

Doktorego Tesia

***Bordetella pertussis*-en adenilato ziklasa toxina: makrofagoetan eragindako mintz-iragazkortasuna eta heriotza zelularraren ikerketa**

Asier Etxaniz Iriondo

2017

Zuzendariak: Helena Ostolaza eta César Martín

Biofisika Unitatea (CSIC-UPV/EHU)

Biokimika eta Biologia Molekularra Saila

familiari eta lagunei

Aurkibidea

1	Sarrera eta helburuak	3
1.1	Kukutxeztula, <i>Bordetella pertussis</i> eta bere birulentzi faktoreak	3
1.1.1	Kukutxeztula	3
1.1.2	<i>Bordetella pertussis</i>	3
1.1.3	Birulentzia faktoreak	4
1.2	Adenilato ziklasa toxina	6
1.2.1	RTX proteina familia	6
1.2.2	Adenilato ziklasa toxinarene ezaugarriak eta ekintza mekanismoa	9
1.2.2.1	Sintesia	9
1.2.2.2	Sekrezioa	12
1.2.2.3	Ezaugarri estrukturalak	14
1.2.2.4	Batura eta translokazioa	16
1.2.2.5	Ekintza mekanismoa	18
1.3	Toxina poro-eratzailleak	21
1.3.1	Poro-eratzaille toxinen egitura eta sailkapena	21
1.3.1.1	α -PFTak	22
1.3.1.2	β -PFT	23
1.3.1.3	RTX toxinen sailkapena	27
1.3.2	Poro-eratzaille toxinak eta gaixotasun kutxakorrak	27
1.3.2.1	PFTak ostalarian duten eragina eta erantzuna	28
1.3.2.2	PFT kontrako erantzun zelularra	29
1.3.2.3	Kaltzio menpeko mintz erreparazioa	31
1.4	Heriotza zelularra	36
1.4.1	Apoptosia	37
1.4.1.1	Apoptosi bide intrintsekoa	38
1.4.1.2	Bide estrintsekoa	39
1.4.2	Heriotza Autofagikoa	39
1.4.3	Nekrosia	39
1.4.4	Apoptosi eta nekrosi bidezidorren arteko elkarrekintza	42
1.4.5	Nekrosi programatuak	44

1.4.5.1	Nekroptosia	44
1.4.5.2	Pyroptosia	44
1.4.6	Toxina poro-eratzailleek eragindako heriotza	46
1.5	Helburuak	49
2	Teknika esperimentalak	51
2.1	Materiala eta errektiboak	53
2.2	Bakterioen hazkuntza	54
2.3	Bakterioen Trasformazioa eta Proteinen Adierazpena	54
2.4	Toxinaren purifikazioa	55
2.5	SDS-PAGE bidezko proteinen bereizketa	56
2.6	Proteina-kontzentrazioaren determinazioa	56
2.7	Aktibitate hemolitikoaren azterketa	57
2.7.1	Hemoglobina askapena	57
2.7.2	Hemolisi-zinetikak	57
2.8	Zelula eukariotoen hazkuntza	58
2.9	Fluxuzko zitometria	59
2.9.1	PI iragazkortasun saioa	60
2.9.2	Anexina-V/PI saioa	61
2.9.3	Populazio hipodiploidearen detekzioa	62
2.9.4	Endozitosiaren kuantifikazioa	62
2.10	Kaltzio intrazelularraren neurketa	62
2.11	Zitotoxizitatearen neurketa	64
2.12	Zelula barneko ATParen neurketa	65
2.13	β -hexosaminidasa aktibitatearen neurketa	65
2.14	Mikroskopia konfokala	66
2.15	K ⁺ neurketa ICP-AES erabiliz	66

3	Emaitzak	69
3.1	ACT- Δ N482 mutantearen poro-eratzaille gaitasunaren karakterizazioa hemolisi esperimentuen bidez	72
3.1.1	Toxina kontzentrazioa eta aktibitate hemolitikoaren arteko erlazioa	72
3.1.2	Zinetika hemolitikoaren azterketa	75
3.1.3	Poro-tamainen azterketa babes osmotikoko esperimentuen bidez	75
3.1.4	Kanale purinergikoen parte-hartzearen azterketa toxinek eragindako hemolisian	76
3.2	Makrofagoetan eragindako mintz-iragazkortasuna	77
3.2.1	Propidio ioduroarekiko iragazkortasuna	77
3.2.2	Potasio intrazelularraren irteera	79
3.2.3	Kaltzio extrazelularraren sarrera	80
3.2.4	Mintz-iragazkortasunak makrofagoen lisia eragiteko gaitasuna	82
3.2.5	Kanale-purinergikoen parte-hartzearen azterketa makrofagoen mintz-iragazkortasunean	83
3.3	ACT- Δ N482ak eragindako mintz-iragazkortasunaren erreparazio mekanismoaren azterketa makrofagoetan	84
3.3.1	Makrofagoek ACT- Δ N482ak eragindako iragazkortasuna erreparatzeko gaitasuna dute.	84
3.3.2	ACT- Δ N482ak sortutak iragazkortasunaren erreparazioa endozitosi bidez	87
3.3.3	ACT- Δ N482ak aktibatutako erreparazio mekanismoa Ca^{2+} eta ATP kontzentrazio intrazelularraren menpekoa da	87
3.3.4	Lisosomen exozitosia eta zeramida eraketaren garrantzia Δ N482	88
3.4	ACT wt eta ACT- Δ N482ak eragindako mintz-iragazkortasunarekiko makrofagoek duten erantzunen arteko alderaketa	92

3.4.1	ACT eta erreparazio mekanismo	92
3.4.2	ACT eta ACT- Δ N482 toxinek eragindako mintz-iragazkortasunaren alderaketa PI iragazkortasun eta zelulen bolumen aldaketaren ikuspuntutik.	95
3.4.3	Glizinarene ezaugarri zelula-babesgarrien erabilpena ACTak eragindako iragazkortasuna aztertzeko zelularen lisi osoa ekidinez.	99
4	ACT toxinak eragindako heriotza zelularraren azterketa	103
4.1	ACT eta ACT- Δ N482 mutanteak J774A.1 makrofagoetan eragindako toxikotasuna	105
4.2	Toxinak eragindako estres ionikoaren efektuen azterketa zelula barneko $[K^+]$ neurtuz	106
4.2.1	ACT- Δ N482-ren efektua J774A.1 zelulen potasio intrazelularraren mailan	106
4.2.2	K^+ irteeraren garrantzia ACTak eragindako LDH askapenean	108
4.2.3	K^+ irteeraren garrantzia ACTak eragindako lisi-osmotikoan	109
4.3	Toxinak eragindako estres energetikoaren azterketa.	110
4.3.1	Toxinak eragindako estres energetikoaren azterketa ATP intrazelularraren neurketaz.	110
4.3.2	K^+ irteeraren garrantzia ACT toxinak eragindako ATParen agortzean	111
4.4	ACT toxinak eragindako makrofagoen apoptosisia	112
4.4.1	ACT toxinak eragindako apoptosi prozesuaren karakterizazio	112
4.4.2	ACT toxinak eragindako kaspasen aktibazioa eta DNAren degradazioa	116
4.4.3	K^+ irteeraren garrantzia ACT toxinak eragindako apoptosian	117
4.4.4	Kaspasen aktibazioaren garrantzia ACT toxinak	120

eragindako heriotza zelularrean	
4.5 K ⁺ irteeraren bidez aktibatzen diren heriotza nekrotiko programatuen garrantzia ACTren mekanismo zitotoxikoan	121
4.5.1 Piroptosiaren eragina toxinen toxikotasunean	122
4.5.2 Nekroptosiaren eragina ACTren zitotoxizitatean	124
4.6 Autofagiaren garrantzia ACTak eragindako heriotza zelularrean	124
5 Eztabaida eta ondorioak	127
6 Bibliografia	145
Eranskina	163

1. Sarrera eta helburuak

1. Sarrera eta helburuak

1.1 Kukutxeztula, *Bordetella pertussis* eta bere birulentzia faktoreak

1.1.1 Kukutxeztula

Kukutxeztula (whooping cough edo pertussis), *Bordetella pertussis* bakterioak eragindako arnas aparatuko gaixotasun kutsakorra da. Sintomarik nabarmenenak etengabeko eztul bortitza eta arnasa hartzeko zailtasunak (apnea) dira (Kilgore et al., 2016) Inkubazio epea 5-20 egun artekoa da. Lehenengo egunetan katarroaren antzeko sintomak agertzen dira: doministikuak eta sukar arina, lehen fase honek 2 aste inguru irauten du. Ondoren, ohiko eztul bortitza agertzen da; eztula etengabekoa da, eta gorakoekin batera agertu ohi da, arnasa hartzeko zailtasuna (apnea) azaltzen da ere. Bigarren fase hau 2 eta 4 aste artekoa da. Hirugarren faseak bi hilabete gehiago iraun dezake, eztulak jarraitzen du baina era arinagoan. Gaitzaren konplikazioak, arnas-aparatu, miokardio eta nerbio-sisteman arazoak sor ditzake eta gehienbat haur jaioberrietan heriotza. 1940ko hamarkadan txertoa zelularra erabiltzen hasi zen eta kasu kopuruak bizkor murriztu ziren, gaixotasuna herrialde garatuetan kontrolpean utziz, baina txertoaren albo-ondorioengatik txerto ez-zelular batengatik aldatu zen. Txertoa egon arren, azkeneko urteetan gaixotasuna goraka ari da oraingoz ezezagunak diren arrazoiengatik (Carbonetti et al., 2005; Cherry and Heininger, 2004).

1.1.2 *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis bakterio gram-negatibo patogeniko bat da eta *B.parapertussis* eta *B.bronchiseptica*-rekin batera, gizakientzako patogenikoa den *Bordetella generoa* osatzen dute. Bakterio hau Jules Bordet eta Octave Gengouek kukutxestularen eragile bezala identifikatu eta isolatu zuten 1906an. Bakterioaren tamaina 0,2-0,7 µm artean dago, mugiezina da, aerobioa, eta ez ditu esporak ekoizten. Bere GC edukia %66-68koa da eta hazteko tenperatura egokiena 35-37 gradutan dago. *In vivo* bakterioa ostalariaren arnas traktuan hazten da, *in vitro* hazteko zailtasun asko ematen ditu behar dituen nutrizio-beharrengatik (Mattoo and Cherry, 2005).

1.1.3 Birulentzia faktoreak

Bakterio baten patogenotasuna bere birulentzi faktoreak ematen diote, infekzioa burutzeko beharrezkoak diren osagaiak. Birulentzi faktore bakoitza infekzio prozesuaren fase desberdinetan izango dira beharrezkoak. Orokorrean, infekzio prozesua lau fasetan desberdindu daiteke: bakterioaren ezarpena, ostalariaren defentsa sistemaren ekiditea, eskala lokalean eragindako kalteak eta kalte sistemikoak. *B. pertussis*-en kasuan lau fase hauek era honetan garatzen dira (Mattoo and Cherry, 2005).

1. Bakterioaren ezartzea: bakterioa ostalariaren goi arnasbideetan ezartzen denean hasten da, bakterioa epitelio zelulen zilioen artean itsastean. Fase honetarako bakterioaren birulentzi faktore garrantzitsuenak adhesinak dira. Hauek Filamentudun hemaglutinina (FHA), pertaktina (PRN) eta fimbriak (FIM) dira.
2. Defentsa sistemaren ekiditea: Adenilato ziklasa toxinak (ACT) eta pertussis toxinak (PT) ostalariaren defentsa sistema ebaztea errazten dute. Bi toxinek makrofagoen fagozitozi gaitasuna gutxiagotu eta linfozito eta makrofagoek infekzio guneetara migrazioa ekiditen dute.
3. Maila lokaleko kalteak: Trakea zitotoxinak (TCT), toxina dermonekrotikoak (DNT) eta lehen aipaturiko ACT toxinak epitelioko zelula ziliatuen kaltea eragin dezakete. Toxina hauetatik TCT da kalte handiena eratzeko gai dena. Ehun epitelialetan eragindako kalte hauek dira gaixotasunak eragiten duen etengabeko eztularen arrazoia (Fedele et al., 2013).
4. Efektu sistemikoak: Beste bakteriodun gaixotasun kutxakorretan ez bezala, kukutxeztulak ez du horrelako manifestazio fisiko esanguratsurik erakusten maila sistemikoan. Kukutxeztul gaixoetan encefalopatiak antzeman direnean, hauek etengabeko eztulak eragindako anoxiarengatik gertatzen dira. Linfozitosisia eta hiperinsulemia ere detektatu dira, biak PT toxinarengatik eraginak. (Fedele et al., 2013).

Bordetella-ren birulentzi faktore ezagunak hauek dira: Pertussis toxina (PT), Adenilato ziklasa toxina (ACT), Fimbria, Hemaglutinina filamentaria (FHA), Pertaktina (PRN), Trakeako zitotoxina (TCT) eta Toxina dermonekrotikoa (DNT). Tesi honetan aztertutako birulentzi faktorea ACT izan da, horregatik beste birulentzi faktoreen ikuspuntu orokor bat eman eta ACT toxinan sakonduko dugu:

FHA: *Bordetella*-ren atxikidura faktore garrantzitsuena da. BvgS/BvgA sistemaren menpe dagoen *fhaB* geneak kodifikatzen duen 220 kDa-ko proteina bat da (Couitte 2001). Bakterioaren zelula-hormari itsatsita gelditzen dira FhaC proteinarekin duten interakzioari esker. Proteina honek domeinu ugari ditu epitelio zelulen mintzeko hartzaileei batzeko: Arg-Gly-Arg domeinua edo; integrina, heparina edo karbohidratoei batzeko domeinu desberdinak adibidez (de Gouw et al., 2011).

PRN proteina: bakterio-zelula loturan parte hartzen duen 69 kDa-eko proteina bat da. Bere egituran batura domeinu ugari ditu, Arg-Gly-Arg domeinuak edo leuzina eta prolina errepikapenak dituzten domeinuak adibidez (Charles et al., 1989).

FIM: harizpi formako estruktura duen *Bordetella*-ren mintz proteina da. Azpiunitate handi bat (Fim 2 edo Fim 3) eta txiki batez (FimD) osatuta dago. Fim 2 eta Fim 3-ak heparinari batzeko domeinuak dituzte, arnas sistemako zelula epiteliarren zelulaz kanpoko matrizerara batzeko gaitasuna ematen diona (Geuijen et al., 1998).

PT: *Bordetella*-ren birulentzi faktore garrantzitsuenetakoa bat da, nahitaezkoa infekzioa aurrera eramateko (Fedele, 2013). AB motako toxina hexamerikoa da non PtxA azpiunitateak aktibitate katalitikoa du (ADP-errribosilasa). Beste bost unitateen funtzioa (Ptx B-E) mintzeko hartzailera batu, oligomerizatu, endozitatu eta endosoman A azpiunitatea zitosolera askatuko duen poro bat eratzea da (Carbonetti, 2010). Zitosolean dagoela, azpiunitate katalitikoak NADH hidrolizatu eta askatutako ADP-erribosa G proteina heterotrimerikoen α -azpiunitatera transferitzen du. Modu honetan proteina hauek aktibatzen duten seinalizazio bidezidorraren inhibizioa ematen da, zelulan efektu kaltegarriak eraginez (Carbonetti et al., 2005).

TCT: bakterio zelula horman dagoen peptidoglikano batetik osatutako 921 kDa-eko tetrapeptido-disakarido bat da (Cookson et al., 1989). Oxido nitrikoaren ekoizpena areagotzen du eta epitelio ziliatuaren suntsipenean parte hartzen du (Heiss et al., 1994).

DNT: 160 kDa-eko AB motako toxina da. Zelulen mintzera batzeko domeinu bat du amino muturrean eta gune katalitikoa karboxilo muturrean. Toxina zelulengatik endozitatua izatean domeinu katalitikoa zitosolera askatzen du. Domeinu katalitikoak Rho GTPasak aktibatzen ditu eta lesio nekrotikoak eragiten ditu (Masuda et al., 2000).

1.2 Adenilato ziklasa toxina

Adenilato ziklasa toxina (ACT, CyaA edo AC-Hly) *B.pertussis* bakterioak sintetizatutako birulentzi faktorea da. Proteina hau 200 kDa -eko pisu molekularra duen 1706 aminoazidoz osatutako kate polipeptidiko bakarra da. Proteinaren mutur bakoitzean dauden bi domeinu nagusitan antolatuta dago eta domeinu hauek proteinari aktibitate katalitikoa eta hemolitikoa ematen diote. Amino muturrean (1-400 aa) adenilato ziklasa domeinua (AC) kokatzen da eta gainerako 1306 aminoazidoek domeinu hemolitikoa edo RTX domeinua osatzen dute. Toxina hau RTX poro-eratzaille toxinen familiaren barnean sailkatzen da eta bere funtzio nagusia ostalariaren sistema immunea kaltetzea da (Vojtova et al., 2006).

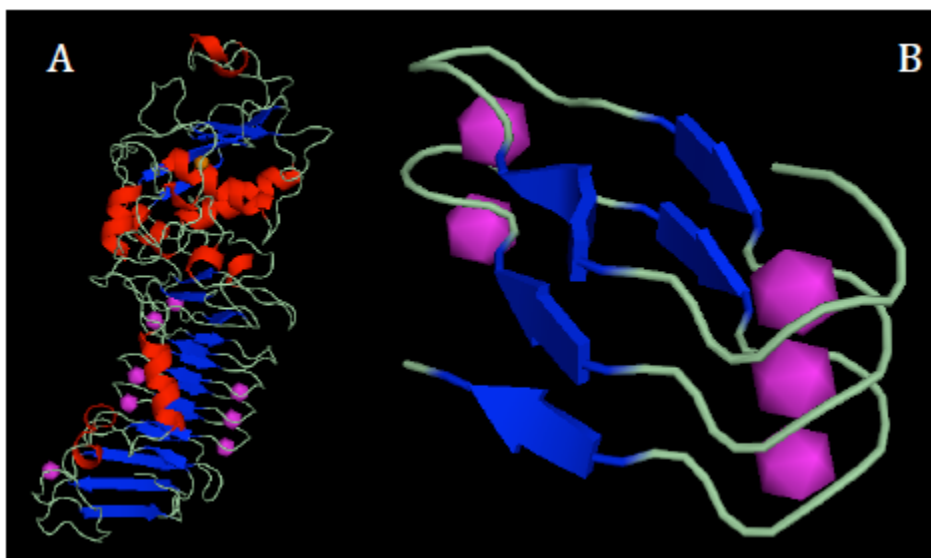
1.2.1 RTX proteina familia

RTX proteinek (ingelesezik “**R**epeats-in-**T**o**X**in”) funtzio ugari dituzten bakterio *Gram*-negatiboek ekoizten dituzten proteina famili handi bat osatzen dute. Familiako kide guztiek bere sekuentzian glizina eta aspartikoan aberatsak diren bederatzi aminoazidoko sekuentzien serie errepikatuak aurkezten dituzte (Welch, 1991). Familia 100 proteina baino gehiagoz osatuta dago aniztasun handiko funtzioekin: proteasa, lipasa edo funtzio estrukturaleko proteinak adibidez (Linhartová et al., 2010). Glizina eta aspartiko sekuentzia hauek kaltzioarekin lotzeko gaitasuna dute, proteinaren estruktura erregulatuz. Horretaz gain, familiako kide guztiak I motako sekrezio mekanismoarengatik (SST1) jariatuak izaten dira.

Kaltzioaren batura nahitaezko prozesua da RTX toxinek bere funtzioak bete ahal izateko (Short and Kurtz, 1971), proteinaren konformazio aktiboa emango dituzten tolesturak ahalbidetuz. Bakterio barnean kaltzio kontzentrazioak txikiak direnez (100 nM inguru) RTX proteinak era tolestugabea mantenduko dira, eta honi esker, SST1 sekrezio sistematik pasa ahal dira. Bakterioaren kanpo medioan kaltzio kontzentrazioak

handiagoak dira (2 mM) eta proteina tolestu eta konformazio aktiboa lortuko du (Koronakis et al., 2000).

Kristalizatu den RTX domeinu bakarra *Pseudomonas aeruginosa* bakterioaren proteasa alkalinoarena izan zen (Baumann et al., 1993). Honek RTX sekuentzia kontsensuaren (X-(L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D) 6 errepikapen ditu. Sekuentzi hau kaltzioarekin batzean β -orri paraleloz osatutako estruktura osatzen du. Estruktura honetan, sekuentziaren lehenengo 6 aminoazidoek kaltzinoa batzen duen bira bat osatzen dute eta hurrengo hiruek β -orri motz bat. Bira eta β -orri sekuentzia errepikatuak β -orri paraleloen helize bat osatzen du, non kaltzinoa bi biraketen artean lotzen da aspartikoei.



1.1.Irudia. *Pseudomonas aeruginosa* bakterioaren proteasa alkalinoarena RTX domeinuaren egitura kristalinoa (A) eta estruktura honen RTX domeinua zehaztasun handiagoarekin. Gorriz margotuta α -helizeak daude eta urdinez β -orriak. Kolore morez Ca^{2+} atomoak ageri dira (DeLano 2002). PDB kodigoa: 1AKL

RTX proteina familiaren barnean RTX toxinak aurkitzen dira. Toxina hauek bakterio Gram-negatibo patogeno ugari ekoiztuak izaten dira, *Bordetella*, *Escherichia*, *Vibrio edo Mannheimia* generoko bakterioak adibidez. Bi talde handitan banatzen dira: toxina poro-eratzailleak eta autoprozesatutako RTX toxina multifuntzionalak (MARTX) (Linhartová et al., 2010). ACT toxina poro-eratzaille toxinen barnean sailkatzen da.

RTX toxina poro-eratzailleak

Antzina, RTX poro-eratzaille toxinak hemolisina edo leukotoxinetan sailkatzen ziren. Leukotoxinek, immunitate sistemako zelula konkretu bat erasotzen zuten, zelula mota honetan adierazten zen hartzaile espezifikoki batuz. Hemolisinek, ordea, zelula anitz eraso ditzakete hartzaile espezifikorik aurkeztu gabe. Urteak pasa ahala sailkapen hau desegokia zela ikusi zen, hemolisina askok zelula mota espezifikoki desberdinen hartzaileak ezagutzen zituztela ikustean. Hala ere, toxinen izenetan sailkapen hau mantentzen da. Orokorrean, famili honetako toxina guztiak ezaugarri batzuk partekatzen dituzte:

1. **RTX operoia:** toxina poro-eratzaillea eta bere sekrezio aparatua (SST1) kodifikatzen dituzten geneak operoi berdinean aurkitzen dira. Operoi hau lau genez osatuta egoten da (*rtxA-D*). *rtxA* geneak poro-eratzaille protoxina kodifikatzen du, *rtxC* geneak protoxina aktibatuko duen aziltransferasa eta *rtxB*, *rtxD* eta *rtxR* geneek sekrezio sistema osatzen duten hiru proteinak kodifikatzen dituzte (Welch, 1991).
2. **Itzulpen geroko eraldaketak:** Toxinak protoxina inaktibo bezala sintetizatzen dira eta bere konformazio aktiboa lortzeko transkripzio ondorengo eraldaketak jasan behar dituzte. Eraldaketa hau aziltransferasa batek bideratutako azilo talde baten batura kobalentea da (Barry et al., 1991; Stanley et al., 1998).
3. **Domeinu hidrofobikoa:** Toxina poro-eratzailleek α -helize anfipatikoak osatzen dituen domeinu hidrofobiko bat edukitzen dute. Domeinu honek bere ituzelulen mintzean katioiekiko espezifikoki diren poroak eratzeko gaitasuna ematen die (Benz et al., 1994).
4. **SST1 bidezko sekrezioa:** RTX proteinen familiako kide guztiak bezala, RTX poro-eratzaille toxinek ere sekrezio sistema hau erabiltzen dute bakteriotik jariatuak izateko
5. **Kaltzio lotura:** Kaltzioaren batura beharrezkoa da azilatua izan den toxinak bere konformazio aktiboa emango duten tolesturak burutzeko. Konformazio aldaketa hau bakteriotik jariatua izatean bakterioaren kanpo medioko kaltzioarekin batzean ematen da (Bakás et al., 1998).

Autoprozesatutako RTX toxina multifuntzionalak (MARTX), RTX poro-eratzailleekin ezaugarri ugari partekatzen dituzten proteina handiak dira (3000-5000 aa), hala ere, desberdintasunak nahikoak dira talde desberdin bezala onartzeko (Satchell, 2007). RTX toxinen antzeko ezaugarriak dituzte: glizinan aberatsak diren RTX sekuentzi nonapeptidikoak dituzte, geneak antzeko operoi baten antolatuta daude, antzeko sekrezio sistema dute eta operoian aziltransferasa bat kodifikatzen duen genea dute. Aziltransferasa eduki arren ez dago daturik azilazioa beharrezkoa dela frogatzen duenik (Satchell, 2007). Hala ere, bi taldeen artean desberdintasun estruktural eta funtzional handiak daude. MARTX-ak dituzten nonapeptido sekuentziak desberdintasunak dituzte eta ez dago argi kaltzioari batzen diren, gainera, sekuentzi hauek amino eta karboxilo muturrean aurkitzen dira. Bi sekuentzi guneen artean, funtzio desberdin antz eduki ditzaketen domeinu funtzionalak aurkitzen dira. Domeinu hauek funtzio oso desberdinak eduki ditzakete, eta RTX toxinekin desberdinduz, denek ez dute poro eragile domeinurik. *Vibrio cholerae* bakterioaren MARTX toxinarekin kasuan, domeinu funtzional hauek aktinarekin interakzionatu, Rho GTPasa-k inaktibatu eta zisteina proteasa domeinu autokatalitiko bat dira, poro eragile domeinu barik (Sheahan et al., 2007).

1.2.2 Adenilato ziklasa toxinarekin ezaugarriak eta ekintza mekanismoa

1.2.2.1 Sintesia

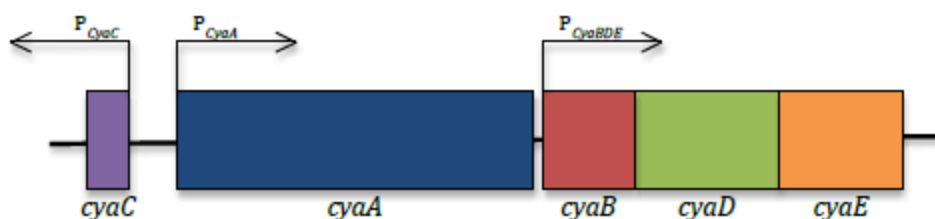
ACT molekula pro-toxina moduan sintetizatzen da (pro-CyaA edo pro-ACT) *cya* operoian dagoen *cyaA* genetik. Transkribatu eta itzuli ondoren, proteinak itzulpen ondoko eraldaketak jasaten ditu CyaC aziltransferasaren bitartez, proteina heldua lortuz (ACT edo CyaA). Hurrengo pausuan, bakterioaren I motako sekrezio sistemak proteina antzeman eta kanpo mediora jariatuko du. Sekrezio sistema hau *cya* operonean dauden CyaB, CyaD eta CyaE proteinek osatzen dute. Toxina jada kanpoan dagoela, kaltzio ioien baturaren bidez bere konformazio natiboa lortuko du, bere aktibitateak burutzeko prest egonez (Vojtova et al., 2006).

Cya operoia

Adenilato ziklasa toxina *B. pertussis*en *cya* operoiarengatik kodifikatuta dago (Barry et al., 1991; Glaser et al., 1988). Operoi hau bost genetik osatuta dago: *cyaA*, *cyaB*,

cyaC, *cyaD* eta *cyaE*. *cyaA* geneak ACT pro-toxina kodifikatzen du, *cyaB*, *cyaD* eta *CyaE* geneek proteinaren sekrezio sistema osatzen dute (CyaB, CyaD eta CyaE) eta *cyaC* geneak CyaC aziltransferaza kodifikatzen du, proteinareni itzulpen ondoko eraldaketa burutzen duena.

cya operona bi eskualde nagusitan antolatuta dago. Alde batetik *cyaABDE* geneek osatutako sekuentzia multigenikoa aurkitzen da (Glaser et al., 1988), eta bestetik, *cyaA* genearen 260 bp aurretik *cyaC* genea dago (Barry et al., 1991). *cyaA* geneak promotore bat du gene honentzako mRNA transkribatzeko eta *cyaABDE* geneak dituen mRNA polizitronikoaren transkripzioa ahalbidetzeko (Laoide and Ullmann, 1990). *cyaA* eta *cyaB* geneen artean bigarren promotorea aurkitzen da, *cyaBDE* mRNA polizitronikoa transkribatzen duena. *cyaC* genearen transkripzioa hirugarren promotore batek burutzen du, aurreko bi promotoreen kontrako zentzuan transkribatzen duena (Barry et al., 1991).



