -helix and the disappearance of extended conformations ( $1620\text{ cm}^{-1}$  band). The increase of the cholesterol content from 25% to 33%, produce instead a 16% decrease of the  $\alpha$ -helix compared to pure DOPC. Besides, the presence of the helix-solvated was increased prominently, almost duplicating its contribution. Interestingly, a further augmentation in the cholesterol concentration, from 33% to 50% mole, reverted the helix-solvated component, which decreased to the half, while the buried  $\alpha$ -helical component remained unchanged. In addition, a new band corresponding to random coils appeared (12%) and the band corresponding to extended conformations increased to 15%.

**Table 5.2. Secondary structure assignment for the main components of P454–487 decomposed spectra and the area percentages for each one (rounded off the nearest integer).**

Band-Center (cm <sup>-1</sup> )	CHOLESTEROL (% mole)				
	0	10	25	33	50
(1) 1675 turn	1	1	1	1	0
(2) 1663 3 <sub>10</sub> -helix	1	0	0	0	2
(3) 1653 $\alpha$ -helix	66	71	72	51	49
(4) 1645 random coil	0	0	0	0	12
(5) 1631 helix-solvated	25	24	25	46	22
(6) 1620 extended	6	2	0	1	15
(7) 1606 side-chains	1	1	2	1	0

To get more insight into the conformational changes induced by the membrane cholesterol concentration, we next performed the 2D-COS-IR analysis of the spectra in the corresponding amide I' band region (**Fig. 5.7B**). We note that relevant effects detected on the 2D maps often reflect subtle changes in the relative contents of the amide I' band components<sup>318,374,375</sup>.

The analysis performed revealed the evolution of the spectral main components. In the synchronous ( $\Phi$ ) 2D map of the spectra of P454–487 (**left subpanel**), the two auto-peaks indicated simultaneous changes in the bands composing the amide I' spectrum. These two auto-peaks were found centered at 1653 cm<sup>-1</sup> and 1620 cm<sup>-1</sup>, whereas the two cross-relation negative peaks 1653/1620 cm<sup>-1</sup> and 1620/1653 cm<sup>-1</sup> reflected that both vibrations were affected in-phase by cholesterol. The  $\alpha$ -helix component diminishes in intensity as cholesterol in the membrane increases and the extended conformation augments.

The corresponding asynchronous ( $\Psi$ ) map (**right subpanel**) reflected the sequential order of events induced by the increase of cholesterol. The asynchronous peaks were positive (red contours) if the change in the first frequency occurred accelerated with respect to that in the second one, and negative (blue contours) if delayed<sup>318,374,375</sup>. Several positive and negative correlation peaks were detected in the asynchronous ( $\Psi$ ) map. Accordingly, the positive correlation peak 1635/1653 cm<sup>-1</sup> detected in the maps suggests the protrusion and exposition

of part of the buried  $\alpha$ -helix to a more polar solvated location, likely because the lipid bilayer becomes less fluid as the cholesterol concentration increases. The second major positive correlation peak  $1620/1635\text{ cm}^{-1}$  suggests a conversion of the solvated helix fraction into an extended conformation.

In conclusion, our FTIR data support that the membrane cholesterol increment up to 33% mole leads to the protrusion of part of the buried  $\alpha$ -helix, which becomes exposed to solvent and/or in contact with interfacial polar moieties. The increment of the cholesterol concentration from 33% to 50% mole seems to promote then conversion of a fraction of the exposed helix into an extended conformation, and the unfolding of other fraction. Curiously, even at the highest cholesterol concentration, the fraction of the buried  $\alpha$ -helix (ca. 50%) remains being the predominant component of the peptide conformations in the membranes.

### 5.3.5. Conformations adopted by P454–487<sup>F485A</sup> in cholesterol-containing bilayers

The effect of cholesterol in the secondary structure of the mutant peptide was assayed upon its reconstitution in liposomes with increasing cholesterol content (0–50% mole) (**protocol 3.4.4.1**). Addition of cholesterol, irrespective of its proportion, had no significant effect on the overall helical conformation of the mutant peptide, with about the 35% of the helix keeping exposed to the solvent (**Table 5.3**). This helix-solvated proportion was greater than the observed for the native peptide, which was of about 25%, except for the 33% mole cholesterol-containing liposomes in which the solvated helix proportion was about the 45% (**Table 5.2**).

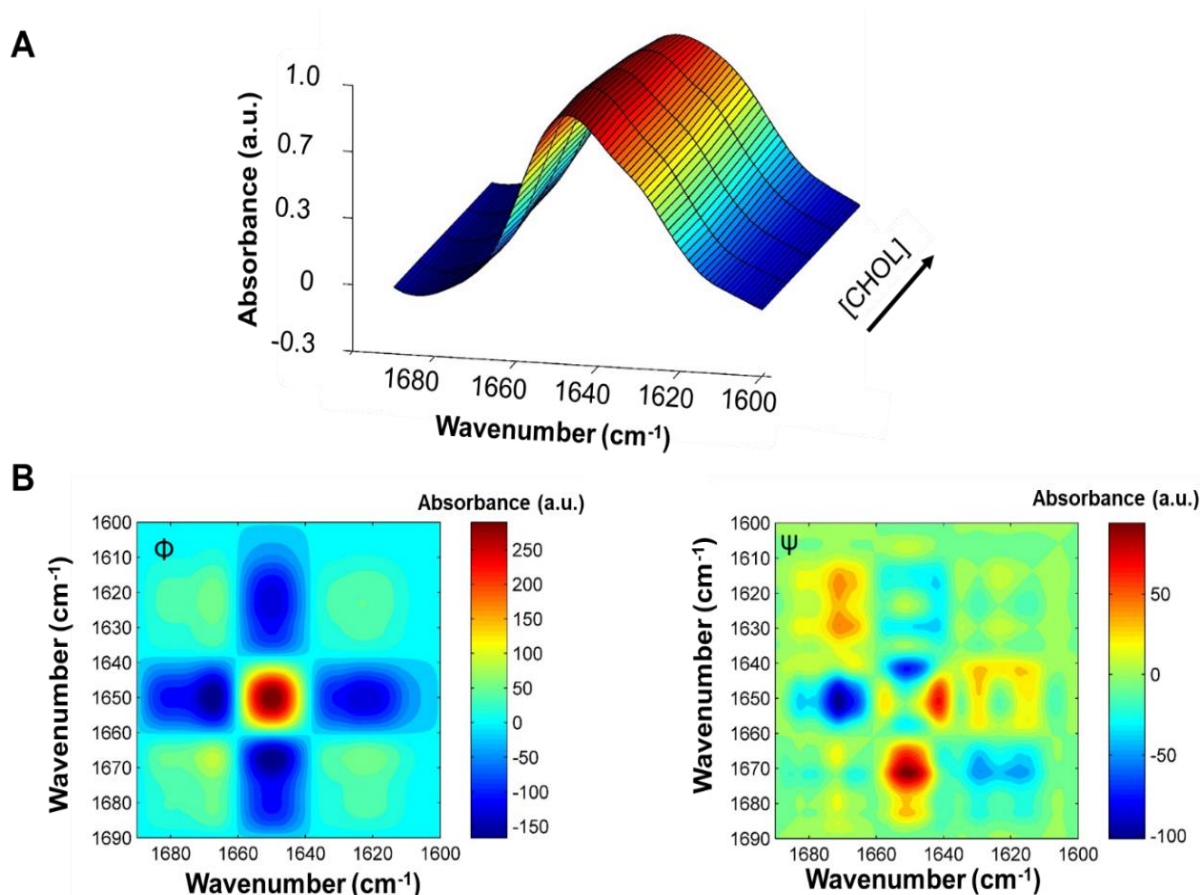
2D-COS-IR analysis of the P454–487<sup>F485A</sup> mutant peptide was in line with these findings (**Fig. 5.8**). The synchronous map ( $\Phi$ ) (**left subpanel**) showed autopeaks in the band corresponding to the  $\alpha$ -helix ( $1653\text{ cm}^{-1}$ ), which might be related to subtle changes in the maximum intensity of this band, due to a small displacement of it. In concordance, the asynchronous map ( $\psi$ ) (**right subpanel**) also displays small changes. Variation on the helix environment might alter the amide I' vibrational modes, even if the secondary structure does not change. Thereupon, FTIR data and 2D-COS-IR analysis support that the addition of cholesterol does not trigger structural interconversion of the P454–487<sup>F485A</sup> peptide and, thus, it does not affect its secondary structure.

**Table 5.3. Secondary structure assignment for the main components of the decomposed P454–487<sup>F485A</sup> spectra and the area percentages for each one of the components.**

Band-Center (cm <sup>-1</sup> )	CHOLESTEROL (% mole)				
	0	10	25	33	50
(1) 1675 turn	2	2	2	0	0
(2) 1663 3 <sub>10</sub> -helix	0	0	0	2	1
(3) 1653 $\alpha$ -helix	58	59	62	55	61
(4) 1645 random coil	0	0	0	0	0
(5) 1631 helix-solvated	37	34	33	41	33
(6) 1620 extended	2	0	0	0	0
(7) 1606 side-chains	3	3	3	2	5

Briefly, P454–487<sup>F485A</sup> mutant peptide is a long  $\alpha$ -helix, that upon interaction with a neutral lipid bilayer inserts ~60% of it into the hydrophobic part of the bilayer, while the other part is solvent accessible. The increasing lipid packing induced by the presence of membrane cholesterol does not practically change these two fractions of the helix (buried/solvent exposed), suggesting that cholesterol does not have effect on the overall secondary structure adopted by the peptide.





**Figure 5.8.** 2D-COS-IR analysis of P454–487<sup>F485A</sup> reconstituted in DOPC with increasing cholesterol concentrations. (A) Normalized 3D FTIR spectra of the amide I' region of P454–487<sup>F485A</sup> reconstituted in DOPC bilayers with increasing cholesterol concentrations (0–50% mole) (peptide-to-lipid ratio, 1:50). (B) 2D-COS-IR analysis of P454–487<sup>F485A</sup> reconstituted in DOPC with increasing cholesterol concentrations. Synchronous ( $\Phi$ , left) and asynchronous ( $\Psi$ , right) correlation map contours of the IR spectra obtained with increasing cholesterol concentrations (0–50% mole). Red peaks correspond to positive correlations and blue peaks to negative ones.

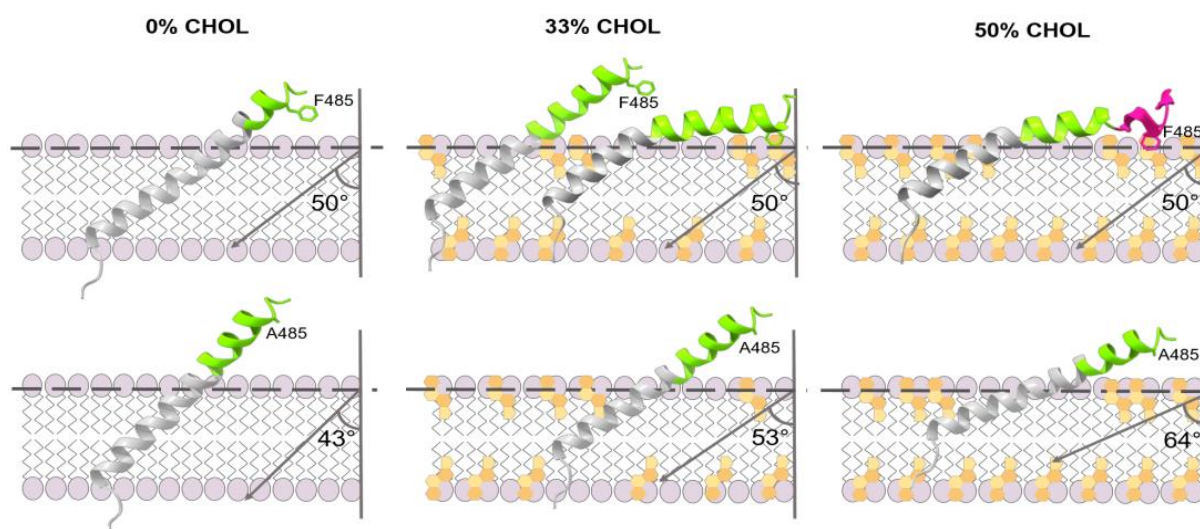
### 5.3.6. Membrane-insertion angle of the P454–487 peptide

The previous results support the efficient reconstitution of the P454–487 peptide as  $\alpha$ -helix in DOPC lipid bilayers, and the possibility that part of it transits to an extended structure in cholesterol-enriched membranes. Using ATR-FTIR spectroscopy (**protocol 3.4.4.2**), we next determined the tilt of the peptide conformations relative to the membrane normal in both pure phospholipid- and cholesterol-containing lipid bilayers. From these spectra, the experimental average dichroic ratios,  $S$  order parameters and tilt angles were calculated (**Table S.5.2**)<sup>315,319,376</sup>.

According to the tilt angle inferred from the dichroic ratios, the longitudinal axis of the P454–487 helix formed an angle of 52° with the DOPC lipid bilayer normal. Similarly, it formed an angle of 49° with the 50% mole cholesterol-containing lipid bilayer normal (**Fig. 5.9, top**

images). Therefore, this suggests that the peptide may insert into the membrane in a tilted orientation, in both lipid compositions.

We also determined the tilt of the P454–487<sup>F485A</sup> peptide conformations relative to the membrane normal (**Table S.5.3**). In accordance with the tilt angle inferred from the dichroic ratios, the longitudinal axis of the P454–487<sup>F485A</sup> helix formed an angle of 43° with the DOPC lipid bilayer normal (**Fig. 5.9 bottom images**). Appealingly, this angle progressively increased as the cholesterol content augmented: from 43° in the most fluid bilayer (DOPC), to ~64° in a highly ordered packed membrane (DOPC/CHOL 1:1 molar ratio), passing through 53° in a less ordered bilayer (DOPC/CHOL 2:1 molar ratio). This suggests that the peptide was progressively expelled out as the bilayer was becoming more rigid and tightly packed.

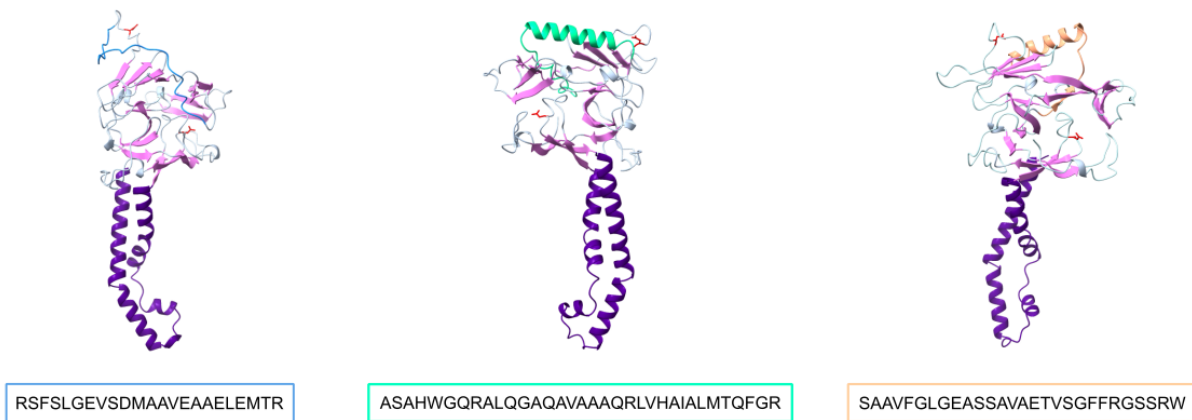


**Figure 5.9.** Angle of insertion of the main conformations adopted by P454–487 and P454–487<sup>F485A</sup> determined by ATR-FITR. The helical segments are drawn in ChimeraX<sup>131</sup> from the NMR structure solved by Sukova and colleagues (PDB ID: 6RFM<sup>215</sup>). Pure  $\alpha$ -helix and helix-solvated conformations are shown in gray and green, respectively. Extended conformations are shown in magenta. F485 and A485 are depicted with sticks for clarity. A cartoon representation of the cell membrane lipid bilayer with phospholipid molecules (purple) and cholesterol molecules (orange) has been included as well. DOPC membranes with increasing cholesterol concentrations (0–50% mole) were used.

### 5.3.7. Glycosylation mapping of helix h2 within the translocation region of CyaA

To follow the membrane insertion and dissect the topology of three helical segments corresponding to the residues 413–435 (h1), 454–487 (h2) and 501–528 (HI) of *Bordetella* CyaA toxin, we performed the *in vitro* glycosylation assay (**protocol 3.8**) designed in the laboratory of Prof. Gunnar von Heijne<sup>327,328,346</sup>. The results presented here have been obtained under the supervision of Drs. Ane Metola and Justin Westerfield, and Prof. Gunnar von Heijne at Biochemistry and Biophysics Department (Stockholm University, Stockholm, Sweden).

Briefly, the segment to be tested is engineered into the luminal periplasmic (P2) domain of the integral membrane protein leader peptidase (*E. coli* LepB<sup>344</sup>) (**Fig. 5.10**), where it is flanked by one or two acceptor-sites for N-linked glycosylation.



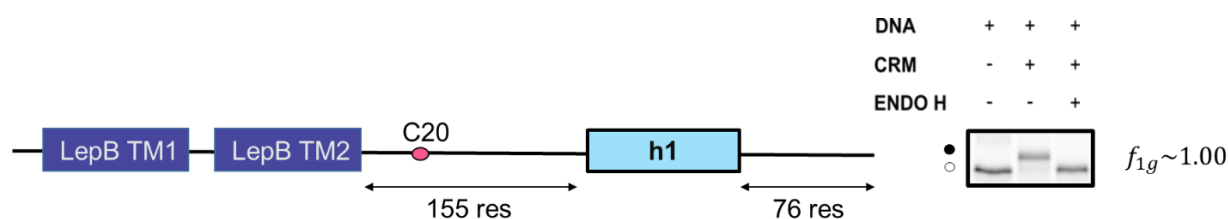
**Figure 5.10. Predicted protein structure for the constructs designed.** AF2 prediction<sup>204,205</sup> of the designed constructs and the corresponding amino acid sequence of each test helix. LepB TM1 and TM2 helices are shown in purple and the periplasmic P2 site in pink. Individual h1, h2 and HI test helices are shown in blue (left), green (center) and orange (right), respectively. Two glycosylation sites (C20 and C5) are labelled with red sticks for clarity. Figure drawn in ChimeraX<sup>131</sup>.

First, we predicted the free energies ( $\Delta G_{\text{pred}}$ ) of membrane insertion of individual helices (h1, h2 and HI) employing the commonly used [ΔG prediction server](#)<sup>327,328</sup> (**protocol 3.7.1**). Due to the low content of nonpolar residues, the segments of interest were not anticipated to insert on the membrane ( $\Delta G_{\text{pred}} \sim 7$  kcal/mol, **Table 5.4**). Only the two TM helices of LepB (TM1 and TM2, residues 4–22 and 62–76, respectively) were considered to be hydrophobic enough for membrane insertion ( $\Delta G_{\text{pred TM1}} = -1.818$  kcal/mol and  $\Delta G_{\text{pred TM2}} = -0.010$  kcal/mol). Membrane-inserting segments in toxins typically have marginally hydrophobic character<sup>377</sup>, and thus, evade detection by prediction<sup>378</sup>. Opposite to canonical TM segments, which are hydrophobic, toxins evolved to have limited hydrophobicity in order to exist in both soluble and membrane-embedded conformations. This feature allows toxins to insert both shallowly and deeply into the membrane, resulting in heterogeneous population of insertion states<sup>378</sup>.

To determine whether the segments of interest partition into a eukaryotic membrane, we utilized the translocon-mediated membrane-insertion assay<sup>327,328,346</sup> (**protocol 3.8.3**). We used a reconstituted cell-free system supplemented with rabbit reticulocyte lysate<sup>335,336</sup> and canine rough microsomes (CRM)<sup>339,340</sup>. Engineered LepB proteins are expressed in an *in vitro* transcription/translation reaction<sup>328,346</sup> and the degree of membrane insertion of each segment is quantified from SDS-PAGE gels by analyzing the glycosylation pattern. Importantly, this assay has been previously used to evaluate the insertion for other proteins that do not insert

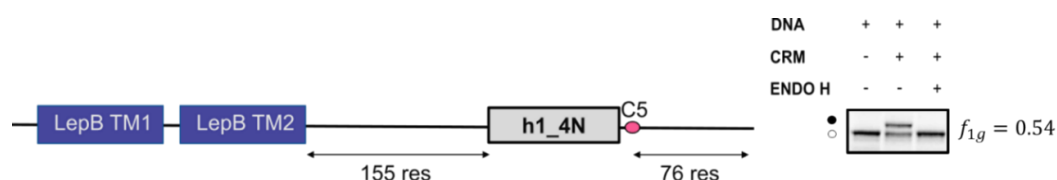
into the membrane via the translocon, i.e. diphtheria toxin<sup>379</sup>, Bcl-2 family<sup>380</sup> or the large clostridial toxin (LCT) family<sup>378</sup>.

To measure the membrane targeting efficiency of our constructs, we first expressed control constructs that contained a single glycan site 20 residues downstream LepB TM2 (C20). As shown in **Fig. 5.11**, ~100% of the total protein was glycosylated, clearly demonstrating that the targeting was very efficient. These data also indicate that TM1 and TM2 insert in the  $N_{lum}-C_{cyt}$  and  $N_{cyt}-C_{lum}$  topology, respectively.