1.2. Irudia. *cya* operoiaren eskema. Operoia *cyaA* (urdinez), *cyaB* (gorriz), *cyaD* (berdez), *cyaE* (laranjaz) osatuta dago. Geziek transkripzioaren norantza adierazten dute. Irudia Masure 1992tik hartua dago (Masure, 1992).

B.pertussis bakterioan ACTren eta *cya* operona osatzen duten geneen adierazpena (CyaC kenduta) BvgS/BvgA bi osagaiez osatutako sistemarengatik erregulatuta dago (Beier and Gross, 2008; Bellalou et al., 1990). Bi osagaiko sistemak, bakterioek erabiltzen dituzten kanpo estimuluei erantzuteko mekanismo akoplatuak dira, bakterioari kanpo baldintzetan ematen diren aldaketen aurrean erantzun erregulatu bat emateko gaitasuna ematen diote (Chen et al., 2013). BvgS/BvgA sistemak *B.pertussis*-en birulentzi faktore nagusien erregulazio genikoa burutzen ditu (Beier and Gross, 2008). BvgS bakterioaren barne-mintzean txertatuta dagoen histidina kinasa aktibitatea duen proteina da, eta BvgA DNArekin batzeko domeinua duen proteina zitosolikoa. Estimulu baten aurrean, BvgS autofosforilatu egiten da, BvgAren fosforilazioan bukatuko duen fosforilazio-kate bat hasiz. BvgA fosforilatua izatean, bere DNArekiko afinitatea handitu egingo da eta sistema honek erregulatzen dituen promotoreen

sekuentziari batuko da, beraien transkripzioa eraginez. ACTren transkripzioaren kasuan, BvgA fosforilatuaz osatutako bi dimerok promotorea baino 80-125 bp lehenago aurkitzen den sekuentzia bati batzen dira. Gero beste bi dimero gertuko sekuentzia bati batzen dira, RNA polimerasaren interakzioa ahalbidetuz eta operoiairen transkripzioa aktibatuz (Jones et al., 2005).

Itzulpen ondoko eraldaketak

ACT pro-toxina moduan sintetizatzen da (proACT), prototoxina honi forma heldugabea edo biologikoki inaktiboa deritzo, bere ahalmen zitotoxikoak nabarmen murriztuak dituelako toxina helduarekin alderatuz (Hewlett et al., 2006). RTX poro-eratzaille familiako beste kide batzuk bezala, *E.coli*-ren α -hemolisina adibidez (HlyA) (Nicaud et al., 1985), ACT toxinarekin aktibazioa azilo taldeen batura kobalentez ematen da CyaC aziltransferasaren bidez (Hackett et al., 1994; Heveker and Ladant, 1997; Westrop et al., 1996). Azilazioa CyaC proteinak burutzen du. ACP proteinatik azilo talde bat jasotzen du azil-CyaC bitartekaria osatuz. Azilatutako CyaC-ak ACT pro-toxinari azilo taldea kobalentez lotzen dio, azilazio gunean dagoen lisina baten amino taldean (Stanley et al., 1998; Westrop et al., 1996; Worsham et al., 2005). Mekanismo hau HlyA toxinarekin kasuan deskribatua izan da baina bi sistemek duten antzekotasun handia kontuan hartuta, ACTren kasuan era berdinean gertatzen dela suposatzen da (Westrop et al., 1996).

ACTak bi azilazio gune ditu, Lys983 eta Lys860. Hasieran antzeman zen *B.pertussis* bakteriotik isolatutako ACT toxinek bakarrik Lys983ren palmitilazioa aurkezten zutela eta *E.coli*-tik lortutako toxina errekonbinatuetan Lys983 eta Lys860ren azilazioa ikusten zela (Hackett et al., 1994, 1995). Gainera, toxina birkonbinatuak azilo talde desberdinak izaten ditu, miristilo (C14:0), palmitilo (C16:0) eta palmitoilo (cis Δ 9 C16:1) taldeak aurkituz (Basar et al., 1999; Hackett et al., 1995). Geroago *B. pertussis*tik isolatutako toxinak bi lisinak azilatuak izatea posible zela ikusi zen, baina palmitilo taldeekin azilatuta bakarrik (Havlíček et al., 2001).

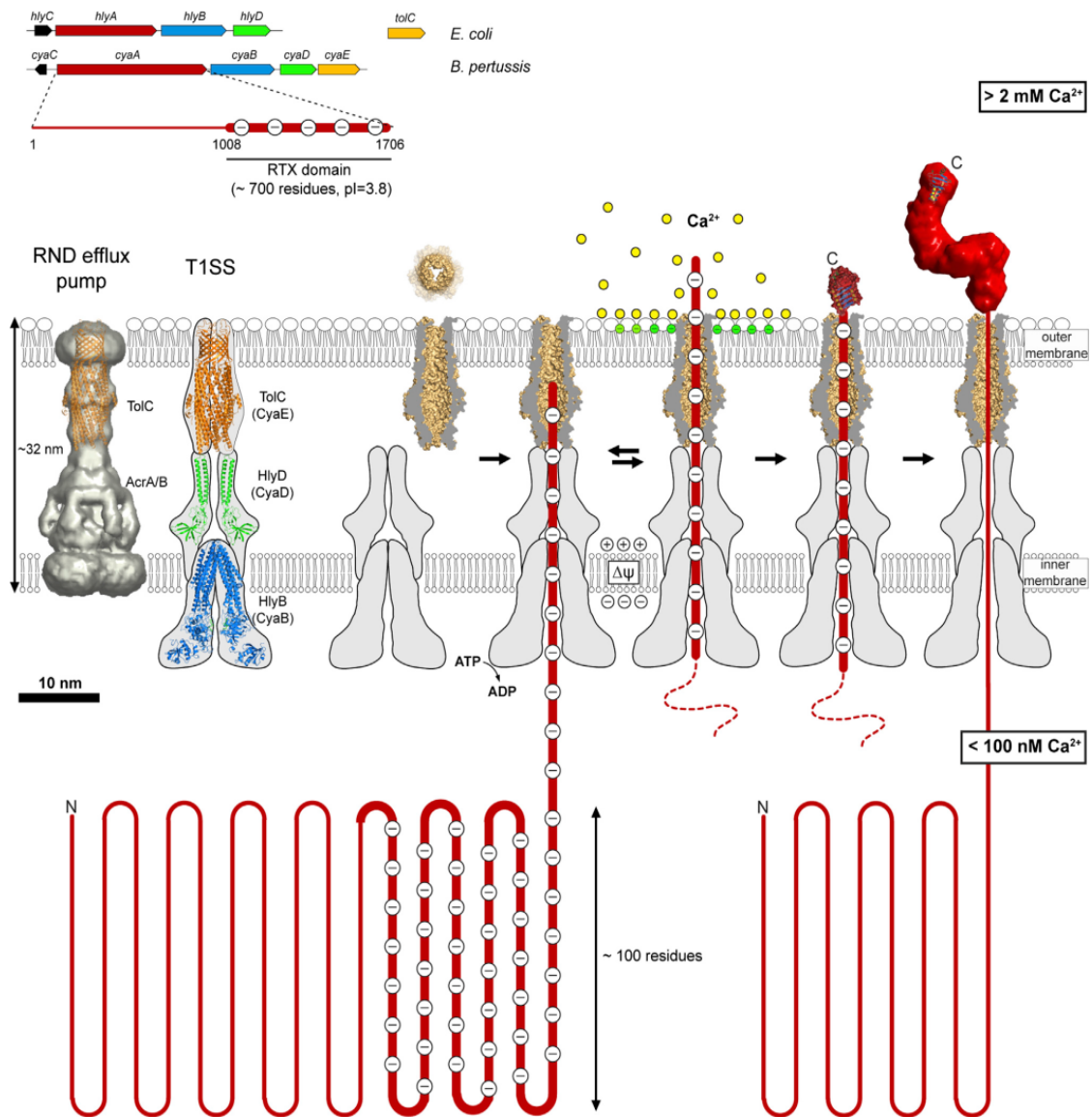
Toxina basatia (Bp-ACT) eta birkonbinatzailearen (r-Ec-ACT) artean dauden azilazio desberdintasun hauek toxinarekin aktibitatean eragina dute. Bi toxinek eritrozitoetan cAMP ekoizteko gaitasun berbera dute baina Bp-ACT-ak gaitasun hemolitiko handiagoa du (Hackett et al., 1995). Desberdintasun hauek toxina bakoitzak dituen azilo talde desberdinekin erlazionatu dira (Linhartová et al., 2010). Beste ikerketa batzuetan

ikusi da Lys983ren azilazioa nahikoa dela toxina birkonbinatzaileak efektu zitotoxikoak egoki burutzeko (Masin et al., 2005).

1.2.2.2 Sekrezioa

ACT molekulak CyaB, CyaD eta CyaE proteinez osatutako SST1 sekrezio sistemaren bidez jariatuak dira bakterioaren kanpo mediora (Sebo et al., 1991). Proteina hauek *E.coli*ren α -hemolisinak erabilitakoen homologia handiarengatik ACTren sekrezio sistemak modu oso antzekoan funtzionatzen duela onartzen da (Nicaud et al., 1985). CyaB barneko mintzean txertatuta dagoen ABC motako proteina garraiatzaile bat da. CyaD, CyaB eta CyaE akoplatzen dituen proteina da eta CyaE bakterioaren zelula horman kanal bat osatzen duen proteina izango litzake, TolC-rekin homologia handia duena.

Toxinak bere C-muturrean CyaB-rekin elkarrekiten duen sekuentzia bat du (Goyard et al., 1993). CyaB-ak CyaD-rekin konplexu bat eratzen dute eta CyaE-rekin batzen dira, bakterioaren zitosola eta kanpo medioa konektatzen duen kanal bat eratuz (Thanabalu et al., 1998). Bakterio barnean dauden kaltzio kontzentrazio baxuengatik (nM inguruan) toxina egoera destolestuan desnaturalizatuan egongo litzake, sekrezio kanaletik pasatzea ahalbidetuz (Chenal et al., 2009). CyaBren ATPasa aktibitateak, protoi gradientearen bidezko indarrak eta proteinaren aminoazido kargadunek sekrezioaren norantza bideratzen dute hasieran (Bumba et al., 2016). Kate polipeptidikoa bakterioaren kanpo mediora iristean kaltzioa lotuko du (2 mM kanpo medioan) lehen aipatutako β -orri egiturak eratuz. Egitura hauek “tapoi” bezala jokatuko dute toxina berriro sekrezio kanaletik sartzea ekidinez, horrela sekrezioa itzulezina bihurtzen da eta molekularen mugimendu brownianoa aprobetxatuz toxina kanporako norantzan jariatua izango da (Bumba et al., 2016). Toxina jariatua izan eta gero sekrezio-konplexua bereizi egingo da.



1.3. Irudia. RTX toxinen sekrezio mekanismoaren eskema. CyaB, CyaD eta CyaE proteinak bakterioaren zitosola eta kanpo medioa batzen duen kanala osatzen dute (T1SS). RTX toxinen C-muturreko jariapen sekuentzia CyaBren ATPasa domeinura batuko da eta honek aktibitatearengatik kanalean barneratuko da. Zelula barne eta kanpoan dagoen mintz-potentzialak jariapenaren norabidea bideratuko du proteinaren karga negatiboek esker. Proteina kanpo medioarekin kontaktatua hartzen doan elean, kaltzioarekin lotu eta β -orri egiturak eratzen joango da. Tolesdura honek jariapena atzera egitea galarazten du, proteina tolestua ezin delako T1SS kanaletik pasa, “tapoi” moduan jokatuz. Irudia Masin et al. 2016-tik hartua dago. Irudian ikusten diren T1SSren estruktura HlyA RTX toxinen dira (HlyB, HlyD, TolC) baina sekuentzi homologo handierarengatik ekintza-mekanismo berbera dutela honartzen da.

ACTren konformazio aktiboa eta lotura kaltzioarekin

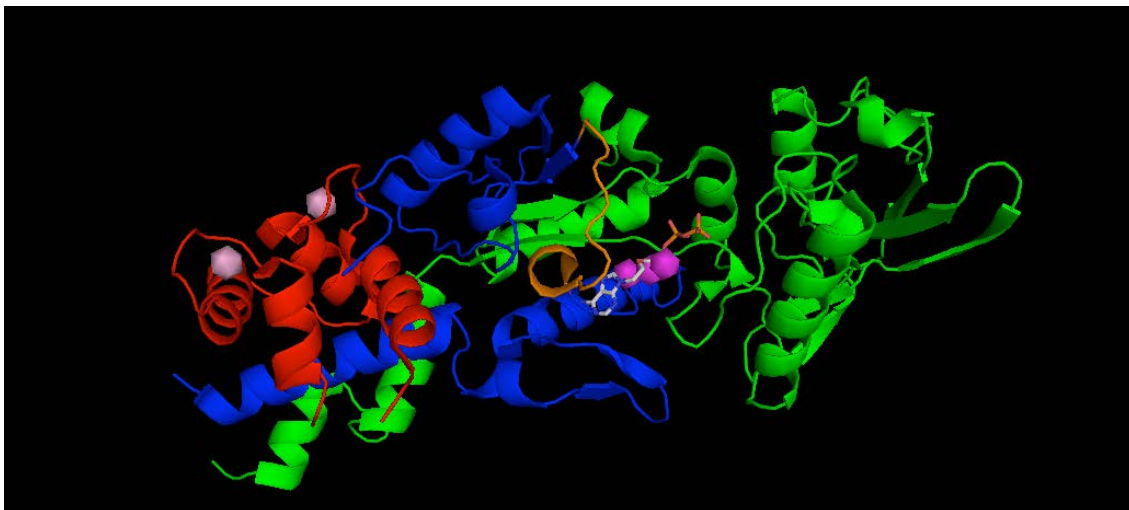
Kaltzioaren presentzia nahitaezko baldintza da toxinak bere konformazio natibo aktiboa lor dezan, kaltzio menpeko tolestura hau burutu gabe toxinak ezingo du aktibitate katalitikorik ez hemolitikorik burutu (Hewlett et al., 1991; Rogel et al., 1991). Kaltzioaren batura hau toxinarekin RTX domeinuan ematen da, glizina eta aspartiko ugari dituzten sekuentziak β -orri egiturak eratzen dituzte kaltzioarekin batzean (Chenal, 2009). Azkeneko ikerketak erakutsi dute kaltzioarekin dituen loturak afinitate altukoak direla eta seguraski proteinaren barnean daudela C- eta N- muturrez babestuta, proteinaren nukleoa osatuz (Cannella et al., 2017). Konformazio eraketaz gain, kaltzioa toxina eta bere afinitate altuko ligandoaren arteko baturan (Guermontez et al., 2001) eta AC domeinua eta kalmodulinaren baturan (Selwa et al., 2012) beharrezkoa izango da ere.

1.2.2.3. Ezaugarri estrukturalak

ACT 200 kDa-eko pisu molekularra duen 1706 aminoazidoz osatutako kate polipeptidiko bakarra da, 4,58-ko puntu isoelektriko (pH_I) teorikoarekin. Estructura eta funtzioaren ikuspuntutik bi domeinu nagusitan antolatzen da: adenilato ziklasa domeinu katalitiko (AC), amino muturreko lehenengo 400 aminoazidoetan, eta RTX edo domeinu hemolitikoa, gainontzeko 1300 aminoazidoetan kokatzen dena (Ladant and Ullmann, 1999). Bi domeinuak independenteak dira bere funtzioak burutzeko orduan (Khelef et al., 1992). Azkeneko SAX bidez lortutako datuek adierazten dute proteinak soluzioan ia globularra den konformazio monomeriko egonkor bat osatzen duela, non C eta N muturreko domeinuak kontaktuan dauden (Cannella et al., 2017).

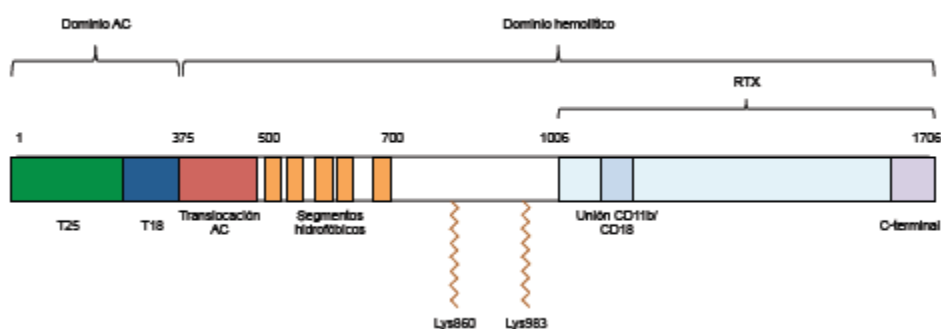
Domeinu katalitikoak ATP pirofosfato liasa aktibitatea du, hau da, adenosina 5'-trifosfatoa (ATP) adenosina monofosfato-3',5' ziklikoa (cAMP) eta anioi pirofosfatoan bihurtzen du. Aktibitate katalitiko nabarmenki areagotua izaten da zelula eukariotoen kalmodulinarekin batzean (100-1000 aldiz), aktibitate maila oso altuak lortuz ($k_{cat} = 2000 \text{ s}^{-1}$) (Guo et al., 2005). Domeinu hau bi azpidomeinuz osatuta dago, T25 (25 kDa, aa. 1-125) eta T18 (18 kDa, aa. 233-364) domeinuak (Ladant et al., 1989). AC domeinuaren estructura kristalinoa lortu zenean ikusi zen gune katalitiko bi azpidomeinuen artean aurkitzen zela, beraz, bi domeinuak beharrezkoak dira aktibitate katalitiko burutzeko (Guo et al., 2005; Ladant et al., 1989). Gune katalitikoan bi magnesioen presentziak ioi honen garrantzia adierazten du aktibitatearentzako, zelula

eukariotoen adenilato ziklasa entzimetan bezala. Proposatu da kalmodulina T18 domeinura batzean gertatzen diren konformazio aldaketak T300-K312 lotura egonkortzen dutela, katalisia burutzeko egitura egokiena lortuz (Guo et al., 2005).



1.4 .Irudia: ACTaren AC domeinuaren egitura kristalinoa kalmodulinari lotuta. T25 eta T18 domeinuak urdin eta berdez daude eta kalmodulina gorriz. Kaltzio ioiak larrosaz margotuta daude. PyMol bidez eraturako irudia, bere PDB kodea: 1Z0T (Guo et al., 2005)

RTX edo domeinu hemolitikoak toxinen funtzio desberdinarentzako beharrezkoak diren egiturak ditu: kaltzioarekin batu eta konformazio aktiboa lortzeko beharrezkoak diren gunek, azilazio gunek, CD11b/CD18 hartzailearekin batzeko gunea, poro-eratzailer aktibitatea eta AC domeinua zelula barnera translokatzeko beharrezko makineria (Vojtova et al., 2006).



1.5. Irudia. ACTaren estrukturaren eskema. AC domeinua N muturrean kokatzen da eta T25 (berdez) eta T18 (urdina) azpidomeinuz osatuta dago. Toxinaren beste zatiak domeinu hemolitikoaren barnean kokatzen dira: AC domeinuaren alboan 100 aminoazidoz osatutako translokazio sekuentzia, poro-eratzailer gaitazuna ematen dion domeinu hidrofobikoak (laranja) eta glizina eta aspartiko ugari dituen

RTX domeinua (urdina), non hartzailearekiko lotura eta kaltziarekin batzen diren sekuentziak daude (Vojtova 2006-tik hartua).

- **Translokazio gunea:** gunea hau AC domeinua eta gero aurkitzen da (aa. 375-485). Sekuentzia hau beharrezkoa da AC domeinuaren translokazioarentzako (Karst et al., 2012) mintz plasmatikoa zehar, sekuentzia hau gabeko ACT mutante trunkatuek ezin dute itu-zeluletan translokazioa burutu. Sekuentzia hau isolatzean ikusi zen mintzarekin interakzionatzean α -helize egitura hartzen zuela (Subrini et al., 2013).
- **Gunea hidrofobikoa:** aa. 500-700 kokatzen da eta bost alfa helize hidrofobiko eta anfipatiko eratze gaitasuna du (aa. 500-522, 529-550, 571-593, 602-627 eta 678-698) (Kurehong et al., 2015). Gunea honek toxinari poro-eratzailer gaitasuna ematen dio baina translokazio prozesuan ere parte hartzen duela ikusi da (Basler et al., 2007). Toxinaren oligomerizazioan ere parte har dezakeela uste da (Vojtova-vodolanova et al., 2009).
- **Azilazio gunea:** gunea honetako lisina 983 eta 860an azilazioak ematen dira. Azilazio hauek CyaC aziltransferasak burutzen ditu bakterio barnean eta beharrezkoak dira toxina aktiboa izateko (Hackett et al., 1995).
- **Hartzaileari batzeko gunea:** Toxinaren afinitate altuko gunea integrina CD11b/CD18 da (Guermontprez et al., 2001) eta bere ligando sekuentzia aa. 1166-1281-etan dago (El-Azami-El-Idrissi et al., 2003).
- **RTX edo kaltzio lotura gunea:** gunea hau 1006-1638 aminoazidoen artean kokatzen da eta glizina eta aspartikoan ugariak (X-(L/I/F)-X-GG-X-G-(N/D)-D) diren serie errepikatuek osatuta dago. Sekuentzia hauek β -orri paralelo konformazioa hartzen dute kaltzioarekin batzean eta toxinaren tolestura egokia lortzeko beharrezkoak dira.
- **Sekrezio sekuentzia:** proteinaren C- muturrean aurkitzen da eta SST1 sekrezio sistemarekin elkarrekiten duen sekuentzia da (Goyard et al., 1993).

1.2.2.4. Batura eta translokazioa

ACTak bere itu-zelulen mintzarekin duen batura, bere afinitate altuko hartzailea den CD11b/CD18 integrinaren (CR3, integrina α M β 2 edo CD11b/CD18) presentziaren araberakoa izango da (Guermontprez et al., 2001). Hartzailea duten zelulentzako

ACTaren batura asegarria da eta kontzentrazio menpekoa, nM inguruko K_d batekin. Integrinaren kontrako antigorputzen inkubazioak toxinen batura eta eragindako cAMP igoeraren inhibizioa dakar. Hala ere, ACT ez da bere hartzailea duten zelulei batzen bakarrik. Ikerketa ugarik frogatu dute ACT eritrozitoi (Gray et al., 1999), zelula epitelialei (Eby et al., 2010), T zelulei (Paccani et al., 2011) eta lipidoz soilik osatutako mintz-eredu sistemei (Martín et al., 2004) batzeko gaitasuna duela.

ACT mintz plasmatikoa txertatzeko RTX domeinua osorik eta kaltzioarekin batuta egotea beharrezkoa da, batez ere alfa helize anfipatikoak eratzen dituen gune hidrofobikoa (Iwaki et al., 1995). Azilazioak ere beharrezkoa ematen du, baina hau ez dago argi, azilaziorik ez duen pro-toxina birkonbinatzailea (proACT) mintz-eredu sistemei batzeko eta solutuen askapena eragiteko gaitasuna du eta (Martín et al., 2004).

Translokazioari buruz, oraindik ez da zehazki ezagutzen prozesu hau nola burutzen den. ACTak eragindako cAMP igoera prozesu bizkorra da eta ez du endozitozia eta endosomen pH jaitsieraren menpekotasunik (Confer and Eaton, 1982; Gordon et al., 1988; Rogel and Hanski, 1992). Endosomarik ez duten zeluletan ere gertatzen da, eritrozitoen kasuan (Rogel and Hanski, 1992). Beraz, ondorioztatzen da translokazioa mintz plasmatikoa bertan gertatzen dela toxina endozitatu izan gabe (Ladant and Ullmann, 1999). Hauek dira translokazio prozesuan eragina duten faktoreak:

- **Kaltzioa:** Tolestura egokia edukitzeko behar duen kaltziotik aparte, toxinak translokazioa burutzeko mM inguruko kaltzioa behar du medioan. Mintzeri batzeko eta poro-eratzailer aktibitatearentzako kaltzio kantitate hauek ez dira beharrezkoak ordea (Cannella et al., 2017).
- **Temperatura:** toxina mintzera duen batura tenperaturarekiko ia independentea izan arren (0-37 °C tartean), translokazioa tenperaturaren menpeko prozesua da, 20 °C-tik behera nabarmenki inhibitzen delako (Gray et al., 1999; Rogel and Hanski, 1992).
- **Mintz potentziala:** translokazioa mintzaren potentziala balore negatiboetan bakarrik dagoenean ematen da (-85 tik -25 mV-ra). Balore positiboetan ez da cAMP igoerarik detektatzen itu-zeluletan (Otero et al., 1995). Mintz-ereduetan eragindako ikerketetan menpekotasun hau ere ikusi da (Veneziano et al., 2013).

- **Gune hidrofobikoaren osotasuna:** gune hidrofobikoko alfa helizeak desegiten dituzten mutazioek tranlokazioa inhibitzen dute (Basler et al., 2007). Seguraski alfa helize hauek translokazioan parte hartzen dutelako.
- **Azilazioa:** azilaziorik gabeko proACT-ak itu-zeluletan cAMP igoera gaitasuna nabarmenki muriztua dauka baina ez da ezagutzen azilazio beharraren zergatia (Masin et al., 2005).
- **Domeinu katalitikoaren karga elektrostatikoa:** AC domeinuaren 224-242 gunean negatiboki kargatutako aminoazidoen insertzioak translokazioaren inhibizioa dakar (Karimova et al., 1998). Karga positibo edo neutroko aminoazidoen txertaketak, ordea, ez du efektu inhibitzailearik. Karga aldaketa honek toxinen estrukturan eragina izan dezake, edo beste ikuspuntu batetik, karga aldaketa honek translokazioak mintz potentzialarekiko duen menpekotasunean eragina izan dezake.
- **AC domeinuaren tolestura:** AC domeinuaren T25 eta T18 artean aminoazido sekuentzien insertzioa egin daiteke translokazio prozesua eragotzi gabe (Gmira et al., 2001), hala ere, beharrezkoa da txertatutako sekuentzi hauek modu destolestuan egotea. Ikerketa honetatik ondorioztatzen da translokazio prozesuan zehar AC domeinuak destolestura bat jasatea beharrezkoa dela mintza zeharkatu ahal izateko.

1.2.2.5 Ekintza mekanismoa eta efektu zitotoxikoak.

ACT toxina CD11b/CD18 integrinarekin batzean itu-zelularen mintzean txertatzen da. Mintzean bere bi aktibitateak burutzen ditu, AC domeinuaren translokazioa eta poro-eraketa. Ikerketa ugarien arabera (Basler et al., 2007; Bumba et al., 2010) toxinak konformazio desberdina du aktibitate bakoitza burutzeko. Translokazioa burutzeko, toxina monomero eran eta poro eraketa toxina oligomero eran dagoenean emango zen. Oligomero honen egituraz informazio gutxi dago, zeharkako datuen arabera gutxienez 3 monomeroz osatuta egongo litzake (Vojtova-vodolanova et al., 2009). Toxinaren AC domeinua translokaturik izatean ostalariaren zitosolean dagoen kalmodulinarekin batzen da, honek toxinen aktibitate katalitikoaren ikaragarri areagotzen du ($K_{cat} 2000 \text{ seg}^{-1}$) zelularentzako toxikoak diren cAMP maila suprafisiologikoak eratuz (Eby et al., 2012). Honetaz gain, kalpaina proteasa zitosolikoak AC domeinua eta domeinu hemolitikoaren artean dauden mozketak sekuentziak ezagutzen ditu eta toxina moztu egiten du, AC domeinua zitosolera askatuz eta mintz plasmatikokoan domeinu hemolitikoaren utziz

(Ostolaza et al., 2013). Bestalde, oligomeroak eragindako poroak katioiekiko espezifikoak dira eta zelularen K^+ irteera eragiten dute, zelula barneko ioi honen kontzentrazioak modu kaltegarrian gutxituz (Wald et al., 2014). Toxinak zelulan kaltzio sarrera bat eragin dezakeela ikusita dago, baina oraindik ez dago argi ze mekanismo bidez burutzen den efektu hau. Toxinaren kontzentrazio edo zelula motaren arabera, kaltzio sarrera cAMP-ak aktibatutako kanalengatik (Martín et al., 2010) edo AC domeinuaren translokazioak mintzean eragindako desegituraketarengatik (Fiser et al., 2007) ematen den eztabaidan dagoen gai bat da gaur egun. (Fiser et al., 2007; Martín et al., 2010) Toxinak bere bi aktibitateak modu independentean burutzeko gaitasuna du (Khelef et al., 1992). Ikerlari batzuen arabera, toxinak translokazio konformeroa edo poro-eratzaille konformazioa hartu dezake, eta aktibitate bakoitza konformero batek burutu ahal izango du, biak bateraezinak izanik. Konformero berberak bi aktibitateak burutzeko gaitasunik ez izatearen arrazoia ez legoke argi, uste da proteinaren gune hidrofobikoan dauden aa sekuentzi berberak bi aktibitateak burutzeko beharrezkoak direla eta translokaziorako eta poro eraketarako egitura edo elkarrekintza desberdinak egin behar dituztela (Masin et al., 2016). Hipotesi honen arabera, kontzentrazio baxuetan mintzeko toxina-populazio gehiena “monomero-translokatzaille” konformazioan egongo litzake eta kontzentrazio altuetan, ordea, toxina gehienak “poro-eratzaille oligomeroa” osatzeko joera izango luke, translokazio efizientzia murriztuz (Eby et al., 2012). Ekintza-mekanismo modelo honek oraindik erantzun gabe dauden galderak sorrarazten ditu: ez dago argi toxinak konformazio mota baten “aukeraketa” prozesu itzulezina den edo, adibidez, toxinak monomero bezala translokatu eta gero oligomero baten osagai bihurtu daitekeen. Zalantza honen harira, ikertzeke dago kalpainarengatik moztua izan eta gero mintzean gelditzen den domeinu hemolitikoak funtzioaren bat betetzen duen, bere kabuz edo beste monomero batzuekin oligomeroak osatuz. Monomero moztu honek aktibo jarraituko balu, bere oligomerizazio eta poro-eratzaille gaitasunak toxina osoaren propietate berdinak izango ziren erantzuteke dago oraindik. Bi aktibitateak itu-zelularentzako toxikoak dira eta toxinaren potentzi zitotoxikoa sinergikoki areagotzen dute (Basler et al., 2006). Efektu hauei esker toxinak sistema immuneko zelulak kaltetu egiten ditu, horrela *B.pertussis*-en aurkako erantzun immunea desregulatuz eta bakterioaren biziraupenean lagunduz (Vojtova et al., 2006)..

ACTren hartzailea zelula mieloideetan adierazten denez (makrofago, zelula dendritiko, neutrofilo eta NK zeluletan) toxinarene efektu gehienak ostalariaren sistema immunean izango dira (Vojtova et al., 2006). Toxinak ekoiztutako cAMP maila handiak makrofagoen funtzio garrantzitsuenak inhibitzen ditu: fagozitosia, kimiotaxia eta oxido nitrikoaren ekoizpena (Confer and Eaton, 1982; Friedman et al., 1992; Kamanova et al., 2008; Mouallem et al., 1990; Osicka et al., 2015). Makrofagoen heriotza ere eragin dezakete, apoptosi bidez kontzentrazio baxuetan (Khelef and Guiso, 1995; Khelef et al., 1993) edo nekrosi bidez kontzentrazio altuetan (Basler et al., 2006; Hewlett et al., 2006). Heriotzaz aparte, erantzun immunea bideratuko duten zitokinen ekoizpenean eragina du. Makrofago eta zelula dendritikoetan IL-10 anturaren aurkako zitokina ekoizpena areagotzen du (Henderson et al., 2012) eta TNF- α eta IL-12 hanturazitokinen ekoizpena inhibitzen du. Bestalde, zitokina inflamakorren ekoizpena ere eragiten du, IL-1 β zelula dendritikoetan (Dunne et al., 2010) eta ziklooxigenasa-2 makrofagoetan (Perkins et al., 2007). Ikerketa hauek ACT-k ostalarian eragin ditzakeen efektuen konplexutasuna erakusten dute, eta oraindik ez da argitu toxinarene efektua hantura erantzuna inhibitzea edo areagotzea den.

Deskribatu diren efektu hauetatik gehienak toxinarene adenilato ziklasa aktibitatearengatik dira. cAMP zelularen bigarren mezulari garrantzitsua da eta prozesu askoren artean erantzun immunearen erregulatzailea da (Wehbi and Taskén, 2016). Toxinak era oso azkarrean molekula honen mailak areagotzen ditu (Eby et al., 2012) eta honek zelularen bidezidor ugariei eragiten die. Ikusi da igoera honek PKA kinasaren aktibazioa dakarrela eta honen bidez mintzean dauden L-motako kaltzio kanalak aktibatu daitezkeela, zelulan kaltzio sarrera nabarmenak eraginez (Martín et al., 2010). Bestalde, PKA-ren aktibazioak SHP-1 fosfatasa aktibatu dezake ere eta honek, oraindik ezezaguna den bidezidor baten bidez, BimEL molekula pro-apototikoaren aktibazioa dakar (Ahmad et al., 2016). Bidezidorretan duen eraginaz gain, aktibitate katalitikoak albo-ondorio nabarmen bat du, zelularen ATP agorpena. Aktibitate katalitikoak hain bortitza izatean zelularen ATP gehiena aktibitate honengatik xahutzen da denbora-tarte oso motzean. Adibidez, makrofagoak 200 ng/ml ACTrekin 30 minutuz inkubatzek, zelularen ATP mailak % 5-raino murriztu ditzake (Eby et al., 2012). Azkenengo urteetan egindako ikerketek frogatu dute zelulen heriotza eragiteko orduan, aktibitate katalitikoak eragindako ATP murrizketak garrantzia handia duela, toxinarene ahalmen zیتotoxikoa areagotuz (Hewlett et al., 2006).

Ikerketa gehienek ACTren adenilato ziklasa aktibitatearen efektuetan sakondu duten arren, toxinaren aktibitate poro-eratzailleak berebiziko garrantzia du bere ekintza mekanismoan. ACT *B.pertussis*-ek ostalariaren infekzioa aurrera eramateko beharrezko birulentzi faktorea da, eta toxinak funtzio hau betetzeko bi aktibitateak eduki behar dituela frogatu da animalia ereduetan (Khelef et al., 1992). Toxinaren ekintza mekanismoan garrantzi handia izan arren, aktibitate poro-eratzaillea ez da ondo karakterizatua izan. Honen arrazoia orokorrean RTX familiako toxinen poro-eragile mekanismoari buruz dagoen informazio urria izan daiteke. Beste proteina poro-eratzailleekin alderatuz, RTX familiakoek ez dute estruktura ezagunik, eta honek beraien ikerketa zailagoa izatea eragiten du (Peraro and van der Goot, 2015). Tesi honetan ACT toxinaren aktibitate poro-eratzaillearen azterketa hartu dugu helburu modura ; azterketa hau burutzeko orokorrean poro-eratzaille toxinei buruz dagoen jakintzari buruzko azalpen bat emango dugu.

1.3 Toxina poro-eratzailleak

1.3.1 Toxina poro-eratzailen egitura eta sailkapena

Mintz plasmaticoaren sorrera bizitzaren eta eboluzioaren oinarrietako bat kontsideratu daiteke. Zelula inguratzen duen mintz honek barne eta kanpoko limiteak definitzeaz gain, zelula barne eta kanpoaldean arteko konposizio kimiko desberdinak egotea ahalbidetzen du, eta hau zelula bizirik mantentzeko prozesu askoren funtsa da. Horrelako garrantzia edukita, zelulek beste zelula aurkarien mintzak erasotzeko mekanismoak garatu dituzte eta, noski, eraso hauetatik mintza defendatzeko mekanismoak ere. Erasorako gehien garatu den estrategia ebolutiboa beste zelulen mintza “zultatze” gaitasuna duten proteinak jariatzea izan da, proteina hauek sintetizatzen zituzten organismoen abantaila handia emanez konpetentzi ebolutiboan . Horregatik toxina poro-eratzailleak (ingelesez “Pore Forming Toxin,” PFT) izaki bizidunen erreinu guztietan agertzen dira, eboluzioan laster agertu zen eraso mekanismo bat dela adieraziz (Iacovache et al., 2008). Ezagunenak eta ikertuenak gizakiarentzako patogenoak diren bakterioek jariatzen dituztenak dira eta hauei buruz sakonduko dugu atal honetan.

Bakterioarengatik sintetizatu eta gero, PFT-ak monomero disolbagarri modura jariatuar izaten dira kanpo mediora. Bere itu-zelularekin mintzean batu eta gero, monomeroak

oligomerizatu egingo dira eta honek eragingo dituen konformazio aldaketak mintzean txertatzea eragingo du, mintza iragazkor bihurtuko duen poroa eratuz (Bischofberger et al., 2012).

Bakterioarengatik jariatuak izan eta gero PFT gehienak uretan disolbagarria den konformazioa hartzen dute. Beraien itu-zelulei batzeko hartzaile espezifikoak antzematen dituzte, hauek proteinak, lipidoak edo azukreak izan daitezke. Hartzailearekiko loturak toxinarekin kontzentrazio lokala asko handitzen du, monomeroen difusioa hiru dimentsioko espazio batetik bi dimentsioko batera pasatuz. Honek monomeroen arteko talka probabilitatea asko handitzen du eta oligomerizazioa bultzatzen du. Oligomerizazioa PFT gehienak behar duten urrats pausu bat da poro eraketarako. Oligomerizazioa gertatzerakoan edo aurreko pausu bezala, toxinak bere gune hidrofobikoak eskuragarri uzten dituen konformazio aldaketa jasaten du, mintzean txertatzea eragiten diona. Ekintza mekanismo hau PFT guztietan oso antzekoa izanda, beraien arteko desberdintasun handienak poroa eratzeko erabiltzen duten estruktura proteiko motan eta poro honek edukiko dituen ezaugarri/efektuetan dago (Gonzalez et al., 2011a).

PFTak bi talde handitan sailkatu daitezke bere estrukturaren arabera, α edo β toxinak. Hau mintzean poroa egiteko erabiltzen duten egitura sekundarioaren arabera izango da. Sei famili desberdin daude identifikatuta eta bi talde handitan antolatzen dira (α -PFT eta β -PFT).

1.3.1.1. α -PFTak

Kolizin familia: *E.coli* bakterioak sintetiaatutako toxina bakteriozidak dira, kolizina A toxina aztertuen izanik. Toxina hauei esker *E.coli*-k beste antzeko bakterioak hil ditzake biziraupenerako konpetentzia kenduz. Bere estruktura ia osotasunean α -helizez osatuta dago. Helize anfipatikoak proteinaren barnean dagoen helize hidrofobikoa inguratzen dute. Kolizinak bakterioen zelula-horman aurkitzen diren hartzaileei batzen zaie eta Tol edo TonB sistemak erabilia, barne mintzera translokatzeko gaitasuna dute. Barne mintzarekin batzean proteinaren nukleoko helize hidrofobikoa mintzean txertatzen da poroa eratzeko. Ez dago argi poro-eraketak ze oligomerizazio maila behar duen, dimero batek poroa eratu dezakeela proposatu da. Bakterioaren barne mintzean duen poro-eratzailerik aktibitateak efektu kaltegarriak ditu bakterioarentzako: mintzaren

despolarizazioa, ATP murrizketa eta bakterioaren heriotza eragiteko gaitasuna (Gouaux, 1997).

ClyA familia: Toxina famili honen adibide: *E.coli*-ren ClyA, *Bacillus cereus*-en Nhe edo BL enterotoxina dira, zitolisina A (ClyA) ikertuena izanik. ClyA-ren estruktura ia guztiz α -helizez osatuta dago β -orri hidrofobiko txiki bat kenduta. Kolesteroldun mintzetan β -orri hau mintzean txertatzen da. Honek proteina osoaren estruktura aldaketa bat eragiten du poroa eratuko duen konformazioa lortuz eta N muturreko α -helizea mintzean txertatuz. Poroa sortzeko oligomerizazioa ematen da, uste da ClyA ezberdinek (ez da zehazki oligomeroaren estekiometria ezagutzen) α -helizez osatutako poro bat eratzen dutela aktinoporinen antzerako α -helizez osatutako poro-lumena eratuz (Hackett et al.; Hunt et al., 2010).

Aktinoporinen familia: Itsas anemonak ekoiztutako toxinak dira. Ikertuenak eta estruktura ezaguna dutenak ekinatoxina II (EqII) , estikolisina II (StnII) eta fragazea C (FraC) toxinak dira. FraC-ren azkeneko X-izpi bidezko ikerketek informazio interesgarria eman dute famili honen estruktura eta ekintza mekanismoari buruz (Tanaka et al., 2015). Aktinoporinak β -sandwich bat eta bi α -helizez osatuta daude. N-muturreko α -helizea izango da mintzean sartu eta poroa eratuko duena. Prozesu hau lipido-menpekoa da guztiz, aktinoporinak esfingomielina behar dute bere poro-erataile aktibitatea burutzeko. Behar hau ez da bakarrik esfingomielinak hartzaile bezala jokatzeko, horrez gain poroaren parte bezala kokatzen da mintzean txertatutako α -helizeen artean kokatuz poroaren lumenean (Tanaka et al., 2015). Beraz, kasu honetan esfingomielinak beharrezko “kofaktore” bezala jokatzeko du hartzaile baino.

1.3.1.2. β -PFT

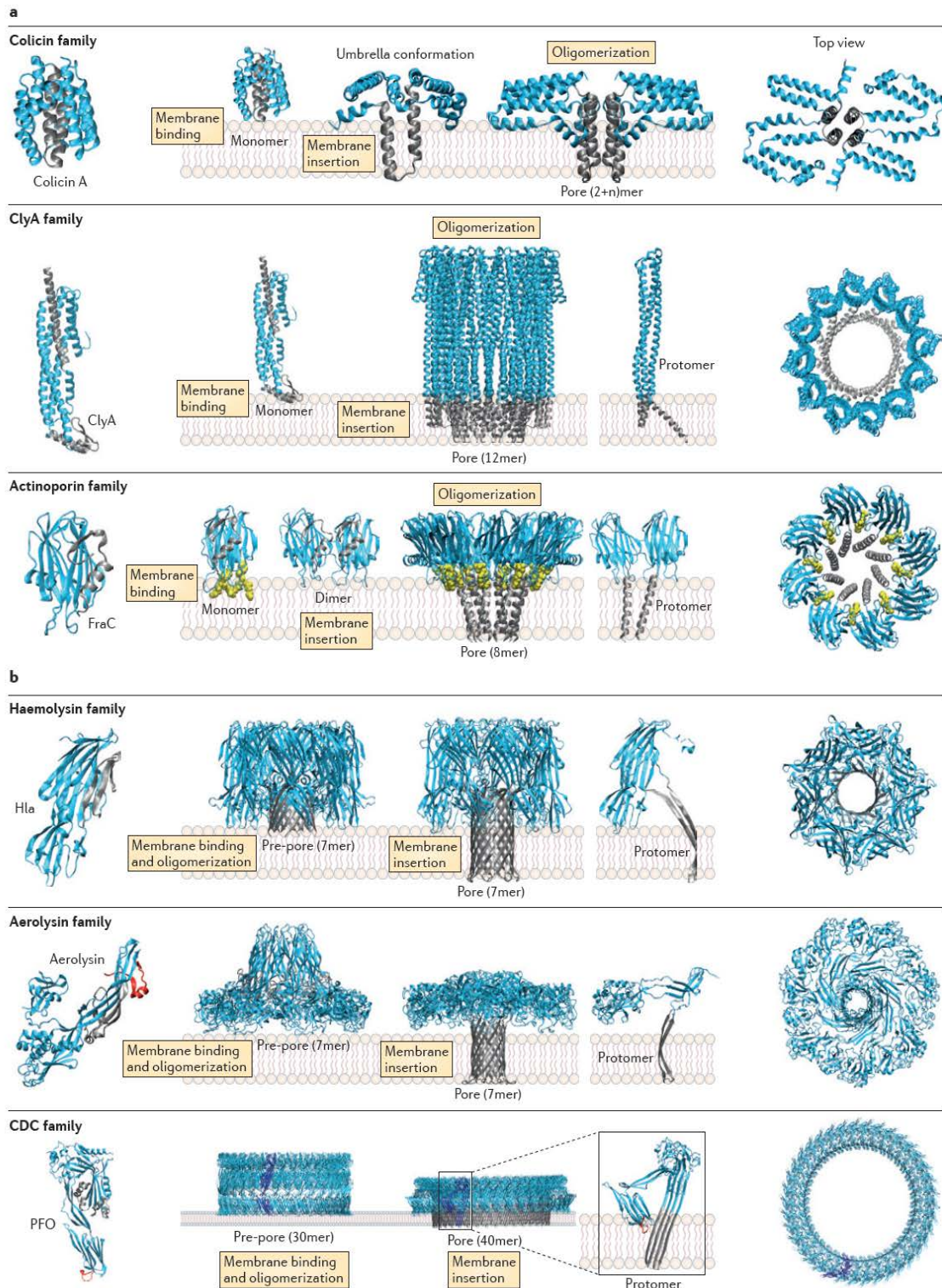
Hemolisina familia: Familia hau *S. aureus* bakterio patogenoak sintetizatzen dituen PFT-ez osatuta dago. Bakterio honek ostalariaren sistema immunea kaltetzeko eta epitelio geruza suntsitzeko PFT desberdin ugari jariatzen ditu, bakoitza funtzio edo itu-zelula espezifiko batekin. Toxina hauek osagai batez edo bi osagaiez osatuta egon daitezke. Osagai batekin α -hemolisina (Hla) dago eta bi osagaiez osatuta, γ -hemolisina AB (HlgAB), HlgCB, leukozidina ED (LukED) edo Panton-Valentine leukozidina daude. Denek estruktura, konformazio eta ekintza mekanismo oso antzekoak dituzte eta desberdintasuna erasotzen duten itu-zelularekiko espezifizitatea da. Beste bakterio batzuetan antzeko toxinak aurkitu dira, Nekrotik enteritis toxin B (NetB) edo *Vibrio*

cholerae-ren VCC kasu. Bakoitzak itu-zelula desberdinak eduki arren, denek egitura eta ekintza mekanismoan antzekotasun handiak dituzte. Toxina hauek β -orrietan ugariak diren monomero trinkoak eratzen dituzte soluzioan. Mintzera batzeko, hartzaile proteikoak (ADAM-10) edo lipidoetara (fosfokolina Hla-ren kasuan) batu daitezke. Mintzera batzean oligomerizatu egiten dira heptameroak eratuz (bi osagaiez osatutako toxinak oktameroak eratzen dituzte, 4 monomero osagai bakoitzeko). Heptameroak preporo konformazioa lortzean mintzean txertatu eta β orriz osatutako kanal bat eratzen du. Kanalaren lumena hidrofilikoa da eta kanpoaldea hidrofobikoa mintzean txertatu ahal izateko. Poro hauek 2 nm-inguruko diametroa izaten dute eta potasioarekiko iragazkorrak izaten dira. Kontzentrazio handietan kaltzio sarrera ere eragin dezake, baina efektu hau gehiegizko dosiarengatik toxinak eragingo duen mintz-desegonkortasunarengatik izango dela uste da, ez poro-kanala kaltzioak zeharkatzen duelako (Vandenesch et al., 2012).

Aerolisina familia: Familia honetan aurkitutako lehenengo toxina *Aeromonas* spp. ekoiztutako aerolisina izan zen. Honetaz gain, *C. perfringens*-en ϵ -toxina eta lektina hemolitikoa dira ikertuenak. Hemolisina familiako toxinak bezala, aerolisinek oso egonkorra den heptamero bat osatzen dute mintzean β -orri osatutako 1,5-2 nm-ko poro bat sortzeko. Bi familien desberdintasunen artean kontuan hartu behar da aerolisina soluzioan domeinu anitzeko monomero bat dela eta proto-toxina bezala jariatua izaten dela (Iacovache et al., 2008). Bere C-muturreko fragmentu bat moztua izan behar da bere aktibitatea burutzeko (Degiacomi et al., 2013). Oligomeroak osatutako β orrizko poroa *S. aureus*-ren Hla-ren poroarekin desberdintasunak ditu, poroaren lumenean dauden aminoazido kargatuetan adibidez (Krause et al., 1998).

Kolesterol menpeko zitolisinen familia (CDC): Gehienbat *Gram*-positibo bakterioek ekoizten dituzten toxina familia handia da (Hotze and Tweten, 2012). *Bacillus*, *Streptococcus*, *Listeria* generoek ekoiztua. Bakterioek funtzio desberdinetarako erabiltzen dituzte: *Listeria*-ren listeriolisina O (LLO) kasuan bakterioa fagosomatik askatzeko, perfringolisina O *C. perfringens*-ek ostalariaren ehunak kaltetzeko edo *S. pneumoniae*-ren pneumolisinak (Ply) hantura erantzuna eragiteko. CDC-ak orain arte azaldu ditugun toxina familiekiko oso desberdinak dira. Desberdintasun handiena eratzen dituzten oligomeroen eta poroaren tamaina handietan dago. Oligomeroak 30-40 monomerotako eraztun antzeko estruktura handiak dira, monomero bakoitzak 50 kDa-ekoa izanik. Oligomero hauek 40 nm-ko poro erraldoiak eratzen dituzte, nondik ioi

desberdinez gain, zelularen zitosoleko proteinak askatu daitezke (Tilley et al., 2005). Monomeroak mintzera batzeko kolesterolaren presentzia beharrezkoa da eta oligomero osoa osatu baino lehen arku-formako bitartekariak eratu daitezke, mintzean poroak eratzeko gaitasunarekin. Arku-motako bitartekari hauek *in vitro* bakarrik agertzen diren, edo zelularen mintzean sortu daitezkeen eztabaidan dagoen gai bat da. Aipagarri bezala, famili honetako perforina proteina, giza immune sistemaren parte da, NK zelulek erabiltzen dute erasotzen dituzten zeluletan gramzinak sartzeko (Metkar et al., 2015).



1.6. Irdia. Poro-eratzailen toxinen famili desberdinen estrukturak eta beraien ekintza-mekanismoak. PFT famili bakoitzeko kide baten monomeroaren ebatzitako estruktura agertzen da. Gero monomeroak mintzera lotzeko duen modua, oligomerizazioa eta poroa eratuko duen konformazioa. ClyA-ren kasuan oligomeroaren estruktura ez da ondo ezagutzen eta irudian agertzen dena konformazio posible bat da. RTX familia ez da agertzen ez dagoelako ebatzitako estrukturarik eta ez dagoelako batera argi ze ekintza mekanismo erabiltzen duten mintzean poroak eratzeko. Irdia Peraro et al. 2016-tik hartuta dago.

1.3.2. RTX toxinen sailkapena

Lehen sakonean azaldutako RTX toxinen familia beste PFT familiekin alderatu eta sailkatzerako orduan zailtasun handiak dakartza (Alouf, 2003). Famili honetako toxina asko identifikatuta eduki arren ez da X-izpi bidezko estruktura osorik orain arte atera. Beraz, toxinek zeluletan eragiten dituzten efektuak ezagutzen dira baina oso gutxi beraien estruktura eta ekintza mekanismotik. Sekuentzia azterketen arabera RTX toxinen poro eraketa gaitasuna C-muturrean dituzten helize hidrofobikoei esker gertatzen da, beraz, α -toxinen taldearen barnean sailkatu beharko lirateke. Honez gain, ez dago informazio fidagarririk toxinek osatzen duten oligomeroaren estekiometriari buruz, edo eratu dezaketen poroaren tamainari buruz. Mintz modeloetan egindako ikerketetan argi ikusten da mintzen konposizio lipidokoak poro-eratzailerik aktibitatean eragin handia duela (Brown et al., 2012; Martín et al., 2004). Informazio guztia sinplifikatuz, RTX toxinen poro-eratzailerik ezaugarriak buruz hau esan daiteke: katioiekiko espezifikoak diren poroak eratzen dituzte, familiako kide gehienetan poro hauek 2 nm inguruko diametroa dute, poroa α -helize bitartez eratzen da, mintzeko konposizio lipidikoak poro-eratzailerik aktibitatean eragina du eta poro hau eratzeko beharrezko monomero kopurua ezezaguna da (Linhartová et al., 2010).

1.3.2 Toxina poro- eratzailerik eta gaixotasun kutzakorrik

Poro-eratzailerik toxinak bakterio patogeno ugari erabilitako proteinak dira. Bakterio patogenikoetan aurkitutako birulentzi faktoreen % 25-30 mota honetako toxinak direnez, bakterio birulentzi faktore garrantzitsuenak kontsideratu daitezke (Gonzalez 2008). Ikusita dago bakterio patogeniko gehienei toxina hauek kentzeak beraien birulentzi gaitasunak ezabatu edo ikaragarri murrizten dietela, eta alderantziz, bakterio ez-patogeniko bati PFT-ak gehitzeak patogeno izateko gaitasuna ematen dio (Los et al., 2013).

PFTen funtzioa bere itu-zelulen mintza zulatzea da, kasu gehienetan zelularen mintz-plasmatikoa, baina zelula barneko organuluaren mintza ere izan daiteke. Orokorrean, funtzio honen helburua itu-zelulen heriotza eragitea, beste birulentzi faktoreen zelula barnerako sarrera erraztea (Collier, 2009), zelula barneko elikagaiak eskuragarri jartzea edo bakterio intrazelularrik fagosometatik askatzea izaten da (Schnupf and Portnoy,

2007). PFT eragiten dituzten efektuak eta ostalariaren erantzunak bi ikuspuntutik aztertu daitezke, zelula-mailan edo organismo-mailan.

Beste kasu batzuetan, PFTak AB toxina baten parte dira. Beraz, bere funtzioa A konposatua zelula barnera sartzea izango da. A domeinua izango da bere ahalmen katalitikoarengatik ostalariaren efektuak eragingo dituen eta PFT konposatuaren funtzioa A ren garraioa izango da. Mota honetako toxina ikertuena *Bacillus anthracis*-en antrax toxina da (Collier, 2009).

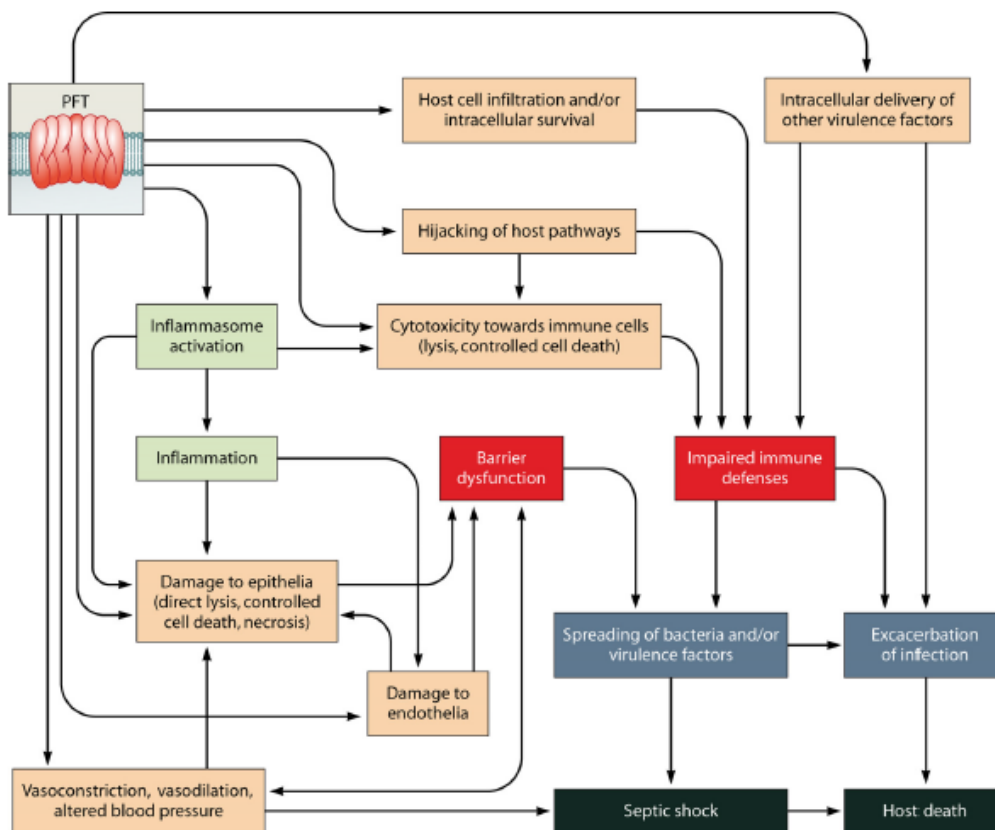
1.3.2.1 PFTek ostalariaren duten eragina eta erantzuna

Orokorki, bi dira PFTak ostalariaren organismoan eragiten dituzten efektu nagusiak: epitelio eta endotelio zelulek osatutako geruzaren kaltea eta erantzun immunearen desregulazio edo inhibizioa.