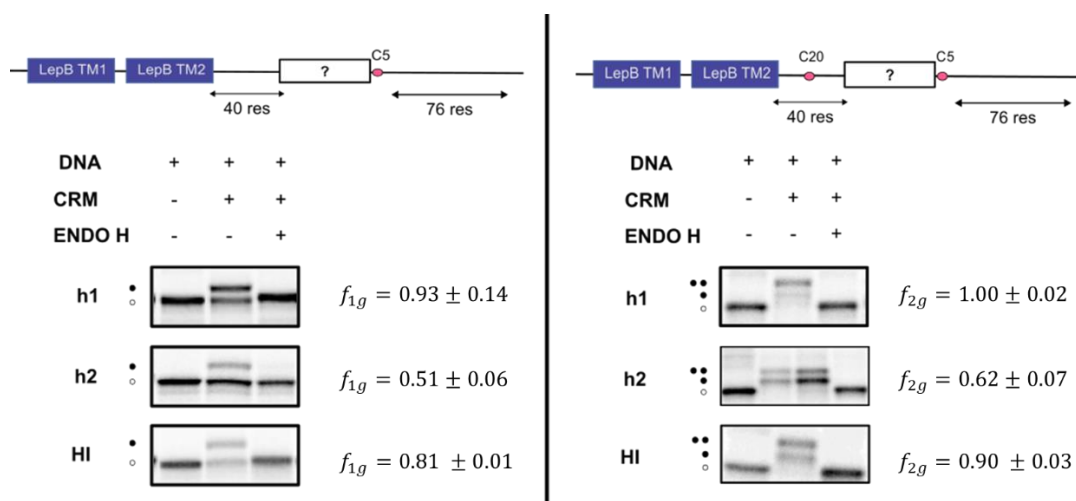
**Figure 5.11. LepB membrane targeting efficiency of constructs containing h1 helix.** The schematic depiction of the construct designed is shown in the left side. The two dark blue boxes represent LepB TM1 and TM2, whereas the light blue box represents test helix h1. The single acceptor-site asparagine was placed 20 residues downstream LepB (shown with a red dot). The gel images show results obtained from a representative *in vitro* transcription/translation experiment in the absence (-) and presence (+) of CRM. Lane 3 shows the effect of Endo H treatment. Unglycosylated ( $g_0$ ) and glycosylated ( $g_1$ ) protein populations are labelled with white and black dots respectively.  $f_{1g}$  values represent the average of at least three independent experiments. ~100% of glycosylated protein population clearly demonstrates that membrane targeting of LepB is very efficient and that TM1 and TM2 insert in the  $N_{lum}-C_{cyt}$  and  $N_{cyt}-C_{lum}$  topology, respectively.

Besides, we quantitated the maximal glycosylation efficiency of the C5 glycan site located 5 residues downstream LepB TM2 (**Fig. 3.17**). We designed a variant of h1 (h1\_4N) corresponding to amino acids RSFSLGEVSDNNNNEAAELEMTR, in which MAAV residues were substituted by NNNN. The more hydrophilic h1\_4N was introduced in the LepB scaffold to assure complete translocation to the ER lumen ( $\Delta G_{pred} h1_{4N} = 12.44$  kcal/mol, see **Table 5.4**). We expressed the construct h1\_4N and measured the singly glycosylated protein fraction ( $f_{1g}$ ) from the total protein amount. Results shown in **Fig. 5.12** suggest that C5 site was not very efficiently glycosylated. Hence, we normalized all the glycosylated protein fractions to the maximal glycosylation efficiency of this site.



**Figure 5.12. Maximum glycosylation efficiency of C5 glycan acceptor-site.** A more hydrophilic variant of h1 helix (h1\_4N) was introduced into the LepB scaffold to assure that the test helix was fully translocated to the ER lumen. The schematic depiction of the construct is shown in the left side. The two dark blue boxes represent LepB TM and TM2, whereas the gray box represents test helix h1\_4N. The glycan acceptor-site (shown with a red dot) was placed 5 residues downstream the test helix. Gel images shown in the right side of the figure display results obtained from representative *in vitro* transcription/translation experiments in the absence (-) and presence (+) of CRM containing h1\_4N.  $f_{1g}$  values represent the average of at least three independent experiments. Unglycosylated ( $g_0$ ) and glycosylated ( $g_1$ ) protein populations are labelled with white and black dots, respectively.

We expressed h1, h2 and HI test helices flanked by either a single (C5) or double (C20 and C5) asparagine acceptor-sites (**Fig. 5.13**). The glycosylation pattern reported by both type of constructs was consistent and very similar. By analyzing glycosylated protein fractions ( $f_{1g}$  or  $f_{2g}$ ), it can be easily concluded that 90–100% of h1 is glycosylated, meaning that this test helix is translocated to the ER lumen. Similar to h1, HI helix is 80–90% glycosylated as well. Thus, according to our data, h1 and HI do not show membrane-insertion propensity and are translocated to the ER lumen. On the contrary and opposite to the hydrophobicity based insertion propensity, h2 seems to have some membrane-insertion capacity. The insertion efficiency of h2 (calculated from the normalized protein fractions) was of 40–50%.



**Figure 5.13. Degree of membrane integration of h1, h2 and HI helices analyzed by SDS-PAGE.** The gels show results obtained from representative *in vitro* transcription/translation experiments of constructs containing h1, h2 or HI in the absence (-) and presence (+) of CRM, and the acceptor-site asparagine located at distance 20 or 5 counting from the last residue of the upstream helix. Single white and black dots represent non-glycosylated ( $g_0$ ) and singly glycosylated populations ( $g_1$ ), whereas two black dots correspond to doubly glycosylated ( $g_2$ ) populations. Lane 3 shows the effect of Endo H treatment. In the right subpanel, duplicates are shown for h2. All  $f_{1g}$  and  $f_{2g}$  values were normalized with the maximum glycosylation efficiency of C5 glycan acceptor site (see **Fig. 5.12**).

We further calculated the thermodynamic constants (see **Table 5.4**) of the membrane integration of these helical segments as detailed in **protocol 3.8.5**<sup>328</sup>. Taking into account that C20 was very efficiently glycosylated (**Fig. 5.11**), we used the results obtained with a single glycan acceptor-site at position C5 (**Fig. 5.13, left subpanel**) to simplify calculations.  $p$  value, represents the quotient between the membrane-inserted protein *vs.* the total protein. The data can also be expressed as an apparent equilibrium constant ( $K_{app}$ ) which represents the ratio between membrane-inserted and non-inserted protein fractions. For direct comparison with biophysical data<sup>328</sup>, we determined the apparent free energies ( $\Delta G_{app}$ ).

**Table 5.4.  $\Delta G_{pred}$  and  $\Delta G_{app}$  free energies of TM insertion.**

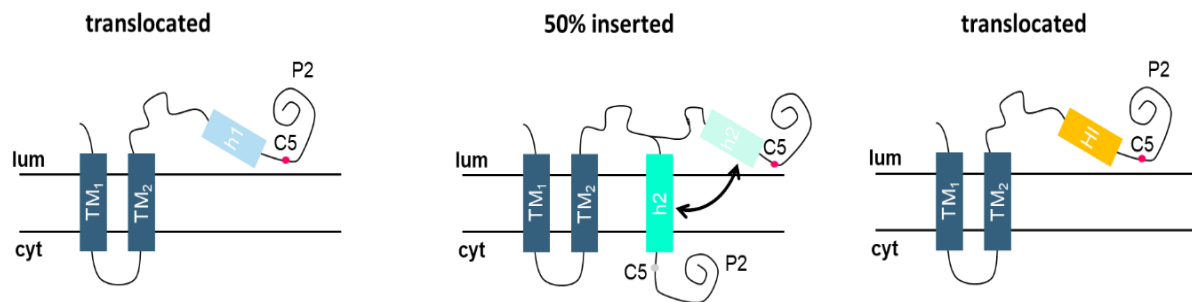
The prediction for TM helix insertion was made using the [AG predicition](#) server<sup>327,328</sup>. The apparent equilibrium constant ( $K_{app}$ ) in the *in vitro* assay was used to calculate the experimental  $\Delta G_{app}$ .

Helix	$\Delta G_{pred}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{app}$ (kcal/mol)
h1	+6.97	+1.1 ± 0.35
h1_4N	+12.44	-
h2	+6.77	-0.03 ± 0.15
HI	+6.02	+0.87 ± 0.04

Surprisingly, all  $\Delta G_{app}$  values were much lower than  $\Delta G_{pred}$ . However, only h2 inserts favorably ( $\Delta G_{app} < 0$ , spontaneous process) into the bilayer (fraction inserted 0.4-0.5), while helices h1 and HI show no insertion (fraction inserted 0–0.1 and 0.1–0.2, respectively).

From the  $p$  and  $K_{app}$  values calculated for h2 ( $p_{h2} = 0.5 \pm 0.06$  and  $K_{app\ h2} = 1.00 \pm 0.26$ ), we speculate that there may be an equilibrium between membrane-integrated and fully translocated protein populations.

Moreover, considering the position of the reporters, we hypothesize that the membrane-inserting population inserts in the  $N_{lum}$ – $C_{cyt}$  topology (see **Fig. 5.14**). On the contrary, h1 and HI helices are mostly found glycosylated in the ER lumen ( $K_{app\ h1} = 0.18 \pm 0.1$  and  $K_{app\ HI} = 0.24 \pm 0.02$ ).



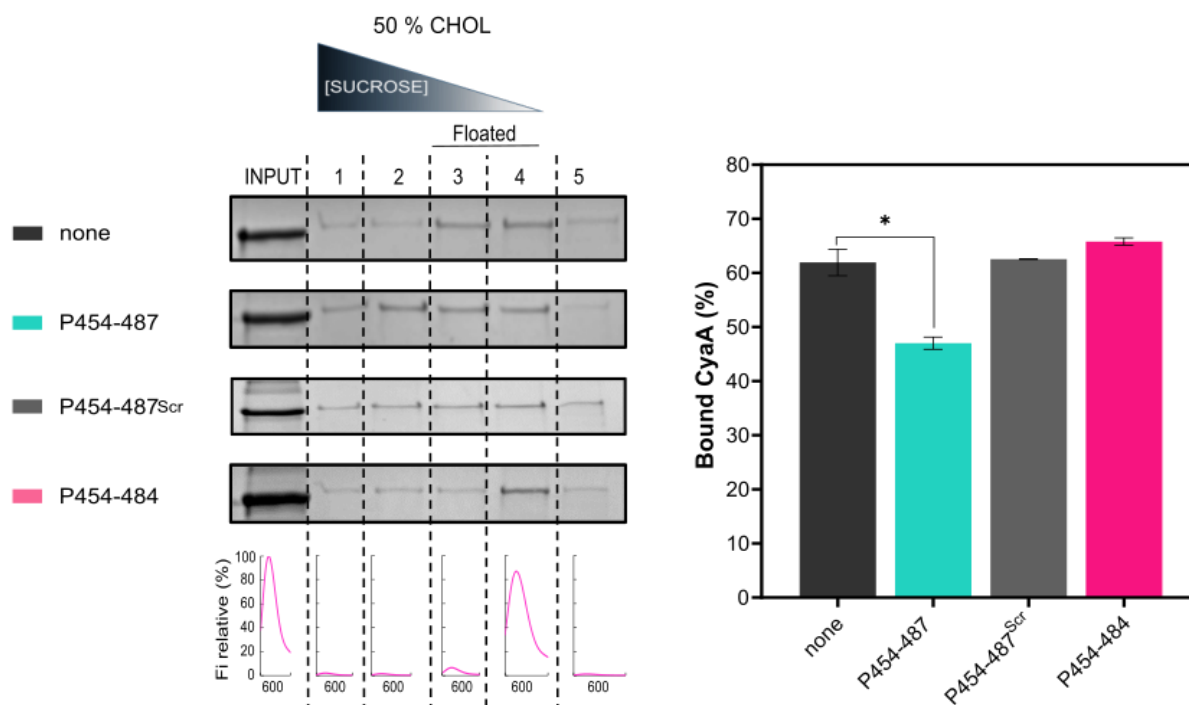
**Figure 5.14. Potential membrane association models.** The panel shows putative membrane insertion models for h1, h2 and HI helices (in blue, green and orange, respectively) based on our experimental data. LepB TM1 and TM2 are colored in dark blue. Glycan acceptor-sites named under the position of the asparagine residue counting from the last residue of the upstream helix. Luminal glycan acceptor-sites are labelled with red dots and the unglycosylated cytoplasmic sites in gray. The glycosylated protein population was considered as non-inserted.

### 5.3.8. P454–487 blocks CyaA binding and inhibits toxin-induced activities

After characterizing the membrane-active properties of P454–487, we examined if the peptide was able to prevent CyaA activities in host cells. To do so, we first evaluated if this peptide was capable of blocking the binding of the full-length toxin to cholesterol-containing liposomes.

We incubated DOPC/CHOL (1:1 molar ratio) vesicles with the corresponding peptide and then, we added CyaA. We quantified the membrane-association of CyaA, as detailed in **protocol 3.3.5.3**.

The quantitation results shown in **Fig. 5.15**, demonstrate that P454–487 is able to block CyaA binding to the vesicles. On the contrary, the incubation with P454–487<sup>Scr</sup> or P454–484 did not alter the binding ability of CyaA, suggesting that only the peptide with the intact CRAC<sup>485</sup> motif was able to inhibit CyaA binding.

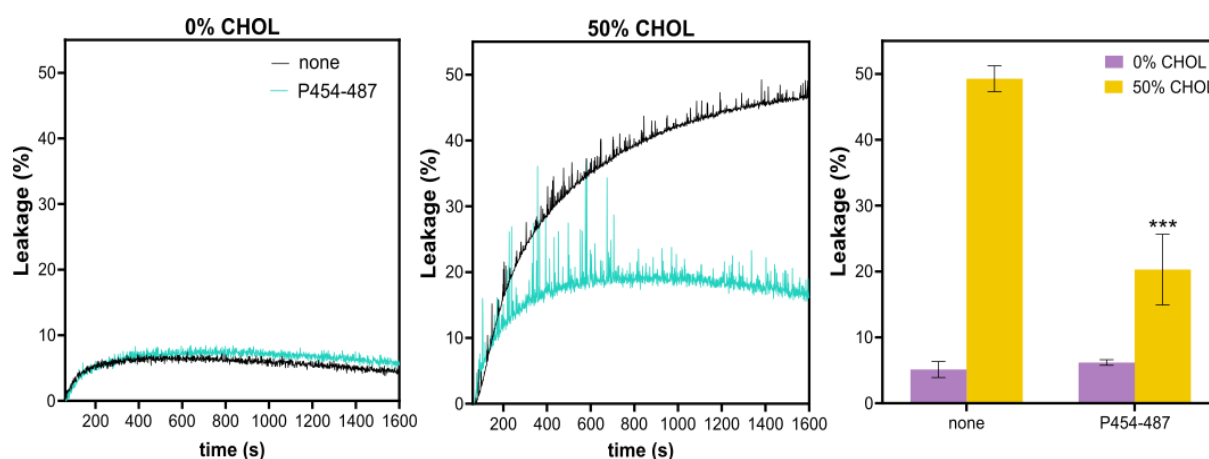


**Figure 5.15. P454-487 peptide inhibits CyaA binding to DOPC/CHOL vesicles.** 5  $\mu$ M P454-487, P454-487<sup>Scr</sup> or P454-484 were incubated with 1.5 mM DOPC/CHOL (1:1 molar ratio) LUVs for 10 min at 25 °C, followed by a second incubation with 750 nM CyaA for 30 min at 37 °C. Data obtained from at least three independent spectra were used to calculate the average values and SD. Statistical significance is based on Welch's t test: none vs. P454-487 \*  $p < 0.05$ .

Thereupon, we analyzed the ability of P454-487 to obstruct CyaA-induced vesicle permeabilization. To that end, ANTS/DPX-containing vesicles were incubated with P454-487, followed by a second incubation with CyaA to record leakage kinetics (**protocol 3.4.1.2**).

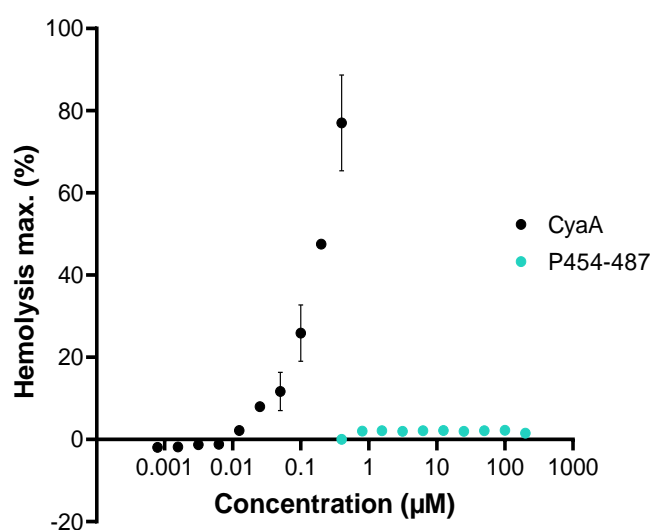
The incubation with P454-487 reduced both the rate and extent of CyaA-induced leakage in cholesterol-containing liposomes (**Fig. 5.16**). The maximum leakage-percentage decreased more than a half (from ~50% to ~20%). However, incubating the peptide with pure DOPC LUVs made no difference in the toxin-induced leakage (~10%). The maximum leakage percentage was of 10%, suggesting that the peptide did not show preference for pure phospholipid membranes.





**Figure 5.16. Incubation of DOPC/CHOL vesicles with P454-487 decrease CyaA-induced vesicle permeabilization.** Representative leakage kinetics induced by 50 nM CyaA in 100  $\mu$ M DOPC (left subpanel) and DOPC:CHOL (1:1 molar ratio) (central subpanel) liposomes are shown in the presence (green line) or absence (black line) of 1  $\mu$ M peptide. Final leakage percentages calculated for each lipid composition, DOPC (purple) and DOPC/CHOL (yellow) are shown in the bar graphs. Data presented in the right subpanel showing bar graphs correspond to the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments with triplicates ( $n = 9$ ). Statistical significance was based on 2-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. 50% mole CHOL none vs. 50% mole CHOL P454-487 \*\*\*  $p < 0.001$ .

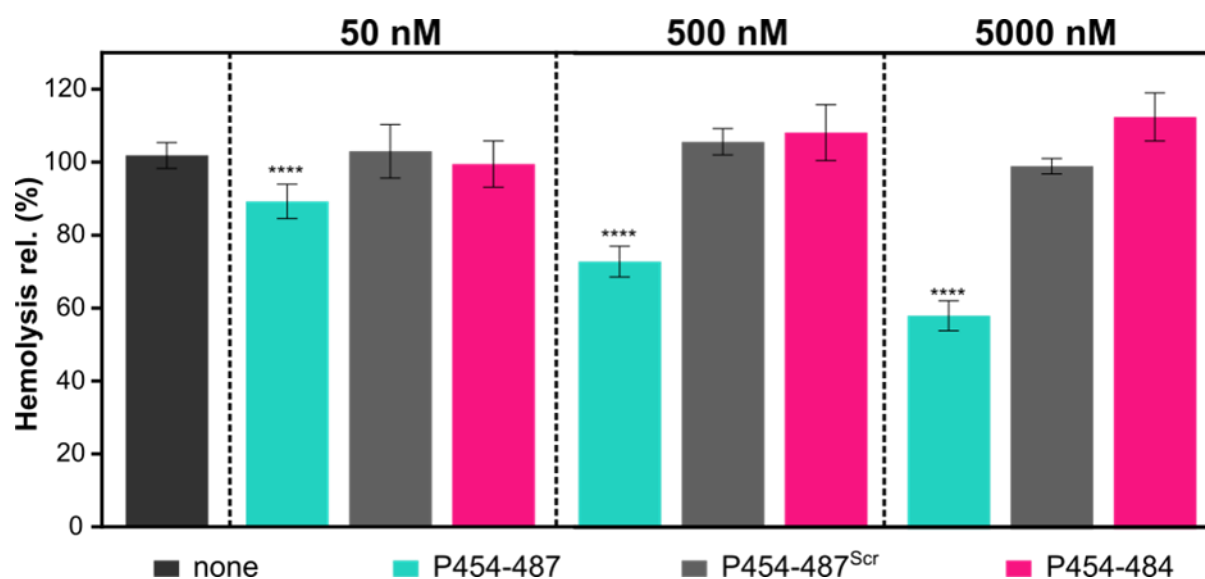
The ability of P454-487 itself to alter membrane permeability of erythrocytes was investigated next, and compared with the lytic capacity of the CyaA toxin (**protocol 3.6.1.6**). It was important to determine if this peptide was itself toxic to cells, since this would prevent a future therapeutic use. As compared to the full-length CyaA, which provoked the lysis of erythrocytes at nanomolar concentrations, no peptide-mediated hemolysis was observed in the treated erythrocytes, even upon incubation with high peptide concentrations up to 200  $\mu$ M (**Fig. 5.17**).



**Figure 5.17. Hemolytic capacity of the P454-487 peptide and comparison with the full-length CyaA toxin.** Maximum hemolysis caused by CyaA (0-400 nM) or P454-487 (0-200  $\mu$ M) on erythrocytes ( $5 \times 10^8$  cells/ml), after incubating the samples at 37  $^{\circ}$ C for 180 min. Data presented correspond to the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments with triplicates ( $n = 9$ ).

Having verified that the P454–487 peptide was able to bind and partition into neutral lipid bilayers and that does not itself cause erythrocytes lysis, we tested next whether this peptide was capable of blocking CyaA binding to erythrocytes, and concomitantly hinder CyaA-induced hemolysis. Again, we wanted to understand if the CRAC<sup>485</sup> motif had any implication in the process. For that purpose, we analyzed two variant peptides that did not possess the functional CRAC<sup>485</sup> site: P454–487<sup>Scr</sup> and P454–484.

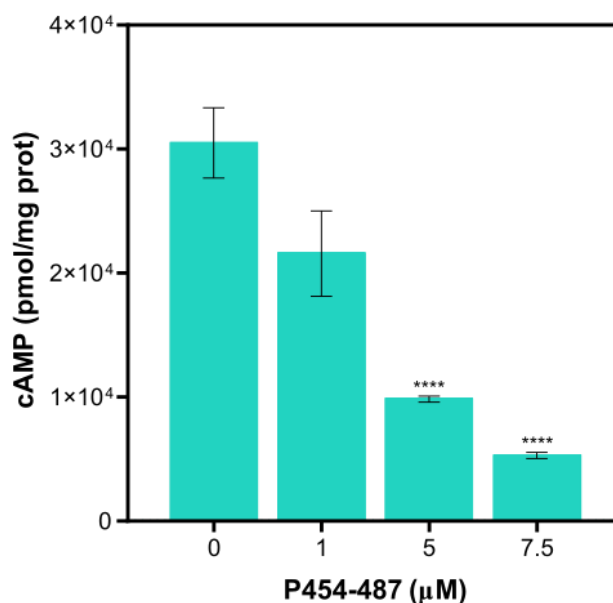
Erythrocytes were initially incubated with different peptide concentrations (0–5  $\mu$ M), followed by the subsequent addition of CyaA, for further recording the hemolysis kinetics (see **protocol 3.6.1.5**). After incubating the erythrocytes with P454–487, but not with the mutant variants, CyaA-induced hemolysis was hampered in a peptide concentration-dependent inhibitory manner. Our results suggest that only P454–487 could outcompete with the full-length CyaA for membrane binding and consequently avoid the lytic effects of CyaA on erythrocytes (**Fig. 5.18**).



**Figure 5.18. P454–487 peptide blocks CyaA binding to erythrocytes and the subsequent toxin-induced lysis.** Maximum hemolysis induced by 50 nM CyaA, after incubating 0–5  $\mu$ M P454–487 with  $5 \times 10^8$  erythrocytes/ml at 4 °C for 15 min. Hemolysis was monitored at 37°C for 180 min. Data correspond to the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments with triplicates (n = 9). Brown-Forsythe and Welch’s ANOVA test was performed with Dunnet’s T3 multiple comparison test, \*\*\*\* p < 0.0001.

Finally, we checked whether the binding of P454–487 to the cell membrane of J774A.1 macrophages was able to impede CyaA binding, and consequently, reduce the toxin-induced cAMP accumulation in the macrophage cytosol.

J774A.1 macrophages were initially incubated with different peptide concentrations and CyaA was later added to the mixture for further incubation (see **protocol 3.6.2.3**). This resulted in an evident inhibitory effect on the cAMP production by CyaA, which diminished accordingly with the peptide doses assayed (**Fig. 5.19**). These results corroborate that P454–487 is capable of hindering CyaA binding to the macrophage cell membrane, and consequently, obstruct the CyaA-induced cAMP accumulation in macrophages.



**Figure 5.19. Incubation of P454–487 with J774A.1 macrophages inhibits toxin-induced cAMP production.** Cells were incubated with different doses of P454–487 (0–7.5 µM) at 4°C for 15 min. cAMP quantification was done after a second incubation of the cells with 200 ng/ml CyaA at 37°C for 30 min. Brown-Forsythe and Welch’s ANOVA tests were performed with Dunnet’s T3 multiple comparison test, \*\*\*\* p<0.0001.

#### 5.4. DISCUSSION

Plasma membrane cholesterol is essential for the two biological activities of *B. pertussis* CyaA toxin<sup>165,168,192</sup>. Recently, we determined that such cholesterol sensitivity is provided by at least four cholesterol-recognition motifs, of CRAC and CARC type, present in helical elements of the translocation region and pore-forming domain<sup>192</sup>. We demonstrate herein that one of those motifs, the CRAC<sup>485</sup>, is responsible for the cholesterol binding by CyaA. To do so, we dissect the membrane-interacting properties of the synthetic peptide, P454–487, comprising residues 454–487 of CyaA and containing the CRAC<sup>485</sup> site, and discuss the relevance of our findings in the context of the full-length toxin.

First, following the fluorescence of residue W458, we show that P454–487 directly interacts with cholesterol in solution. Strikingly, the mutant peptides harboring the incomplete

CRAC<sup>485</sup> motif (P454–487<sup>F485A</sup>, P454–487<sup>Scr</sup> and P454–484) were not sensitive to cholesterol addition (in 0–400 nM range). Hence, these results suggest that the functional CRAC<sup>485</sup> site is necessary for the peptide-cholesterol interplay (**section 5.3.1**).

We also report that P454–487 penetrates into neutral lipid bilayers composed of pure DOPC and DOPC/CHOL (**section 5.3.2**). Interestingly, in the presence of DOPC/CHOL, W458 spectra displays a prominent shift to the left (~8 nm), which is consistent with the higher affinity of the peptide for cholesterol-containing liposomes ( $K_{D \text{ DOPC}} = 6.20 \times 10^{-4} \text{ M}$  vs.  $K_{D \text{ DOPC/CHOL}} 3.10 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) (**Table 5.1**).  $\Delta G$  values indicate that all the peptides assayed partition spontaneously into neutral bilayers ( $\Delta G < 0$ ) (**Table S.5.1**); however, only the WT peptide shows preference for DOPC/CHOL membranes, as reflected by the lower  $K_D$  values. Remarkably,  $K_D$  values calculated here for P454–487 are significantly higher than the ones reported for other peptides derived from other cholesterol-dependent RTX toxins, i.e. *A. actinomycetemcomitans* LtxA-derived peptide containing CRAC<sup>336</sup> site<sup>171</sup>, or peptides derived from UPEC HlyA, harboring the CARC<sup>347</sup> and CRAC<sup>641</sup> sites<sup>193</sup> (in the range of  $10^{-8}$  and  $10^{-6}$  M, respectively). Therefore, in the future it would be interesting to use the same techniques (ITC or SPR) to measure the affinity of P454–487 for cholesterol-containing liposomes.

In the past, other group studied the interaction with lipid bilayers of the shorter P454–484 peptide<sup>216,381</sup>. Authors first reported that this peptide acquires  $\alpha$ -helical secondary structure upon interaction with a lipid bilayer and lies parallel to the membrane plane. Furthermore, it associates to vesicles containing negatively charged phospholipids (POPG or POPS), inducing their permeabilization at peptide concentrations in the range of micro-molar<sup>212</sup>. Although it was suggested that P454–484 peptide does not partition to and permeabilize neutral liposomes, the same group later calculated  $K_x$  and  $\Delta G$  values of partitioning in SUVs composed of DOPC ( $5.05 \times 10^5$  and  $-7.8 \text{ kcal/mol}$ ) and DOPC:CHOL (7:3 molar ratio) ( $6 \times 10^4$  and  $-6.5 \text{ kcal/mol}$ )<sup>383</sup>. We note that the different  $K_x$  and  $\Delta G$  values calculated here for the same peptide in LUVs may be related to the impact of the membrane curvature<sup>382</sup> (DOPC  $8.83 \times 10^4$  and  $-6.72 \text{ kcal/mol}$ ; DOPC:CHOL (1:1 molar ratio)  $9.57 \times 10^4$  and  $-6.77 \text{ kcal/mol}$ ). Yet, the values are in a similar range.

Opposite to the hydrophobicity based insertion propensity, the glycosylation mapping results show that h2 helix, corresponding to residues 454–487 of CyaA, has certain capacity (40–50%) to insert in the eukaryotic ER membrane. Unlike canonical hydrophobic TM segments, membrane-integrating segments in toxins typically have marginally hydrophobic character and exist in both soluble and membrane-embedded conformations<sup>377</sup>. Thus, these segments tend to

evade detection by prediction<sup>378</sup>. The glycosylation mapping assay has been previously used to evaluate the insertion of other toxins, i.e. diphtheria toxin<sup>379</sup> or the LCT family<sup>378</sup>. Here, we uncover that the helical segment h2 partitions not only in model lipid bilayers, but also in eukaryotic membranes. However, the effect of cholesterol in the membrane insertion of the helix could not be explored in this assay, as the ER membrane<sup>19,383</sup> is poor in cholesterol content (3–6% of total lipids)<sup>384</sup>. Furthermore, Nilsson and colleagues found that the protein translocation machinery is sensitive to changes in cholesterol levels in the ER membrane. In fact, this sterol reversibly inhibits protein translocation when present at a concentration that is similar to its concentration in the Golgi and significantly lower than in the plasma membrane of eukaryotic cells<sup>385</sup>. Finally, we utilize asparagine acceptor-sites as reporters to ascertain the TM topology of h2, and determine that the membrane-integrated protein fraction inserts in the N<sub>lum</sub>–C<sub>cyt</sub> topology (**section 5.3.7**). This is consistent with our hypothesis that h2 would insert in “head first” (N<sub>in</sub>–C<sub>out</sub>) orientation in the host cell membrane.

Combining CD, conventional FTIR spectroscopy, 2D-COS-IR spectroscopy and ATR-FTIR, we analyze the conformation and orientation adopted by this peptide upon reconstitution into lipid bilayers. Regarding the structure of the membrane-bound peptide, we show that the membrane-association of P454–487 is accompanied by an increase in  $\alpha$ -helical secondary structure. About two thirds of the helix (~22 residues) would be buried into the membrane core of DOPC bilayers, while the remaining third (~12 residues) would remain exposed to solvent and/or in contact with interfacial polar moieties (see **sections 5.3.4** and **5.3.6**). This seems consistent with the length of the peptide, which exceeds the ~20 residues on average required by a TM  $\alpha$ -helix to span a phospholipid bilayer<sup>386,387</sup>. We find that P454–487 penetrates the DOPC bilayer in a tilted orientation, forming an oblique angle of ~52° relative to the membrane normal (**Table S.5.2** and **Fig. 5.9 top figures**). The insertion with tilted orientation could be a compensation mechanism for hydrophobic mismatch, this is the difference between the thicknesses of hydrophobic regions of a TM protein/peptide and of the lipid membrane it spans<sup>388,389</sup>. Nevertheless, we cannot exclude that in the context of the full-length CyaA the tilt angle varies as has been described for helices in polytopic membrane proteins which have their tilt and rotation fully constrained by their tertiary structure<sup>390</sup>.

The finding of the modulating effect of cholesterol on the membrane-associated P454–487 conformation is also remarkable (**Fig. 5.7** and **Table 5.2**). We show that P454–487 adopts  $\alpha$ -helical structure in both pure DOPC and DOPC/CHOL vesicles with low cholesterol concentrations, penetrating the lipid bilayer in a tilted orientation. We note that low cholesterol

concentrations (10–25% mole) have little effect on the peptide conformation, causing only a small increment of ca. 6% in the  $\alpha$ -helix component, which may be consistent with the increased thickness of the pure phospholipid bilayers in presence of cholesterol<sup>355</sup>. However, in cholesterol-rich membranes, the P454–487 helix experiments conformational changes that depend on the presence of an intact C-terminal CRAC<sup>485</sup> motif. Our FTIR data support that a greater sterol content (33% mole) leads to the protrusion of part of the buried  $\alpha$ -helix, which becomes exposed to solvent and/or in contact with interfacial polar moieties. This proves that P454–487 is sensitive to the lipid packing effect, which is fully coherent with part of the peptide penetrating into the more hydrophobic core formed by the acyl chains of DOPC. Importantly, a further augmentation of the cholesterol concentration in the membrane (50% mole) seems to provoke several conformational changes, but that apparently affect only to the protruded  $\alpha$ -helix fraction of P454–487, which partly adopts  $\beta$ -strand conformation (~15%), while other part unfolds (~12%). Curiously, even at the highest cholesterol concentration, the fraction of the buried  $\alpha$ -helix (ca. 50%) remains being the predominant component of the P454–487 peptide conformations in the membranes.

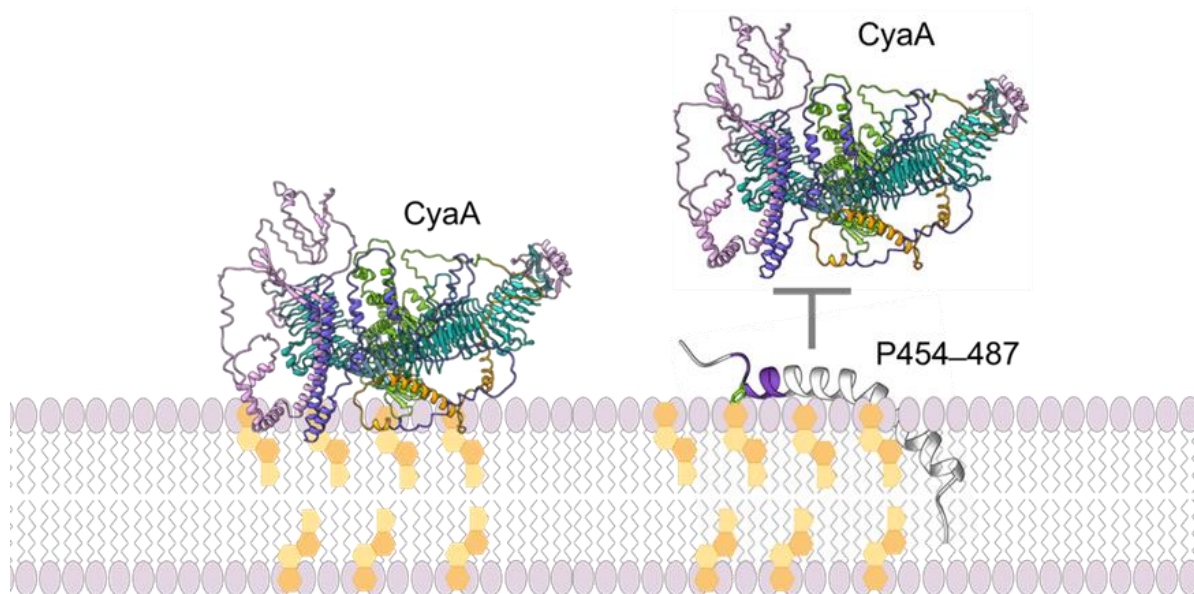
In parallel, we find that cholesterol in the lipid bilayer, irrespective of its proportion, does not affect the overall secondary structure adopted by the mutant P454–487<sup>F485A</sup> in membranes (sections 5.3.5 and 5.3.6). This mutant peptide inserts, either in DOPC as in the different DOPC/CHOL mixtures assayed, as a tilted  $\alpha$ -helix, with about 60% of it buried into the lipid bilayer, and 40% remaining solvent accessible (Table S.5.3 and Fig. 5.9 bottom figures). The only effect cholesterol seems to have on P454–487<sup>F485A</sup> is the progressive augmentation of the tilting angle of the buried helix. Given that the only difference between those peptides and P454–487 is the functional CRAC<sup>485</sup> motif, we can conclude that the presence of this intact cholesterol-recognition motif is relevant for the peptide-membrane association as may determine the membrane-anchoring properties of the peptide in cholesterol-enriched membranes.

At present, we can only speculate on the biological relevance of these findings. One possibility would be that the conformational change experimented by the solvent accessible fraction of the helix in cholesterol-rich membranes would allow to strengthen the peptide-cholesterol interaction, and/or to establish new additional interactions likely with the polar heads of phospholipids, with the final outcome of retaining large part of the P454–487  $\alpha$ -helix buried within the bilayer (irreversible insertion). Going a step further, in the context of the full-length CyaA molecule, the irreversible insertion of a given helix in the translocation region could

contribute to determine the membrane topology of the neighboring helices. The present data are, thus, fully consistent with our previous results showing that the point mutation F485A in the CRAC<sup>485</sup> motif of the full-length CyaA affects the lytic and translocation activities of the toxin<sup>192</sup>. They further support our hypothesis that a direct CyaA interaction with membrane cholesterol through the four cholesterol-binding motifs in the translocation region and hydrophobic domain would stabilize the TM topology of several helical elements that ultimately build the CyaA structure for AC delivery and pore-formation.

Finally, also consistently with our data, others previously noted that an *A. actinomycetemcomitans* LtxA-derived peptide, containing the functional CRAC<sup>336</sup> site, changes from  $\alpha$ - to  $\beta$ -structure as the cholesterol content of the bilayer increases up to 40% mole<sup>171</sup>. This peptide was shown to efficiently interact with cholesterol and inhibit the activity of the full-length LtxA<sup>167,171</sup>. The peptides derived from UPEC HlyA, harboring the CARC<sup>347</sup> and CRAC<sup>641</sup> sites, were also reported to interact preferentially with cholesterol-containing membranes, though only the last peptide was capable of inhibiting the HlyA-induced hemolytic activity<sup>193</sup>.

Binding and productive insertion into the lipid bilayer are the first essential stages in the action mechanism of any toxin acting at the level of cell membranes. Precluding this initial step may thus be a direct way to avoid their toxic effects on target cells. Here, we show that the cholesterol-binding P454–487 peptide outcompetes with the full-length CyaA toxin for the sterol binding in nude lipid bilayers (**Fig. 5.15**). Besides, we also blocked the toxin association with membrane cholesterol in target cells. The method significantly reduced the ability of CyaA to kill erythrocytes (**Fig. 5.16** and **Fig. 5.18**) and induce cAMP accumulation in J774A.1 macrophages (**Fig. 5.19**).



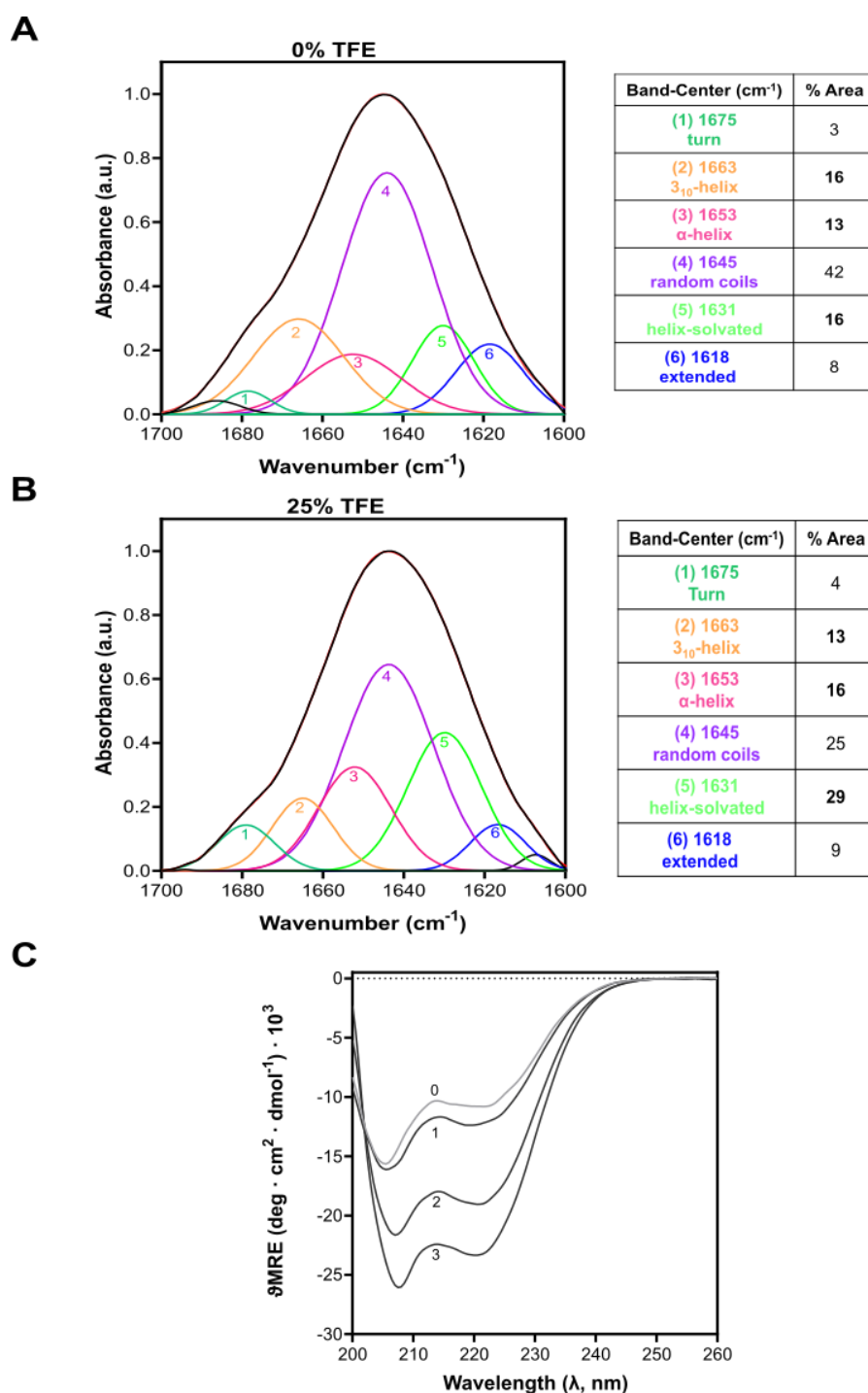
**Figure 5.20. The use of a CRAC peptide to inhibit the cholesterol binding of a bacterial toxin.** Schematic depiction of the P454–487 peptide derived from *Bordetella pertussis* CyaA toxin, blocking the binding of the full-length CyaA. AF2 model<sup>204,205</sup> of CyaA is shown; the color code is similar to that in **Fig. 1.6**. P454–487 was represented using the NMR structure solved by Sukova and colleagues (PDB ID: 6RFM<sup>215</sup>). A cartoon representation of the cell membrane with phospholipid (purple) and cholesterol molecules (orange) has been included as well. ChimeraX was used for visualization<sup>131</sup>. (Figure not drawn to scale).