Epitelio-geruzaren suntsipena: Bakterio patogenoak ostalariaren gorputzeko atal desberdinak kolonizatu eta bertan hedatzeko espezializatuak daude. Geruzaren apurketa hau mekanismo desberdinez lortu daiteke. Toxinek epitelio zelulen heriotza programatua eragin dezakete edo zelula-zelula arteko loturak apurtu, zelulen artean bakterioa pasatzeko tartearak utziz. Geruzaren kalte hau zeharkako efektu bat izan daiteke, hantura seinaleak eragindako gehiegizko neutrofilo migrazioarengatik. Epitelio geruzan eragindako kalteek odol fluxuaren presioan eragin kaltegarriak eduki ditzake ere, kalte nekrotikoak eraginez. Proposatuta da PFTak zelula ez-immuneetan eragindako kalteen helburua bakterioentzako elikagaiak eskuragarri jartzea izan daitekeela. Adibidez, *E.coli*-ren HlyA RTX toxinak eritrozitoak hemolizatzen ditu *in vivo* (May et al., 2000), eta HlyA-ren adierazpena medioan dagoen burdin eskuragarriaren arabera ematen da (Waalwijk et al., 1983). Hala ere, hipotesi hau kasu konkretu batzuk kenduta ez dago ondo frogatua. Ikerlari gehienek arabera, PFTak epitelio geruza kaltetzearen funtsa bakterioari kolonizazio nitxoak aurkitzen laguntzea da (Los et al., 2013).

Erantzun immunearen desregulazioa: PFT askok sistema immunearen desregulazioa eragiteko gaitasuna dute, bai gehiegizko erantzuna, edo sistemaren inhibizioa eraginez. Gehiegizko hantura seinaleen aktibazioak ostalariaren ehunetan kalte handiak eragin ditzake. Bakterioari erantzun immunetik ihes egin edo hau inhibitzen laguntzeko estrategi desberdinak erabiltzen dituzte PFTak. *L. monocytogenes*-en LLO toxinak bakterioa makrofagoen fagosomen barnean bizirautea ahalbidetzen du (Schnupf and

Portnoy, 2007), modu honetan bakterioak erantzun immunearen efektuak ekidinez. Beste era bat sistema immunearen zelulak zuzenean kaltetzea da, beraien heriotza programatua eragiten. Efektu hau toxina askok eragiten dute, *Bordetella pertussis*-en ACT eta *E.coli*-ren HlyA adibidez (Russo et al., 2005). Azkenik, infekzio gunerako neutrofiloen migrazio gaitasuna inhibitzea, ikusi den beste estrategia bat da ere (Lin et al., 2009).



1.7. Irudia. PFTak ostalariaren *in vivo* eragin ditzaketen efektuen ikuspuntu orokorra. Toxina bakoitzak efektu eta bidezidor desberdinak aktibatuko ditu bere ezaugarrien arabera, baina guztien helburua patogenoaren hazkuntza erraztuko dituen baldintzak lortzea da. Ostalariaren defentsak ezin badute efektu hauei aurre egin ostalariaren heriotza gerta daiteke. Irudia Los et al. 2013-tik hartua da.

1.3.2.2. PFT kontrako erantzun zelularra

In vitro egindako ikerketa askotan ikusi da zelulek PFTak eragindako kalteen aurrean defentsak mekanismo eta heriotza zelular mota ugari aktibatze gaitasuna dutela. Ikerketa hauen gehiengoa *in vitro* sistema sinpleetan egiten dira, gehienetan birkonbinatzaile baten purifikazioak zelula mota konkretu batetan eragiten dituen

efektuak aztertuz. Metodo honek defentsa mekanismoen azterketa zehatza eta ulergarria egitea baimentzen du, sisteman aldagarriak diren faktoreak murriztuz. Arazoa sistema honetatik lortutako datuak interpretatzeko orduan dator, zaila delako aztertutako defentsa mekanismoak ostalariarentzako edo patogenoarentzako mesedegarria den interpretatzea. Honekin laguntzeko, azkeneko urteetan ikerketa talde batzuk *C. elegans* nematodoa erabiltzen hasi dira, toxina-zelula sistematik ateratako hipotesiak organismo multizelular baten testatzeko (Los et al., 2011). Aurkitutako defentsa mekanismoak bi erantzun mota orokorretan sailka daitezke: zelula barneko seinalizazio bidezidorrek erregulatutako erantzunak eta mintzaren iragazkortasuna erreparatzeko mekanismoak. Lehenengo taldean MAPK bideak, K^+ irteerak aktibatutako defentsak eta beste seinalizazio bidezidor batzuk aurkitzen dira. Mintz-erreparazio mekanismoak kaltzio sarreran oinarritzen dira beraien aktibaziorako.

MAPK bidezidorra: p38 MAPK kinasak, zelulak PFTen aurrean duten erantzuna erregulatzen duela ikerketa ugarietan ikusi da (Porta et al., 2011). p38 eta bere urbera dagoen JNK kinasen garrantzia poro txikiak (Cry5B) edo handiak (SLO) eratzen dituzten PFTen aurkako erantzunean parte hartzen duela frogatu da. Hau zelulekin *in vitro* egindako esperimentuetan (Porta et al., 2011) eta *in vivo* *C.elegans*-en egindako ikerketetan (Kao et al., 2011). Zelularen mintza iragazkor bihurtzen denean kinasak hau aktibatu egiten da eta oraindik ezezagunak diren mekanismoak aktibatzen ditu zelulak egoera bideragarri bat berreskuratzeko. Bidezidor honen ezagutzan ikerketa ugari daude egiteke, ez dago argi ze proteina “efektore” erabiltzen dituen zelularen baldintza fisiologiko egokiak berreskuratzeko, eta bidezidor honek nolatan detektatu dezakeen zelulak PFTen eraso jasaten ari dela ez dago argi. Mintz iragazkortasunak eragindako ioi-desoreka intrazelularra faktore garrantzitsua da bidezidor honen aktibaziorako (Kloft et al., 2009). Hala ere, ze proteina edo konposatu den zelularen ioi-desorekaren sentore bezala jokatzen duena oraingoz ezezaguna da.

K^+ irteera menpeko defentsa mekanismoak: Itu-zelulen mintzean poroak eratzearen ondorio garrantzitsuenetako bat zelula barneko potasio irteera da. Aerolisinak eragindako potasio irteerak kaspasa-1 bidezko piroptosis (heriotza zelular programatua) aktibatu dezakeela ikusi da (McCoy et al., 2010). Honi kontrajarriz, K^+ irteera bidez aktibatutako kaspasa-1-ek zelularen biziraupenean lagundu dezakeela ere ikusi da SREPB bidezidorra aktibatuz (Gurcel et al., 2006). PFTek autofagia K^+ irteeraren bidez aktibatzen dutela ere ikusi da, zelularen biziraupenerako energi iturriak lortzeko

(Gonzalez et al., 2011b). *S. aureus*-en α -hemolisina, *Vibrio cholerae*-ren zitolisina (VCC) eta *E. coli*-ren HlyA aktibatutako p38 MAPK bidezidorra potasio irteerarengatik dela frogatuta dago (Kloft et al., 2009).

Beste bidezidor batzuk:

Tolestu gabeko proteinen erantzuna (Unfolded Protein Response , UPR): erantzun honen bitartez zelularen proteina sintesia blokeatuta gelditzen da. Ugaztun zeluletan ikusi da aerolisinarekiko erantzunean (Bischofberger et al., 2009).

Hipoxiarekiko erantzun bidezidorra : *C. elegans* Cry toxinarekin tratatzean , HIF-1 (ingelesez “Hypoxia inducible faktor-1 α ”) proteina nematodoaren biziraupenerako beharrezkoa dela frogatu da. Proteina honen adierazpena handitzeak, nematodoa toxinarekiko erresistentea bihurtzen zuen (Bellier et al., 2009).

Intsulina moduko hazkuntza faktorea (ingelesez “Insulin like growth factor 1”, IGF-1): Intsulinarekin hartzaila den DAF-2 galtzeak, *C.elegans* PFT-ekiko erresistentea bihurtzen du (Chen et al., 2010).

Kaltzio menpeko mintz erreparazioa: mekanismo hauen funtsa PFTak sortutako mintz iragazkortasuna gelditzea da, PFTak eratutako poroa mintzetik kenduz. Erreparazio sistema aktibatzeke, PFTak eragindako poroa kaltzioarekiko iragazkorra izatea beharrezkoa da (Andrews et al., 2014). Mekanismo hau zelulak frikzio bidez mintzean sortu daitezkeen apurketa handiak erreparatzeko erabiltzen duena ere da (Draeger et al., 2011). Tesi honetan makrofagoek mekanismo hau ACT toxinak eragindako iragazkortasuna erreparatzeko erabiltzen duten aztertuko dugunez, modu sakonagoan azalduko dugu .

1.3.2.3 Kaltzio menpeko mintz erreparazioa

1950-eko hamarkadan itsas trikuen arrautzetan egindako ikerketetan ikusi zen kaltzioa beharrezkoa zela zelularen mintz apurketak erreparatzeko. Mintza zulatua zuten arrautzak itsas urarekin jartzean bere apurketak erreparatzen zituzten abiadura azkarrean, arrautza bideragarri mantenduz, eta itsas urari kaltzioa kentzean erreparazio hau ez zen ematen (Ponder and Heilbrunn, 1956). Hurrengo hamarkadetan egindako ikerketek ikusi zuten kaltzio sarrerak, mintz kaltetua zegoen puntuan exozitosi bizkor bat eragiten zuela, erreparazioarako beharrezkoa zena (Miyake and McNeil, 1995).

Mintz kaltetua zegoen lekuan besikula intrazelularren akumulazio bat ageri zen, honek pentsarazi zuen kaltzioak besikula intrazelularrak mintz plasmaticoarekin fusionatzea eragin zezakeela (Bi et al., 1995). Honek “adabaki hipotesia” (patch hypothesis) proposatzea ekarri zuen. Hipotesi honen arabera, mintza zulatu edo lokalki apurtzen zenean zelula barneko besikulak zulatutako mintzaren zatiarekin fusionatzen ziren eta horrela kaltetutako gunea ixten zen. Honen arabera, zelulak kanpo mediotik sartzen den kaltzioa, zuloa aurkitzeko sentzore bezala erabiltzen du besikula intrazelularrak kaltetutako gunera joateko (McNeil and Steinhardt, 2003). Adabaki hipotesiaren aldaera bat “tentsio linealaren murrizpen hipotesia” izan zen. Honen arabera besikula intrazelularrak ez zuten beharrez mintz-zati kaltetuarekin fusionatu behar, kalte puntuaren inguruko mintzarekin fusionatzean mintz osoaren tentsioa murriztuko lukete, eta honek mintza espontaneoki ixtea eragingo luke (Togo et al., 2000).

Zelula barneko organulu desberdinen markatzaileekin egindako ikerketetan, frogatu zen mintz kaltetuarekin fusionatzen ziren besikula intrazelular bakarrak lisosomak zirela. *Lamp-1* proteina lisosomala mintz plasmaticoan agertzen zen erreparazioa eta gero, eta zelularen kanpo medioan hidrolasa lisosomalen aktibitatea detektatzen zen (Reddy et al., 2001). Mekanismo hau zehatzago aztertuz, ikusi zen mintz kaltetuarekin fusionatzen ziren lisosomak mintz plasmaticotik gertu aurkitzen diren lisosoma populazio batetik irteten zirela (Jaiswal et al., 2002) eta lisosoma mintzean aurkitzen den Sinaptotagmin VII proteinak “kaltzio-sentsore” bezala jokatzeko zuela lisosomak kaltzio gradientea jarraitzeko mintz kaltetura iritsi arte (Jaiswal et al., 2004). Ikusten denez, prozesu honek neuronetan ematen den neurotransmisoreen jariapenarekin antzekotasunak ditu. *Lamp-1*-en markaketarekin fusio prozesu hau jarraitzean ikusi zen *Lamp-1* ez zela mintz kaltetuaren puntu kontzentratu batean agertzen, zuloaren inguruan modu sakabanatuan agertzen zen (Reddy et al., 2001). Datu hau adabaki-hipotesiaren aurka joango litzake. Hipotesi honen arabera lisosoma mintz gune kaltetuarekin fusionatu beharko litzateke mintzeko zuloa “ixteko”. Beraz, fusio honen funtsa mintzaren tentsioa murriztea zela pentsatu zen, horrela mintza modu pasiboan histeko.

Lisosoma exozitosi bidezko mintz erreparazio mekanismo hau PFTak eragiten zituzten mintz iragazkortasunak erreparatzeko ere erabiltzen zela ikusi zen (Idone et al., 2008). Erabilitako PFTak konplexu oligomeriko oso egonkorak eratzen dituzte. Mintzaren tentsio aldaketa batek poro egonkor hauen ixtea posible izatea zalantza asko dakar eta arrazoi honengatik PFTak eragindako mintz erreparazioa modu sakonagoan aztertu zen.

Ikusi zen SLO toxinak erasotako zeluletan endozitosi ugari eta bizkorra ematen zela, iragazkortasuna sortu eta segundoetara. SLO toxinak estalkirik gabeko besikula handietan (300-500 nm) ikusten ziren zelula barnean, denboran zehar besikula hauek besikula anirtzeko gorputzak bihurtu eta lisosometan bukatzen zuten (Corrotte et al., 2012). Ikerketa honetatik ondorioztatzen da kaltzio menpeko lisosoma-mintz plasmatico fusioa, kaltetutako mintz zatiak modu azkar batean endozitatzeko mekanismo bat dela. Prozesu hau egoki eramateko kaltzio sarrera handi bat eta ATP kontsumoa beharrezkoa zirela ikusi zen (Idone et al., 2008).

Azkeneko ikerketen proposamenen arabera, PFTak zelularen mintzean eratzen dituzten poroak deuseztatzeko, azaldutako endozitosi mekanismoaz gain, exozitosi bidezko mekanismo bat ere existitzen da, kaltetutako mintz zatiak jariatuak izateko. Azken ikerketen arabera ESCRT proteina konplexuak jariapen prozesu hau erregulatuko luke (Jimenez et al., 2014). Beste ikerlari batzuen iritziz, kaltzioarekiko sentikorrak diren anexinak izango lirateke prozesu honen erregulatuzaileak (Potez et al., 2011). Askotan ikusi da SLO bezalako toxinak mintzean “bleb” deituriko protuberantziak sortzen dituela, baina gehienetan bleb hauek erlaxatu eta mintzaren parte izatera itzultzen dira, exozitatuak izan gabe. ESCRT bidez jariatzen diren besikulak ohiko bleb-ak baino txikiagoak izaten dira (50 nm-ko diametroa) eta mekanismo hau mintzeko kalte txikien erantzunean bakarrik parte hartuko luke (Jimenez et al., 2014). ESCRT inguruko ikerketak orain dela gutxiak dira eta oraindik prozesu hau ikertzeko zailtasunak daude. Zailtasun handia dakar erreparazioak sortutako exosomak zelulak pasiboki jariatzen dituen mintz zatietatik bereiztea, biek duten tamaina txiki eta antzekoarengatik. Oraingoan prozesu honen mekanikak ikerketa gehiago behar ditu.

Azaldutako endozitosi eta exozitosi bidezko erreparazio erantzunak ez dira kontrajarriak eta posiblea da biak batera jardutea. Hala ere, ikusi den endozitosisia hain bortitz eta ugaria izanda, mintzean zegoen toxina gehiena gero zelula barnean agertzen dela ikusita, eta endozitosiaren inhibizioak mintz-erreparazioa guztiz inhibitzen duela frogatuta, iradoki daiteke kaltzioak aktibatutako erreparazio-mekanismoa funtsean endozitosi prozesu erregulatu bat dela (Andrews et al., 2014).

Lisosomak mintz plasmaticoarekin fusionatzean bere lumen-eko proteinak mintz plasmaticoaren kanpo aldera askatzen dira. Lisosomek bere barnean 50 hidrolasa baino

gehiago dituzte (Saftig and Klumperman, 2009) eta hauek lehen azaldutako endozitosi prosezuan zereginik zuten jakitea ikerketa talde desberdinen helburu izan zen .

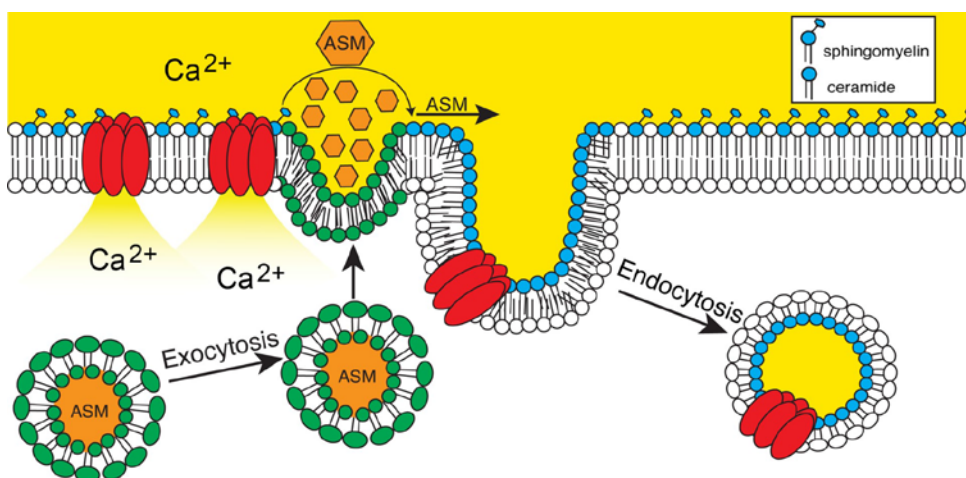
Aztertuta zegoen esfiengomielinasa entzima zelulei gehitzean endozitosisia areagotzen zela eta estalki-gabeko endosoma irregularrak agertzen zirela momentuan ATP gastu beharrik gabe (Zha et al., 1998). Esfiengomielinasa, esfiengomielina zeramida bihurtzen duen entzima da eta zelulan dauden mota desberdinetatik, esfiengomielinasa azidoa da lisosoma barnean kokatzen dena (Saftig and Klumperman, 2009). Datu hauetan oinarrituz, Andrews-en taldeak entzima honek mintz-erreparazioan zuen garrantzia aztertu zuen. Ikerketa honetan frogatu zen ASM-ren aktibitatea beharrezkoa zela SLO toxinak eragindako mintz-iragazkortasunaren erreparazio azkarra emateko (Tam et al., 2010). Horretaz gain, ikerketa desberdinek frogatu zuten mintz plasmaticoan zeramida-plataformak eratzen zirela eta hauek PFT ekoizlea den *Pseudomonas aeruginosa* bakterioen aurka erantzuteko beharrezkoak zirela (Grassmé et al., 2003).

Zeramidaren aintzindaria esfiengomielina da. Esfiingolipido hau animalia zelulen mintz-plasmaticoaren kanpo aldean kontzentrazio altuan dago, baina bere zeramidarako bihurtzea prozesu oso erregulatua da seinalizazio bidezidor askoren aktibatzaile izan daitekelako. Arrazoi honengatik mintz plasmaticoan zeramida gutxitan agertzen da. Zeramida ezaugarri bereziko lipidoa da, berarengatik bakarrik osatutak domeinuetan antolatzeke joera du eta kurbatura negatiboa du . Liposometan egindako ikerketetan ikusi da esfiengomielinasak berak mintzaren inbaginazioa sortzeko gaitasuna duela. Ikerketa hauetatik iradoki daiteke zeramida-plataformak eratzeak, espontaneoki mintzaren inbaginazioa eta endozitosisia eragin dezakela. Gainera, esfiengomielinasa gehituz zeluletan sortzen diren endosomak SLO toxinen erreparazio-erantzunean agertzen diren endosomen antzekotasun handiak dituzte (Tam et al., 2010). Kanpotik gehitutako esfiengomielinasarekin eta SLOren erreparazio erantzunean gertatzen den endozitosisia dinaminarekiko independentea dela ikusi da ere (Corrotte et al., 2013).

Fibroblasto, epitelio eta muskulu eskeletiko zeluletan egindako azkeneko ikerketetan ikusi da mintz kaltetuaren inguruan pilatzen diren endosomak kabeolak direla (Corrotte et al., 2013). Kabeolak kabeolina proteinak eratutako mintz-plasmaticoaren inbaginazio txikiak (50-80 nm) dira, kolesterol eta esfiengomielinan aberatsa den konposizio lipidikoarekin (Parton and Simons, 2007). Konposizio lipidiko honek zerikusi handia du azaldu dugun erreparazio mekanismoarekin: kolesterol murrizketak

mintz-erreparazioa eta endozitozia inhibitzen du (Tam et al., 2010) eta esfingomielina zeramidaren aintzindaria da . Gainera, kabeolak zeramidarekin elkarrekintzan antzemandu da (Parton and Simons, 2007). Hau horrela izanik, ondoriozta daiteke kabeolak ASM entzimak endozitosia eragiten duen guneak direla, egestura hauek mintz-erreparazioaren osagai bat bezala kontsideratuz. Hala ere, hau zelula motaren arabera izango da, zelula mota batzuetan kabeolaren espresioa oso urria delako, leukozitoen kasuan adibidez (Parton and Simons, 2007).

Azaldutakoa laburbilduz, kaltzio sarrera eragiten duten PFTek eragindako mintz-iragazkortasuna erreparatzeko zelulak duen mekanismoa hau da: Toxinaren poroak eragiten duen kaltzio sarrerak lisosomak mintz-plasmaticoarekin fusionatzea eragiten du, kaltzio iragazkortasuna dagoen mintz zatitik gertu. Fusio honek lisosomaren lumenean dagoen ASM entzima mintz plasmaticoaren kanpoaldera askatzen du, eta hori esfingomielina zeramidan bihurtzen du, zeramida plataformak eratuz. Zeramida-plataformek mintzaren inbaginazioa eragiten dute eta mintz zati hau endozitatua izango da. Eraturako endosomak tamaina txikikoak eta estalki-gabekoak dira eta beste endosomekin fusionatzen joango dira lisosomekin batu eta toxinaren degradazioa eman arte. Prozesua guztia minutu gutxitan ematen da. Endozitosiaz gain, zelulak ESCRT proteina konplexuaren bidez, toxina dagoen mintz zatia jariatu egin dezake exosoma moduan. Bi prozesu hauei laguntzen anexina proteinak egon daitezkeela uste da (Babiychuk and Draeger, 2015). Anexinak , poro inguruan dauden PS lipidoei batuz, proteina bloke handi bat era dezakete toxinaren porotik material zitosoliko gehiegi ez askatzeko.



1.8. Irudia. Ca²⁺ menpeko lisosoma exozitosi-endozitozi erreparazio mekanismoa.

Toxinaren poroak eragindako Ca²⁺ sarrerak lisosomak mintz plasmaticoarekin batzea eragiten du. ASM entzima lisosomala mintz plasmatikora askatuko da eta esfingomielina zeramidan bihurtuko du. Eratutako zeramidak mintzaren inbaginazioa eragingo du eta hionek toxinaren endozitozia, zelula barnean degradatua izateko. Idone et al. 2008-tik hartua.

1.4 Heriotza zelularra

Lehen azaldutako erantzun eta erreparazio mekanismoak poro-eratzailen toxinen efektuei aurre egiteko nahikoak ez direnean, zelulak heriotza zelularra jasaten dute. Zelula batek heriotza zelularra jasan duela adierazteko, irizpide morfologiko hauetatik gutxienez bat bete beharko du NCCD-ak (ingelesez “The Nomenclature Committee on Cell Death”) proposatzen duenaren arabera: mintz plasmaticoaren osotasunaren galera, nukleoaren guztizko zatiketaren ondorioz eraturako “gorputz apoptotikoen” agerpena edota inguruko zelula zatikien barneraketa (Kroemer et al., 2009). Heriotza motak hiru mota nagusietan sailkatu dira historikoki, zelulak erakusten dituzten ezaugarri morfologikoen arabera. **I motako heriotza** zelularra, apoptosi bezala ezagutua, zeluletan ematen diren ezaugarri morfologiko bereizgarri batzuegandik dago definitua: kromatinaren kondentsazioa (pyknosis) eta fragmentazioa (karyorrhexis), zelularen uzkuradura eta gorputz apoptotikoen eraketa. **II motako heriotza** zelularrak autofagia bidezko bakuolizazio zitoplasmaticoa du ezaugarri nagusizat. **III. motako heriotza** zelularra nekrosi bezala ezagutzen da eta askotan I eta II motako ezaugarriak ez dituen heriotza mota bezala definitu da. Bere ezaugarriak zelulen “puztea” edo bolumen handipena eta mintz plasmaticoaren haustura bizkorra dira. Historikoki I eta II motako heriotzak heriotza-programatu bezala sailkatu dira, eta nekrosia era pasibo eta kontrolik gabean gehiegizko kalte batengatik gertatzen zen heriotza bezala definitzen zen. Aurrerago komentatuko dugunez azkeneko hamarkadako ikerkuntzek sailkapen hori berrikustea eragin dute (Festjens et al., 2006).

1.4.1. Apoptosia

Apoptosi deritzon prozesua 1972 urtean aurkitu zen. Gorputzaren garapenean, zelulak uzkurtuz gorputzaren homeostasia mantentzeko modu ez-patologikoan hiltzen zirela ikustean, prozesu honi apoptosia deitu zitzaion (Kerr et al., 1972). Aurrerago *C. elegans* nematodoarekin egindako ikerketetan heriotza mota hau genetikoki kodifikatutako proteinen bidez bideratua dagoela ikusi zen, horrela heriotza programatu bezala sailkatuz (Hengartner et al., 1992). Hurrengo urteetan egindako ikerketek erakutsi zuten apoptosiak garrantzi handia duela zelulen garapen fisiologikoan eta gorputzaren homeostasiaren mantentzean, kaltetuak dauden zelulak hantura erantzun bat eragin gabe ezabatu ahal izateko (Golstein and Kroemer, 2007). Horretaz gain, patogenoen infekzio desberdinen aurkako erantzun bezala ere jokatzen du. Gorputzaren funtzionamendurako garrantzizkoak diren hainbeste prozesuetan parte hartzean, apoptosiaren desregulazioak gaixotasun desberdinak ekarri ditzake. Adibidez, gutxieneko apoptosiak minbizia eta gaixotasun immunologikoekin dauka zerikusia eta gehiegizko apoptosiak, ordea, kalte neurologiko eta gaixotasun kardiobaskularrak ere ekar ditzake (Strasser et al., 2011). Horrelako garrantzia edukita prozesu hau oso ikertua izan da azkeneko hamarkadetan eta bere betearazte eta erregulazioan parte hartzen duten mekanismo eta bidezidorren ezagutza sakona daukagu beste heriotza motekin alderatuz.

Apoptosia modu honetan definitu daiteke: zelularen heriotza eragiten duen genetikoki kodifikatutako mekanismo zelularra, gorputzaren garapena betetzeko edo inguruneke seinaleei erantzuteko burutua. Morfologikoki ezaugarri hauek betetzen dituzte zelula apoptotikoek (Galluzzi et al., 2014):

- Zelulak uzkurdura edo bolumen murrizketa bat jasaten du baina organuluek ez dute aldaketa esanguratsurik jasaten. Zitoeskeletoaren berrantolaketarengatik zelularen borobiltzea ematen da. Prozesu hau zelularen mintzeko kanal desberdinez ondo erregulatuta dago eta nahitaezko ezaugarria da apoptosia modu egokian betearazteko (Lang et al., 2006).
- Nukleoak aldaketa sakonak jasaten ditu: kromatina kondentsazioa eta DNA apurketa

- Zelularen zatiketa gorputz apoptotikoak deituriko besikuletan. Gorputz apoptotikoak makrofagoengatik fagozituak izango dira modu azkarrean hantura-erantzunik eragin gabe.

Zelularen morfologiaz gain, apoptosi prozesuak markatzaile biokimiko desberdinen bidez identifikatu daiteke. Ezagunenak zelularen mintz plasmaticoaren kanpoaldean PS agertzea, zelulak bere mintzaren osotasuna mantentzea, kaspasen aktibazioa eta DNAREN degradazioa dira (McConkey, 1998). Prozesu hau bi bidezidor nagusiengatik erregulatuta dago: bidezidor estrintsekoa eta intrintsekoa

1.4.1.1 Apoptosi bide intrintsekoa

Apoptosiaren bide intrintsekoa ebolutiboki oso kontserbatua dagoen bidezidorra da eta mitokondria bidezidor intrintsekoa bezala ere izendatzen da. Bide hau zelularen homeostasia kaltetzen duten kalte edo estres desberdinek aktibatzen dute, estimulu hauen artean DNA kaltea, estres oxidatiboa, proteina destolestuen presentzia erretikulu plasmaticoan edo hipoxia izan daitezke (Youle and Strasser, 2008).