Remarkably, we show that P454–487 does not itself exhibit lytic properties in the range of concentrations in which inhibits CyaA activity on cells (**Fig. 5.17**), all of which allows affirming that the use of P454–487 may represent a valid non-toxic method for blocking binding of CyaA to host cell membrane cholesterol (**Fig. 5.20**) and minimize Cya-induced cytotoxicity. Blocking toxin binding to host cells through a cholesterol-binding peptide may thus have a potential clinical applicability in controlling several infections related to RTX toxins<sup>117,167,171,193</sup>.

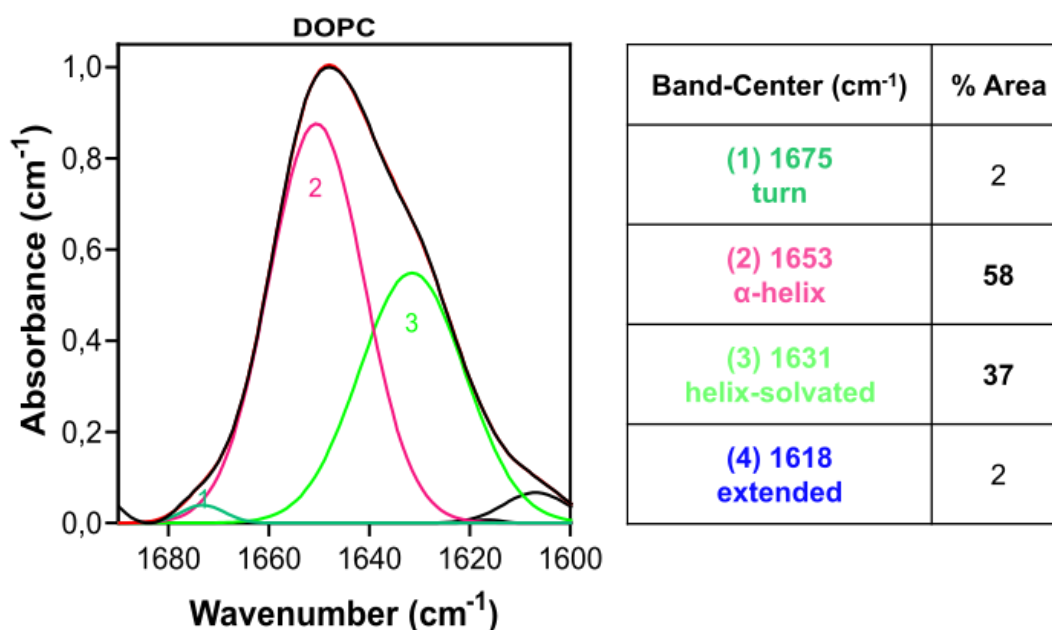


## 5.6. SUPPLEMENTARY MATERIAL

## 5.6.1. Supplementary figures



**Figure S.5.1. Structural analysis of P454–487<sup>F485A</sup> in a low polarity medium.** (A) Normalized FTIR spectrum of the amide I' region for the P454–487<sup>F485A</sup> peptide obtained in buffer. (B) Normalized FTIR spectrum of the amide I' region for the P454–487<sup>F485A</sup> peptide obtained in 25% (v/v) TFE. The absorption band was decomposed into different components. The original spectrum and the sum of the band components are superimposed and indistinguishable. The inset displays the secondary structure assignment for the main components (bands labelled with numbers 1 to 6) and the area percentages (rounded off to the nearest integer). (C) CD spectra obtained for P454–487 at 25 °C in the presence of increasing concentrations of TFE (0–25% v/v) labelled with ascending numbers (0–3).



**Figure S.5.2.** Normalized FTIR spectrum of the amide I' region for the P454–487<sup>F485A</sup> peptide reconstituted in DOPC lipid bilayers. The absorption band was decomposed into different components. The original spectrum and the sum of the band components are superimposed and indistinguishable. The inset displays the secondary structure assignment for the main components (bands labelled with numbers 1 to 4) and the area percentages (rounded off to the nearest integer).

### 5.6.2. Supplementary tables

**Table S.5.1.** Membrane partitioning of P454–487 and its variants P454–487<sup>F485A</sup>, P454–487<sup>Scr</sup> and P454–484 in DOPC or DOPC:CHOL (1:1 molar ratio) LUVs.

Partition coefficient ( $K_x$ ) and the free energy ( $\Delta G$ ) of transfer of each peptide to membrane were calculated using Eq. 3.8 and Eq. 3.9, respectively as described in protocol 3.4.2.2<sup>307</sup>.

	PEPTIDE	DOPC	DOPC/CHOL
$K_x$	P454–487	$8.95 \times 10^4$	$1.79 \times 10^5$
	P454–487 <sup>F485A</sup>	$6.48 \times 10^4$	$7.21 \times 10^4$
	P454–487 <sup>Scr</sup>	$1.94 \times 10^5$	$1.03 \times 10^5$
	P454–484	$8.83 \times 10^4$	$9.57 \times 10^4$
$\Delta G$ (kcal/mol)	P454–487	-6.73	-7.14
	P454–487 <sup>F485A</sup>	-6.54	-6.60
	P454–487 <sup>Scr</sup>	-7.20	-6.81
	P454–484	-6.72	-6.77

**Table S.5.2. ATR-FTIR data of the P454–487 peptide.**

a, vibrations are presented as symmetric (s) or asymmetric (as). b, direction of the dipole moment associated with the vibration with respect to the direction of the main molecular axis (aliphatic chain or peptide-secondary structure). c, S, form factor. d,  $\gamma^\perp$ , angle between the direction of the molecular axis and the perpendicular to the crystal plane (similar to the membrane plane). e,  $\gamma^L$ , angle between the direction of the peptide-secondary structure axis and the calculated aliphatic chain axis.

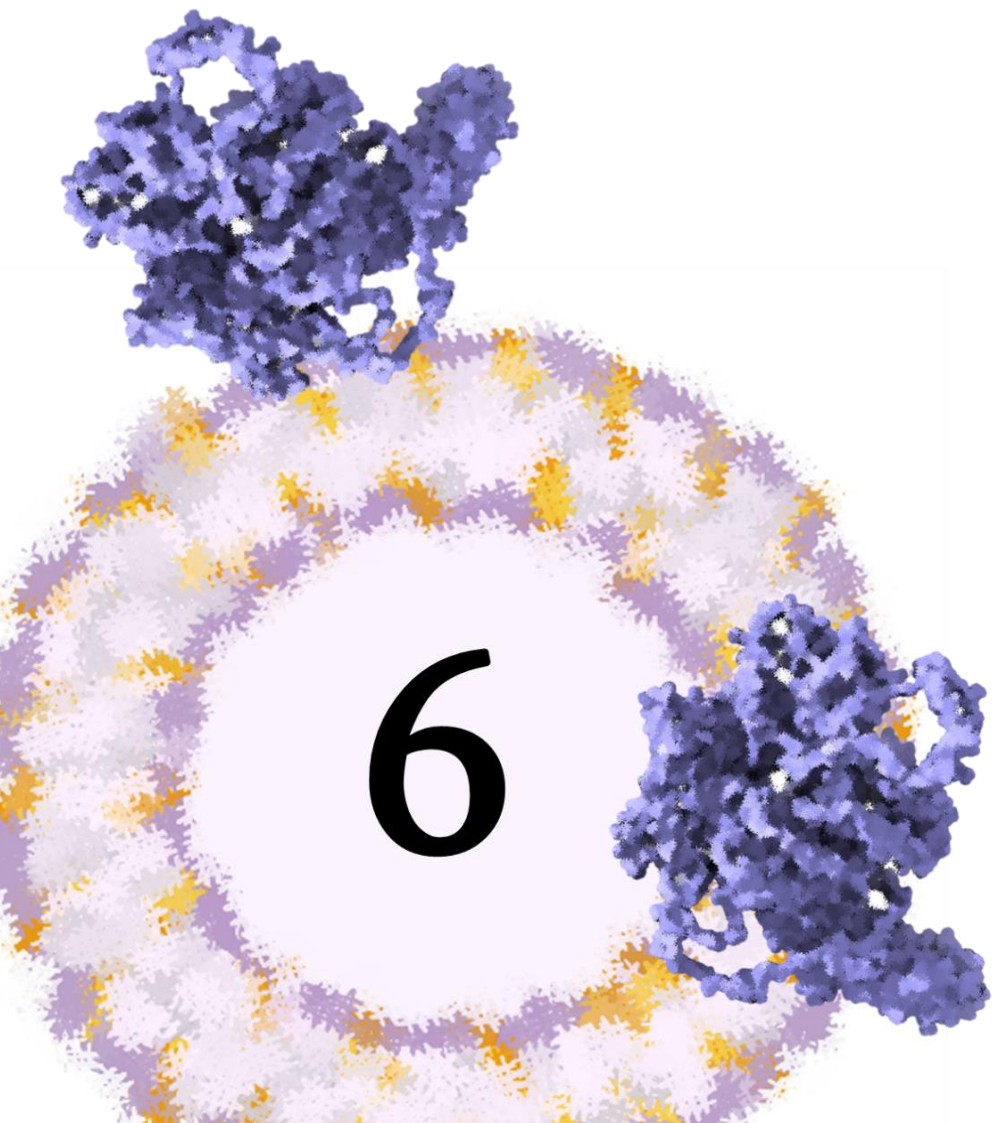
Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Vibration <sup>a</sup>	$\Theta$ (°) <sup>b</sup>	Avg. dichroic ratio $\pm$ SD	Avg S $\pm$ SD <sup>c</sup>	Avg $\gamma^\perp \pm$ SD <sup>d</sup>	Avg $\gamma^L \pm$ SD <sup>e</sup>
<b>0% mole CHOL</b>						
2921	as CH <sub>2</sub> stretching	90	1.63 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.04	45.37 $\pm$ 1.65	
2851	s CH <sub>2</sub> stretching	90	1.60 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.01	44.64 $\pm$ 0.55	
2873.5	s CH <sub>3</sub> stretching	0	1.77 $\pm$ 0.04	-0.07 $\pm$ 0.01	57.68 $\pm$ 0.54	
1656	Amide I'-helix	30	2.03 $\pm$ 0.06	0.01 $\pm$ 0.03	54.14 $\pm$ 1.10	<b>52.74 <math>\pm</math> 4.07</b>
<b>10% mole CHOL</b>						
2921	as CH <sub>2</sub> stretching	90	1.58 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.01	43.89 $\pm$ 0.42	
2851	s CH <sub>2</sub> stretching	90	1.57 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.01	43.61 $\pm$ 0.5	
2873.5	s CH <sub>3</sub> stretching	0	1.72 $\pm$ 0.03	-0.09 $\pm$ 0.01	58.43 $\pm$ 0.43	
1656	Amide I'-helix	30	2.01 $\pm$ 0.06	0.00 $\pm$ 0.03	54.67 $\pm$ 1.15	<b>54.38 <math>\pm</math> 4.04</b>
<b>25% mole CHOL</b>						
2921	as CH <sub>2</sub> stretching	90	1.75 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.00	48.45 $\pm$ 0.16	
2851	s CH <sub>2</sub> stretching	90	1.64 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.03	45.5 $\pm$ 0.96	
2873.5	s CH <sub>3</sub> stretching	0	1.70 $\pm$ 0.04	-0.10 $\pm$ 0.01	58.78 $\pm$ 0.62	
1656	Amide I'-helix	30	1.96 $\pm$ 0.01	-0.02 $\pm$ 0.00	55.41 $\pm$ 0.15	<b>57.59 <math>\pm</math> 0.34</b>
<b>33% mole CHOL</b>						
2921	as CH <sub>2</sub> stretching	90	1.70 $\pm$ 0.00	0.19 $\pm$ 0.00	47.18 $\pm$ 0.08	
2851	s CH <sub>2</sub> stretching	90	1.60 $\pm$ 0.00	0.27 $\pm$ 0.00	44.28 $\pm$ 0.03	
2873.5	s CH <sub>3</sub> stretching	0	1.64 $\pm$ 0.02	-0.12 $\pm$ 0.01	59.67 $\pm$ 0.25	
1656	Amide I'-helix	30	1.84 $\pm$ 0.01	-0.08 $\pm$ 0.00	57.96 $\pm$ 0.13	<b>67.99 <math>\pm</math> 0.67</b>
<b>50% mole CHOL</b>						
2921	as CH <sub>2</sub> stretching	90	1.78 $\pm$ 0.00	0.14 $\pm$ 0.00	49.24 $\pm$ 0.09	
2851	s CH <sub>2</sub> stretching	90	1.70 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.02	47.38 $\pm$ 0.65	
2873.5	s CH <sub>3</sub> stretching	0	1.74 $\pm$ 0.00	-0.08 $\pm$ 0.00	58.06 $\pm$ 0.00	
1656	Amide I'-helix	30	2.05 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.01	53.75 $\pm$ 0.35	<b>49.39 <math>\pm</math> 4.94</b>

**Table S.5.3. ATR-FTIR data of the P454-487<sup>F485A</sup> peptide.**

a, vibrations are presented as symmetric (s) or asymmetric (as). b, direction of the dipole moment associated with the vibration with respect to the direction of the main molecular axis (aliphatic chain or peptide-secondary structure). c, S, form factor. d,  $\gamma^\perp$ , angle between the direction of the molecular axis and the perpendicular to the crystal plane (similar to the membrane plane). e,  $\gamma^L$ , angle between the direction of the peptide-secondary structure axis and the calculated aliphatic chain axis.

Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Vibration <sup>a</sup>	$\Theta$ (°) <sup>b</sup>	Avg dichroic ratio $\pm$ SD	Avg S $\pm$ SD <sup>c</sup>	Avg $\gamma^\perp \pm$ SD <sup>d</sup>	Avg $\gamma^L \pm$ SD <sup>e</sup>
<b>0% mole CHOL</b>						
2921	as CH <sub>2</sub> stretching	90	1.60 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.04	44.51 $\pm$ 1.5	
2851	s CH <sub>2</sub> stretching	90	1.61 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.03	44.67 $\pm$ 1.27	
2873.5	s CH <sub>3</sub> stretching	0	1.81 $\pm$ 0.02	-0.06 $\pm$ 0.01	57.20 $\pm$ 0.27	
1656	Amide I'-helix	30	2.17 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.00	51.67 $\pm$ 0.11	
<b>10% mole CHOL</b>						
2921	as CH <sub>2</sub> stretching	90	1.56 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.02	43.33 $\pm$ 0.69	
2851	s CH <sub>2</sub> stretching	90	1.57 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.02	43.52 $\pm$ 0.76	
2873.5	s CH <sub>3</sub> stretching	0	1.80 $\pm$ 0.01	-0.06 $\pm$ 0.00	57.25 $\pm$ 0.11	
1656	Amide I'-helix	30	2.20 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01	51.28 $\pm$ 0.55	
<b>25% mole CHOL</b>						
2921	as CH <sub>2</sub> stretching	90	1.72 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	47.86 $\pm$ 0.34	
2851	s CH <sub>2</sub> stretching	90	1.64 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01	45.7 $\pm$ 0.32	
2873.5	s CH <sub>3</sub> stretching	0	1.74 $\pm$ 0.02	-0.08 $\pm$ 0.01	58.13 $\pm$ 0.25	
1656	Amide I'-helix	30	2.08 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.01	53.37 $\pm$ 0.43	
<b>33% mole CHOL</b>						
2921	as CH <sub>2</sub> stretching	90	1.43 $\pm$ 0.33	0.43 $\pm$ 0.28	37.60 $\pm$ 11.43	
2851	s CH <sub>2</sub> stretching	90	1.66 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.02	46.13 $\pm$ 0.76	
2873.5	s CH <sub>3</sub> stretching	0	1.73 $\pm$ 0.02	-0.09 $\pm$ 0.01	58.32 $\pm$ 0.3	
1656	Amide I'-helix	30	2.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	54.35 $\pm$ 0.25	
<b>50% mole CHOL</b>						
2921	as CH <sub>2</sub> stretching	90	1.77 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	49.12 $\pm$ 0.37	
2851	s CH <sub>2</sub> stretching	90	1.67 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.01	46.39 $\pm$ 0.26	
2873.5	s CH <sub>3</sub> stretching	0	1.70 $\pm$ 0.00	-0.1 $\pm$ 0.00	58.75 $\pm$ 0.07	
1656	Amide I'-helix	30	1.90 $\pm$ 0.02	-0.05 $\pm$ 0.01	56.65 $\pm$ 0.42	

# KAPITULUA



## EZTABAIDA OROKORRA ETA ONDORIOAK

Zenbait patogeno eta birulentzia-faktorek *raft*<sup>53,54,291</sup> domeinuetako kolesterolari eraso egiten diote<sup>177-184</sup>. Adibidez, azterketa askok adierazi dute kolesterola funtsezkoa dela hainbat RTX toxinaren funtzio biologikoetarako<sup>135,138,150,164,165</sup>. Doktorego-tesi honetan, *Bordetella* CyaA toxinaren eta mintzeko kolesterolaren arteko elkarreragina aztertu dugu.

Urte batzuk atzera, kolesterolak CyaA toxinaren ahalmen zitotoxikoa eta zitolitikoa modulatzeko egiaztatu zen<sup>135,165</sup>. Berrikiago, mintzeko kolesterolak CyaA-ren lisi gaitasuna areagotzen duela jakin genuen, eritrozitoetan eta geruza lipidikoetan toxinaren txertaketa eta oligomerizazioa sustatuz<sup>168</sup>. Dena den, gaur arte ez zegoen argi CyaA-ren jardura biologikoek kolesterolarekiko zuten mendekotasuna zuzeneko loturaren ondorio zen, edo, bestela, esterolak fosfolipido geruzaren egoera fisikoan eragindako aldaketek eragina zen.

Kolesterolaren eta CyaA-ren arteko interakzioak toxinaren mintzeko lotura areagotzen duela argitzen duten ebidentzia andana bat aurkezten dugu hemen<sup>191</sup>. Lehenik eta behin, frogatu dugu CyaA kolesterola duten liposomekin elkartzen dela, eta afinitate hori ez duela sustatzen kolesterolak lipidoen fase-bereizketa bultzatzeko daukan gaitasunak. Lan honetan erabilitako DOPC/CHOL formulazioak (% 25 edo % 50 mol kolesterol dute) guztiz nahaskorrak dira<sup>364</sup>, PC-dun mintzetan kolesterolaren disolbagarritasun-muga % 66 molekoa baita<sup>352</sup>. Hala, erabilitako nahasteek fase bakarra dute (Ld edo Lo), eta, beraz, ez dira fase bereizietan banatzen<sup>51</sup>. Gainera, kolesterolaren analogo estrukturala den ergosterolarekin lortutako lotura-erakustek erakusten dute toxina DOPC eta DOPC/ERG (% 25 mol ergosteroldunak) besikuletan antzera lotzen dela, eta horrek adierazten du CyaA-kolesterola elkarrekintza espezifikoa dela. Beste lau RTX toxina ere kolesterolarekin zuzenean elkartzen direnez<sup>138,150,164,170</sup>, baliteke familiako identitate-ikur komun bat izatea.

Zenbait RTX toxinek, hala nola *A. actinomycetemcomitans* LtxA-k<sup>138</sup>, *K. kingae* RtxA-k<sup>150</sup> eta UPEC HlyA-k<sup>193</sup>, kolesterola ezagutzeko CRAC eta alderantzizko CARC motibo funtzionalak dituzte beren sekuentzia primarioetan. Hemen, RTX familiako 13 toxinatan CRAC eta CARC gune potentzialak identifikatu ditugu<sup>365</sup>, (L/V)-X<sub>1,5</sub>-(Y/F)-X<sub>1,5</sub>-(R/K) eta (R/K)-X<sub>1-5</sub>-(Y/F)-X<sub>1-5</sub>-(L/V) patroiak jarraitzen dituztenak, hurrenez hurren. Cané eta kideek argitaratutako MSA emaitzekin bat eginez<sup>193</sup>, motibo horietako batzuk oso kontserbatuta daudela erakutsi dugu, toxina horien domeinu poro-eragilean, hain zuzen ere. Ebidentzia horrek aditzera ematen du eskualde horretako CRAC/CARC motiboei esker, familia honetako zenbait kidek kolesterola ezagutu dezaketela<sup>365</sup>.

## 6. KAPITULUA: EZTABAIDA OROKORRA ETA ONDORIOAK

Bestalde, toxina horien aminoazido-sekuentziak aztertuta, motibo posible berriak identifikatu ditugu (erdiko posizioan fenilalanina dutenak). Esaterako, Masinek eta lankideek *B. pertussis* CyaA-ren domeinu hemolitikoan identifikatu zituzten bost CRAC motiboez gain<sup>170</sup>, translokazio-eskualdean eta domeinu poro-eragilean kokatutako beste bost motibo aurkitu ditugu (CARC<sup>404</sup>, CARC<sup>415</sup>, CRAC<sup>485</sup>, CRAC<sup>521</sup> eta CARC<sup>532</sup> guneak). Bitxia bada ere, toxina honetan identifikatutako CRAC/CARC motibo posibleetako bat ere ez da kontserbatzen gainerako familia-kideetan. Kontserbazio ezaren esanahi zehatza zein den, eta itu zelulamintzean txertatzen den domeinu poro-eragilearen egitura-elementu edo mekanismoekin lotuta egon daitekeen, oraindik ez dakigu.

Bi ebidentzia-lerro erabili dira nagusiki CRAC/CARC segmentuek funtzioarekin duten erlazioa frogatzeko. Batetik, proteinan ustezko motibo bat mutatzea eta horrek kolesterolaren funtzioa eta/edo interakzioa aldatzen duen zehaztea. Duela hamar urte, *A. actinomycetemcomitans* LtxA CRAC (Y336P eta Y503P) mutanteak erabiliz, Brownek eta kideek frogatu zuten identifikatutako bi CRAC guneetatik CRAC<sup>336</sup> gunea bakarrik zela funtsezkoa LtxA-ren zitotoxikotasunerako. Ondoren, 2018an, Osickovak eta kolaboratzaileek erakutsi zuten *K. kingae* RtxA toxinarene jarduera litikoa murrizten zutela, hurrenez hurren, CARC<sup>343</sup> eta CRAC<sup>352</sup> motiboetako Y343F eta Y352F mutazioek<sup>150</sup>. Era berean, CARC<sup>415</sup>, CRAC<sup>485</sup>, CRAC<sup>521</sup> eta CARC<sup>532</sup> guneetako F/A ordezkapenek nabarmen murrizten dute toxinak AC domeinua translokatzeko daukan gaitasuna, eta *B. pertussis* CyaA-ren potentzia hemolitikoari ere eragiten diote<sup>191</sup>. CRAC<sup>632</sup>, CRAC<sup>658</sup>, CRAC<sup>725</sup> eta CRAC<sup>738</sup> motiboei dagokienez, Masinek eta lankideek adierazi zuten Y/F ordezkapenek ez zutela eraginik izan ez translokazioan ez toxinarene jarduera hemolitikoan<sup>170</sup>.

Estrategia alternatibo bat CRAC/CARC guneari dagokion peptido sintetikoa erabiltzea da, eta peptidoak kolesterolarekin elkarreraginean aritzeko gaitasunik ba ote duen aztertzea. Lan honetan, peptido sintetiko bat erabili dugu (P454–487), CyaA-ren 454–487 hondarrak dituen, toxinak kolesterola CRAC<sup>485</sup> motiboa erabiliz lotzen duela frogatzeko. Translokazio-eskualdeko bigarren helizea (h2) AC domeinuaren garraioan inplikaturik dagoela proposatu zenez<sup>211,216</sup>, eta toxina osoaren F485A mutantearekin lortutako emaitzek CRAC<sup>485</sup> gunearen partehartzea iradokitzen zuten CyaA-ren jarduera biologikoetan<sup>191</sup>, P454–487 peptidoa azterketarako hautagai ontzat jo zen.

Lan honetan, motibo hori aztertu dugu zenbait metodo biofisikoren bidez, eta peptido-mintz elkarreraginaren inguruko xehetasun batzuk eman ditugu. Esaterako, liposometan neurtutako peptido-bigeruza partizioaren konstante termodinamikoak kalkulatu ditugu. Horrez gain,

peptidoak disoluzioan dagoen kolesterolarekin bat egiten duela ikusi dugu, eta DOPC eta DOPC/CHOL duten geruza lipidiko neutroetan sartzen dela, kolesterola duten mintzekiko afinitate handiagoa erakutsiz. Era berean, nabarmentzekoa da kontrol peptidoekin (CRAC<sup>485</sup> gune osatu gabea dute) lortutako emaitzek adierazten dutela gune hori beharrezkoa dela peptiko-kolesterolaren arteko interakzio egokia lortzeko. Etorkizunean, beste teknika batzuk erabiltzea, hala nola SPR, DSC edo ITC, garrantzitsua litzateke triptofanoaren fluoreszentzia bidez kalkulaturako partizio-koefizienteak konparatzeko. Interesgarria litzateke, halaber, toxina osoak kolesterolarekiko duen afinitatea neurtzea.

P454–484 peptido laburrerako adierazi ez bezala<sup>216</sup>, P454–487 gai da lipidoen geruza neutroetan eta zelula eukariotoen mintzetan lotzeko. Bigeruza lipidikoetan inklinaturako helize luze gisa txertatzen da, baina konformazio hedatu eta desegituratuetarantz aldatzen da % 50 mol kolesterolen presentzian. Mintzeko kolesterolak modulaturako konformazio-aldaketak CRAC<sup>485</sup> gune funtzionala zuen peptidoan bakarrik behatu ahal izan ziren. Azpimarratu behar da, Brownek eta kideek ere adierazi zutela *A. actinomycetemcomitans* LtxA toxinarekin CRAC<sup>336</sup> gune funtzionala daukan peptidoa aldatu egiten dela  $\alpha$ -tik  $\beta$ -egiturara, geruza bikoitzeko kolesterol-edukia % 40 moleraino handitzen denean<sup>171</sup>.

*B. pertussis* CyaA-ren kasuan, posible da konformazio-aldaketa horiek aukera ematea peptido-kolesterol interakzioa indartzeko eta/edo fosfolipidoen buru polarrekin gerta daitezkeen beste elkarrekintza osagarri batzuk ezartzeko, bigeruzan txertaturako P454–487 helizearen zati handi bat txertatzearen ondorioz (txertatze itzulezina). Luzera osoko CyaA molekularen testuinguruan, translokazio-eskualdeko helize jakin bat modu itzulezinean sartzeak inguruko helizeen TM topologia zehazten lagun lezake. Peptido sintetikoekin lortutako datuak, beraz, guztiz bat datoz aurreko emaitzekin, eta erakusten dute F485A mutazio puntualak toxinarekin funtzio biologikoei eragiten diela<sup>191</sup>. Gure hipotesiaren arabera, translokazio-eremuan eta eremu hidrofobikoan dauden lau CRAC/CARC motiboen eta kolesterolaren arteko zuzeneko elkarrekintzak, egonkortu lezake zenbait elementu helikoidalen TM topologia, eta, hala CyaA-ren egitura funtzionala eratzen lagundu.

*A. actinomycetemcomitans* LtxA-ren CRAC<sup>336</sup> gunea<sup>171</sup> eta UPEC HlyA-ren CRAC<sup>641</sup> motiboa gordetzen dituzten peptidoek<sup>193</sup>, batez ere, kolesterola duten mintzekin elkarreragiten dute eta toxina horien jarduera inhibitzen dute. Era berean, hemen frogatu dugu CyaA-tik eratorritako P454–487 peptidoa gai dela zelula-mintzekin elkartzeko, eta geruza bikoitzetan eta zelula mintzetan txertatzeko. Gainera, CyaA-ren zitotoxikotasuna murriztu dezake, toxinarekin



## 6. KAPITULUA: EZTABAIDA OROKORRA ETA ONDORIOAK

lehiatzen baita kolesterolak lotzeko. Horri esker, CyaA-k eragindako lisiaren eta J774A.1 makrofagoetan cAMP metatzearen inhibizio eraginkorra behatu dugu.

Frogatu dugu P454–487 peptidoak ez dituela berezko propietate litikoak zeluletan, CyaA-ren jarduera inhibitzen duen kontzentrazio-tartean behintzat. Horrek guztiak esan nahi du P454–487 peptidoa erabiltzea metodo ez-toxiko baliagarria izan daitekeela CyaA zelula ostalariei lotzea oztopatzeko eta toxinak eragindako zitotoxikotasuna gutxitzeko. Etorbizunean, beste motibo funtzionalen (CARC<sup>415</sup>, CRAC<sup>521</sup> eta CARC<sup>532</sup>) karakterizazio osagarriak helikoidalak diren segmentu horien TM topologiaren berri eman dezake, eta CyaA-kolesterolaren interakzioa blokeatzeko hautagai berriak identifikatzen lagun dezakeg. *A. actinomycetemcomitans* LtxA-rentzat proposatu bezala<sup>117</sup>, toxinarene eta kolesterolaren arteko elkarreagina eta CyaA-k zelula ostalariarekin elkarrekintzan aritzeko eta hura hiltzeko erabiltzen duen mekanismoa ulertzea erabilgarria izan liteke CyaA-ren aurkako estrategiak diseinatzeko. Hala, *Bordetella*-k eragindako infekzioak prebenitu eta trata litezke.

Doktorego-tesi honetan aurkeztutako emaitzekin ondorio hauek atera dira:

1. *Bordetella* CyaA toxinak kolesterolarekin elkarreagiten du espezifikoki.
2. CyaA-k kolesterola hauteman dezaketan CRAC/CARC motibo posibleak ditu bere sekuentzia primarioan.
3. CARC<sup>415</sup>, CRAC<sup>485</sup>, CRAC<sup>521</sup> eta CARC<sup>532</sup> gunetako F/A ordezkapenek nabarmen murrizten dute CyaA-ren translokazio-ahalmena eta haren potentzia hemolitikoari eragiten diote.
4. CRAC<sup>485</sup> motiboa kolesterola lotzeaz arduratzen da.
5. CyaA toxinatik eratorritako, translokazio-eskualdeko h2 helizea eta CRAC<sup>485</sup> motiboa daukan, P454–487 peptidoa gai da zelula mintzetan txertatzeko eta toxinarekin lehiatzen da zelula ostalariaren mintz plasmatikoko kolesterolarekin bat egiteagatik, hala, bi toxina-jarduerak inhibituz.

## ERREFERENTZIAK

1. Yeagle, P. L. Chapter 2 - The Lipids of Biological Membranes. in *The Membranes of Cells (Third Edition)* (ed. Yeagle, P. L.) 27–56 (Academic Press, Boston, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-800047-2.00002-4.
2. Lombard, J. Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biol. Direct* **9**, 32 (2014).
3. Bernardes, N. & M. Fialho, A. Perturbing the Dynamics and Organization of Cell Membrane Components: A New Paradigm for Cancer-Targeted Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3871 (2018).
4. Kulma, M. & Anderluh, G. Beyond pore formation: reorganization of the plasma membrane induced by pore-forming proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 6229–6249 (2021).
5. Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C. & Han, J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res.* **28**, 9–21 (2018).
6. Gilbert, R. J. C. Pore-forming toxins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **59**, 832–844 (2002).
7. Gorter, E. & Grendel, F. ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD. *J. Exp. Med.* **41**, 439–443 (1925).
8. Bernardino de la Serna, J., Schütz, G. J., Eggeling, C. & Cebecauer, M. There Is No Simple Model of the Plasma Membrane Organization. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 106 (2016).
9. Nicolson, G. Update of the 1972 Singer-Nicolson Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure. *Discoveries* (2013) doi:10.15190/d.2013.3.
10. Goñi, F. M. The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 1467–1476 (2014).

## ERREFERENTZIAK

11. Maxfield, F. R. & van Meer, G. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 422–429 (2010).
12. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720–731 (1972).
13. Vereb, G. *et al.* Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8053–8058 (2003).
14. Bagatolli, L. A., Ipsen, J. H., Simonsen, A. C. & Mouritsen, O. G. An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Prog. Lipid Res.* **49**, 378–389 (2010).
15. Verkley, A. J. *et al.* The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **323**, 178–193 (1973).
16. Bretscher, M. S. Phosphatidyl-ethanolamine: Differential labelling in intact cells and cell ghosts of human erythrocytes by a membrane-impermeable reagent. *J. Mol. Biol.* **71**, 523–528 (1972).
17. Hölzl, G. & Dörmann, P. Structure and function of glycolipids in plants and bacteria. *Prog. Lipid Res.* **46**, 225–243 (2007).
18. Rahim, N. *et al.* A Review On Phase Behaviour Of Glycolipids Derived From Plants. *Mater. Today Proc.* **5**, S180–S185 (2018).
19. van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124 (2008).
20. van Meer, G. & de Kroon, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* **124**, 5–8 (2011).

21. Quinville, B. M., Deschenes, N. M., Ryckman, A. E. & Walia, J. S. A Comprehensive Review: Sphingolipid Metabolism and Implications of Disruption in Sphingolipid Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5793 (2021).
22. Ghosh, S. Sialic acid and biology of life: An introduction. *Sialic Acids Sialoglycoconjugates Biol. Life Health Dis.* 1–61 (2020) doi:10.1016/B978-0-12-816126-5.00001-9.
23. Mouritsen, O. G. & Zuckermann, M. J. What's so special about cholesterol? *Lipids* **39**, 1101–1113 (2004).
24. Ashraf, R. & Bhatti, H. N. Chapter 10 - Stigmasterol. in *A Centum of Valuable Plant Bioactives* (eds. Mushtaq, M. & Anwar, F.) 213–232 (Academic Press, 2021). doi:10.1016/B978-0-12-822923-1.00019-4.
25. Bagiński, M., Tempczyk, A. & Borowski, E. Comparative conformational analysis of cholesterol and ergosterol by molecular mechanics. *Eur. Biophys. J. EBJ* **17**, 159–166 (1989).
26. Chaudhuri, A. & Chattopadhyay, A. Transbilayer organization of membrane cholesterol at low concentrations: Implications in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808**, 19–25 (2011).
27. Chapman, D. Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Q. Rev. Biophys.* **8**, 185–235 (1975).
28. Fantini, J., Garmy, N., Mahfoud, R. & Yahi, N. Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Rev. Mol. Med.* **4**, 1–22 (2002).
29. Chang, H. M., Reitstetter, R., Mason, R. P. & Gruener, R. Attenuation of channel kinetics and conductance by cholesterol: an interpretation using structural stress as a unifying concept. *J. Membr. Biol.* **143**, 51–63 (1995).

## ERREFERENTZIAK

30. Hanson, M. A. *et al.* A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **16**, 897–905 (2008).
31. Rosenhouse-Dantsker, A., Noskov, S., Durdagi, S., Logothetis, D. E. & Levitan, I. Identification of novel cholesterol-binding regions in Kir2 channels. *J. Biol. Chem.* **288**, 31154–31164 (2013).
32. Fantini, J., Di Scala, C., Baier, C. J. & Barrantes, F. J. Molecular mechanisms of protein-cholesterol interactions in plasma membranes: Functional distinction between topological (tilted) and consensus (CARC/CRAC) domains. *Chem. Phys. Lipids* **199**, 52–60 (2016).
33. Baier, C. J., Fantini, J. & Barrantes, F. J. Disclosure of cholesterol recognition motifs in transmembrane domains of the human nicotinic acetylcholine receptor. *Sci. Rep.* **1**, 69 (2011).
34. Garidel, P. *et al.* Self-Organisation, Thermotropic and Lyotropic Properties of Glycolipids Related to their Biological Implications. *Open Biochem. J.* **9**, 49–72 (2015).
35. Lombardo, D., Kiselev, M. A., Magazù, S. & Calandra, P. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches. *Adv. Condens. Matter Phys.* **2015**, e151683 (2015).
36. Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*. (Academic Press, London, 1992).
37. Mouritsen, O. G. Lipids, curvature, and nano-medicine. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113**, 1174–1187 (2011).
38. Bagatolli, L. A. & Mouritsen, O. G. Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing? *Front. Plant Sci.* **4**, 457 (2013).

39. Tenchov, B., Koynova, R. & Rapp, G. New Ordered Metastable Phases between the Gel and Subgel Phases in Hydrated Phospholipids. *Biophys. J.* **80**, 1873–1890 (2001).
40. Mouritsen, O. G. & Bagatolli, L. A. *LIFE - AS A MATTER OF FAT: Lipids in a Membrane Biophysics Perspective*. (Springer International Publishing, Cham, 2016). doi:10.1007/978-3-319-22614-9.
41. Vaz, W. L. C. Lipid Bilayers: Properties. in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* 1–15 (John Wiley & Sons, Ltd, 2008). doi:10.1002/9780470048672.wecb281.
42. Marsh, D. Lateral order in gel, subgel and crystalline phases of lipid membranes: Wide-angle X-ray scattering. *Chem. Phys. Lipids* **165**, 59–76 (2012).
43. Kulkarni, C. V. Lipid crystallization: from self-assembly to hierarchical and biological ordering. *Nanoscale* **4**, 5779–5791 (2012).
44. Brown, D. Structure and function of membrane rafts. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **291**, 433–437 (2002).
45. Hjort Ipsen, J., Karlström, G., Mouritsen, O. G., Wennerström, H. & Zuckermann, M. J. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **905**, 162–172 (1987).
46. Johnston, E. J., Moses, T. & Rosser, S. J. The wide-ranging phenotypes of ergosterol biosynthesis mutants, and implications for microbial cell factories. *Yeast* **37**, 27–44 (2020).
47. Brown, D. A. Lipid Rafts. in *Encyclopedia of Biological Chemistry* (eds. Lennarz, W. J. & Lane, M. D.) 584–587 (Elsevier, New York, 2004). doi:10.1016/B0-12-443710-9/00363-X.

## ERREFERENTZIAK

48. Mattjus, P. & Slotte, J. P. Does cholesterol discriminate between sphingomyelin and phosphatidylcholine in mixed monolayers containing both phospholipids? *Chem. Phys. Lipids* **81**, 69–80 (1996).
49. Radhakrishnan, A., Anderson, T. G. & McConnell, H. M. Condensed complexes, rafts, and the chemical activity of cholesterol in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 12422–12427 (2000).
50. Fantini, J. & Barrantes, F. J. Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1788**, 2345–2361 (2009).
51. Brown, D. A. & London, E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* **164**, 103–114 (1998).
52. Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P. & Peter Slotte, J. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* **41**, 66–97 (2002).
53. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
54. Brown, D. A. & London, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 111–136 (1998).
55. Huang, J. & Feigenson, G. W. A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys. J.* **76**, 2142–2157 (1999).
56. Ali, M. R., Cheng, K. H. & Huang, J. Ceramide drives cholesterol out of the ordered lipid bilayer phase into the crystal phase in 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine/cholesterol/ceramide ternary mixtures. *Biochemistry* **45**, 12629–12638 (2006).

57. Anderson, R. G. W. & Jacobson, K. A Role for Lipid Shells in Targeting Proteins to Caveolae, Rafts, and Other Lipid Domains. *Science* **296**, 1821–1825 (2002).
58. Infante, R. E. *et al.* Purified NPC1 protein. I. Binding of cholesterol and oxysterols to a 1278-amino acid membrane protein. *J. Biol. Chem.* **283**, 1052–1063 (2008).
59. Gupta, L. K., Molla, J. & Prabhu, A. A. Story of Pore-Forming Proteins from Deadly Disease-Causing Agents to Modern Applications with Evolutionary Significance. *Mol. Biotechnol.* (2023) doi:10.1007/s12033-023-00776-1.
60. Linhartová, I. *et al.* RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *Fems Microbiol. Rev.* **34**, 1076–1112 (2010).
61. Welch, R. A. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **257**, 85–111 (2001).
62. Welch, R. A. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**, 521–528 (1991).
63. Coote, J. G. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **8**, 137–161 (1992).
64. Stanley, P., Koronakis, V. & Hughes, C. Acylation of Escherichia coli hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **62**, 309–333 (1998).
65. Stanley, P., Packman, L. C., Koronakis, V. & Hughes, C. Fatty Acylation of Two Internal Lysine Residues Required for the Toxic Activity of Escherichia coli Hemolysin. *Science* **266**, 1992–1996 (1994).



## ERREFERENTZIAK

66. Balashova, N. V., Shah, C., Patel, J. K., Megalla, S. & Kachlany, S. C. Aggregatibacter actinomycetemcomitans LtxC is required for leukotoxin activity and initial interaction between toxin and host cells. *Gene* **443**, 42–47 (2009).
67. Barry, E. M. *et al.* Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, cyaC, for activation. *J. Bacteriol.* **173**, 720–726 (1991).
68. Osickova, A. *et al.* Acyltransferase-mediated selection of the length of the fatty acyl chain and of the acylation site governs activation of bacterial RTX toxins. *J. Biol. Chem.* **295**, 9268–9280 (2020).
69. Greene, N. P., Crow, A., Hughes, C. & Koronakis, V. Structure of a bacterial toxin-activating acyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E3058–E3066 (2015).
70. Spitz, O. *et al.* Type I Secretion Systems—One Mechanism for All? *Microbiol. Spectr.* **7**, 10.1128/microbiolspec.psib-0003–2018 (2019).
71. Holland, I. B., Schmitt, L. & Young, J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol. Membr. Biol.* **22**, 29–39 (2005).
72. Holland, I. B. *et al.* Type I Protein Secretion-Deceptively Simple yet with a Wide Range of Mechanistic Variability across the Family. *EcoSal Plus* **7**, (2016).
73. Wandersman, C. & Delepelaire, P. TolC, an Escherichia coli outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4776–4780 (1990).
74. Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A. & Danchin, A. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of Bordetella pertussis. *EMBO J.* **7**, 3997–4004 (1988).