Prozesu honen gertaera garrantzitsua mitokondriaren kanpo mintzaren iragazkortze prozesua (ingelesez “Mitochondrial outer membrane permeabilization”, MOMP) da. Mekanismo honen bidez mitokondrioaren mintz arteko guneetan dauden faktore pro-apoptotikoak zitosolera askatzen dira bidezidor apoptotikoen aktibazioa eraginez (Tait and Green, 2010), honez gain mitokondrioaren funtziorako beharrezkoa den mintz potentziala galduko da. Faktore hauen artean c zitokromo , SMAC/DIABLO, OMI/HTR2A, AIF eta G endonukleasa daude. MOMP Bcl2 familiako proteinengandik erregulatua dago, non proteina pro-apoptotikoak eta anti-apoptotikoen bidez MOMP noiz ematen den erregulatzen dute (Youle and Strasser, 2008). MOMP gertatzerakoan c zitokromoa APAF-1 proteinari batuko zaio eta plataforma honek kaspasa-9 batu eta aktibatuko du apoptosoma deituriko konplexua eratuz. Kaspasa-9ak kaspasa-3,6 edo 7 aktibatuko ditu eta kaspasa efektore hauek apoptosi prozesua modu itzulezunean burutuko dute. MOMP bidez askatutako AIF eta G endonukleasa nukleora translokaturiko dira eta kromatinaren kondentsazioa eta DNA apurketa burutuko dute (Susin et al., 2000).

1.4.1.2 Bide estrinsekoa

Bide estrinsekoa mintz plasmaticoan dauden hartzaileengatik aktibatua da. Hartzaile hauek TNFR gene superfamiliakoak dira eta alde zitosolikoan “heriotza domeinu” bat duten mintz proteina trimerikoak dira. Ligandoa hartzaile hauei batzean heriotza apoptotikora eramango duen bidezidorra aktibatutako dute. Ligando/hartzaile ikertuenak hauek dira: FasL/FasR, TNF α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 eta Apo2L/DR5 dira (Elmore, 2007).

Hoberenik ikertuta dagoen bidezidorra FasL/FasR-rena da. FasR FasL hartzaileari batzean, hartzaileak aldaketa konformazionala jasaten du eta honek zitosol gunean heriotza-domeinudun proteinak erakarriko ditu (RIPK1, FADD, cFLIP) eta DISC izeneko superkonplexua eratuko dute (ingelesetik “Death-Inducing Signaling Complex). DISC-ek kaspasa-8 eta 10-en aktibazioa eragingo du, jarraian azken hauek apoptosiaren exekutatzaileak diren kaspasa-3/7 aktibatuz (Lavrik et al., 2005).

1.4.2. Heriotza autofagikoa

Zelulen heriotza autofagiko terminoa bakuolizazio zitoplasmatico masiboa ezaugarritzat duten zelulen heriotza deskribatzeko erabilia izan da. Hala eta guztiz ere, autofagia-prozesuak zelulen heriotza eta biziraupenean duen eginkizun bikoitzaren inguruan eztabaida handia dago (Boya et al., 2005). Autofagiak bizi-luzeko proteinen, zelula agregatuen eta kaltetutako organuluaren degradazio eta birziklapenaren bidezko garbiketa prozesuan daukan garrantzia aski ezaguna da (Yang and Klionsky, 2010). Ezagunak diren autofagia klase desberdinen artean, makroautofagia da gaur egunera arte gehien aztertua izan den autofagia mota. Prozesu honen ezaugarri bereizgarrienak ondorengoak dira: kromatinaren kondentsazioa, bakuolizazio zitoplasmatico masiboa eta lisosomekin fusionatzen duten autofagosomen metatzea (autolisosomak emateko) (Mizushima et al., 2008).

1.4.3. Nekrosia

Nekrosia atzera bueltarik gabeko kalte zelularren ondorioz sortutako aldaketen multzoa da. Gehiegizko estres fisiko edo kimikoek eragindako kalteengatik zelulek bere

mintzaren osotasuna galtzen dute, mintza zuzenki kaltetzen delako edo energi mailen murrizketarengatik mintzaren osotasuna mantentzeko gai ez izateagatik. Mintz osotasun galera honek zelularen osagaiak zelularen kanpo-mediora askatuak izatea eragiten du, gorputzean hantura erantzuna eraginez (Zong and Thompson, 2006). Zelula nekrotikoek ezaugarri morfologiko hauek betetzen dituzte: organuluen eta zitoplasmaren puzketa edo bolumen handipena (onkosis) eta mintz plasmaticoaren osotasunaren galera goiztiarra. Historikoki, nekrosia zelulak kontrolatu ezin duen gertaera pasibo bat bezala definitu da. Hala ere, azken urteetako ikerketek ikuspuntu hori eraldatu dute. Jakina, kalte ez-fisiologikoekin (izozketa zikloak edo garbigarriekin tratatuz) zelulak era deskontrolatu eta pasiboan hiltzen dira baina ikusi da fisiologikoki eman daitezkeen kalteen aurrean zelulak era nekrotikoan hiltzen direnean, gertaera molekular zehatzak errepikatzen direla zelula mota desberdinetan (Vanlangenakker et al., 2008). Honek nekrosia transdukzio-seinale eta mekanismo kataboliko ezberdinek erregula dezaketen prozesu bat bezala kontsideratzera eramaten du (Golstein and Kroemer, 2007). Honen arabera, nekrosia, gorputzak bere osotasuna arriskuan jarri dezakeen kalte bateri erantzuteko erabiltzen duen “arrisku alarma”-ren funtzioa betetzen duen prozesua dela iradoki daiteke, gorputzak erantzun immune egokia emateko. Nekrosian ikusten diren gertaera molekularrak hauek dira: zelularen eta organuluen mintz potentzialaren galera azkarra, mitokondrioaren funtzio galera, ROS-en areagotzea, barne zelulako kaltzio kontzentrazioen igoera, lisosomen mintzen iragazkortasuna eta kaspasa ez diren proteasen aktibazioa. Ikusi denez, zaila da jakitea gertaera hauek sekuentzia jarrai bat osatzen duten, beraien artean potentziatu egiten direlako “feedback-positiboak” eratuz (Festjens et al., 2006). Gertaera molekular hauen ondorioak zelularen galera bioenergetikoa eta mintz plasmaticoaren osotasunaren galera dira.

- **Funtzio mitokondrialaren galera:** Eragile desberdinengatik mitokondrioaren iragazkortasun-trantsizioa (ingelesez *Mitochondrial permeability transition, mPT*) ematen da (Hunter and Haworth, 1979). Prozesu honek mitokondrioaren mintzean poroak eragingo ditu, mitokondrioaren barne mintzeko potentziala galduz. Poro eraketa hau osagai desberdinengatik erregulatuta dago, CypD garrantzitsuena izanik (Javadov and Kuznetsov, 2013). Barne mintzeko potentziala galdua, arnas kateak ezin du modu egokian lan egin eta ATP

- ekoizpenaren murrizketa ematen da. mPT-aren eragile ezagunen artean ROS eta Ca^{2+} igoera aurkitzen dira (Vanlangenakker et al., 2008).
- **ROS** (ingelesetik *Reactive Oxygen Species*) ekoizpena: ROS gehiegizko ekoizpenak eragindako estres oxidatiboak kalte handiak eragin ditzake zelulako osagai anitzetan. Adibidez, mitokondrioko arnas katearen osagaiak kaltetu ditzake hauek ROS gehiago ekoiztea eta ATP murrizketa areagotzea eraginez.. ROSeK lipidoen peroxidazioa eragin dezake mintzen osotasuna kaltetuz, eta hauek lisosomen mintzen edo mintz plasmaticoaren iragazkortasuna eragin dezake (Festjens et al., 2006).
 - **Kaltzio igoera:** Kaltzioa Krebs zikloaren areagotzaile garrantzitsua da eta bere balore homeostatikoa galtzeak mitokondrioaren funtzioen galera eragin dezake ROS ekoizpena areagotuz (Zong and Thompson, 2006). Mitokondrioko fosforilazio oxidatiboa eman ezin ez denean zelulak glikolisi bidez lortzen du ATPa zitosolean. Gehiegizko glikolisi batek zitosoleko azidosia eragin dezake, mintzeko ASIC Ca^{2+} kanalak aktibatu ditzake (ingelesetik Acid Sensing Ion Channels) zelulan Ca^{2+} sarrera eraginez eta azaldutako efektuak areagotuz (Xiong et al., 2004). Azkenik, kaltzio sarrerak kalpaina proteasak aktibatu ditzake eta hauek mintzeko $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kanala protealizatu dezake, zitoplasmako kaltzio kontzentrazioa gehiago handituz (Yamashima, 2004). Honetaz gain kalpainen aktibazioak zelularentzako kaltegarriak diren efektu ugari ditu: zitoeskeletoaren degradazioa edo mintz-lisosomalaren apurketa, katepsinak zitosolera askatuz (Golstein and Kroemer, 2007). Efektu honi kalpaina-katepsina bidea deritzo, eta neuronen nekrosian garrantzi handia izan dezakeen bidezidorra del uste da (Yamashima, 2004).
 - **Lisosoma mintzaren iragazkortasuna** (ingelesezt *Lysosome Membrane Permeabilization ,LMP*): Lisosomaren mintza kaltetzean, bere barnean dauden hidrolasa azidoak zitosolera askatzen dira. Hauetatik garrantzitsuenak katepsinen familiako proteasak dira (Boya and Kroemer, 2008). Katepsina B eta D-a bere aktibitate egokia burutzeko lisosomen ingurumen azidoa behar dute, baina zitosoleko pH neutrorra askatuak izatean bere aktibitatearen ehuneko garrantzitsu bat mantentzen dute eta zelularen osagai askoren proteolisia eragiten dute, zelularen nekrosia eraginez. LMP-a eragin dezaketen konposatu asko ezagutzen dira, hauetatik garrantzitsuenak: ROS, kalpainak, zeramidatik eratutako

esfingosina, cPLA2, Bcl-2 familiko BAX proteina, katepsina B berak eta toxina desberdinak (Boya and Kroemer, 2008).

1.4.4 Apoptosi eta nekrosi bidezidorren elkarrekintzak

Ezaugarri morfologiko desberdinak eta kontrako hantura erantzunak eragin arren, ikerlari askoren ustez apoptosiak eta nekrosiak mekanismo biokimiko ugari partekatzen dituzte eta prozesu berberaren mi muturreko egoera bezala ulertu daitezke (McConkey, 1998; Vanlangenakker et al., 2008). Hemen azaldutako azalpenetan argi ikusi daiteke eragile berberak bi prozesuetan parte hartzen dutela: mitokondrioaren funtzio galera, Ca^{2+} igoera, ROS ekoizpena edo lisosomen mintz iragazkortasuna. Dirudenez, faktorearen natura baino, eragiten duen kaltearen tamainak eta honi zelulak erantzuteko duen gaitasunak erabakitzen du zelularen heriotzak ze bidezidor hartuko duen. Faktore hauetatik erabakigarriena zelularen energi maila edo ATP eskuragarritasuna da. Lehen azaldu dugun bezala, apoptosiaren aktibazioan apoptosomaren eraketa ATP menpeko prozesua da. Bestetik, apoptosian zehar zelulak jasango dituen aldaketa morfologikoak (zelularen uzkurdura, gorputz apoptototikoen eraketa) era ordenatuan eta mintzen osotasuna mantenduz burutzeak ATP behar esanguratsua duten prozesuak dira. Beste ikerketa batzuetan ikusita dago zelulak duen ATP mailaren arabera estimulu berberarekiko apoptosi edo nekrosi bidez hilko dela (Eguchi et al., 1997; Leist et al., 1997). Gainera ikerketa horietan ikusi zen apoptosi prozesuan zehar zelulak ez zuela ATP murrizketa bortitzik erakusten, nekrosian ikusten zen bezala. Estaurosporina eragile bezala eta zelulak glukosa maila desberdineko medioetan inkubatuz ikusi zen zelulak tratatu gabeko kontrolaren ATP mailaren %50 gutxiagotik aurrera estimulu apoptotiko bati nekrosia burutuz erantzuten zutela, ATP ehuneko hau zelulak apoptosi prozesua modu egokian burutzeko behar duen mugari bezala ezarriz (Leist et al., 1997). Beste ikerketa batzuek mugari hori %15-25ean ezarri zuten (Lieberthal et al., 1998). Bestalde, aktinomizina A-rekin (arnas katea kaltetzen duen konposatua) egindako ikerketetan ikusi da apoptosi prozesua aktibatuta eta martxan egon arren zelulak ez badu prozesua aurrera eramateko energia nahikorik heriotza nekrotiko bat jasango duela. Beraz, heriotza mota honek apoptosi eta nekrosi ezaugarriak partekatzen dituenek, **aponekrosi** izenarekin definitu da, hau da, aktibatua eta bideratua egon arren, estres energetiko edo gehiegizko kaltearengatik burutu ezin den eta nekrosi bezala bukatzen duen prozesu apoptotikoa (Formigli et al., 2000; Pretorius and Bornman,

2005). Prozesu honen energi beharrekin jarraituz, aipatzekoa da mitokondrioaren mintz potentzialaren galera bi prozesuen hasierako ezaugarria izan daitekeela .

ATP mailaz gain, kaltzio sarrerak eta ROS ekoizpenak zelula apoptosi edo nekrosi bidez hilko den erabakiko dute. Kaltzio ionoforoek, kontzentrazioaren arabera, bi erantzunak eragin ditzaketela ikusi da (McConkey, 1998). Zitosoleko kaltzio kontzentrazio igoera moderatu batek (200-400 nM) apoptosia eragin dezake eta kontrolik gabeko Ca^{2+} igoera bortitz eta iraunkor batek (1 μM inguru) zelulen nekrosia eragingo du. Nekrosi honek seguraski lehen aipatutako kalpaina proteasen aktibazioarekin zerikusia izango du (McConkey, 1998). Hala ere, kaspasa ez diren proteasa ezberdinen aktibazioa ez dago nekrosiarekin bakarrik erlazionatuta. LMPren bidez zitoslara askatutako katepsinek apoptosia eragin dezaketela ikusi da, faktore proapoptotikoak aktibatuz (Boya and Kroemer, 2008). ROS ekoizpenarekin antzekoa gertatzen da; orain dela urte askotatik jakin da zelula apoptotikoek estres oxidatiboa jasaten dutela eta estres hau ekiditeak apoptosiaren aktibazioa ekiditen duela (Hockenbery et al., 1993), baina estres hau gehiegizkoa denean kaspasen inhibizioa ekarri dezake eta , lehenago azaldu dugun bezala, nekrosira eramango duten efektuak eragingo ditu (Festjens et al., 2006).

Azkenik, apoptosiaren markaitzaile den mintz plasmatikoko PS esposizioa aipatu behar da. Markaitzaile hau askotan erabili da apoptosi/nekrosi zelulak bereizteko, baina azken urteetako ikerketek adierazten dute ezaugarri hau ez dela uste zena bezain bereizgarria. PS esposizioa kaspasa bidezko ATP11C flipasaren inaktibazioa eta XKR8 eskranblasaren aktibazioarengatik ematen da, biak modu itzulezinean emanaz kaspasaren proteolisiarengatik (Segawa and Nagata, 2015). Hala ere, zelula barneko Ca^{2+} igoera ATP11ren inaktibazioa eta TMEN16F eskramblasaren aktibazio itzulgarria eragiteko gai da, zelulak mintz plasmatikokoaren kanpo aldean PS edukitzea eraginez. Aktibazio/inaktibazio hau era itzulgarrian izan arren, nekrosian dauden zelulak ez dituzte bere Ca^{2+} mailak kontrolatzen eta zelulak prozesu nekrotiko guztian zehar Ca^{2+} maila altuak eduki ditzake. Beraz, teorikoki posiblea da zelula batek PS esposizioa edukitzea nekrosia jasaten egon arren. Gainera, aipatutako flipasa eta eskramblasa hauek bere aktibitatea burutzeko ATP beharra dute. Ikerketa desberdinetan ikusi da nekrosiaren hasieran puztutzen ari diren zelulek (onkosi) PS esposizioa eduki dezaketela (Krysko et al., 2004; Lecoœur et al., 2001).

Ebidentzia guzti hauek batuz iradoki daiteke apoptosiak eta nekrosiak antzeko bidezidorrak partekatzen dituztela. Bi prozesuak bereizten dituen ezaugarri garrantzitsuena apoptosia kaspasa apoptotikoen bidez bideratutako bidezidorra dela, eta nekrosia kaspasekiko independentea dela onartu daiteke. Ikuspuntu morfologikotik, zelula apoptotikoak mintz osotasuna mantentzea eta zelularen bolumen murrizketa, nekrositik argi bereizten dituen ezaugarriak dira. Hala ere, *in vitro* saioetan ezaugarri honekin kontu handia eduki behar da zelula apoptotikoek denboran zehar nekrosi sekundarioa jasaten dutelako, eta bi prozesuen desberdintasuna mintz iragazkortasuna gertatzen den zinetika da. Erantzun immunean argi dago apoptosiak hantura inflamazio erantzun isila dakarrela, eta nekrosiak erantzun hau areagotzen duela.

1.4.5. Nekrosi programatuak

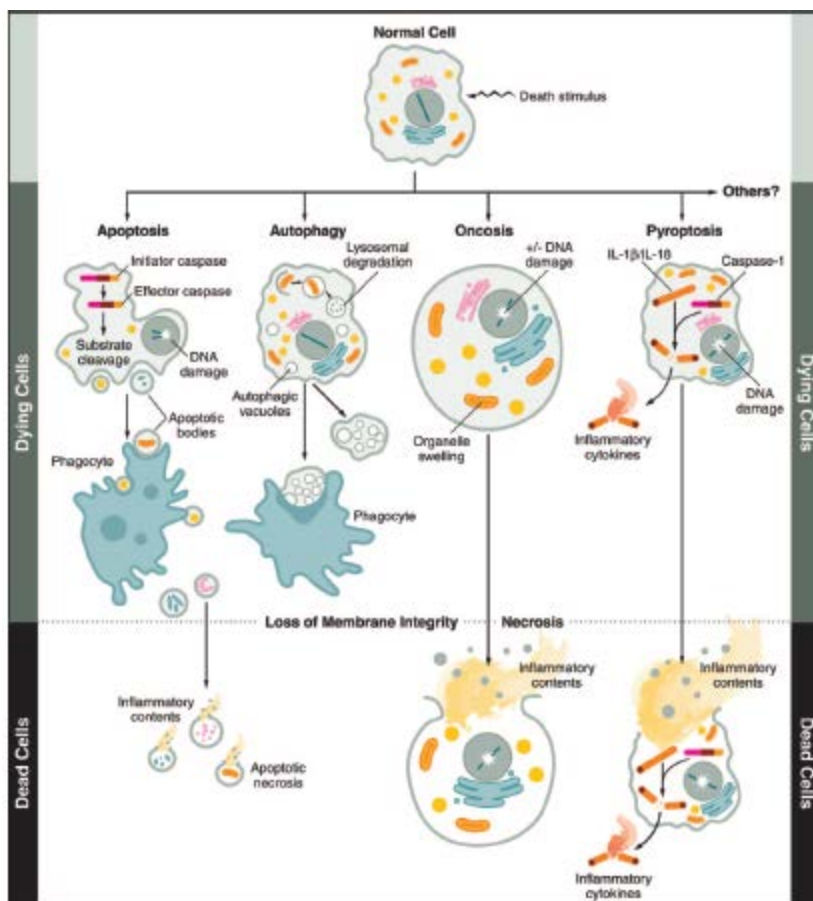
1.4.5.1. Nekroptosia

Nekroptosia RIPK kinasek bideratutako eta kaspasekiko independentea den nekrosi ezaugarriak dituen heriotza programatua da. Heriotza honen bidez zelulak mintzaren osotasuna galdu eta lisia jasango du, hantura erantzuna emanaz (Kearney and Martin, 2017). Uste da mekanismo hau kaspasak inhibitzeko gaitasunak dituzten patogenoen kontrako defentsa mekanismo bezala erabiltzen duela zelulak (Mocarski et al., 2015). Estimulu hauen aurrean, RIPK-1 fosforilazio bidez aktibatzen da. Honek RIPK-3 batzen du eta oligomerizazioz **nekrosoma** deituriko konplexu bat eratzen dute. Kaspasa-8ak konplexu honen eraketa inhibitzen du, eta apoptosi eta nekroptosiaren arteko erregulazioaren adibide da. Nekrosomak, oraindik ondo ikertzeke dagoen bidezidor batengatik, MLKL proteina aktibatzen du (Petric et al., 2017). Proteina honek oligomerizatzean aktibitate poro-eratzailera du eta organulu desberdinen eta mintz plasmaticoaren apurketa eragiten du, zelula lisatuz (Vanden Berghe et al., 2014).

1.4.5.2. Piroptosia

Piroptosia, zelularen lisi azkarra eragiten duen kaspasa-1-menpeko heriotza zelular programatua da, makrofago eta zelula dendritikoetan bakarrik ikusi dena (Miao et al., 2011). Heriotza programatu honen bidez, zelulak patogeno intrazelularren kontra egiteko bere buruaz egiten du hantura-erantzun bat sortuz. Piroptosia jasaten duten zelulen ezaugarri morfoloziak zelularen puztea, kromatina kondentsazioa eta mintzaren

osotasunaren galera azkarra dira. Markatzaile biokimiko ezagunak, kaspasa-1-en aktibazioaren menpekotasuna, mintz-plasmatikoa iragazkor bihurtzea (PI sarrera, LDH askapena) eta inflamasoma ezberdinen eraketa dira. Kaspasa batek gidatua izanik, historikoki prozesu hau apoptosiarekin nahastua izan da. Bi prozesuek markatzaileak partekatzen dituzte: piroptosiak mintzean poroak eratzean annexin-V barne mintzeko PS-arekin batu daiteke eta DNA kalteak TUNEL saioan positibo ematen dute ere. Bi prozesuen arteko desberdintasun handiena lisia bai edo ez gertatzea izango litzake (Duprez et al., 2009). Piroptosia aktibatzen dituzten estimuluen artean, zitosolean bakterio proteinen detekzioa (flagelina edo T3SS), toxina poro-eratzailleek eragindako K^+ irteera eta kanal purinerikoen aktibazioak eragindako K^+ irteerak daude (Rivers-Auty and Brough, 2015). Estimulu hauek inflamasoma eratuko duten proteina desberdinak aktibatuko dituzte eta honek kaspasa-1 erakarri eta aktibatu egingo dute, apoptosian apoptosoma eta kaspasa-9-arekin gertatzen den antzera. Inflamasoma desberdinak daude, NLRC4, NLRP1b, NLRP3. NLR-ak (ingelesezik “Nod-like receptors”) aktibatzean oligomerizatu eta ASC proteina egokitzailea batzen dute, honek prokaspasa-1 erakarriko du eta hau proteolisi bidez aktibatuko da. Aktibazio honek bi efektu nagusi dauzka: pro-inflamatorioak diren IL-1 β eta IL-18ren ekoizpena eta piroptosia (Miao et al., 2011). Piroptosia exekutatzeko duen proteina gasdermina D da, proteina honek aktibitate poro-eratzaille du eta kardiolipinan eta PSrekin batzean bere aktibitatea areagotzen du (Ding et al., 2016). Gasdermina D-ak zelula piroptotikoaren mintza zulatuko du zelularen lisia sortuz eta zitokina pro-inflamatorioak jariatuko dira. Ikusi denez, kaspasa-1-en aktibazioak ez du beti piroptosia eragiten, hau zelulak jasaten duen kalte mailaren arabera inhibitua izan daiteke (Katsnelson et al., 2015).



1.9 Irudia. Heriotza mota desberdinen eskema. Ezaugarri morfologikoengatik heriotza motak bi talde nagusitan sailka daitezke, mintzaren osotasuna mantentzen dutenak hantura-erantzuna eragin gabe (apoptosia eta autofagia bidezko heriotza) eta zedularen puzketa eta mintzaren apurketa bidez hantura-eragile osagaiak kanpo mediora askatzen dutenak (nekrosia eta piroptosia moduko nekrosi programatuak). Nekroptosia ez da da eskema honetan agertzen baina piroptosiaren antzeko efektuak izango lituzke. Irudia Fink et al. 2005-etik hartua dago.

1.4.6 Toxina pro-eratzailiek eragindako heriotza motak

Lehenago aipatu dugun bezala, bakterio patogeno ugari pro-eratzailen toxinak jariatzen dituzte ostalariaren zelulak kaltetzeko. Toxina hauek beraien itu-zelulen mintzean proak eratuz zelula hauen heriotza eragiten dute era desberdinetan. Honen bidez bakterioak ostalariaren sistema immunea kaltetzea lortzen du infekzioa aurrera eramanez. Ikusi dugunez, heriotza mota bakoitzak erantzun immune desberdinak eragin ditzake, hantura areagotze edo inhibitzaileak. Historikoki PFTak eragiten duten heriotza apoptosi edo nekrosi bezala sailkatu da. Apoptosia eragitearen

helburua hantura-erantzuna murriztea, eta nekrosiarena hantura eragitea dela onartu da. Hala ere, hemen azaldu dugun bezala ostalariak piroptosia edo nekroptosia bezalako heriotza zelularrak erabili ditzake zelulen heriotza pro-inflamatorioa eragiteko. Mota desberdineko heriotza zelularrak eragitea bakterioarentzako edo ostalariaren defentsarako edo bakterioaren infekziorako mesedegarria den interpretatzea uste baino zailtasun handiagoa dakar (Aachoui et al., 2013). Adibidez, bakterio intrazelularrengatik babesteko piroptosia erantzun efektiboa da zelula ostalariaren heriotza azkarra eragin arren; modu honetan bakterioa ezin da zelularen barnean erreplikatu eta eragindako erantzun pro-inflamatorioak immunitate-sistemako sistema immuneko zelula gehiago erakarri ditzake (Miao et al., 2011). Beste ikuspuntu batetik, nekrosi ugaria eraginez gehiegizko hantura erantzun bat gertatu daiteke, ostalariaren sistema immuneak infekzio guneak asko kaltetuz eta bakterioari infekzioa erraztuz. Patogeno-ostalari artean dagoen “guda ebolutiboan” eraso eta defentsa mekanismo askoren arteko oreka bat ematen da, eta gertaera bakoitzak ze partaideri on egiten dion jakiteko ikerketa ugariak baldintza desberdinetan burutzea beharrezkoa da (Aachoui et al., 2013).

Tesi honen helburuetako bat ACTak eragiten duen heriotza mota aztertzea eta poro-eratzaille aktibitateak heriotza honetan daukan garrantzia aztertzea da. Orain arte toxina honek eragiten duen heriotza mota eta ekintza mekanismoari buruz argitaratu dena 1.2.2.5. atalean azaldu dugu. Heriotza mota hauetan ACTaren aktibitate litikoak duen zeregina hobeto ulertzerakoan erreferentziak edukitzeko, famili desberdineko poro-eratzaille toxinek eragiten duten heriotz moten adibide batzuk azalduko ditugu modu laburrean. Ezaugarri desberdineko PFT ikertuenak aukeratu ditugu: CDC familiako SLO, *S.aureus*-ek ekoiztutako α -toxina eta noski, ACT kide den RTX familiako toxinen partaideak: *E.coli*-ren HlyA eta *A.actinomycetemcomitans*-ek ekoiztutako LktxA. Kasu guztietan kontuan hartu behar da edozein zelula PFTrekin kontzentrazio oso altuetan inkubatuz mintzaren apurketa inespezifiko bat eragingo duela, zelularen lisi osmotikoa eraginez modu ez kontrolatuan.

- **α -toxina** : Lehenago azaldu dugun β -toxina honek mintzean K^+ rekiko iragazkorak diren poroak eragiten ditu. Ikusi da K^+ irteera honek apoptosiaren aktibazioa eragin dezakeela (Jonas et al., 1994) eta aktibazio hau kaspasa-2ren menpekoa dela zelula epitelialetan. (Imre et al., 2012). Hala ere, kartzinoma zeluletan egindako ikerketetan ikusi da ezaugarri apoptotikoak sorrarazi arren (DNA degradazioa, kaspasa aktibazioa, c zitocromoaren askapena) toxinak eragindako heriotza ez dela kaspasen menpekoa eta

gehienbat ezaugarri nekrotikoak dituela: mintz osotasun galera azkarra eta ATP agorpena. Toxina kontzentrazio altuetan inkubatzeko bada itu-zeluletan Ca^{2+} sarrera eragin dezake, zuzenean nekrosia eraginez (Hildebrand et al., 1991). Saguetan egindako esperimenduetan α -toxinak NLRP3 inflamasomarekin erlazionatutako piroptosia ere eragin dezakeela frogatu zen (Kebaier et al., 2012).

- **LLO**: *L.monocytogenes* bakterioak ekoiztutako CDC familiako toxina hau bakterioak fagolisosomak apurtu eta askatzeko erabiltzen du. Ikusi da bakterioak hepatozitoak apoptosi bidez hiltzen dituela eta honetarako toxina honen adierazpena beharrezkoa dela (Weinrauch and Zychlinsky, 1999). Bestalde, ikusi da makrofagoetan LLO-ak kaspasa-1 bidezko pyroptosia eragiten duela (Cervantes et al., 2008).

- **HlyA**: Lehenago azaldu dugunez RTX familiako toxina honek K^+ eta Ca^{2+} -entzako iragazkorak diren poroak eratzen ditu zelulen mintzean. Toxina honek apoptosia eta nekrosia eratzeko gaitasuna duela ikusi da, kontzentrazioa eta zelula motaren arabera. J774 makrofagoen apoptosia eta giza monozitoen nekrosia eragin dezake (Fernandez-Prada et al., 1998). Neutrofiloetan kontzentrazio baxutan apoptosia eragin eta altuetan nekrosi/lisia eragieten duela aztertu da (Russo et al., 2005).

- **Lktx**: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ekoiztutako RTX toxina honek HlyA-ren poro-eratzaille ezaugarri antzekoak ditu itu zelulan (K^+ , Ca^{2+} iragazkorra) eta ACTaren hartzaile berberari batzen da. Toxina hau zeluletan apoptosi eragilea zela ikusi zen (Korostoff et al., 1998) baina azkeneko ikerketek beste ikuspuntu bat eman diote baieztapen honi; giza leukozitoetan egindako ikerketetan ikusi zen inkubazioaren hasieran Lktx-ek bere itu zeluletan apoptosi markatzaileen agerpena eragin arren (PS espozizioa, kaspasen aktibazioa), toxinarekin zitotoxizitatea lisosomen mintza apurtuz askatzen diren katepsinen menpe zegoela, eta kaspasen inhibizioak ez zuela eraginik heriotza zelularrean (DiFranco et al., 2012). Ikerketa hau sendotuz, Lktx-ek bere itu-zelulen zitosola azidifikatu egiten duela frogatu zen, katepsinen aktibitateko baldintza hobetoak baimenduz (Balashova et al., 2016).

1.5 Helburuak

Adenilato ziklasa toxina *Bordetella pertussis*-en birulentzia-faktore garrantzitsuenetakoa izan arren, gaur egun bere ekintza-mekanismoa ez da guztiz ulertzen. Toxina honek adenilato ziklasa eta poro-eratzaille aktibitateak ditu, gehien ikertu dena adenilato ziklasa aktibitate entzimatikoa izanik. Tesi honek toxinen poro-eratzaille aktibitatean sakonduko du, aktibitate hau karakterizatuz, eta toxinen zitotoxikotasunean duen garrantzia aztertuz. Helburu zehatzak hauek izan ziren:

1. Domeinu katalitiko ez duen ACT- Δ N482 mutantea erabiliz, ACT toxinen poro-eratzaille aktibitatearen karakterizazioa burutzea, toxina basatiak eta mutanteak eritrozito eta makrofagoetan dituzten efektuak aztertuz.
2. ACTaren poro-eratzaille aktibitateak makrofagoen heriotza zelularrean duen eraginaren azterketa, eta heriotza mota horren karakterizazioa.

2.Teknika esperimentalak

2. Teknika esperimentalak

2.1 Material eta erreaktiboak

Produktua	Deskribapena	Hornitzailea
2-Deoxy-D-glucosa	Glikolisia inhibitzen duen glukosaren analogoa	Sigma
3-Methyladenine (3-MA)	autofagiaren inhibitzailea	Sigma
4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide	β -Hexosaminidasaren substratu fluoreszentea	Santa Cruz Biotechnology
ac-YVAD-cmk	kaspasa 1-en inhibitzailea	Sigma
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	kaspasa 3 edo 7-aren aktibitatea neurtzeko	Promega
Azida Sodikoa	Arnas katearen inhibitzailea	Sigma
BAPTA-AM	kaltzio kelantea	Thermo Fisher
Brilliant Blue G (BBG)	P2X7 kanale purinergikoen inhibitzailea	Sigma
Bromo-enol lactona	kaltzio independente fosfolipasa A2-ren inhibitzailea	
Ca-074-Me	Katepsina B-ren inhibitzailea	Enzo Life Sciences
CyaA (9D4)	ACTaren antigorputza	Santa Cruz Biotechnology
Desfibrinatutako ahari odola		Pronadina
Desipramina	Esfingomielinasa azidoaren inhibitzailea	Sigma
Estaurosporina	apoptosi eragilea	Santa Cruz Biotechnology
Fura-2, AM, cell permeant	Kaltzio intrazelularren sentsorea	Thermo Fisher
Ioduro propidioa		Sigma
Ionomizina	Kaltzio ionoforoa	Sigma
Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay Platform	ATP mailak luminizentzia bidez neurtzeko	Promega
KT5720	Kinasa A proteina (PKA) inhibitzailea	Sigma
Nekrostatina 1	RIP1 kinasaren inhibitzailea	Santa Cruz Biotechnology
Nekrostatina 5	RIP kinasen inhibitzailea	Sigma
Nifedipine	L-motako Ca ²⁺ kanalen inhibitzailea	Sigma
Nigerizina	Potasio ionoforoa	Sigma
Opti-MEM I Reduced Serum Media	zelula hazkuntza media	Thermo Fisher

Pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt hydrate (PPADS)	Kanale purinergikoen inhibitzailea	Sigma
z-DEVD-fmk	kaspasa 3/7-ren inhibitzailea	Santa Cruz Biotechnology
z-VAD-fmk	kaspasa inhibitzaile orokorra	Santa Cruz Biotechnology

2.2 Bakterioen hazkuntza

Escherichia coli XL1-blue anduia (Stratagene) 37 °C-tan hazten da LB (Luria-Bertani) hazkuntza medioan (10 g triptona, 5 g legami erauzkina, 5 g/l NaCl)(Maniatis 1982). Medio solidoko kultiboak LB-Agar medioan (LB medioa + agar % 1,5 p/b). Bakterioaren izozketa medio berdinean egiten da, baina glizerola % 40 (b/b) gehituta - 80 °C-tara kontserbatuz.

2.3. Bakterioen Trasformazioa eta Proteinen Adierazpena

ACT toxinarekin adierazpenerako bakterioak Pt7CACT1 plasmidoarekin transformatu ziren (Dr. P. Sebok aditasunez emandako plasmidoa, Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic), eta ACT-ΔN482 mutantearen adierazpenerako pCyaAC-PF plasmido erabili zen (Dr. C. Angsuthanasombat eta Dr. B. Powthongchin-ek aditasunez utzita ,Biofisika eta Biologia molekularreko Institutua, Mahidol Unibertsitatea, Tailandia). . Transformaziorako metodoa kaltzio kloruroarena izan zen (Cohen et al., 1972) . *E. coli* XL1-blue bakterioak gau oso batez hazi ziren LB medioan 37 °C-tan etengabeko irabiaketapean.. Bakterioen kultiboa LB berriarekin 20 aldiz diluitu eta ondoren hazten uzten da OD₆₀₀ 0,5 lortu arte. Bakterio-kultiboa zentrifugatu 2000 x g, 10 min, 4 °C, eta jalkina berreseki egiten da CaCl₂ 100 mM duen soluzioan eta 30 minutuz izotzetan mantenduz. Gero minutu batez zentrifugatu, eta medioari 900 µl kentzen zaizkio 100 µl lagatzeko. 100 µl horiei 1 µl plasmido gehitzen zaie, eta 15 minutuz izotzetan lagatzen da. Gero talka termiko bat ematen da 90 segunduz 42 °C -tara jarritz. Soluzioari 500 µl LB medio gehitzen zaio, eta 45 min 37 °C-tan inkubatzen da. Bukatzeko, zelulak zentrifugatu egiten dira 1 min 2000 x g giro tenperaturan, eta ampizilina duen (100 µg/ml) LB-agarrean kultibatzen dira (bi plasmidoek ampizilinarekiko erresistentzia dute). Gau oso bat hazten usten da bakterio transformatuak haz daitezen.

2.4. Toxinaren purifikazioa

Toxinen purifikazioa Karst eta kolaboraitzeek argitaratutako metodoa jarraituz burutzen (Karst et al., 2014). Trasformatutako bakterioak ampizilina eta tetraklinadun (100 µg/ml) LB medioan hazi ziren, 37 °C-tan 200 rpm-ko irabiaketarekin Certomat BS-1 inkubagailu baten (Sartorius Stedim Biotech, Irlanda) . Medio asetuak 30 aldiz diluitu ziren LB medioan ampizilina kontzentrazio berberarekin OD₆₀₀ 0,6-0,8 lortu harte. Gero toxinaren adierazpena induzitzen da isopropil-β-D-1-tiogalaktopiranosidoa (IPTG, Apollo Scientific) gehituz 1 mM-ko bukaerako kontzentrazioan. Kultibo hauek 37 °Ctan 175 rpm-ko irabiaketapean inkubatu ziren 4 orduz, inkubagailu berberean.

Adierazpena induzitu eta gero bakterioak zentrifugatu egin ziren 8000 x g 15 min 4 °Ctan JLA 9.1000 errotorekin (Beckman Coulter) Beckamn zentrifugan. Jalkina TN tanpoian (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8) berreseki zen eta PMSF (1 mM) eta proteasa inhibitzaileak (cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) gehitu zitzaizkion. Bakterioak Soniprep 150 sonikatzailuan sonikatu ziren, 12 mikrako anplitudearekin 10 piztu/itzali ziklo eginez. Hurrengo pausuan, sonikatutako bakterioak zentrifugatu egin ziren JA-20 rotorea erabiliz (Beckman Coulter) Beckman zentrifugan. Lehenengo zentrifugazioa 26000 x g , 15 min, 4 °C izan zen, eta jalkina TN tanpoian berreseki zen. Hurrengo zentrifugazioa 18000 x g, 18 min, 4 °C egin zen, eta jalkina TNU tanpoiarekin (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH 8) berreseki zen eta 4 °Ctan utzi zen gau oso bat.

Lagina elkartruke ionikoko zutabe batetik pasatu zen, gainjalkina Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, IL, EEUU) erretxinarekin nahastu zen, hau lehenago 1 M Tris-HCl pH 8 soluzio batekin orekatua izanik, gero 50 mM Tris pH 8-rekin eta azkenik A oreka tanpoiarekin (150 mM NaCl, 50 mM, 8 M Urea, pH 8). Nahasketa ordu bat eduki zen irabiatzen giro tenperaturan. Inkubazio denbora bukatzean erretsina proteinarekin paketatuta eta A tanpoiarekin garbitu zen. Proteina B tanpoiarekin (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH 8) eluitu zen eta 2 ml-ko frakzioak hartu ziren. Frakzio hauek SDS-PAGE eta *Coomassie* tindaketa bidez aztertu ziren proteina detektatzeko. Proteinadun frakzioak batu eta 50 mM Tris-HCl, 8 M tanpoian diluitu ziren. Jarraian, proteinadun lagina A tanpoian aurre-orekatua zegoen elkatruke ionikoko (Q Sepharose Fast Flow) zutabe batetik zehar pasa zen.. Proteina txertatu eta gero A tanpoiarekin garbitu zen, eta B eluzio tanpoiarekin proteina eluitu zen 2 ml-ko frakzioak batuz.

Frakzio hauetatik proteina zeintzuk zuten SDS-PAGE eta *Coomassie* bidez detektatu zen.

Proteina gehien zuten frakzioak batu, 5 aldiz A tanpoian diluitu eta paketatutako HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose High Performance (GE Healthcare,) elkarrekintza hidrofobikoko zutabe baten kargatu zen. Zutabe honen erretxina tanpoi berberarekin orekatua izan zen alde zurretik. Toxina kargatu eta gero zutabea A tanpoiarekin garbitu zen, gero 50 mM Tris-HCl, pH 8, % 50 isopropanol, eta azkenik isopropanol 50 mM Tris-HCl pH 8ra. Proteina B tanpoiarekin (50 mM Tris-HCl, 8 M urea, 2 mM EDTA, pH 8) eluitu zen eta berriro SDS-PAGE eta *Coomassie* bidez frakzioak aztertu ziren. Proteina kontzentrazioa Bradford metodoarekin kuantifikatu zen.

2.5. SDS-PAGE bidezko proteinen bereizketa.

Proteinen bereizketa poliakrilamida eta dodezilsulfato sodikoa (SDS) duten geletan burutzeko Laemlik (1970) deskribatutako teknika jarraitu zen. Gelak bi fase ditu, proteina kontzentratzeko hasierako fasea edo (“stacking”-a) eta proteinak bereiztuko diren fasea (“resolving”-a). Gelaren “Stacking”aren konposizioa %4,7 (p/b) akrilamida/bisakrilamida (30:0,8), Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, %10 (p/b) SDS, % 0,1 (b/b) PSA eta % 0,15 TEMED izan zen. Bereizketa faseak edo “resolving”-ak konposizio hau zuen: %8,5 (p/b) akrilamida/bisakrilamida(30:0,8) Tris-HCl 375 mM, pH 8,8, %0,1 (p/b) SDS, % 0,04 (b/b) PSA eta % 0,15 TEMED. Elektroforesia burutzeko mini-PROTEAN 3 (BioRad) sistemak erabili ziren.

Elektroforesia bukatzerakoan gela *Coomasie* urdin soluzioarekin (% 0,1 Coomasie Brilliant Blue R-250, % 40 (b/b) metanol, % 10 (b/b) azido azetiko) 30 minutuz giro tenperaturan eta *Coomasie* gabeko soluzioarekin garbitu zen, bandak ikusi ahal izateko.

2.6. Proteina-kontzentrazioaren determinazioa

Proteinen kontzentrazioa Bradford-ek deskribatutako metodoa erabiliz neurtu zen (Bradford, 1976). Coomassie Brilliant Blue G-250 koloratzaileak aminoazido aromatiko eta positiboak batzen ditu. Batuketa honen ondorioz, uhin luzera maximoa lekualdatzen da 465 nm-tik 595 nm-ra. Proteina kontzentrazioa BSA zuzen-patroi

batekin alderatuz zehaztu da. Teknika honek detektatu ahal duen proteina kontzentrazio-tartea 1-1500 $\mu\text{g/ml}$ da.

BSA proteinarekin zuzen patroia egiten da 0-5 μg kontzentrazio-tartean, saioaren tanpoi berdinean. Lagin bakoitzari 1 ml *Bradford* erreaktiboa (1:5 diluitua) gehitzen zaio eta 20 minutuz inkubatzen da giro tenperaturan. Gero Abs 595 nm-tan neurtzen da UV-Vis Biomate-3 espektofotometro baten (Thermo Fisher).

2.7. Aktibitate hemolitikoaren azterketa

2.7.1 Hemoglobina askapena

Toxinaren aktibitate hemolitikoa Synder eta Koch-ek garatutako metodoan oinarrituz burutu zen (Snyder and Koch, 1966). Eritrozitoen esekidura estandarizatuei toxinaren diluzio seriatuak gehitzen zaizkie. Hemolisia, espektofotometria bidez kuantifikatzen da eritrozitoek mediora askatutako hemoglobina kuantifikatuz.

Saio hauetan ahari eritrozitoak erabili ziren (Pronadisa). Estandarizatzeko, odola gatz-soluzio batekin (% 0,9 (p/b) NaCl) garbitu zen (1500 x g, 10 min, 4 °C) eta hemolisi tanpoian berreseki ziren (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM) 0,6 OD₄₁₂ lortu arte (eritrozitoen esekiduren 37,5 μl 3 ml urekin nahastean). Baldintza hauetan eritrozito esekidurak $\approx 10^9$ zelula/ml edukiko du.

Hemolisi-saioak 96 putzuko plaketan burutu ziren. ACT eta ACT- Δ N482ren diluzio seriatuak (100 nM-tik hasita) eritrozito esekidurei gehitu zitzairen eta 4 orduz 37 °C-tan inkubatu ziren etengabeko irabiaketarekin. Inkubazioa bukatzean plakak zentrifugatu egiten zen (2000 x g, 10 min, 4 °C) eta gainjalkinaren absorbantzia neurtu zen 412 nm-tara. Txuria (hemolisiaren %0) eritrozito esekidura estandarizatuari tanpoia soilik gehituz lortu zen, eta hemolisiaren % 100, eritrozitoei Triton X-100 (% 0,1) gehituz.

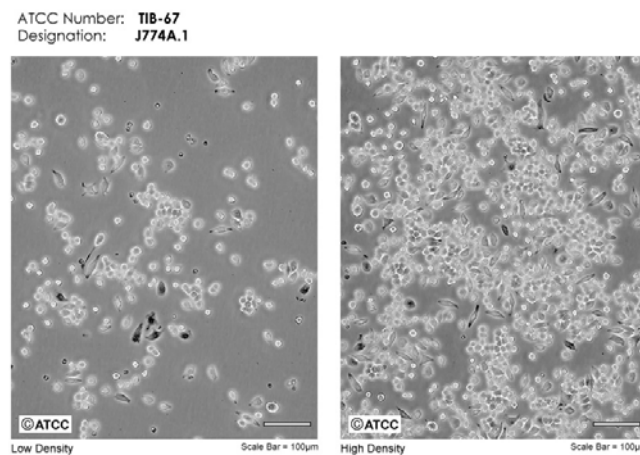
2.7.2 Hemolisi-zinetikak

Hemolisi-zinetikak laginaren uhertasunaren (argi dispersioa) jeitsiera neurtuz aztertu ziren. Ahari odola estandarizatzeko gatz-soluzio batekin garbitu zen eta hemolisi-

tanpoian (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2,4 mM) berreseki zen uhertasun balorea (Abs 700 nm) 0,6-koa izan arte. Aktibitate saioa 96 putzu plakan egin zen plaka irakurlean (Synergy HTX, Biotek) uhertasuna neurtuz 37 °C-tan. Hemolisiaren 100% kontrol bezala Triton X-100-ekin tratatutako lagina erabili zen. Hemolisi-zinetikaren malda altueneko guneari erregresio lineala eginez hemolisiaren abiadura maximoa (V_{max}) kalkulatu zen. Erregresio lineal honen eta hasierako Abs balorearen intersekzioak lag-denbora jakinaraziko digu (lag-time).

2.8. Zelula eukariotoen hazkuntza

Tesi honetan erabilitako zelula eukariotoak J774A.1 zelulak izan ziren. Monozito-makrofago zelula-lerro hau (ATCC TIB-67) xaguen linfometatik abiatuz lortu zuten lehen aldiz Ralph eta bere taldeak (Ralph et al., 1976). Zelula hauek ACTren CD11b/CD18 hartzailea adierazten dutenez, oso erabiliak dira toxina honen *in vivo* eta *in vitro* ikerketak egiteko (Eby et al., 2012; Guermontprez et al., 2001). Zelulak “Flask” oinarriari itsatsita hazten dira, DMEM medioan (Low glucose 1 g/L, GE, Healthcare, EEUU). DMEM medioari inaktibatutako %10 (b/b) behi-fetuaren seruma (FBS) (Lonza, Belgika), 100 U/mL penizilina, 100 µg/mL estreptomizina eta 4 mM glutamina (Pen Strep Glutamine, Invitrogen) gehitzen zaizkio. Toxinarekin edozein inkubazio egin aurretik, zelulak saio bakoitzeko medioan inkubatu ziren ordu batez.



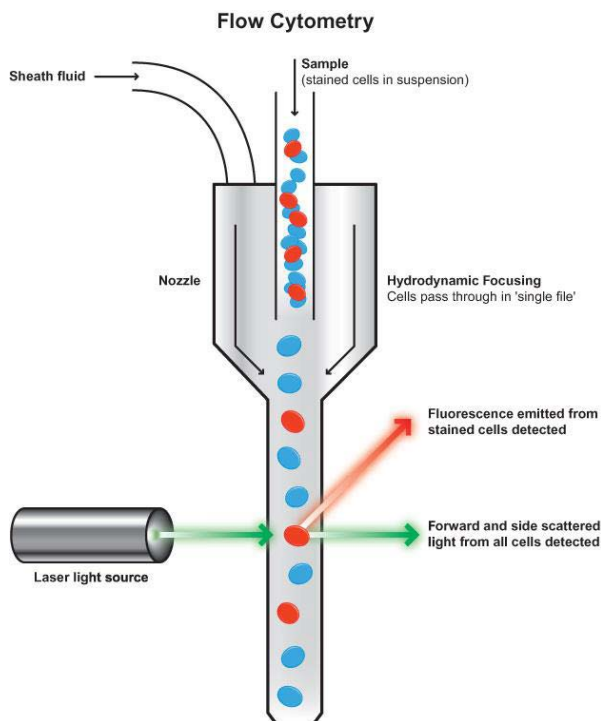
2.1 Irudia. J774.A1 zelulen kultiboa. ATCC-tik hartutako irudia

2.9 Fluxuzko zitometria

Fluxuzko zitometria zelulen analisirako parametro anitzeko teknika da. Bertan, aztertu behar diren partikulen esekidura (gehienetan zelulak) banan bana alienatuta laser batetik pasarazten dira. Laserrak zelulekin talka egitean informazioa ematen duten seinale desberdinak igortzen ditu, argiaren dispersioarengatik eta fluoreszentzia igorpenarengatik. Zelula bakoitzetik detektatzen diren parametroak hauek dira:

- Argiaren dispersio frontala (ingelesez “forward scatter”, FSC): Partikulak duen tamainarekiko proportzionala den parametroa da.
- Angelu zuzeneko dispersioa (ingelesez “Side Scatter” SSC): zelulak duen barne konplexutasunarekiko proportzionala da
- Fluoreszentzi intentsitatea uhin luzera desberdinetan: Zelulak saioan jasan duen markaketa edo fluorokromoaren arabera izango da

Teknika hau tesi honetako propidio ioduroarekiko (PI) iragazkortasun saioetan, AnexinaV/PI saioan, SubG1 populazioaren detekzioan eta endozitosi saioetan erabili da. Erabilitako zitometroa FACScalibur (BD bioscience) izan zen.



2.2 Irudia. Fluxu zitometroaren mekanismoaren eskema. (<http://www.abcam.com>)-tik hartutako irudia

2.9.1 PI iragazkortasun saioa

Propidio ioduroa (PI) azido nukleikoei batzen zaion molekula fluoreszentea da. DNA naiz RNA-ri sekuentzia espezifikotasun gabe batzen zaio, eta hau gertatzean bere fluoreszentzia 20-30 aldiz handitzen da. Bere kitzikapen/igorpen maximoak 533/617 nm dira eta zelula osasuntsuetan mintzarekiko iragazgaitza da. Propietate hauei esker zelula bideragarriak (biziak) eta hilak bereizteko ere erabiltzen da. Honetaz gain, toxina poro-eratzailleek itu-zelulen mintzean egindako poroak detektatzeko erabili daiteke (Tam et al., 2010).

Zelulak 6 putzuko plaketan % 60ko konfluentzian hazi ziren ($4-6 \times 10^5$ zelula/putzuko). Kultibo medioa suero gabeko medio batengatik ordezkatu zen, saioak hasi baino ordu bat lehenago, gero zelulak saio bakoitzean toxina kontzentrazio desberdinekin eta denbora tarte desberdinetan inkubatu ziren. Bi inkubazio mota erabili ziren : inkubazio “arrunta” edo etengabea eta “pulse” deituriko inkubazioa. “Pulse” inkubazioan zelulak toxinarekin 5 minutuz inkubatu eta gero medioa garbitu eta toxina gabeko medio batengatik ordezkatzeko zen, zelulak medio garbiarekin denbora tarte desberdinak utziz (0-120 min). Inkubazio arruntean ez zen medioa garbitzen eta toxina etengabe dago saioko medioan. Inkubazio denborak bukatzean, zelulak propidio ioduroarekin (50 $\mu\text{g/ml}$) inkubatu ziren 4 minutuz. Inkubazioa eta gero, zelulak PBS-rekin garbitu ziren, plakatik jaso eta zitometrora eramane ziren. PI-rekin tratatu gabeko zelulak, eta toxina gabeko kontrolak, zelula PI negatiboen seinalearen mugak finkatzeko erabili ziren. Muga hori baino seinale gehiagoko zelulak PI positibo modura kontsideratu genituen. Saio batzuetan, PI seinalea zelulen FSC (tamaina buruzko informazioa ematen du) balioekin alderatu zen.

2.9.2 Anexina-V/PI saioa

Toxinarekin tratatutako zelulen ezaugarri apoptotikoak aztertzeko FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) erabili genuen.. Zelula osasuntsuek mintz plasmatico asimetrikoa dute, fosfatidil serina (PS) lipidoa monogeruza zitosolikoan kokatzen delarik. Apoptosian zeharreko aktibazio zelularrak, kalte zelularrak edo energia galerak mintz plasmaticoaren asimetrikotasuna hausten dute, PS-a lipido bigeruzaren kanpo monogeruzara azaleratuz (Janko et al., 2013). Anexina-V PSri

batzen zaion proteina da, horrela kit honen bidez PS-ren kanporaketa jasaten duten zelula apoptotikoak detektatu daitezke, beraiei FITCrekin markatutako Anexina-Vak batzean. Propidio ioduroarekin batera inkubatuz, apoptosi goiztiarrean eta berantiarrean (edo nekrosian) dauden zelulak bereizi daitezke.

Zelulak 24 plaketan inkubatu ziren, eta saioa baino ordu bat lehenago medioa aldatu zitzaien HBSS medioarengatik ((NaCl 140 mM, KCl 5 mM, Hepes 10 mM, CaCl₂ 2.4 mM, MgCl₂ 0.5 mM, K₂HPO₄ 0.36 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, D-Glukosa 5.5 mM, NaHCO₃ 4.2 mM, pH 7.4) edo K⁺ altuko medioarekin ((NaCl 5 mM, KCl 140 mM, Hepes 10 mM, CaCl₂ 2.4 mM, MgCl₂ 0.5 mM, K₂HPO₄ 0.36 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, D-Glukosa 5.5 mM, NaHCO₃ 4.2 mM, pH 7.4). Ondoren, toxina kontzentrazio desberdinak gehitu, eta denbora tarte desberdinetan inkubatu ziren. Inkubazioak bukatzean zelulak PBSrekin garbitu eta plakatik jaso ziren. Zelulen esekidura zentrifugatu egin zen (200 x g, 10 min, 4 °C) eta Anexina V eta PI duen medioko 100 µl-tan berreseki ziren, 15 minutu iluntasunean utziz giro tenperaturan. Gero kit tanpoiaren 400 µl gehitu eta zitometroan analizatu ziren.

2.9.3 Populazio hipodiploidearen detekzioa

Propidio ioduroa DNArri batzen zaionez (PI molekula bat 4 base pareko) egoera iragazkorretan zelulak duen DNA kopuruari buruz informazioa eman dezake. Propietate hau erabiliz zelula dagoen ziklo zelularreko fasea identifikatu daiteke (G0/G1, S edo M). Apoptosian zehar zelula barneko endonukleasak aktibatutak izaten dira, eta hauek zelularen DNA apurtzen dute. Beraz, zelula hauek G0/G1 fasean dauden zelulak baino DNA kantitate gutxiago izango dute, zelula hipodiploide edo SubG1 zelula bezala identifikatuz.

Zelulak 6 putzuko plaketan hazi ziren eta saioa baino ordu bat lehenago hazkuntza medioa kendu eta HBSS tanpoia jarri zitzaien. Gero toxinarekin inkubatu ziren 4 orduz. Inkubazioa bukatzean zelulak PBSrekin garbitu, plakatik jaso eta etanol %70-rekin fixatu ziren 24 h, 4 °C-tan utziz. Zelulak PBSrekin garbitu ziren zentrifugazioz (250 x g, 10 min, 4 °C) etanola kentzeko eta PI eta RNAsa A zuen soluzio batekin inkubatu ziren 15 min iluntasunean, gero zelulak zitometrora eramateko. Zitometroan

azterterakoan G1 populazioaren seinalea detektatu zen eta seinale hori baino gutxiago zuen populazioa SubG1 edo hipodiploide bezala identifikatu zen.

2.9.3. Endozitosiaren kuantifikazioa

Antigorputzen bidez zelulen mintzean dauden molekulak fluoreszentezki markatu daitezke. Markaketa hau fluxu zitometroa erabiliz zelula bakoitzaren mintzean dagoen molekula honen kantitatearen arabera fluoreszentzia jasoko da. Ezaugarri hau erabili zen ACT- Δ N482 toxina J774.A1 zelulen mintzean denboran zehar duen endozitosiaren azterketa egiteko..