75. Gygi, D. *et al.* Isolation of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* haemolysin gene and the activation and secretion of the prohaemolysin by the HlyC, HlyB and HlyD proteins of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **4**, 123–128 (1990).
76. Blenner, M. A., Shur, O., Szilvay, G. R., Cropek, D. M. & Banta, S. Calcium-induced folding of a beta roll motif requires C-terminal entropic stabilization. *J. Mol. Biol.* **400**, 244–256 (2010).
77. Benz, R., Schmid, A., Wagner, W. & Goebel, W. Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect. Immun.* **57**, 887–895 (1989).
78. Valeva, A. *et al.* Binding of *Escherichia coli* Hemolysin and Activation of the Target Cells Is Not Receptor-dependent\*. *J. Biol. Chem.* **280**, 36657–36663 (2005).
79. Ludwig, A., Schmid, A., Benz, R. & Goebel, W. Mutations affecting pore formation by haemolysin from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **226**, 198–208 (1991).
80. Bárcena-Uribarri, I., Benz, R., Winterhalter, M., Zakharian, E. & Balashova, N. Pore forming activity of the potent RTX-toxin produced by pediatric pathogen *Kingella kingae*: characterization and comparison to other RTX-family members\*. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 1536–1544 (2015).
81. Osičková, A., Osička, R., Maier, E., Benz, R. & Šebo, P. An Amphipathic  $\alpha$ -Helix Including Glutamates 509 and 516 Is Crucial for Membrane Translocation of Adenylate Cyclase Toxin and Modulates Formation and Cation Selectivity of Its Membrane Channels\*. *J. Biol. Chem.* **274**, 37644–37650 (1999).
82. Basler, M. *et al.* Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of *Bordetella adenylate cyclase* toxin. *J. Biol. Chem.* **282**, 12419–12429 (2007).

## ERREFERENTZIAK

83. Roderova, J. *et al.* Residues 529 to 549 participate in membrane penetration and pore-forming activity of the Bordetella adenylate cyclase toxin. *Sci. Rep.* **9**, 5758 (2019).
84. Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J. M. & Holland, I. B. Escherichia coli hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.* **52**, 63–69 (1986).
85. Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K. M. & McKay, D. B. Three-dimensional structure of the alkaline protease of Pseudomonas aeruginosa: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *EMBO J.* **12**, 3357–3364 (1993).
86. Nicaud, J.-M., Mackman, N., Gray, L. & Holland, I. B. The C-terminal, 23 kDa peptide of E. coli haemolysin 2001 contains all the information necessary for its secretion by the haemolysin (Hly) export machinery. *FEBS Lett.* **204**, 331–335 (1986).
87. Koronakis, V., Koronakis, E. & Hughes, C. Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of Escherichia coli hemolysin protein across both bacterial membranes. *EMBO J.* **8**, 595–605 (1989).
88. Mackman, N. *et al.* Release of a chimeric protein into the medium from Escherichia coli using the C-terminal secretion signal of haemolysin. *EMBO J.* **6**, 2835–2841 (1987).
89. Menestrina, G., Moser, C., Pellet, S. & Welch, R. Pore-formation by Escherichia coli hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family. *Toxicology* **87**, 249–267 (1994).
90. Filipi, K., Rahman, W. U., Osickova, A. & Osicka, R. Kingella kingae RtxA Cytotoxin in the Context of Other RTX Toxins. *Microorganisms* **10**, 518 (2022).
91. Vega, B. A., Belinka Jr., B. A. & Kachlany, S. C. Aggregatibacter actinomycetemcomitans Leukotoxin (LtxA; Leukothera®): Mechanisms of Action and Therapeutic Applications. *Toxins* **11**, 489 (2019).

92. Hewlett, E. L., Urban, M. A., Manclark, C. R. & Wolff, J. Extracytoplasmic adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 1926–1930 (1976).
93. Lim, K. B. *et al.* Escherichia coli  $\alpha$ -Hemolysin (HlyA) Is Heterogeneously Acylated in Vivo with 14-, 15-, and 17-Carbon Fatty Acids \*. *J. Biol. Chem.* **275**, 36698–36702 (2000).
94. Fong, K. p. *et al.* Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin is post-translationally modified by addition of either saturated or hydroxylated fatty acyl chains. *Mol. Oral Microbiol.* **26**, 262–276 (2011).
95. Basar, T., Havlíček, V., Bezoušková, S., Hackett, M. & Šebo, P. Acylation of Lysine 983 Is Sufficient for Toxin Activity of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase: SUBSTITUTIONS OF ALANINE 140 MODULATE ACYLATION SITE SELECTIVITY OF THE TOXIN ACYLTRANSFERASE CyaC \*. *J. Biol. Chem.* **276**, 348–354 (2001).
96. Nicaud, J.-M., Mackman, N., Gray, L. & Holland, I. b. Characterisation of HlyC and mechanism of activation and secretion of haemolysin from *E. coli* 2001. *FEBS Lett.* **187**, 339–344 (1985).
97. Masin, J. *et al.* Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella* adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry* **44**, 12759–12766 (2005).
98. Döbereiner, A., Schmid, A., Ludwig, A., Goebel, W. & Benz, R. The effects of calcium and other polyvalent cations on channel formation by *Escherichia coli* alpha-hemolysin in red blood cells and lipid bilayer membranes. *Eur. J. Biochem.* **240**, 454–460 (1996).
99. Soloaga, A., Ostolaza, H., Goñi, F. M. & De La Cruz, F. Purification of *Escherichia coli* Pro-Haemolysin, and a Comparison with the Properties of Mature  $\alpha$ -haemolysin. *Eur. J. Biochem.* **238**, 418–422 (1996).

## ERREFERENTZIAK

100. Masín, J., Konopásek, I., Svobodová, J. & Sebo, P. Different structural requirements for adenylate cyclase toxin interactions with erythrocyte and liposome membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1660**, 144–154 (2004).
101. O'Brien, D. P. *et al.* Post-translational acylation controls the folding and functions of the CyaA RTX toxin. *FASEB J.* **33**, 10065–10076 (2019).
102. Karst, J. C. *et al.* Calmodulin-induced conformational and hydrodynamic changes in the catalytic domain of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *Biochemistry* **49**, 318–328 (2010).
103. Ostolaza, H., Soloaga, A. & Goñi, F. M. The binding of divalent cations to Escherichia coli alpha-haemolysin. *Eur. J. Biochem.* **228**, 39–44 (1995).
104. Chenal, A., Guijarro, J. I., Raynal, B., Delepierre, M. & Ladant, D. RTX calcium binding motifs are intrinsically disordered in the absence of calcium: implication for protein secretion. *J. Biol. Chem.* **284**, 1781–1789 (2009).
105. Bauche, C. *et al.* Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *J. Biol. Chem.* **281**, 16914–16926 (2006).
106. Chenal, A. *et al.* Calcium-induced folding and stabilization of the intrinsically disordered RTX domain of the CyaA toxin. *Biophys. J.* **99**, 3744–3753 (2010).
107. Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J. & Ladant, D. Interaction of calcium with Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* **270**, 26370–26376 (1995).
108. Rhodes, C. R. *et al.* Structural consequences of divalent metal binding by the adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis. *Arch. Biochem. Biophys.* **395**, 169–176 (2001).

109. Sotomayor-Pérez, A.-C., Subrini, O., Hessel, A., Ladant, D. & Chenal, A. Molecular Crowding Stabilizes Both the Intrinsically Disordered Calcium-Free State and the Folded Calcium-Bound State of a Repeat in Toxin (RTX) Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 11929–11934 (2013).
110. Powthongchin, B. & Angsuthanasombat, C. Effects on haemolytic activity of single proline substitutions in the Bordetella pertussis CyaA pore-forming fragment. *Arch. Microbiol.* **191**, 1–9 (2009).
111. Hyland, C., Vuillard, L., Hughes, C. & Koronakis, V. Membrane Interaction of Escherichia coli Hemolysin: Flotation and Insertion-Dependent Labeling by Phospholipid Vesicles. *J. Bacteriol.* **183**, 5364–5370 (2001).
112. Benz, R. Channel formation by RTX-toxins of pathogenic bacteria: Basis of their biological activity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1858**, 526–537 (2016).
113. Balashova, N. V., Crosby, J. A., Al Ghofaily, L. & Kachlany, S. C. Leukotoxin confers beta-hemolytic activity to Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Infect. Immun.* **74**, 2015–2021 (2006).
114. Guernonprez, P. *et al.* The Adenylate Cyclase Toxin of Bordetella pertussis Binds to Target Cells via the  $\alpha$ M $\beta$ 2 Integrin (Cd11b/Cd18). *J. Exp. Med.* **193**, 1035–1044 (2001).
115. Lally, E. T. *et al.* RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 30463–30469 (1997).
116. Ristow, L. C. *et al.* The Extracellular Domain of the  $\beta$ 2 Integrin  $\beta$  Subunit (CD18) Is Sufficient for Escherichia coli Hemolysin and Aggregatibacter actinomycetemcomitans Leukotoxin Cytotoxic Activity. *mBio* **10**, e01459-19 (2019).
117. Krueger, E. & Brown, A. C. Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin: From mechanism to targeted anti-toxin therapeutics. *Mol. Oral Microbiol.* **35**, 85–105 (2020).

## ERREFERENTZIAK

118. Benz, R., Piselli, C. & Potter, A. A. Channel Formation by LktA of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* in Lipid Bilayer Membranes and Comparison of Channel Properties with Other RTX-Cytolysins. *Toxins* **11**, 604 (2019).
119. Vanden Bergh, P. G. A. C., Zecchinon, L. L. M., Fett, T. & Desmecht, D. Porcine CD18 mediates *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIII species-specific toxicity. *Vet. Res.* **40**, 33 (2009).
120. Confer, D. L. & Eaton, J. W. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* **217**, 948–950 (1982).
121. Gueirard, P., Le Blay, K., Le Coustumier, A., Chaby, R. & Guiso, N. Variation in *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide during human infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**, 331–337 (1998).
122. Kamanova, J. *et al.* Adenylate Cyclase Toxin Subverts Phagocyte Function by RhoA Inhibition and Unproductive Ruffling<sup>1</sup>. *J. Immunol.* **181**, 5587–5597 (2008).
123. Khelef, N., Zychlinsky, A. & Guiso, N. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* **61**, 4064–4071 (1993).
124. Pearson, R. D., Symes, P., Conboy, M., Weiss, A. A. & Hewlett, E. L. Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J. Immunol.* **139**, 2749–2754 (1987).
125. Weingart, C. L. & Weiss, A. A. *Bordetella pertussis* Virulence Factors Affect Phagocytosis by Human Neutrophils. *Infect. Immun.* **68**, 1735–1739 (2000).
126. Dhakal, B. K. & Mulvey, M. A. The UPEC pore-forming toxin  $\alpha$ -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host Microbe* **11**, 58–69 (2012).

127. Wiles, T. J., Kulesus, R. R. & Mulvey, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* **85**, 11–19 (2008).
128. El-Azami-El-Idrissi, M. *et al.* Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 38514–38521 (2003).
129. Osicka, R. *et al.* *Bordetella* adenylate cyclase toxin is a unique ligand of the integrin complement receptor 3. *eLife* **4**, e10766.
130. Goldsmith, J. A., DiVenere, A. M., Maynard, J. A. & McLellan, J. S. Structural basis for non-canonical integrin engagement by *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *Cell Rep.* **40**, (2022).
131. Goddard, T. D. *et al.* UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **27**, 14–25 (2018).
132. Nygren, P. *et al.* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin causes activation of lymphocyte function-associated antigen 1. *Cell. Microbiol.* **21**, e12967 (2019).
133. Ristow, L. C. & Welch, R. A. RTX Toxins Ambush Immunity's First Cellular Responders. *Toxins* **11**, 720 (2019).
134. Masin, J. *et al.* Retargeting from the CR3 to the LFA-1 receptor uncovers the adenylyl cyclase enzyme–translocating segment of *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *J. Biol. Chem.* **295**, 9349–9365 (2020).
135. Martín, C. *et al.* Membrane Restructuring by *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin, a Member of the RTX Toxin Family. *J. Bacteriol.* **186**, 3760–3765 (2004).
136. Ostolaza, H., Bartolomé, B., Serra, J. L., de la Cruz, F. & Goñi, F. M.  $\alpha$ -Haemolysin from *E. coli* purification and self-aggregation properties. *FEBS Lett.* **280**, 195–198 (1991).



## ERREFERENTZIAK

137. Bakás, L., Veiga, M. P., Soloaga, A., Ostolaza, H. & Goñi, F. M. Calcium-dependent conformation of *E. coli*  $\alpha$ -haemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1368**, 225–234 (1998).
138. Brown, A. C. *et al.* Aggregatibacter actinomycetemcomitans Leukotoxin Utilizes a Cholesterol Recognition/Amino Acid Consensus Site for Membrane Association\*. *J. Biol. Chem.* **288**, 23607–23621 (2013).
139. Ostolaza, H., Bartolomé, B., de Zárate, I. O., de la Cruz, F. & Goñi, F. M. Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin  $\alpha$ -haemolysin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1147**, 81–88 (1993).
140. Brown, A. C. *et al.* Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin cytotoxicity occurs through bilayer destabilization. *Cell. Microbiol.* **14**, 869–881 (2012).
141. Fiser, R. & Konopásek, I. Different modes of membrane permeabilization by two RTX toxins: HlyA from *Escherichia coli* and CyaA from *Bordetella pertussis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 1249–1254 (2009).
142. Keane, W. F., Welch, R., Gekker, G. & Peterson, P. K. Mechanism of *Escherichia coli* alpha-hemolysin-induced injury to isolated renal tubular cells. *Am. J. Pathol.* **126**, 350–357 (1987).
143. Suttorp, N., Flöer, B., Schnittler, H., Seeger, W. & Bhakdi, S. Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect. Immun.* **58**, 3796–3801 (1990).
144. Gadeberg, O. V. & Orskov, I. In vitro cytotoxic effect of alpha-hemolytic *Escherichia coli* on human blood granulocytes. *Infect. Immun.* **45**, 255–260 (1984).
145. Bhakdi, S., Muhly, M., Korom, S. & Hugo, F. Release of interleukin-1 beta associated with potent cytotoxic action of staphylococcal alpha-toxin on human monocytes. *Infect. Immun.* **57**, 3512–3519 (1989).

146. Bhakdi, S., Muhly, M., Korom, S. & Schmidt, G. Effects of Escherichia coli hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release. *J. Clin. Invest.* **85**, 1746–1753 (1990).
147. Mobley, H. L. *et al.* Pyelonephritogenic Escherichia coli and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect. Immun.* **58**, 1281–1289 (1990).
148. Crosby, J. A. & Kachlany, S. C. TdeA, a TolC-like protein required for toxin and drug export in *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Gene* **388**, 83–92 (2007).
149. Murphy, G. L., Whitworth, L. C., Clinkenbeard, K. D. & Clinkenbeard, P. A. Hemolytic activity of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.* **63**, 3209–3212 (1995).
150. Osickova, A. *et al.* Cytotoxic activity of *Kingella kingae* RtxA toxin depends on post-translational acylation of lysine residues and cholesterol binding. *Emerg. Microbes Infect.* **7**, 1–15 (2018).
151. Kehl-Fie, T. E. & St. Geme, J. W. Identification and Characterization of an RTX Toxin in the Emerging Pathogen *Kingella kingae*. *J. Bacteriol.* **189**, 430–436 (2007).
152. Bakás, L., Ostolaza, H., Vaz, W. L. & Goñi, F. M. Reversible adsorption and nonreversible insertion of Escherichia coli alpha-hemolysin into lipid bilayers. *Biophys. J.* **71**, 1869–1876 (1996).
153. Ostolaza, H., Bakás, L. & Goñi, F. M. Balance of Electrostatic and Hydrophobic Interactions in the Lysis of Model Membranes by *E. coli*-Haemolysin. *J. Membr. Biol.* **158**, 137–145 (1997).

## ERREFERENTZIAK

154. Iwase, M., Lally, E. T., Berthold, P., Korchak, H. M. & Taichman, N. S. Effects of cations and osmotic protectants on cytolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.* **58**, 1782–1788 (1990).
155. Sánchez-Magraner, L. *et al.* The Calcium-binding C-terminal Domain of *Escherichia coli*  $\alpha$ -Hemolysin Is a Major Determinant in the Surface-active Properties of the Protein \*. *J. Biol. Chem.* **282**, 11827–11835 (2007).
156. Forman, M. S. *et al.* Gangliosides Block *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* Leukotoxin (LtxA)-Mediated Hemolysis. *Toxins* **2**, 2824–2836 (2010).
157. Varki, A. & Schauer, R. Sialic Acids. in *Essentials of Glycobiology* (eds. Varki, A. *et al.*) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2009).
158. Munksgaard, P. S. *et al.* Sialic Acid Residues Are Essential for Cell Lysis Mediated by Leukotoxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **82**, 2219–2228 (2014).
159. Morova, J., Osicka, R., Masin, J. & Sebo, P. RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5355–5360 (2008).
160. Gable, P., Eaton, J. & Confer, D. Intoxication of Human Phagocytes by *Bordetella* Adenylate-Cyclase Toxin - Implication of a Ganglioside Receptor. *Clin. Res.* **33**, A844–A844 (1985).
161. Mrówczyńska, L., Bobrowska-Hägerstrand, M., Lindqvist, C. & Hägerstrand, H. *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin Can Bind Ganglioside GM1. *BIO* **1**, 67–71 (2011).
162. Hasan, S. *et al.* Interaction of *Bordetella* adenylate cyclase toxin with complement receptor 3 involves multivalent glycan binding. *FEBS Lett.* **589**, 374–379 (2015).

163. Rahman, W. U. *et al.* Binding of *Kingella kingae* RtxA Toxin Depends on Cell Surface Oligosaccharides, but Not on  $\beta$ 2 Integrins. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9092 (2020).
164. Vazquez, R. F. *et al.* Novel evidence for the specific interaction between cholesterol and  $\alpha$ -haemolysin of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **458**, 481–489 (2014).
165. Bumba, L., Masin, J., Fiser, R. & Sebo, P. Bordetella adenylate cyclase toxin mobilizes its beta2 integrin receptor into lipid rafts to accomplish translocation across target cell membrane in two steps. *PLoS Pathog.* **6**, e1000901 (2010).
166. Fong, K. P. *et al.* *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin requires lipid microdomains for target cell cytotoxicity. *Cell. Microbiol.* **8**, 1753–1767 (2006).
167. Brown, A. C., Koufos, E., Balashova, N. V., Boesze-Battaglia, K. & Lally, E. T. Inhibition of LtxA toxicity by blocking cholesterol binding with peptides. *Mol. Oral Microbiol.* **31**, 94–105 (2016).
168. González Bullón, D., Uribe, K. B., Amuategi, J., Martín, C. & Ostolaza, H. 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. *FEBS J.* **288**, 6795–6814 (2021).
169. Herlax, V., Maté, S., Rimoldi, O. & Bakás, L. Relevance of Fatty Acid Covalently Bound to *Escherichia coli*  $\alpha$ -Hemolysin and Membrane Microdomains in the Oligomerization Process\*. *J. Biol. Chem.* **284**, 25199–25210 (2009).
170. Masin, J. *et al.* The conserved tyrosine residue 940 plays a key structural role in membrane interaction of Bordetella adenylate cyclase toxin. *Sci. Rep.* **7**, 9330 (2017).
171. Koufos, E., Chang, E. H., Rasti, E. S., Krueger, E. & Brown, A. C. Use of a Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus Peptide To Inhibit Binding of a Bacterial Toxin to Cholesterol. *Biochemistry* **55**, 4787–4797 (2016).

## ERREFERENTZIAK

172. Cortajarena, A. L., Goñi, F. M. & Ostolaza, H. Glycophorin as a Receptor for Escherichia coli $\alpha$ -Hemolysin in Erythrocytes\*. *J. Biol. Chem.* **276**, 12513–12519 (2001).
173. Ramstedt, B. & Slotte, J. P. Interaction of Cholesterol with Sphingomyelins and Acyl-Chain-Matched Phosphatidylcholines: A Comparative Study of the Effect of the Chain Length. *Biophys. J.* **76**, 908–915 (1999).
174. Fantini, J., Yahi, N. & Garmy, N. Cholesterol accelerates the binding of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide to ganglioside GM1 through a universal hydrogen-bond-dependent sterol tuning of glycolipid conformation. *Front. Physiol.* **4**, 120 (2013).
175. Rose, I. A., Hanson, K. R., Wilkinson, K. D. & Wimmer, M. J. A suggestion for naming faces of ring compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 2439–2441 (1980).
176. Marlow, B., Kuenze, G., Li, B., Sanders, C. R. & Meiler, J. Structural determinants of cholesterol recognition in helical integral membrane proteins. *Biophys. J.* **120**, 1592–1604 (2021).
177. Jutras, I., Abrami, L. & Dautry-Varsat, A. Entry of the lymphogranuloma venereum strain of Chlamydia trachomatis into host cells involves cholesterol-rich membrane domains. *Infect. Immun.* **71**, 260–266 (2003).
178. Hessey, S. J. *et al.* Bacterial adhesion and disease activity in Helicobacter associated chronic gastritis. *Gut* **31**, 134–138 (1990).
179. Pieters, J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect.* **3**, 249–255 (2001).
180. Goluszko, P. & Nowicki, B. Membrane Cholesterol: a Crucial Molecule Affecting Interactions of Microbial Pathogens with Mammalian Cells. *Infect. Immun.* **73**, 7791–7796 (2005).

181. Elkins, M. R. *et al.* Cholesterol-binding site of the influenza M2 protein in lipid bilayers from solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 12946–12951 (2017).
182. Sun, X. & Whittaker, G. R. Role for influenza virus envelope cholesterol in virus entry and infection. *J. Virol.* **77**, 12543–12551 (2003).
183. Prasad, V. R. & Bukrinsky, M. I. New clues to understanding HIV nonprogressors: low cholesterol blocks HIV trans infection. *mBio* **5**, e01396-01314 (2014).
184. Meher, G., Bhattacharjya, S. & Chakraborty, H. Membrane Cholesterol Modulates Oligomeric Status and Peptide-Membrane Interaction of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Fusion Peptide. *J. Phys. Chem. B* **123**, 10654–10662 (2019).
185. Li, H. & Papadopoulos, V. Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Function in Cholesterol Transport. Identification of a Putative Cholesterol Recognition/Interaction Amino Acid Sequence and Consensus Pattern. **139**, (1998).
186. Jamin, N. *et al.* Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **19**, 588–594 (2005).
187. Ulmschneider, M. B. & Sansom, M. S. Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochim. Biophys. Acta* **1512**, 1–14 (2001).
188. Fantini, J. & Barrantes, F. J. How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Front. Physiol.* **4**, 31 (2013).
189. Fantini, J., Di Scala, C., Evans, L. S., Williamson, P. T. F. & Barrantes, F. J. A mirror code for protein-cholesterol interactions in the two leaflets of biological membranes. *Sci. Rep.* **6**, 21907 (2016).

## ERREFERENTZIAK

190. Fantini, J., Epand, R. M. & Barrantes, F. J. Cholesterol-Recognition Motifs in Membrane Proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1135**, 3–25 (2019).
191. Amuategi, J., Alonso, R. & Ostolaza, H. 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. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 8703 (2022).
192. Azzaz, F. *et al.* Chapter 7 - Cholesterol-recognizing amino acid consensus motifs in transmembrane proteins: Comparative analysis of in silico studies and structural data. in *Cholesterol* (eds. Bukiya, A. N. & Dopico, A. M.) 127–145 (Academic Press, 2022). doi:10.1016/B978-0-323-85857-1.00004-3.
193. Cané, L. *et al.* Biophysical Analysis to Assess the Interaction of CRAC and CARC Motif Peptides of Alpha Hemolysin of Escherichia coli with Membranes. *Biochemistry* **62**, 1994–2011 (2023).
194. Carbonetti, N. H. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of Bordetella pertussis and cell biology tools. *Future Microbiol.* **5**, 455–469 (2010).
195. Mattoo, S. & Cherry, J. D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 326–382 (2005).
196. Wolff, J., Cook, G. H., Goldhammer, A. R. & Berkowitz, S. A. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 3841–3844 (1980).
197. Rogel, A. *et al.* Bordetella pertussis adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme. *EMBO J.* **8**, 2755–2760 (1989).
198. Glaser, P., Danchin, A., Ladant, D., Barzu, O. & Ullmann, A. Bordetella pertussis adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **13 Suppl**, 239–252 (1988).

199. Ehrmann, I. E. *et al.* Enzymatic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* is not required for hemolysis. *FEBS Lett.* **304**, 51–56 (1992).
200. Osickova, A. *et al.* Adenylate cyclase toxin translocates across target cell membrane without forming a pore. *Mol. Microbiol.* **75**, 1550–1562 (2010).
201. Gross, M. K., Au, D. C., Smith, A. L. & Storm, D. R. Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional *cyaA* toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4898–4902 (1992).
202. Ludwig, A. & Goebel, W. CHAPTER 29 - Structure and mode of action of RTX toxins. in *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Third Edition)* (eds. Alouf, J. E. & Popoff, M. R.) 547–569 (Academic Press, London, 2006). doi:10.1016/B978-012088445-2/50034-2.
203. Ladant, D. & Ullmann, A. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* **7**, 172–176 (1999).
204. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).
205. Varadi, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* **50**, D439–D444 (2022).
206. Ladant, D. *et al.* Characterization of the Calmodulin-binding and of the Catalytic Domains of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase. *J. Biol. Chem.* **264**, 4015–4020 (1989).
207. Munier, H. *et al.* The role of histidine 63 in the catalytic mechanism of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **267**, 9816–9820 (1992).



## ERREFERENTZIAK

208. Glaser, P. *et al.* Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by site-directed mutagenesis. *EMBO J.* **8**, 967–972 (1989).
209. Shen, Y. *et al.* Physiological calcium concentrations regulate calmodulin binding and catalysis of adenylyl cyclase exotoxins. *EMBO J.* **21**, 6721–6732 (2002).
210. Guo, Q. *et al.* Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylyl cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J.* **24**, 3190–3201 (2005).
211. Karst, J. C. *et al.* Identification of a Region That Assists Membrane Insertion and Translocation of the Catalytic Domain of *Bordetella pertussis* CyaA Toxin. *J. Biol. Chem.* **287**, 9200–9212 (2012).
212. Gray, M. C. *et al.* Translocation-Specific Conformation of Adenylate Cyclase Toxin from *Bordetella pertussis* Inhibits Toxin-Mediated Hemolysis. *J. Bacteriol.* **183**, 5904–5910 (2001).
213. Lee, S. J., Gray, M. C., Guo, L., Sebo, P. & Hewlett, E. L. Epitope mapping of monoclonal antibodies against *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect. Immun.* **67**, 2090–2095 (1999).
214. Masin, J. *et al.* Negatively charged residues of the segment linking the enzyme and cytolysin moieties restrict the membrane-permeabilizing capacity of adenylate cyclase toxin. *Sci. Rep.* **6**, 29137 (2016).
215. Sukova, A. *et al.* Negative charge of the AC-to-Hly linking segment modulates calcium-dependent membrane activities of *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1862**, 183310 (2020).
216. Subrini, O. *et al.* Characterization of a membrane-active peptide from the *Bordetella pertussis* CyaA toxin. *J. Biol. Chem.* **288**, 32585–32598 (2013).

217. Tsirigos, K. D., Peters, C., Shu, N., Käll, L. & Elofsson, A. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Res.* **43**, W401-407 (2015).
218. Felmler, T., Pellett, S. & Welch, R. A. Nucleotide sequence of an Escherichia coli chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.* **163**, 94–105 (1985).
219. Soloaga, A. *et al.* Insertion of Escherichia coli  $\alpha$ -haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol. Microbiol.* **31**, 1013–1024 (1999).
220. Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C. & Ullmann, A. Deletions affecting hemolytic and toxin activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase. *Infect. Immun.* **58**, 3242–3247 (1990).
221. Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. & Sebo, P. Adenylate cyclase toxin (CyaA) of Bordetella pertussis. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **269**, 27231–27239 (1994).
222. Juntapremjit, S. *et al.* Functional importance of the Gly cluster in transmembrane helix 2 of the Bordetella pertussis CyaA-hemolysin: Implications for toxin oligomerization and pore formation. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* **106**, 14–19 (2015).
223. Sebo, P., Glaser, P., Sakamoto, H. & Ullmann, A. High-level synthesis of active adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis in a reconstructed Escherichia coli system. *Gene* **104**, 19–24 (1991).
224. Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & Hewlett, E. L. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis. *Science* **266**, 433–435 (1994).

## ERREFERENTZIAK

225. Hackett, M. *et al.* Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**, 20250–20253 (1995).
226. Westrop, G. D., Hormozi, E. K., Da Costa, N. A., Parton, R. & Coote, J. G. Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin: proCyaA and CyaC proteins synthesised separately in *Escherichia coli* produce active toxin in vitro. *Gene* **180**, 91–99 (1996).
227. Lepesheva, A. *et al.* Modification of the RTX domain cap by acyl chains of adapted length rules the formation of functional hemolysin pores. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1866**, 184311 (2024).
228. Lee, S.-J., Gray, M. C., Zu, K. & Hewlett, E. L. Oligomeric behavior of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin in solution. *Arch. Biochem. Biophys.* **438**, 80–87 (2005).
229. Sotomayor Pérez, A.-C. *et al.* Characterization of the regions involved in the calcium-induced folding of the intrinsically disordered RTX motifs from the bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *J. Mol. Biol.* **397**, 534–549 (2010).
230. Luo, J. *et al.* A sequence-based two-level method for the prediction of type I secreted RTX proteins. *Analyst* **140**, 3048–3056 (2015).
231. Sotomayor-Pérez, A. C., Ladant, D. & Chenal, A. Calcium-induced folding of intrinsically disordered repeat-in-toxin (RTX) motifs via changes of protein charges and oligomerization states. *J. Biol. Chem.* **286**, 16997–17004 (2011).
232. Bumba, L. *et al.* Calcium-Driven Folding of RTX Domain  $\beta$ -Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts. *Mol. Cell* **62**, 47–62 (2016).
233. Sotomayor-Pérez, A.-C., Ladant, D. & Chenal, A. Disorder-to-order transition in the CyaA toxin RTX domain: implications for toxin secretion. *Toxins* **7**, 1–20 (2014).

234. Gentschev, I., Dietrich, G. & Goebel, W. The *E. coli*  $\alpha$ -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol.* **10**, 39–45 (2002).
235. Sebo, P. & Ladant, D. Repeat sequences in the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin can be recognized as alternative carboxy-proximal secretion signals by the *Escherichia coli* alpha-haemolysin translocator. *Mol. Microbiol.* **9**, 999–1009 (1993).
236. Lecher, J. *et al.* An RTX transporter tethers its unfolded substrate during secretion via a unique N-terminal domain. *Struct. Lond. Engl. 1993* **20**, 1778–1787 (2012).
237. Masin, J., Osicka, R., Bumba, L. & Sebo, P. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a unique combination of a pore-forming moiety with a cell-invading adenylate cyclase enzyme. *Pathog. Dis.* **73**, ftv075 (2015).
238. Vojtova, J., Kamanova, J. & Sebo, P. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 69–75 (2006).
239. Khelef, N. & Guiso, N. Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**, 27–32 (1995).
240. Basler, M., Masin, J., Osicka, R. & Sebo, P. Pore-forming and enzymatic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect. Immun.* **74**, 2207–2214 (2006).
241. Hewlett, E. L., Donato, G. M. & Gray, M. C. Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP! *Mol. Microbiol.* **59**, 447–459 (2006).
242. Uribe, K. B., Etxebarria, A., Martín, C. & Ostolaza, H. Calpain-Mediated Processing of Adenylate Cyclase Toxin Generates a Cytosolic Soluble Catalytically Active N-Terminal Domain. *PLoS One* **8**, e67648 (2013).

## ERREFERENTZIAK

243. Bachelet, M., Richard, M.-J., François, D. & Polla, B. S. Mitochondrial alterations precede Bordetella pertussis-induced apoptosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **32**, 125–131 (2002).
244. Paccani, S. R. *et al.* Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis. *Infect. Immun.* **76**, 2822–2832 (2008).
245. Eby, J. C., Gray, M. C. & Hewlett, E. L. Cyclic AMP-Mediated Suppression of Neutrophil Extracellular Trap Formation and Apoptosis by the Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin. *Infect. Immun.* **82**, 5256–5269 (2014).
246. Cerny, O., Anderson, K. E., Stephens, L. R., Hawkins, P. T. & Sebo, P. cAMP Signaling of Adenylate Cyclase Toxin Blocks the Oxidative Burst of Neutrophils through Epac-Mediated Inhibition of Phospholipase C Activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **198**, 1285–1296 (2017).
247. Cerny, O. *et al.* Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin Blocks Induction of Bactericidal Nitric Oxide in Macrophages through cAMP-Dependent Activation of the SHP-1 Phosphatase. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 4901–4913 (2015).
248. Mobberley-Schuman, P. S. & Weiss, A. A. Influence of CR3 (CD11b/CD18) expression on phagocytosis of Bordetella pertussis by human neutrophils. *Infect. Immun.* **73**, 7317–7323 (2005).
249. Dunne, A. *et al.* Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against Bordetella pertussis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 1711–1719 (2010).
250. Schlecht, G., Loucka, J., Najar, H., Sebo, P. & Leclerc, C. Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4+ and CD8+ T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 6089–6097 (2004).

251. Gordon, V. M., Leppla, S. H. & Hewlett, E. L. Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase toxin but not that of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect. Immun.* **56**, 1066–1069 (1988).
252. Otero, A. S., Yi, X. B., Gray, M. C., Szabo, G. & Hewlett, E. L. Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J. Biol. Chem.* **270**, 9695–9697 (1995).
253. Veneziano, R. *et al.* *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin translocation across a tethered lipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20473–20478 (2013).
254. Ehrmann, I. E., Gray, M. C., Gordon, V. M., Gray, L. S. & Hewlett, E. L. Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *FEBS Lett.* **278**, 79–83 (1991).
255. Rogel, A. & Hanski, E. Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J. Biol. Chem.* **267**, 22599–22605 (1992).
256. Fiser, R. *et al.* Third activity of *Bordetella* adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b<sup>+</sup> monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *J. Biol. Chem.* **282**, 2808–2820 (2007).
257. Martín, C., Gómez-Bilbao, G. & Ostolaza, H. *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin Promotes Calcium Entry into Both CD11b<sup>+</sup> and CD11b<sup>−</sup> Cells through cAMP-dependent L-type-like Calcium Channels. *J. Biol. Chem.* **285**, 357–364 (2010).
258. O'Brien, D. P. *et al.* Calcium-dependent disorder-to-order transitions are central to the secretion and folding of the CyaA toxin of *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough. *Toxicon* **149**, 37–44 (2018).

## ERREFERENTZIAK

259. González-Bullón, D. *et al.* Membrane Permeabilization by Bordetella Adenylate Cyclase Toxin Involves Pores of Tunable Size. *Biomolecules* **9**, 183 (2019).
260. Ostolaza, H. *et al.* Membrane Permeabilization by Pore-Forming RTX Toxins: What Kind of Lesions Do These Toxins Form? *Toxins* **11**, 354 (2019).
261. Maier, E., Reinhard, N., Benz, R. & Frey, J. Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**, 4415–4423 (1996).
262. Gilbert, R. J. C. Cholesterol-dependent cytolysins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **677**, 56–66 (2010).
263. Heuck, A. P., Moe, P. C. & Johnson, B. B. The cholesterol-dependent cytolysin family of gram-positive bacterial toxins. *Subcell. Biochem.* **51**, 551–577 (2010).
264. Cannella, S. E. *et al.* Stability, structural and functional properties of a monomeric, calcium-loaded adenylate cyclase toxin, CyaA, from *Bordetella pertussis*. *Sci. Rep.* **7**, 42065 (2017).
265. Cosentino, K. & García-Sáez, A. J. Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle? *Trends Cell Biol.* **27**, 266–275 (2017).
266. Bleicken, S., Landeta, O., Landajuela, A., Basañez, G. & García-Sáez, A. J. Proapoptotic Bax and Bak Proteins Form Stable Protein-permeable Pores of Tunable Size. *J. Biol. Chem.* **288**, 33241–33252 (2013).
267. Fuertes, G., Giménez, D., Esteban-Martín, S., Sánchez-Muñoz, O. L. & Salgado, J. A lipocentric view of peptide-induced pores. *Eur. Biophys. J. EBJ* **40**, 399–415 (2011).
268. Terrones, O. *et al.* Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J. Biol. Chem.* **279**, 30081–30091 (2004).

269. Moayeri, M. & Welch, R. A. Effects of temperature, time, and toxin concentration on lesion formation by the *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun.* **62**, 4124–4134 (1994).
270. Bakás, L., Chanturiya, A., Herlax, V. & Zimmerberg, J. Paradoxical Lipid Dependence of Pores Formed by the *Escherichia coli*  $\alpha$ -Hemolysin in Planar Phospholipid Bilayer Membranes. *Biophys. J.* **91**, 3748–3755 (2006).
271. Kilgore, P. E., Salim, A. M., Zervos, M. J. & Schmitt, H.-J. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 449–486 (2016).
272. Groisman, E. A. *Principles of Bacterial Pathogenesis*. (Academic Press, 2001).
273. Kamanova, J. Bordetella Type III Secretion Injectosome and Effector Proteins. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 466 (2020).
274. Mattoo, S., Foreman-Wykert, A. K., Cotter, P. A. & Miller, J. F. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **6**, E168-186 (2001).
275. Fedele, G., Bianco, M. & Ausiello, C. M. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: talented modulators of host immune response. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **61**, 445–457 (2013).
276. Edwards, K. M. & Decker, M. D. 23 - Pertussis vaccines. in *Vaccines (Sixth Edition)* (eds. Plotkin, S. A., Orenstein, W. A. & Offit, P. A.) 447–492 (W.B. Saunders, London, 2013). doi:10.1016/B978-1-4557-0090-5.00030-6.
277. Teruya, S. *et al.* *Bordetella* Dermonecrotic Toxin Is a Neurotropic Virulence Factor That Uses CaV3.1 as the Cell Surface Receptor. *mBio* **11**, e03146-19 (2020).
278. Finger, H. & von Koenig, C. H. W. *Bordetella*. in *Medical Microbiology* (ed. Baron, S.) (University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX), 1996).



## ERREFERENTZIAK

279. Cone, T. C. Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640. *Pediatrics* **46**, 522 (1970).
280. Pinkbook: Pertussis | CDC. <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pert.html> (2022).
281. Cherry, J. D., Brunell, P. A., Golden, G. S. & Karzon, D. T. Report of the Task Force on Pertussis and Pertussis Immunization—1988. *Pediatrics* **81**, 933–984 (1988).
282. Lutwick, L. & Preis, J. Pertussis. *Emerg. Infect. Dis.* 359–371 (2014) doi:10.1016/B978-0-12-416975-3.00027-3.
283. Crowcroft, N. S., Stein, C., Duclos, P. & Birmingham, M. How best to estimate the global burden of pertussis? *Lancet Infect. Dis.* **3**, 413–418 (2003).
284. Lee, G. M. *et al.* Societal costs and morbidity of pertussis in adolescents and adults. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **39**, 1572–1580 (2004).
285. Burdin, N., Handy, L. K. & Plotkin, S. A. What Is Wrong with Pertussis Vaccine Immunity? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a029454 (2017).
286. Karst, J. C. *et al.* Calcium, Acylation, and Molecular Confinement Favor Folding of Bordetella pertussis Adenylate Cyclase CyaA Toxin into a Monomeric and Cytotoxic Form\*. *J. Biol. Chem.* **289**, 30702–30716 (2014).
287. Ulrich, A. S., Sami, M. & Watts, A. Hydration of DOPC bilayers by differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta* **1191**, 225–230 (1994).
288. Almeida, R. F. M. de, Fedorov, A. & Prieto, M. Sphingomyelin/Phosphatidylcholine/Cholesterol Phase Diagram: Boundaries and Composition of Lipid Rafts. *Biophys. J.* **85**, 2406–2416 (2003).

289. Bagnat, M., Keränen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Simons, K. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 3254–3259 (2000).
290. Ipsen, J. H., Mouritsen, O. G. & Bloom, M. Relationships between lipid membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order. The effects of cholesterol. *Biophys. J.* **57**, 405–412 (1990).
291. Levental, I., Levental, K. R. & Heberle, F. A. Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain. *Trends Cell Biol.* **30**, 341–353 (2020).
292. Nes, W. R. & McKean, M. L. *Biochemistry of Steroids and Other Isopentenoids*. (University Park Press, 1977).
293. Hung, W.-C. *et al.* Comparative Study of the Condensing Effects of Ergosterol and Cholesterol. *Biophys. J.* **110**, 2026–2033 (2016).
294. Stevens, M. M., Honerkamp-Smith, A. R. & Keller, S. L. Solubility Limits of Cholesterol, Lanosterol, Ergosterol, Stigmasterol, and  $\beta$ -Sitosterol in Electroformed Lipid Vesicles. *Soft Matter* **6**, 5882–5890 (2010).
295. Mj, H., Mb, B., G, W. & Pr, C. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* **812**, (1985).
296. Torralba, J. *et al.* Molecular recognition of a membrane-anchored HIV-1 pan-neutralizing epitope. *Commun. Biol.* **5**, 1–14 (2022).
297. Fiske, C. H. & Subbarow, Y. THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF PHOSPHORUS. *J. Biol. Chem.* **66**, 375–400 (1925).

## ERREFERENTZIAK

298. Yethon, J. A., Epand, R. F., Leber, B., Epand, R. M. & Andrews, D. W. Interaction with a Membrane Surface Triggers a Reversible Conformational Change in Bax Normally Associated with Induction of Apoptosis \*. *J. Biol. Chem.* **278**, 48935–48941 (2003).
299. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
300. Ellens, H., Bentz, J. & Szoka, F. C. Fusion of phosphatidylethanolamine-containing liposomes and mechanism of L.alpha.-HII phase transition. *Biochemistry* **25**, 4141–4147 (1986).
301. Royer, C. A. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chem. Rev.* **106**, 1769–1784 (2006).
302. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Volume 6: Protein Fluorescence*. (Springer US, Boston, MA, 2000). doi:10.1007/b115628.
303. Yammine, A., Gao, J. & Kwan, A. H. Tryptophan Fluorescence Quenching Assays for Measuring Protein-ligand Binding Affinities: Principles and a Practical Guide. *Bio-Protoc.* **9**, e3253 (2019).
304. Weber, G. & Teale, F. W. J. Determination of the absolute quantum yield of fluorescent solutions. *Trans. Faraday Soc.* **53**, 646–655 (1957).
305. Pierce, D. W. & Boxer, S. G. Stark effect spectroscopy of tryptophan. *Biophys. J.* **68**, 1583–1591 (1995).
306. Scott, H. L., Westerfield, J. M. & Barrera, F. N. Determination of the Membrane Translocation pK of the pH-Low Insertion Peptide. *Biophys. J.* **113**, 869–879 (2017).