Zelulak 6 putzuko plaketan hazi ziren % 80-ko konfluentziararte. Saioa hasi baino ordu bat lehenago, hazkuntza medioa serum gabeko medioarengatik ordezkatu zen. Zelulak toxinarekin 5 minutuz inkubatu ziren 4 °C-tan, eta ondoren medioa PBS hotzarekin garbitu zen zelulak berriz serum gabeko medioarekin saioko denbora desberdinetan (0-30 min) uzteko. Gero zelulak plaketatik jaso ziren eta PBSrekin garbitu ziren zentrifugazioz (250 x g, 10 min, 4 °C) eta %3,7 (p/b) paraformaldehido soluzio batekin fixatu ziren 10 minutuz. Gero zelulak PBSrekin garbitu eta TBST + FBS %10 blokeo soluzio batekin inkubatu ziren 45 min giro tenperaturan. Inkubazio hau eta gero, zelulak TBSTrekin garbitu eta antigorputz primarioarekin (CyaA antibody 9D4) inkubatu ziren gau osoa 4 °C-tan. Zelulak garbitu eta antigorputz sekundarioarekin inkubatu ziren ordu batez. Azkenik, zelulak PBSrekin garbitu eta zelulak zitometroan aztertu ziren. Datuak Flowing Software programarekin aztertu ziren, zelulen fluoreszentiaren GMFI baloreak kontrolarekiko erlatibizatu ziren toxinarekin endozitosi ehunekoa kalkulatzeko. Kontrola 5 minutuz toxinarekin izotzean inkubatutako zelulen balorea izan zen. Kontrol hau izotzean (4 °C) egitean endozitosia inhibituta dago, eta batura balore maximoa bezala kontsideratzen da.

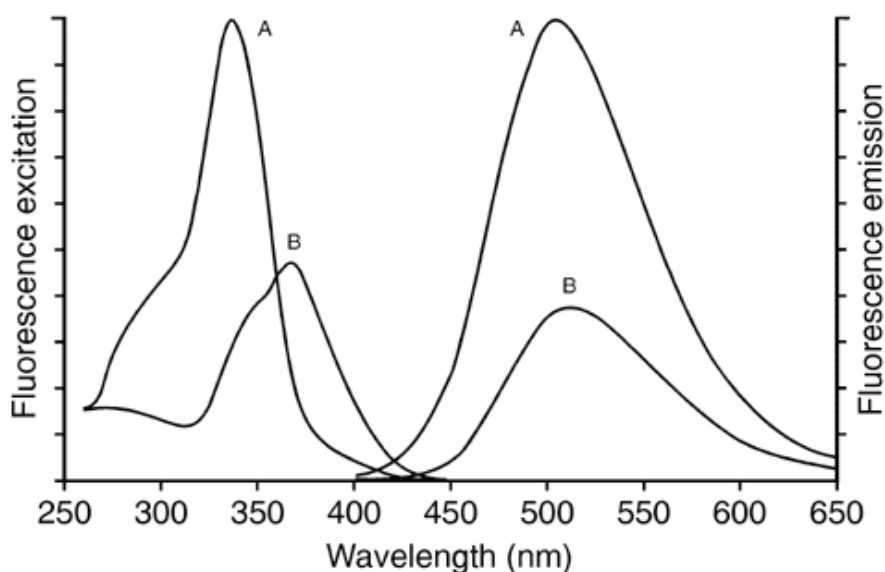
% endozitosia:= $[GMFI(0-30 \text{ minutu})/GMFI(5 \text{ minutu } 4 \text{ }^\circ\text{C})] \times 100$

2.10. Kaltzio intrazelularren neurketa

Zelulen kaltzio intrazelularra aztertzeko bi adierazle mota nagusi daude;

- Uhin luzera sinpleko adierazleak: Adierazle hauek Ca^{2+} ekin batzean bere fluoreszentzia intentsitatea nabarmen handitzen dute, baina kitzikapen eta igorpen maximoak ez dira aldatzen. Adierazle hauen artetik erabilienetakoak Fluo-4 eta Fluo-8 dira.
- Adierazle ratiometrikoak edo uhin luzera bikoitzekoak: Argi ultramorearekin kitzikatzen dira eta Ca^{2+} ri batuta edo ez egoteak bere kitzikapen maximoa aldatzen du. Adierazle hauen adibide INdo-1 edo Fura-2 dira eta azken hau tesi honetan erabili duguna da. Adierazle hauek abantailak dituzte lehenengoetik, kitzikapen maximo bikoitzari esker saioko arazo desberdinen eragina urriagoa izatea ahalbidetzen dute, uhin luzera bakarreko adierazleekin alderatuz. Faktore hauen artean zelula bakoitzak jasan duen adierazle karga desberdintasuna edo barne zelulako baldintzak (pH adibidez) molekularen fluoreszentzian izan dezakeen eraginen efektua baztertzea ahalbidetzen dute.

Saio hauetan Fura 2-AM adierazlea erabili dugu. Adierazle hau Ca^{2+} ri batuta dagoenean bere kitzikapen maximoa 340 nm-ko uhin luzeran dago eta kaltzioari batzean kitzikapen maximo hau 380 nm-ra aldatzen da. Kaltzioari batuta egon edo ez molekularen fluoreszentzia igorpen maximoa 510 nm-tan mantentzen da. Ezaugarri hauei esker eta Furak kaltzioarekin duen K_d jakinda (240 nM), Grynkiewicz-en formula erabilita (Grynkiewicz et al., 1985) zelula barneko Ca^{2+} kontzentrazioarekin balio hurbildua kalkula daiteke.



2.3 Irudia: Fura-2ren kitzikapen eta igorpen espektroa. A) Fura Ca²⁺ altuko medio batean bere kitzikapen maximoa 340 nm-tan du eta igorpen maximoa 510 nm-tan. B) Ca²⁺ gabeko medio batean Fura 2ren kitzikapen maximoa 380 nm-tan dago eta igorpen maximoa 510 nm-tan mantentzen da.

Zelulak 12 mm-ko estalkietan hazi ziren %80 konfluentziararte. Zelulak garbitu eta Fura 2-AM-rekin kargatu ziren (1 µM) 45 minutuz 37 °C-tara. Gero zelulak PBSrekin garbitu eta honetarako erabilitako buferrean (Tris 20 mM, CaCl₂ 2,4 mM, glukosa 50 mM, pH 7,4) jarri zitzairen. Zelulak dauden estalkia ganbera termostatisatu batean jarri ziren 37 °C-tara egoteko Nikon Eclipse TE 300-based microspectrofluorometer batetan eta toxinarekin kontzentrazio desberdinekin tratatu ziren. Zelulak 340 nm eta 380 nm-tan kitzikatzen joan ziren fluoreszenti igorpena 510 nm-tan jasoz. 340 eta 380 nm-tan kitzikatutako zelulen igorpenen arteko ratioa Delta-Ram system erabiliz (Photon Technologies International, Princeton) lortu zen eta ekuazio honen bidez barne [Ca²⁺]-tan bihurtu zen:

$$[Ca^{2+}] = K_D * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * Q$$

K_d Fura eta Ca²⁺ arteko disoziazio-konstantea da eta ; R 340 eta 380 nm-tan kitzikatuta jasotako igorpenen (510 nm-tara) ratioa da ; R_{max} eta R_{min} Fura Ca²⁺ rekin guztiz asetuta eta guztiz aske dagoenean, ratioak dituen baloreak dira ; Q 380 nm-tan kitzikatzean lortu daitekeen maximo eta minimoak dira, hau da, Fura kaltzio gabe eta kaltzioarekin asean dagoen baldintzetan. R_{max} lortzeko saioen bukaeran zelulak Triton X-100ekin tratatu ziren eta gero R_{min} lortzeko EDTA Ca²⁺ kelatailearekin.

2.11 Zitotoxizitatearen neurketa

Toxinarekin inkubatutako J774A.1 zelulen bideragarritasuna aztertzeko, laktato deshidrogenasaren (LDH) askapena neurtu zen CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) kita erabiliz, hornitzailearen protokoloa jarraituz. LDH entzima zitosolikoa denez, medioan detektatzen bada lisi zelularraren adierazlea izango da. Kit honekin, toxinarekin ondorioz lisatutako zelulek askatutako LDH kantitatea kuantifikatzen da kolorimetrikoki, erreakzio akoplatu baten bidez tetrazolio gatza (INT) formazan gorrian bihurtzen delako. Esperimenturako, zelulak 96 putzuko plaketan hazten dira (2x10⁵ zelula/ml) eta, toxina gehitu baino ordubete lehenago Opti-MEM (Thermo Fisher) edo HBSS medioan inkubatzen dira, saioaren arabera. Toxinarekin denbora desberdinetan inkubatu ondoren, plaka zentrifugatu eta gain-jalkina jasotzen

da. Honi, kit-eko erreaktiboa gehitzen zaio 1:1 proportzioan, eta 30 minutuz inkubatu ondoren plaka-irakurgailuan (Synergy HTX multi-mode reader, Biotek) xurgapena neurtzen da 490 nm-tara. Absorbantzia baloreak interpretatzeko, zitotoxizitatearen kontrol positibotzat (%100 zitotoxikoa) Triton X-100 detergentarekin tratatutako zelulak erabili ziren, eta kontrol negatibotzat (%0 zitotoxikoa) toxinarekin tratatu gabeko zelulak.

2.12. Zelula barneko ATParen neurketa.

Toxinaren adenilato ziklasa aktibitateak zelularen ATP mailetan eragiten duen murrizketa neurtzeko, Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay (Promega) kit komertziala erabili zen. Honek, kinasak eta luziferasak entzimak akoplatzen dituen erreakzio bat erabiltzen du; kinasak erabiltzen duen ATP mailaren arabera, luziferasaren aktibitatea aldatzen da (argia igortzen da soluzioaren ATP kopuruaren arabera). Zelulak 24 putzuko plaketan hazi eta toxinarekin denbora desberdinetan inkubatu ziren. Inkubazio denbora pasa ondoren PBSrekin garbitu ziren eta zelulak lisi-tanpoian inkubatu ziren (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, %1 (b/b) IGEPAL, EDTA 2.5 mM, %10 (b/b) glizerola, pH 8.0, proteasa inhibitzaileak) 20 minutuz. Mikroskopioz zelula guztiak lisatuta zeudela ziurtatu zen. Zelula lisatuen medioa zentrifugatu zen (300 x g, 10 min, 4 °C) eta gainjalkinaren 50 µl kitarekin nahastu ziren 1:1 proportzioan. Gero plaka-irakurgailuan luminiszentzia neurtu zen.

2.13. β -hexosaminidasa aktibitatearen neurketa

β -hexosaminidasa lisosoma barnean aurkitzen den entzima da. Bere aktibitatea entzimatikoa N-azetil- β -D-Hexosaminidoen N-azetil-D-hexosamina hondarra hidrolizatzea da. Hemen burututako saioaren helburua, entzima honen aktibitatea toxinarekin tratatutako zelulen kanpo medioan detektatzea izan zen. Lisosomak mintz plasmaticoarekin fusionatzean bere lumeneko osagaiak zelularen kanpoaldera askatuak izango dira. Zelulen kanpo medioan entzima honen substratu fluoreszente bat gehituta bere aktibitatea kuantifika daiteke eta hau, zelulak lisosomen exozitosisia burutzen ari direnaren adierazgarritzat har daiteke. Saio honetan ziurtatu zen toxinarekin tratatutako denbora tarteetan zelulak ez zirela lisatzen. Erabili genuen metodoa beste talde batzuek garatutako protokoloa izan zen (Rodríguez et al., 1997).

Zelulak 24 putzuko plaketan inkubatu ziren % 80 konfluentziarate eta saioa baino ordu bat lehenago medioa ordezkatu zitzairen HBSS medioarengatik. Zelulak toxinarekin baldintza desberdinetan tratatu eta gero, zelulen gainjalkinaren 350 µl hartu ziren eta sodio zitrato-fosfato tanpoian diluitutako 4-methylumbellyferil-N-acetyl-β-D-glucosaminide (Sigma) (6 mM)-rekin nahastu ziren 15 minutuz 37 °C –tan iluntasunean. Erreakzioa gelditzeko 100 µl 2 M Na₂CO₃, 1.1 M Glizina tanpoia gehitu zen. Fluorimetroan (FluoroMax 3) laginaren fluoreszentzia neurtu zen 365 nm-tan kitzikatuz eta 450 nm-tan igorpena jasoz. Zelulak jariatutako β-hexosaminidasa ehunekoak kalkulatzeko, % 100 zelulak Triton X-100ekin lisatuz kalkulatu zen.

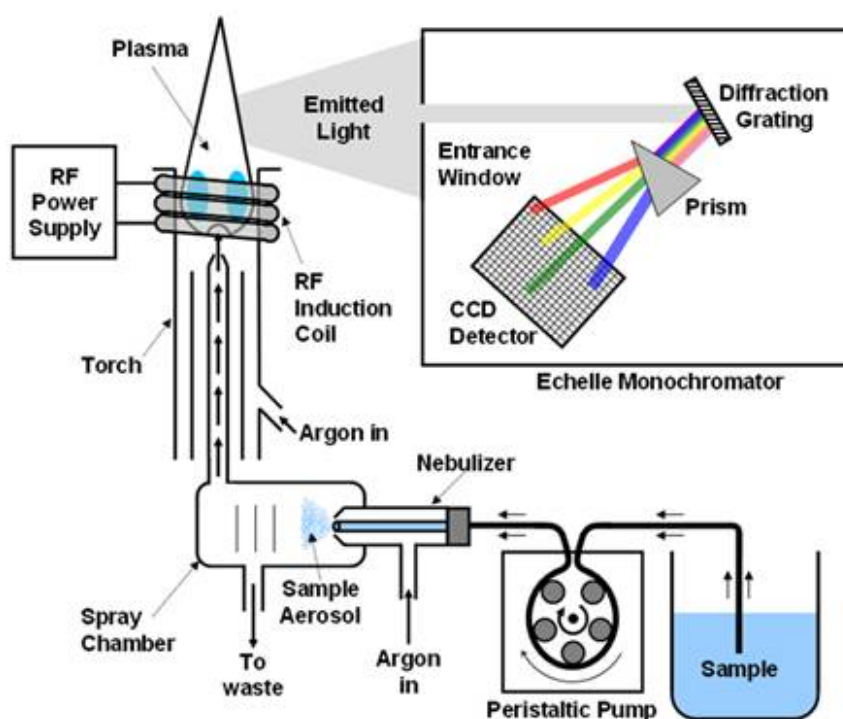
2.14. Mikroskopia konfokala

Toxina molekulek zelulan duten lokalizazioa aztertzeko, zelulak toxinaren aurkako antigorputzekin tratatu ziren eta laginak mikroskopia konfokal bidez aztertu ziren. J774.A1 zelulak estalki gainean 24 putzuko plaketan hazi ziren % 80-ko konfluentziarate eta toxinaren tratamendua 4°C edo 37 °C-tan egin, eta gero PBSrekin garbitu ziren eta %4 paraformaldehidoarekin fixatu ziren 10 minutuz giro tenperaturan. Gero PBSrekin garbitu, eta azetona hotzarekin (-20 °C) inkubatu ziren 3 minutuz. Azetona garbitu, eta zelulak blokeo soluzioarekin (%5 (p/b) BSA duen PBS) inkubatu ziren ordu batez. Inkubazio denbora bukatzean toxinaren aurkako antigorputzarekin inkubatu ziren (CyaA antibody 9D4) 4 °C-tan gau osoz. Hurrengo pausuan zelulak PBSrekin garbitu, eta antigorputz sekundarioarekin inkubatu ziren goat (anti-mouse alexa 488) ordu batez, giro tenperaturan. Azkenik, zelulak Hoechst 3342rekin 10 minutuz inkubatu ziren zelulen nukleoak bereizteko. Gero laginak PBSrekin garbitu ziren. Irudiak IX 81 mikroskopia konfokala (Olympus) erabiliz lortu ziren eta irudiak ImageJ softwarearekin aztertu ziren.

2.15. K⁺ neurketa ICP-AES erabiliz

ICP-AES (ingelesez Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy’), lagin baten metal kontzentrazioa neurtzeko erabiltzen den teknika analitikoa da. Emisiozko espektroskopia mota bat da, non akoplatutako plasma erabiltzen den laginaren atomoak ionizatzeke eta epektrofotometria bidez beraien kantitatea neurtzeko.

Bi zati nagusi ditu, ICP eta espektrometroa. ICPak argoi gasaren bidez 7000 K tenperaturan dagoen plasma eratzen du. Aztertu behar den lagin likidoa nebulizagailu batetik pasaratzen da, lagina aerosol moduan plasmara gehitzeko. Plasmaren efektuarengatik lagina desatomizatu egingo da, eta atomoak ionizatu egingo dira. Atomo ionizatu bakoitzak uhin luzera desberdinean igortuko du argia eta hau espektrometroaren bidez detektatu daiteke. Plasmak igortutako argia monokromadore bidez bereiztuko da, guk aukeratutako uhin kuzera detektatuz. Saio honetan K^+ interesatzen ziztaigunez 766.491 nm eta 769.897 nm arteko uhin luzerak detektatu genituen.



2.4 Irudia: ICP-AES funtzionamenduaren eskema. Skoog ,1998-tik hartua

Zelulak 6 putzuko plaketan inkubatu ziren, eta saioa hasi baino ordu bat lehenago hazkuntza medioa kendu eta K^+ gabeko HBSS tanpoiarengatik ordezkatu zitzairen. Gero toxinekin inkubatu ziren, denbora desberdinetan (0, 2, 5 eta 10 minutuz). Zelulak PBSrekin garbitu ziren eta 500 μ l ur-distilatuarekin inkubatu ziren 20 minutuz edo guztiz lisatu arte. Lisatutako zelulak zentrifugatu egin ziren (40000 x g, 20 min, 4 °C) eta gainjalkina hartu zen. Gainjalkina (0,7 ml) HNO_3 -rekin inkubatu zen 24 orduz liseriketa azidoa egiteko eta karbono konposatuak kentzeko. Gero laginak UPV/EHUko SGIker zerbitzuko ICP-AES (Horiba Jobin Yvon, Activa) bidez aztertu ziren eta K^+ kontzentrazioak neurtu ziren.

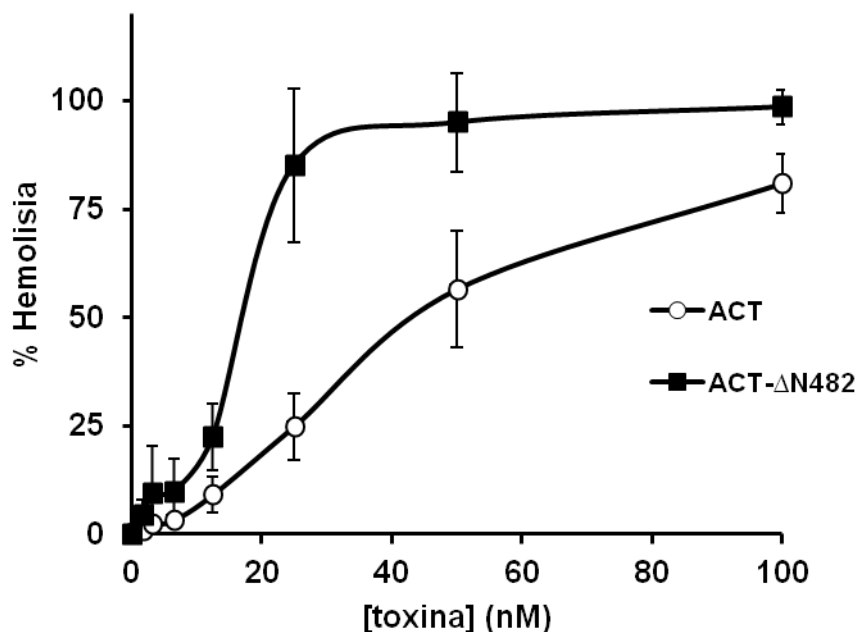
3. Emaitzak: ACTren poro-eratzaille aktibitatearen karakterizazioa ACT- Δ N482 mutantea erabiliz

3. EMAITZAK: ACTren poro-eratzaille aktibitatearen karakterizazioa ACT- Δ N482 mutantea erabiliz.

3.1 ACT- Δ N482 mutantearen aktibitate poro-eratzaillearen karakterizazioa hemolisi esperimentuen bidez

3.1.1 Toxina kontzentrazioa eta aktibitate hemolitikoaren arteko erlazioa

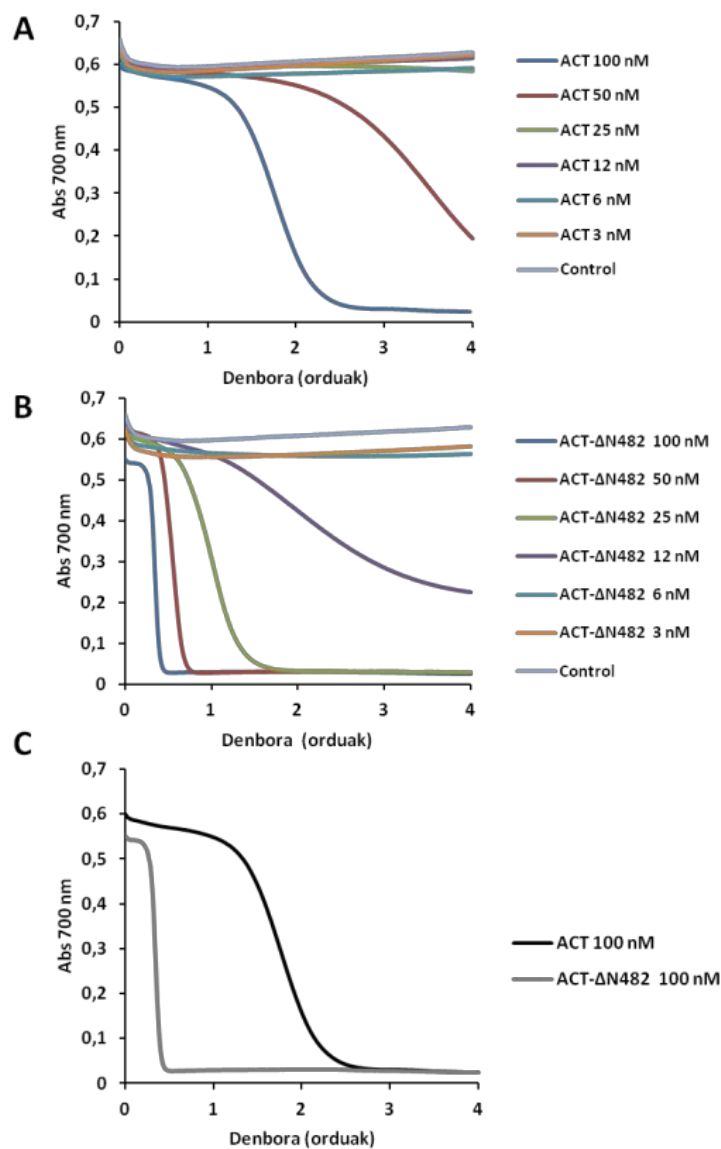
Atal honen helburua ACT- Δ N482 mutantea erabiliz ACT toxinarekin poro-eratzaille aktibitatearen azterketa burutzeko da. ACT- Δ N482 mutanteak toxina basatiaren 482-1706 aminoazidoak ditu bakarrik, beraz, ez du AC domeinurik baina poro eraketan parte hartzen duen domeinu hemolitiko osoa du (helize hidrofobikoak, azilazio gunea, RTX errepikapenak, hartzaileari batzeko gunea...). Lehenik eta behin, hemolisi saioen bidez mutante honen poro-eraketa gaitasuna aztertu zen eta emaitzak toxina basatiarekin alderatu ziren. Ahari-eritrozitoak toxina poro-eratzaillearen aktibitatea aztertzeko askotan erabili dira zelula-eredu bezala. Aktibitate hemolitikoa neurtzeko hemoglobinarekin askapena detektatzen da laginarekin absorbantzia 412 nm-tara neurtuz. Emaitzetan ikusten denez (**3.1 Irudia**), ACT- Δ N482 mutanteak ACT-k baino aktibitate hemolitiko handiagoa dauka. Lau ordutan eritrozitoen % 50 hemolizatzeko ACTak 50 nM-eko kontzentrazioa behar du eta ACT- Δ N482ak 15 nM-rekin efektu berdina lortu dezake. Honen arabera esan daiteke, domeinu hemolitikoaz soilik osatuta dagoen mutantea toxina basatia baino ≈ 3 aldiz hemolitikoagoa dela. ACT- Δ N482 mutanteak hemolisiaren % 100 25 nM-tik gorako kontzentrazioetara lortzen du, ACTak ordea, ez du portzentai hau lortzen saio honetan erabilitako kontzentrazioetan (100 nM-rekin %80 inguru lortzen da). Saioan ACTren aktibitate maximoa ikusi ez arren, 100 nM baino kontzentrazio handiagoa ez erabiltzea erabaki zen. Kontzentrazio hau toxinak “in vivo” eduki dezakeena baino askoz handiagoa da, eta gainera, toxina purifikatu bolumen handiak bota beharko zirenez, toxinarekin purifikaziorako erabiltzen den urekin eritrozitoen hemolisia eragin ahalko luke.



3.1 Irudia. ACT eta ACT-ΔN482 mutantearen aktibitate hemolitikoaren azterketa. Eritrozito soluzio estandarizaturia toxinen diluzio seriatu batekin inkubatu zen 4 orduz, 37 °C-tan. Hemolisi portzentaia eritrozitoek askatutako hemoglobinareneko hemo-taldearen absorbantzia neurtuz kalkulatu zen, espektrofotometro bidez absorbantzia 412 nm-tan neurtuz. Hemolisiaren % 100a eritrozitoak Triton X-100 % 0,1 inkubatuaz lortu zen. Errore barrek hiru esperimentu independenteen arteko desbiazio estandarra adierazten dute

3.1.2 Hemolisi-zinetikaren azterketa

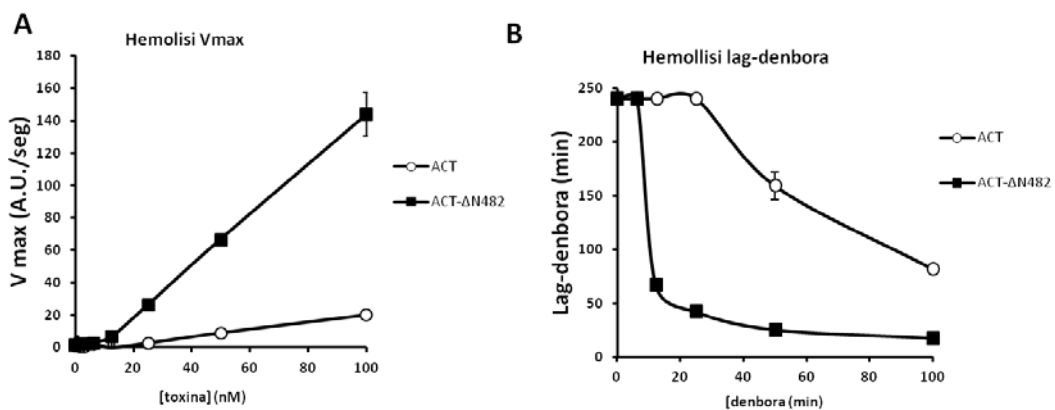
Toxinaren aktibitate hemolitikoaren zinetika aztertzeko, eritrozitoak 4 orduz toxina kontzentrazio desberdinekin inkubatu ziren, eta hemolisia uhertasun jeitsiera bidez neurtu zen (Abs 700 nm). **3.2 irudian** ACT eta ACT-ΔN482rekin egindako zinetikak agertzen dira. Argi ikusten da ACT-ΔN482ak aktibitate hemolitiko handiago eta azkarragoa duela. ACTrekin erabilitako kontzentrazioetatik, bakarrik 100 nM eta 50 nM-rekin antzematen da uhertasun jeitsiera (**3.2A irudia**). 25 nMrekin ez da efekturik ikusten inkubazio 4 orduetan. ACT-ΔN482rekin uhertasun jeitsiera 12nM-tik aurrera eta 25 nM-rekin laginak uhertasun minimoa lortzen du (**3.2 B irudia**). **3.2 C Irudian** toxina basati eta mutantearen 100 nM-ekin egindako inkubazioen zinetikak alderatzen dira. ACT-ΔN482aren zinetikak malda handiagoa eta lag-denbora askoz motzagoa duela argi ikusten da.