307. White, S. H., Wimley, W. C., Ladokhin, A. S. & Hristova, K. [4] Protein folding in membranes: Determining energetics of peptide-bilayer interactions. in *Methods in Enzymology* vol. 295 62–87 (Elsevier, 1998).
308. Ladokhin, A. S., Jayasinghe, S. & White, S. H. How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? *Anal. Biochem.* **285**, 235–245 (2000).
309. Wimley, W. C. & White, S. H. Membrane partitioning: distinguishing bilayer effects from the hydrophobic effect. *Biochemistry* **32**, 6307–6312 (1993).
310. Barrera, F. N., Garzón, M. T., Gómez, J. & Neira, J. L. Equilibrium unfolding of the C-terminal SAM domain of p73. *Biochemistry* **41**, 5743–5753 (2002).
311. Royer, C. A. & Scarlata, S. F. Fluorescence approaches to quantifying biomolecular interactions. *Methods Enzymol.* **450**, 79–106 (2008).
312. Woody, R. W. Circular dichroism. *Methods Enzymol.* **246**, 34–71 (1995).
313. Martin, S. R. & Schilstra, M. J. Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. *Methods Cell Biol.* **84**, 263–293 (2008).
314. Wei, Y., Thyparambil, A. A. & Latour, R. A. Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230 nm. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1844**, 2331–2337 (2014).
315. Shai, Y. ATR-FTIR studies in pore forming and membrane induced fusion peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1828**, 2306–2313 (2013).
316. Elliott, A. & Ambrose, E. J. Structure of synthetic polypeptides. *Nature* **165**, 921–922 (1950).

## ERREFERENTZIAK

317. Arrondo, J. L. & Goñi, F. M. Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **72**, 367–405 (1999).
318. Iloro, I., Chehín, R., Goñi, F. M., Pajares, M. A. & Arrondo, J.-L. R. Methionine Adenosyltransferase  $\alpha$ -Helix Structure Unfolds at Lower Temperatures than  $\beta$ -Sheet: A 2D-IR Study. *Biophys. J.* **86**, 3951–3958 (2004).
319. Menikh, A., Saleh, M. T., Gariépy, J. & Boggs, J. M. Orientation in lipid bilayers of a synthetic peptide representing the C-terminus of the A1 domain of shiga toxin. A polarized ATR-FTIR study. *Biochemistry* **36**, 15865–15872 (1997).
320. Marsh, D. Dichroic ratios in polarized Fourier transform infrared for nonaxial symmetry of beta-sheet structures. *Biophys. J.* **72**, 2710–2718 (1997).
321. Goormaghtigh, E., Raussens, V. & Ruyschaert, J. M. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**, 105–185 (1999).
322. Churchill-Angus, A. M. *et al.* Characterisation of a tripartite  $\alpha$ -pore forming toxin from *Serratia marcescens*. *Sci. Rep.* **11**, 6447 (2021).
323. Garg, S. *et al.* Plasmodium Perforin-Like Protein Pores on the Host Cell Membrane Contribute in Its Multistage Growth and Erythrocyte Senescence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 121 (2020).
324. Sathyanarayana, P. *et al.* Cholesterol promotes Cytolysin A activity by stabilizing the intermediates during pore formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E7323–E7330 (2018).
325. Louw, A. I. & Visser, L. Kinetics of erythrocyte lysis by snake venom cardiotoxins. *Biochim. Biophys. Acta* **498**, 143–153 (1977).

326. Ralph, P., Moore, M. A. & Nilsson, K. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J. Exp. Med.* **143**, 1528–1533 (1976).
327. Hessa, T. *et al.* Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon. *Nature* **450**, 1026–1030 (2007).
328. Hessa, T. *et al.* Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* **433**, 377–381 (2005).
329. Reynolds, S. M., Käll, L., Riffle, M. E., Bilmes, J. A. & Noble, W. S. Transmembrane topology and signal peptide prediction using dynamic bayesian networks. *PLoS Comput. Biol.* **4**, e1000213 (2008).
330. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680 (1994).
331. Robert, X. & Gouet, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* **42**, W320–W324 (2014).
332. Matlin, K. S. & Caplan, M. J. The secretory pathway at 50: a golden anniversary for some momentous grains of silver. *Mol. Biol. Cell* **28**, 229–232 (2017).
333. Nirenberg, M. W. & Matthaei, J. H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **47**, 1588–1602 (1961).
334. Blobel, G. & Dobberstein, B. Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J. Cell Biol.* **67**, 852–862 (1975).

## ERREFERENTZIAK

335. Hunt, T. & Jackson, R. J. The rabbit reticulocyte lysate as a system for studying mRNA. *Hamatol. Bluttransfus.* **14**, 300–307 (1974).
336. Pelham, H. R. & Jackson, R. J. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **67**, 247–256 (1976).
337. Bessman, J. D. Reticulocytes. in *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations* (eds. Walker, H. K., Hall, W. D. & Hurst, J. W.) (Butterworths, Boston, 1990).
338. Merrick, W. C. Gene expression using cell-free systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1**, 79–81 (1990).
339. Palade, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 347–358 (1975).
340. Palade, G. E. A small particulate component of the cytoplasm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 59–68 (1955).
341. Uhlén, M. *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419 (2015).
342. Lingappa, V. R., Lingappa, J. R., Prasad, R., Ebner, K. E. & Blobel, G. Coupled cell-free synthesis, segregation, and core glycosylation of a secretory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 2338–2342 (1978).
343. Berg, B. van den *et al.* X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**, 36–44 (2004).
344. Wolfe, P. B., Wickner, W. & Goodman, J. M. Sequence of the leader peptidase gene of *Escherichia coli* and the orientation of leader peptidase in the bacterial envelope. *J. Biol. Chem.* **258**, 12073–12080 (1983).

345. Dalbey, R. E. Leader peptidase. *Mol. Microbiol.* **5**, 2855–2860 (1991).
346. Lundin, C., Kim, H., Nilsson, I., White, S. H. & von Heijne, G. Molecular code for protein insertion in the endoplasmic reticulum membrane is similar for N<sub>in</sub>–C<sub>out</sub> and N<sub>out</sub>–C<sub>in</sub> transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 15702–15707 (2008).
347. Kozak, M. Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5073–5080 (1989).
348. Lundin, C. *et al.* Membrane topology of the human seipin protein. *FEBS Lett.* **580**, 2281–2284 (2006).
349. Nilsson, I. M. & von Heijne, G. Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **268**, 5798–5801 (1993).
350. Nilsson, I., Witt, S., Kiefer, H., Mingarro, I. & Heijne, G. von. Distant Downstream Sequence Determinants Can Control N-tail Translocation during Protein Insertion into the Endoplasmic Reticulum Membrane \*. *J. Biol. Chem.* **275**, 6207–6213 (2000).
351. Walter, P. & Blobel, G. [6] Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. in *Methods in Enzymology* vol. 96 84–93 (Academic Press, 1983).
352. Huang, J., Buboltz, J. T. & Feigenson, G. W. Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1417**, 89–100 (1999).
353. Alavizargar, A., Keller, F., Wedlich-Söldner, R. & Heuer, A. Effect of Cholesterol Versus Ergosterol on DPPC Bilayer Properties: Insights from Atomistic Simulations. *J. Phys. Chem. B* **125**, 7679–7690 (2021).



## ERREFERENTZIAK

354. Luchini, A. *et al.* Effect of ergosterol on the interlamellar spacing of deuterated yeast phospholipid multilayers. *Chem. Phys. Lipids* **227**, 104873 (2020).
355. Hung, W.-C., Lee, M.-T., Chen, F.-Y. & Huang, H. W. The Condensing Effect of Cholesterol in Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **92**, 3960–3967 (2007).
356. Pencer, J. *et al.* Bilayer thickness and thermal response of dimyristoylphosphatidylcholine unilamellar vesicles containing cholesterol, ergosterol and lanosterol: A small-angle neutron scattering study. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1720**, 84–91 (2005).
357. Madeira, F. *et al.* Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res.* **50**, W276–W279 (2022).
358. Gilbert, R. J. C., Dalla Serra, M., Froelich, C. J., Wallace, M. I. & Anderluh, G. Membrane pore formation at protein-lipid interfaces. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 510–516 (2014).
359. Parker, M. W. & Feil, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **88**, 91–142 (2005).
360. Peraro, M. D. & van der Goot, F. G. Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 77–92 (2016).
361. Tilley, S. J. & Saibil, H. R. The mechanism of pore formation by bacterial toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 230–236 (2006).
362. Lashuel, H. A. & Lansbury, P. T. Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Q. Rev. Biophys.* **39**, 167–201 (2006).
363. Rosado, C. J. *et al.* A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science* **317**, 1548–1551 (2007).

364. Flanagan, J. J., Tweten, R. K., Johnson, A. E. & Heuck, A. P. Cholesterol Exposure at the Membrane Surface Is Necessary and Sufficient to Trigger Perfringolysin O Binding. *Biochemistry* **48**, 3977–3987 (2009).
365. Ostolaza, H. & Amuategi, J. Membrane Interaction Characteristics of the RTX Toxins and the Cholesterol-Dependence of Their Cytolytic/Cytotoxic Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 3131 (2024).
366. Strandberg, E. & Killian, J. A. Snorkeling of lysine side chains in transmembrane helices: how easy can it get? *FEBS Lett.* **544**, 69–73 (2003).
367. Tukova, A. & Rodger, A. Spectroscopy of model-membrane liposome-protein systems: complementarity of linear dichroism, circular dichroism, fluorescence and SERS. *Emerg. Top. Life Sci.* **5**, 61–75 (2021).
368. PROCEEDINGS OF THE PHYSIOLOGICAL SOCIETY: January 22, 1910. *J. Physiol.* **40**, i–vii (1910).
369. Blanco, F. J. *et al.* NMR solution structure of the isolated N-terminal fragment of protein-G B1 domain. Evidence of trifluoroethanol induced native-like beta-hairpin formation. *Biochemistry* **33**, 6004–6014 (1994).
370. Storrs, R. W., Truckses, D. & Wemmer, D. E. Helix propagation in trifluoroethanol solutions. *Biopolymers* **32**, 1695–1702 (1992).
371. Dyson, H. J., Merutka, G., Waltho, J. P., Lerner, R. A. & Wright, P. E. Folding of peptide fragments comprising the complete sequence of proteins. Models for initiation of protein folding. I. Myohemerythrin. *J. Mol. Biol.* **226**, 795–817 (1992).
372. Vu, D. M., Myers, J. K., Oas, T. G. & Dyer, R. B. Probing the Folding and Unfolding Dynamics of Secondary and Tertiary Structures in a Three-Helix Bundle Protein. *Biochemistry* **43**, 3582–3589 (2004).

## ERREFERENTZIAK

373. Walsh, S. T. R. *et al.* The hydration of amides in helices; a comprehensive picture from molecular dynamics, IR, and NMR. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **12**, 520–531 (2003).
374. Fabian, H., Mantsch, H. H. & Schultz, C. P. Two-dimensional IR correlation spectroscopy: Sequential events in the unfolding process of the  $\lambda$  Cro-V55C repressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 13153–13158 (1999).
375. Noda, I. Two-Dimensional Correlation Analysis Useful for Spectroscopy, Chromatography, and Other Analytical Measurements. *Anal. Sci.* **23**, 139–146 (2007).
376. Menestrina, G. Use of Fourier-transformed infrared spectroscopy for secondary structure determination of staphylococcal pore-forming toxins. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **145**, 115–132 (2000).
377. Orrell, K. E., Zhang, Z., Sugiman-Marangos, S. N. & Melnyk, R. A. Clostridium difficile toxins A and B: Receptors, pores, and translocation into cells. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **52**, 461–473 (2017).
378. Orrell, K. E. *et al.* Direct Detection of Membrane-Inserting Fragments Defines the Translocation Pores of a Family of Pathogenic Toxins. *J. Mol. Biol.* **430**, 3190–3199 (2018).
379. Vargas-Urbe, M. *et al.* Thermodynamics of Membrane Insertion and Refolding of the Diphtheria Toxin T-Domain. *J. Membr. Biol.* **248**, 383–394 (2015).
380. García-Sáez, A. J., Mingarro, I., Pérez-Payá, E. & Salgado, J. Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry* **43**, 10930–10943 (2004).
381. Voegelé, A., Subrini, O., Sapay, N., Ladant, D. & Chenal, A. Membrane-Active Properties of an Amphitropic Peptide from the CyaA Toxin Translocation Region. *Toxins* **9**, 369 (2017).

382. Terakawa, M. S. *et al.* Impact of membrane curvature on amyloid aggregation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1860**, 1741–1764 (2018).
383. Escribá, P. V. *et al.* Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 829–875 (2008).
384. Lange, Y. Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *J. Lipid Res.* **32**, 329–339 (1991).
385. Nilsson, I., Ohvo-Rekilä, H., Slotte, J. P., Johnson, A. E. & von Heijne, G. Inhibition of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane by sterols. *J. Biol. Chem.* **276**, 41748–41754 (2001).
386. von Heijne, G. Membrane proteins: the amino acid composition of membrane-penetrating segments. *Eur. J. Biochem.* **120**, 275–278 (1981).
387. Hildebrand, P. W., Preissner, R. & Frömmel, C. Structural features of transmembrane helices. *FEBS Lett.* **559**, 145–151 (2004).
388. Strandberg, E. *et al.* Tilt angles of transmembrane model peptides in oriented and non-oriented lipid bilayers as determined by <sup>2</sup>H solid-state NMR. *Biophys. J.* **86**, 3709–3721 (2004).
389. Duque, D., Li, X., Katsov, K. & Schick, M. Molecular theory of hydrophobic mismatch between lipids and peptides. *J. Chem. Phys.* **116**, 10478–10484 (2002).
390. Park, S. H. & Opella, S. J. Tilt angle of a trans-membrane helix is determined by hydrophobic mismatch. *J. Mol. Biol.* **350**, 310–318 (2005).

## ERREFERENTZIAK

## ARGITALPENAK

Ostolaza, H., & **Amuategi, J.** (2024). Membrane Interaction Characteristics of the RTX Toxins and the Cholesterol-Dependence of Their Cytolytic/Cytotoxic Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms25063131>

**Amuategi, J.**, Alonso, R., & Ostolaza, H. (2023) Kukutxeztula: Hurbileko begirada bat. *Elhuyar Zientzia eta Teknologia Aldizkaria*.

**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*, Vol. 23, Page 8703, 23(15), 8703. <https://doi.org/10.3390/IJMS23158703>

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>

**Amuategi, J.**, Benito-Vicente, A., B. Uribe, K., Martín, C., & Ostolaza, H. (2021). Kukutxeztula: «gainditutako» gaitz baten itzulera. *EKAIA EHUKo Zientzia Eta Teknologia Aldizkaria*, 39, 61–78. <https://doi.org/10.1387/EKAIA.21789>

Ostolaza, H., González-Bullón, D., Uribe, K. B., Martín, C., **Amuategi, J.** & Fernandez-Martínez, X. (2019). Membrane Permeabilization by Pore-Forming RTX Toxins: What Kind of Lesions Do These Toxins Form? *Toxins*, 11(6), 354. <https://doi.org/10.3390/toxins11060354>



## ESKER EMATEA

Ezinezkoa zait aitortza labur bat idaztea; honaino iritsi banaiz, bidea ongi lagunduta egin dudalako izan baita (eta eskerrak!). Era batera edo bestera, askok parte hartu dute lan honetan eta beraz, tesi hau, nirea ez ezik, haiena ere bada.

Hasteko, eskerrak Helenari, lana gauzatzeko konfiantza eta askatasunagatik. Davidi, irakatsi zidan guztiagatik. Igor de la Aradari, espektroskopia infragorria erraza egitearren. Igor Tascóni, biologia estrukturalagatiko interesa piztu zidalako. Isaaci mikroskopia aurrean pasatako egunengatik. Alexandra Elbakyani jakintza zientifikoa guztiontzako eskuragarri uztearren.

Nire lankide zoro eta maitagarriei, askogatik, baina bereziki, horren ondo zaindu eta sostengatu nautelako; abentura honek haiek gabe ez luke zentzurik izango. Kafe eta gosarietako ekipoari, egunak alaitu eta ostiralak berezi egin dituztelako. Amaiari, mila arrazoigatik, baina batez ere, nigan sinestearren. Asierri, bidea elkarrekin egitea plazera izan delako. Carmeni, eskainitako laguntzagatik. Joni, begi zorrotzez zuzendu eta maitasunez komunikatzearren. Maialeni, pazientzia handiz, Dinamika Molekularra zertan datzan irakastearren. Nereari, beti adi entzuten naudelako. Rociori, denagatik; betirako lagun bat daramat bihotzean.

Stockholmi eta bertakoei, eskerrik asko. GvH taldeari, zientifikoki hazten laguntzearren. Aneri eta Gunnari, bereziki, hasieratik baietz esan zidatelako, 2023ko udaberrian beso zabalik jaso nindutelako eta proiektu honetan buru-belarri inplikatu direlako. Justini, eztabaida interesgarriengatik. Maddison eta Spyri, lanean dibertitzen dakitelako. Onekari, hiriko zoko guztiak erakutsi zizkidalako, baina, batez ere, etxean sentitu nintzelako hari esker. Bisitan etorri ziren guztiei eskerrak, iparraldea epeltzearren.

Nalua Eibarko talde feministari, borrokarako lubakia eskaintzeagatik. Kezka Dantza Taldeari, arnasa ematearren. Familia eta lagunei, laborategitik kanpo mundu bat existitzen dela gogorarazten didatelako, eta mundu hori bizigarria egiten dutelako. Amama Begori, haren etxeko atea beti dagoelako zabalik. Ane, Felix eta Mariajeri, nitaz arduratzerren. Mikeli, egiten dudan guztia balioan jartzearren. Gurasoei eskerrak guztiagatik, beti. Nire lorpen denak haienak dira. Haiei zor dizkiet irakurzaletasuna eta euskararekiko ardura, besteak beste. Andoniri, leher eginda nengoenean nigandik tira eta bultza egitearren; nire ametsei leku egin dielako eta bereak balira bezala elikatu dituelako.

Lan hau neure indar eta ausardiaren fruitu bada ere, zorionekoa naiz bidea samurragoa egin didatelako.







Toxina poro-eragileen txertatzeari eta mihizatzeari buruzko ehunka ikerketa argitaratu dira, besteak beste, solugarriak diren proteinak mintzean integratutako egitura egonkor nola bihurtzen diren ulertzeko; batez ere, haien ekintza-mekanismoa ornodunen immunitate-sistemako zenbait proteinaren edo proteina amiloideen antzekoa delako.

Hainbat toxina poro-eragilek haien toxikotasuna modulatzeko mintzeko lipidoak erabiltzen dituzte eta hala, mintzean-zeharreko helizeak egonkortzen dituzte. Adibidez, mintzeko kolesterola funtsezkoa da bakterio patogenoek jariatutako zenbait RTX toxinen ekintza-mekanismorako. Hain zuzen, gero eta RTX toxina gehiagok kolesterola ezagutzeko CRAC eta CARC motako motibo funtzionalak erabiltzen dituztela deskribatu da.

Besteak beste, mintzeko kolesterolak *Bordetella pertussis* kukutxeztularen bakterioak jariatutako adenilato ziklasa toxinen (CyaA) jarduera zitotoxiko eta zitolitikoak modulatzeko ditu. Hala ere, oraindik ez zegoen argi kolesterolaren zuzeneko loturak edo esterol honek fosfolipido bigeruzaren egoera fisikoan dauzkan zeharkako ondorioek eragindakoa ote zen. Lan honetan, kolesterolak eta CyaA-k espezifikoki elkarreragiten dutela eta horrek toxinen mintzeko lotura hobetzen duela argitu dugu. Izan ere, CyaA toxinen aminoazido-sekuentziaren azterketak erakutsi zuenez, beste RTX toxina batzuek bezala, CRAC eta CARC motiboak ditu. Kolesterolarekiko sentikortasuna gutxienez mintzarekin elkarreragin dezaketen bi domeinutan (translokazio-eskualdea eta domeinu poro-eragilea) dauden kolesterola ezagutzeko lau motibok (CARC<sup>415</sup>, CRAC<sup>485</sup>, CRAC<sup>521</sup> eta CARC<sup>532</sup>) gutxienez ematen dutela proposatzen dugu. Gainera, peptido sintetiko bat erabiliz frogatu dugu motibo horietako bat, CRAC<sup>485</sup>, kolesterola CyaA-rekin lotzeaz arduratzen dela, eta peptido horrek mintzekin elkarreragiteko dauzkan ezaugarriak aztertu ditugu. Garrantzitsua da nabarmentzea peptidoak ez duela zelula-lisirik eragiten CyaA-ren jarduera inhibitzen duen kontzentrazio-tartean. Horrenbestez, peptido hori erabiltzea metodo ez-toxiko baliagarria izan daiteke CyaA zelula ostalariei lotzea oztopatzeko eta CyaA-k eragindako zitotoxikotasuna murrizteko. Beraz, horrek esan nahi du etorkizunean *Bordetella* infekzioa kontrolatzeko erabil daitekeela klinikoki.