3.2 Irudia. ACT eta ACT-ΔN482aren zinetika hemolitikoaren azterketa. Eritrozitoen soluzioa 0,6 uhertasuna (Abs 700 nm) edukitzeko estandarizatu zen eta toxinen diluzio-seriatuarekin inkubatu zen 4 orduz, 37 °C-tan. Plaka-irakurlean (Synergy/HTX multi-moder reader, Biotek) uhertasun jeitsiera jarraitu zen absorbantzia 700 nm-tan neurtuz. **A)** ACT toxinarekin zinetika hemolitikoak. **B)** ACT-ΔN482 mutantearen zinetika hemolitikoak. **C)** ACT 100 nM eta ACT-ΔN482 100 nM duten zinetiken arteko alderaketa

Behatutako desberdintasun hauek hobeto aztertzeko, kontzentrazio bakoitzeko hemolisiaren parametro zinetikoak kalkulatu genituen, hemolisi abiadura maximoa (V_{max}) eta hemolisia hasi aurretik igarotako denbora-tartea (lag-time). Ezaugarri hauen irudikapena **3.3 irudian** ikusi daiteke. Testatutako kontzentrazio guztietan ACT-ΔN482ak lortutako abiadura hemolitiko maximoak (V_{max}) ACTarenak baino nabarmen handiagoak dira. ACT-ΔN482ren kontzentrazioa handitzean V_{max} igotzen

doa 100 nM-ekin 140 A.U./seg abiadura lortuz. ACT 100 nM-rekin lortzen den V_{max} handiena 20 A.U./seg da, ACT- Δ N482 baino 7 aldiz gutxiago. ACT ren V_{max} oso balore baxuetan mantentzen da toxina kontzentrazioa igo arren, ACT- Δ N482ren kasuan ordea, V_{max} baloreak ez du ematen balore maximo bat lortu duenik. Hemolisia hasi aurretik igarotako denbora-tartearen azterketan ere ACT- Δ N482rekin askoz denbora gutxiago behar da hemolizatzen asteko (30-50 minutu) eta denbora tarte hau 50 nM-etik aurrera egonkortuta dago. ACT-rekin lag-denbora askoz luzeagoa da, 50 nM-ekin 2 ordu baino gehiago behar ditu hemolisisa hasteko (kontzentrazio honetan toxinak eritrozitoen % 50 hemolizatzen ditu). Hemolisi gaitasunarekin gertatzen zen bezala, lag-denbora balorea ez du ematen 100 nM-ekin bere minimora iritsi denik eta ACT- Δ N482-rekin balore hau egonkortuta dagoela dirudi. Datu hauetatik ondorioak ateratzerakoan ezin da baztertu ACT toxinarekin kontzentrazio handiagoetan ACT- Δ N482 mutantearen antzeko ezaugarriak dituen hemolisi aktibitatea ikustea, baina lehen azaldu den bezala, ez da teknikoki posible ACT kontzentrazio askoz altuagoak erabiltzea esperimendu honetan.



3.3 Irudia. ACT eta ACT- Δ N482ren parametro zinetikoen irudikapena toxina kontzentrazioaren arabera.

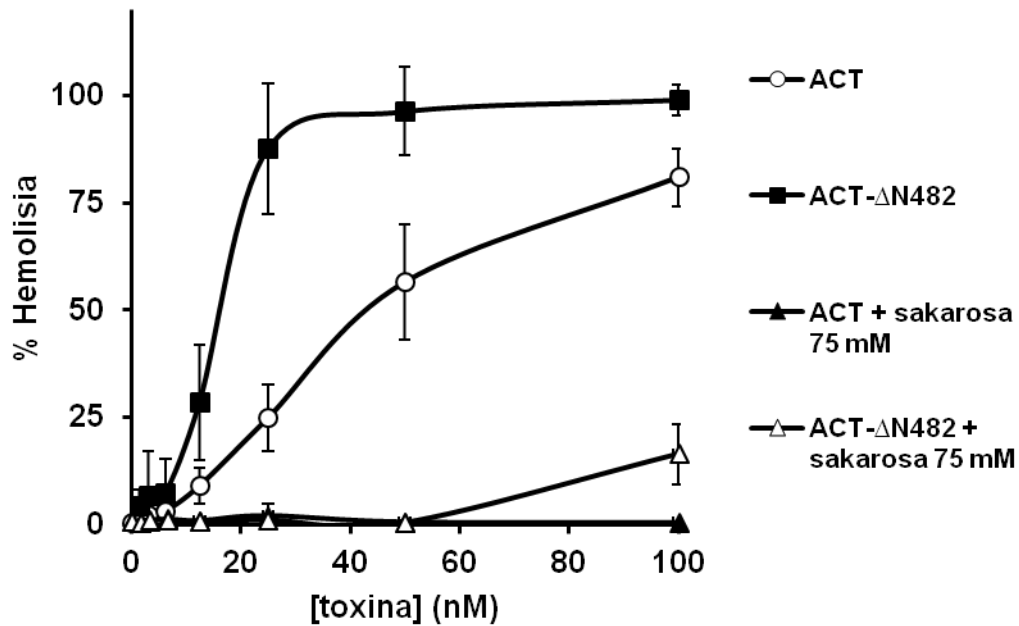
Uhertasun jaitsiera aztertuz burutu ziren zinetika hemolitikoen analitik ateratako baloreak bi grafiketan irudikatu ziren. A) ACT eta ACT- Δ N482aren zinetikan lortutako abiadura maximoak toxina kontzentrazioaren arabera. B) ACT eta ACT- Δ N482aren zinetikan neurtutako lag-denborak toxina kontzentrazioaren arabera. Errore barrak hiru esperimendu independenteen arteko desbiazio estandarra adierazten dute

ACT- Δ N482 mutanteak, toxina basatiarekin alderatuz, potentzi hemolitiko handiagoa duela dirudi, baina datu hauek teknika berdinarekin aztertutako beste toxina hemolitiko batzuekin alderatzeko orduan, argi ikusten da toxina basatia eta bere mutantea “toxina hemolitiko ahul” bezala sailkatu behar direla. Adibidez, era berdinean burututako esperimenduan, *Fragaceae* familiako toxina baten lag-

denborak segunduetan neurtzen dira eta hemolisi % 100ak 15 nM inguruko kontzentrazioekin lortzen dira, eritrozitoen mintzean gure toxinaren antzekoak diren 2 nm-ko poro "txikia" eratu arren (García-Linares et al., 2016).

3.1 .3 Poro-tamainen azterketa babes osmotikoko esperimntuen bidez

Zinetika saioetan ikusitako ACT- Δ N482 eta ACTren arteko desberdintasun nabarmenak azaltzeko era bat, ACT- Δ N482 mutanteak eratzen duen poroa toxina basatiak eratzen duena baino handiagoa izatea da. Toxina poro-eratzailleek mintzean egindako poroen diametroa estimatzeko, babes-osmotikoko medio batekin burututako hemolisia askotan erabilitako metodo bat da. Babes-osmotikorako aukeratutako molekulak ezin badu toxinak eratutako poroa zeharkatu, eritrozitoaren barne eta kanpoko osmolaritateak antzerako mantenduko dira eta ez da talka-osmotikorik emango, hemolisia inhibituz. Aurreko ikerketetan egindako saiakeretan ikusi zen ACTak eragindako hemolisia sakarosa babesle osmotiko bezala erabiliz inhibitzen zela (Ehrmann et al., 1991). Sakarosaren diametroa 0,92 nm ingurukoa da, beraz, toxinak eratzen duen poroa balio hau baino txikiagoa izan beharko luke. Hau egiaztatzeko, hemolisi saioa sakarosa (75 mM) babes-osmotiko bezala erabiliz egin zen. **3.4 irudian** ikusten denez, ACT eta ACT- Δ N482ak eragindako hemolisia guztiz inhibitzen da (% 5-10 da gehieneko hemolisia kontzentrazio handiengan) sakarosadun medioarekin. Honek adierazten digu ACT basatiak eta toxina mutanteak eritrozitoen mintzean eratzen duten poroa ≤ 0.92 nm dela, baina informazio hau ez da nahiko zehatza hemolisi potentzien arteko desberdintasun nabarmen horiek azaltzeko.

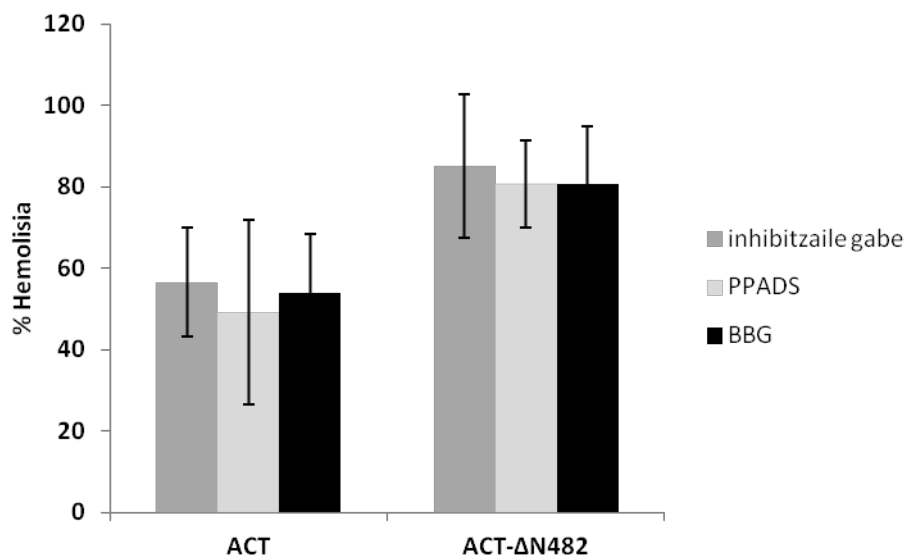


3.4 Irudia. Sakarosarekin egindako babes osmotikoko saioak. ACT eta ACT-ΔN482 kontzentrazio desberdinekin hemolisi saioak burutu ziren 75 mM sakarosa medioan gehituz babes-osmotiko bezala. Eritrozito soluzio estandarizatua toxinen diluzio seriatu batekin inkubatu zen 4 orduz 37 °C -tan. Hemolisi portzentaia eritrozitoek askatutako hemoglobinarekin hemo-taldea neurtuz egin zen, espektrofotometro bidez absorbantzia 412 nm-tan neurtuz. Hemolisiaren % 100 eritrozitoak Triton X-100 % 0,1 inkubatzu lortu zen. Errore barrak hiru esperimentu independenteen arteko desbideratze estandarra adierazten dute.

3.1.4 Kanale purinergikoen parte-hartze eza toxina basatiak eta bere mutanteak eragindako hemolisian

Beste RTX toxina poro-eratzailerekin egindako ikerketetan ikusi da eritrozitoen mintzean sortutako poroek ATP askatzen dutela zelularen kanpoaldera, mintzean dauden kanale-purinergikoak aktibatuz eta zabalduz (Skals et al., 2009). Honek toxinen gaitasun hemolitikoa indartzen du toxinen poroak eragindako iragazkortasunari kanal zabalduak eragiten duena gehituz. ACT toxinen kasuan ikusi da ez dituela kanal hauek aktibatzen (Masin et al., 2013), baina posiblea da ACT-ΔN482ek bai aktibatzea eta lehenago ikusitako hemolisi gaitasunen desberdintasuna kanal hauen efektuarengatik izatea. Hau egiaztatzeko, bi inhibitzaile desberdin erabili genituen eritrozitoen kanale-purinergikoak inhibitzeko, PPADS (Pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid)) eta BBG (Brilliant Blue G). Bi inhibitzaile hauen presentzian toxinekin egindako hemolisi

saioeta ez zen efektu inhibitzaile esanguratsurik ikusi (**3.5 Irudia**). Datu honetatik iradokitzen da kanal-purinergikoez ez dutela ez ACT ez ACT- Δ N482ren aktibitate hemolitikoan parte hartzen.



3.5 Irudia. Kanale purinergikoen inhibitzaileen efektuaren azterketa ACT eta ACT- Δ N482 eragindako hemolisian. Hemolisi saioa ACT 50 nM eta ACT- Δ N482 25 nM-ekin burutu zen 4 orduz 37 °C-tan. Eritrozitoak PPADS (200 μ M) eta BBG (100 μ M) inhibitzaileekin inkubatu ziren ordu batez saioa hasi baino lehen. Hemolisi kantitatea eritrozitoek askatutako hemo-taldea neurtuz egin zen, espektrofotometro bidez absorbantzia 412 nm-tan neurtuz. Hemolisi %100 eritrozitoak Triton X-100 % 0,1 inkubatuz lortu zen. Errore barrak hiru experimentu independenteen arteko desbiazio estandarra adierazten dute

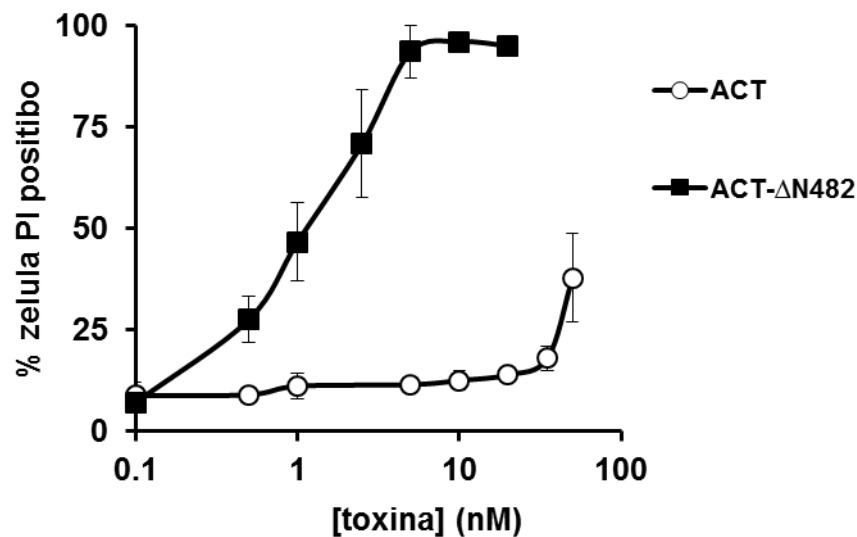
Hemolisi saioetan lortutako datu guztiak batuz hau da iradokitzen duguna: ACT- Δ N482 mutanteak eritrozitoetan toxina basatiaren itxuraz antzeko poroa eratuz eta kanal-purinergikoen laguntzarik gabe, ACTak eragiten duena baino aktibitate hemolitiko askoz azkarrago eta handiagoa daukala.

3.2 Makrofagoetan eragindako mintz-iragazkortasuna

3.2.1 Propidio ioduroarekiko iragazkortasuna

ACT- Δ N482ren aktibitate hemolitikoaren azterketa egin eta gero, aktibitate honek J774A.1 makrofagoetan dituen ezaugarriak aztertu genituen. J774.A1 makrofagoek CD11b/CD18 integrina mintzean adierazten dute (toxinaren afinitate altuko hartzailea)

eta horregatik ikerketa askotan toxinen itu-zelula eredu bezala erabili dira. Zelula hauetan ACT- Δ N482ren aktibitate litikoa aztertzeko, zelulek propidio ioduroarekiko (PI) zuten iragazkortasuna neurtzea erabaki zen. Zelula eukariotikoen mintz-plasmatikoa PI-rekiko iragazkaitza da, PI-k mintza iragazteko bide bakarra zelulak bere bideragarritasuna galtzea edo mintzean iragazkorak diren poroak eratzea da. PI iragazkortasun saioan, zelulak toxina kontzentrazio desberdinekin 37 °C - tan 5 minutuz tratatu eta gero, PI rekin inkubatu ziren (50 μ g/ml) 2 minutuz, eta ondoren fluxuzko zitometria bidez aztertu ziren. **3.6 irudian** ikusi daiteke ACT- Δ N482ak makrofagoen mintza PIrekiko iragazkor bihurtzeko gaitasuna duela kontzentrazioaren arabera. Tratatu gabeko kontrolarekin alderatuz (% 8 iragazkor), ACT- Δ N482ak 0,5 nM kontzentrazioetik aurrera makrofagoak nabarmen iragazkortzeko gaitasuna erakusten du. Kontuan eduki behar da PI-ren diametroa 1 nm ingurukoa dela, beraz, toxinak mintzean eratzten duen poroaren erradio minimoa 1 nm inguru izan beharko luke. Datu hau eritrozitoetan egindako osmoprotekzio saioetatik ondorioztatutako poro-tamainuaren antzekoa dela esan daiteke (0,92 nm eritrozitoetan). ACTren kasuan, kontzentrazio askoz handiagoak behar ditu zelulak PI iragazkor bihurtzeko. Ezberdintasun honen arrazoiak aurrerago ikertuko ditugu 3.4 atalean.



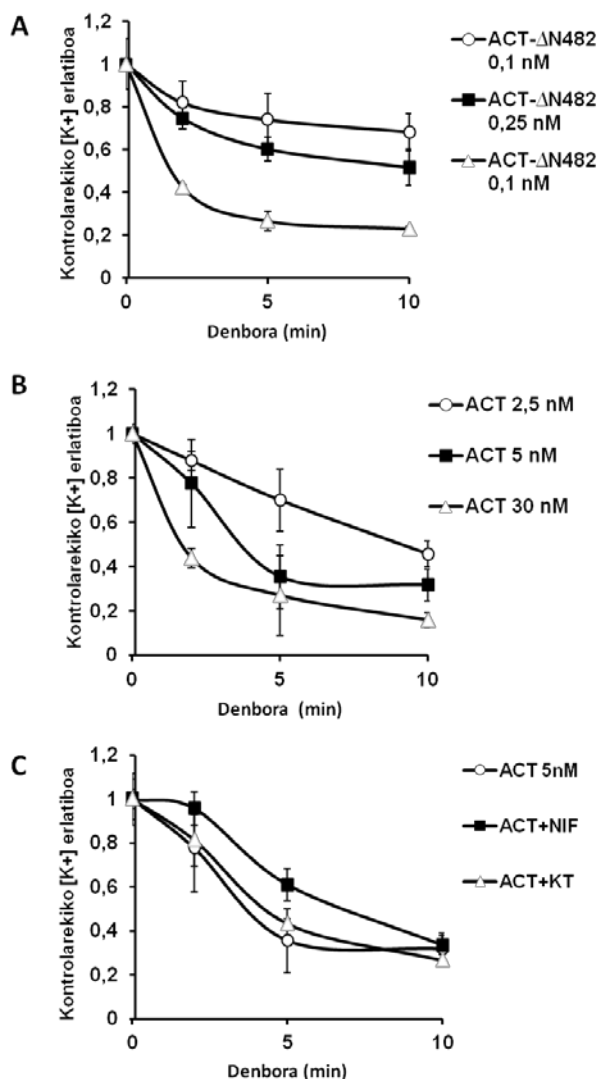
3.6 Irudia. Propidio ioduroarekiko iragazkortasun saioa J774 zeluletan. Zelulak 5 minutuz 37 °C -tara ACT eta ACT- Δ N482 kontzentrazio desberdinekin inkubatu ziren. Gero ioduro propidioarekin (PI, 50 μ g/ml) inkubatu ziren 4 minutuz eta fluxuzko zitometri bidez aztertu ziren. PI-iragazkaitzak ziren laginak baino seinale gehiago dituzten zelulak PI-positibo bezala sailkatu ziren. Errore barrak hiru esperimentu independenteen arteko desbiazio estandarra adierazten dute

3.2.2 Potasio intrazelularraren irteera

Poro-eratzaille toxinek beraien itu-zelulen mintza ioi desberdinekiko iragazkor bihurtzeko gaitasuna dute, zelulari kalte eginez bere barneko ioi-kontzentrazioak aldatuz. Zelularen funtzionamendurako ioi garrantzitsuenetariko bat potasioa (K^+) da. Baldintza fisiologiko arruntetan, K^+ zelularraren barne kontzentrazioa 150 mM ingurukoa izaten da, kanpoaldekoa 5 mM inguru izanik. Arrazoi honengatik zelularen mintzean K^+ -rekiko iragazkorra den poro bat eratzeak K^+ -ren irteera eragiten du, zelularen bideragarritasunean kalte handiak eraginez. ACT- $\Delta N482$ ak ioi honen irteera eragiten duen jakiteko ICP-AES teknika erabili zen. Irudian ikusten denez (**3.7 Irudia A**) ACT- $\Delta N482$ ak hasierako minutuetan K^+ irteera eragiteko gaitasuna du erabilitako toxina kontzentrazioaren arabera. Datu hauek bat datoz PI-iragazkortasun saioan lortutakoekin. Aurretik egindako ikerketetatik badakigu ACT toxina basatiak K^+ irteera eragiteko gaitasuna duela, horrenbestez, teknika honentzako kontrol moduan saio berdina ACT toxinarekin egin zen (**3.7 Irudia B**). ACT eta bere mutantearen K^+ irteerazinetikak alderatuz antzeman daiteke toxina mutanteak gaitasun handiagoa duela K^+ irteera eragiteko.

Gure taldeko aurreko lanetan aurkitu zen ACT toxinak bere adenilato ziklasa aktibitateari esker L-motako kaltzio kanalak zabaltzeko gaitasuna duela (Martín et al., 2010). Kaltzio sarrerak kaltzio menpeko K^+ kanalak ere aktibatu ditzakeela jakinda, L-motako kaltzio kanalen inhibizioak ACTak eragiten duen K^+ irteeran eraginik duen aztertu zen. Honetarako zelulak L-motako Ca^{2+} kanalak inhibitzen dituen nifedipina inhibitzailearekin tratatu ziren. L-motako kanalen aktibazioa PKA bidez ematen da (toxinaren AC aktibitateak aktibatzen duen kinasak), arrazoi honengatik zelulak kinasak honen inhibitzaileak den KT5720-rekin tratatu ziren. Irudiko emaitzetatik (**3.7 C Irudia**) iradoki daiteke L-motako kanalak eta AC aktibitate bidez aktibatzen den PKA kinasak ez dutela efektu esanguratsurik ACTak eragindako K^+ irteeran. Horrenbestez, aztertutako kanalen parte hartzea baztertua, ondoriozta daiteke ACT toxinareneko domeinu hemolitikoak bere kabuz K^+ -rekiko iragazkorra diren poroak eratzeko gaitasuna duela. Ondorio hau, bibliografian askotan erabilitako CyaA- ΔAC (387-1706) mutantetik ateratako ondorioak kontrajartzen ditu. Domeinu hemolitiko isolatuaren eredu bezala

erabiltzen den mutante honek ez duelako K^+ irteera eragiteko gaitasunik (Dunne et al., 2010).

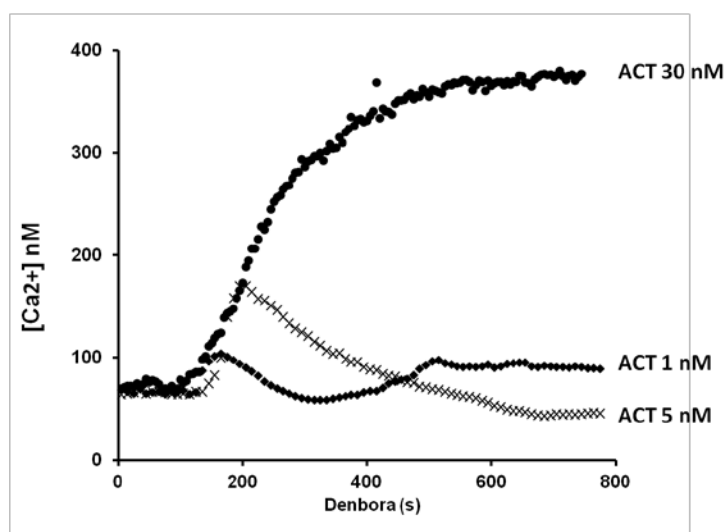


3.7 Irudia. ACT eta ACT-ΔN482ren efektua J774.A zelulen potasio intrazelular mailan. Zelulak toxina kontzentrazio desberdinekin tratatu ziren 10 minutuz eta K^+ kantitateak ICP-MS bidez kuantifikatu ziren. A) Zelulak ACT-ΔN482 kontzentrazio desberdinekin inkubatuta. B) Zelulak ACT kontzentrazio desberdinekin inkubatuta. C) Zelulak nifedipina (10 μ M) eta KT5720 (56 μ M) aurreinkubatu ziren 30 minutuz, ACT kontzentrazio desberdinekin tratatu aurretik. Lortutako potasio kontzentrazioak tratatu gabeko kontrolaren potasio kontzentrazioaren arabera erlatibizatzen dira. Errore barrak hiru esperimentu independenteen desbideratze estandarra adierazten du.

3.2.3 Kaltzio extrazelularren sarrera.

ACT-ΔN482ak itu-zeluletan Ca^{2+} intrazelularren kontzentrazioak igo ditzakeen neurtzeko, Ca^{2+} -rekiko sentikorra den FURA-2-AM fluoroforo ratiometrikoa erabili genuen. Lehendik egindako ikerketetatik badakigu ACTak Ca^{2+} sarrera eragiteko

gaitasuna duela (Martín et al. 2010), baina lan honetan sarrera hori K^+ irteera ikusi dugun kontzentrazioetan ikusten den frogatuko dugu (1-5 nM). Erreferentzi bezala gure taldearen beste lanetan Ca^{2+} sarrera eragiten duen kontzentrazio ezaguna erabiliko dugu (35 nM) eta gero, ACT- Δ N482ak ere Ca^{2+} sarrera eragiteko gairasuna duen testatuko dugu. ACTrekin ikusi genuen (**3.8 Irudia**) 5 eta 1 nM-ko kontzentrazioetan ez duela Ca^{2+} sarrera esanguratsurik eragiten. 1 nM-ekin ez da igoera nabarmenik ematen eta 5 nM-rekin hasieran igoera bat ematen da baina Ca^{2+} baloreak bizkortazun handiz hasierako egoerara bueltatzen dira. Igoera hau, seguraski, toxina mintzera batzean eta translokatzearan eragindako mintz desegituraketarengatik izango da (Fiser et al., 2007). Makrofagoak ACT- Δ N482rekin (1-5 nM) inkubatzearan, zelulen fluoreszentzi ratioak igoera azkarra dauka inkubazioaren lehenengo 5 minutuetan (**3.9 Irudia**). Emaitza hauek adierazten dute ACT- Δ N482ak kontzentrazioaren arabera Ca^{2+} intrazelularraren igoera azkar bat eragiten duela J774 makrofagoetan.

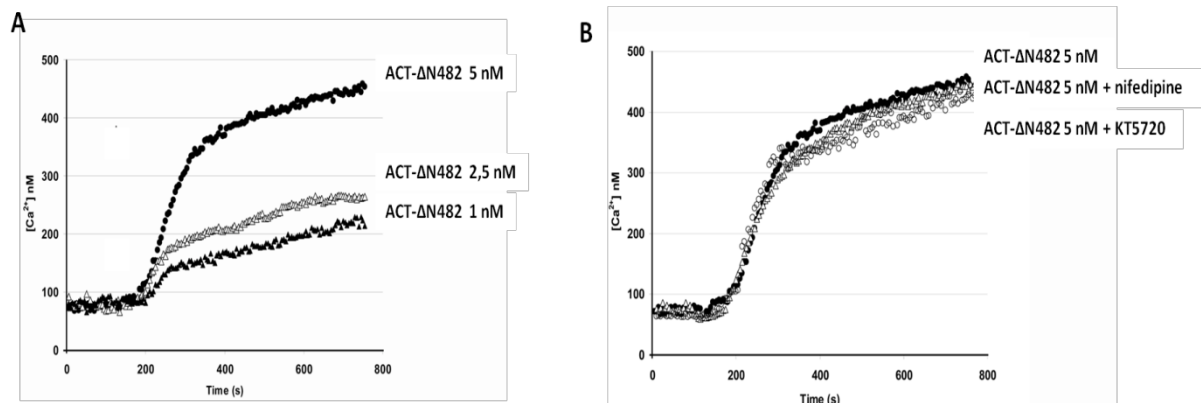


3.8 Irudia: ACTak eragindako kaltzio sarrera. Fura 2-AMrekin kargatutako zelulak ACT kontzentrazio desberdinekin (1, 5 eta 35 nM) tratatu ziren eta Fura 2ren fluoreszentziaren zinetika jarraitu zen 30 minutuz.. Grafikako borobil beltzak ACT 35 nM dira, gurutzak ACT 5 nM eta karratu beltzak ACT 1 nM. . Zinetikak hiru esperimentu independenteen media da, esperimentu bakoitzean 30 zelula aztertu ziren.

Arestian aipatu dugun moduan, aurreko ikerketetan gure taldeak frogatu zuen ACT toxinak makrofagoetan Ca^{2+} sarrera bat eragiten zuela L-motako Ca^{2+} kanalak aktibatuz. Arrazoi honengatik, kanal hauek ACT- Δ N482ak eragindako Ca^{2+} sarreraren eraginik duten begiratu genuen. Horretarako, zelulak nifedipina (10 μ M) eta KT5720-rekin (56

μM) aurretratu genituen 30 minutuz, gero FURA-2-AM bidez Ca^{2+} sarrera neurtzeko.

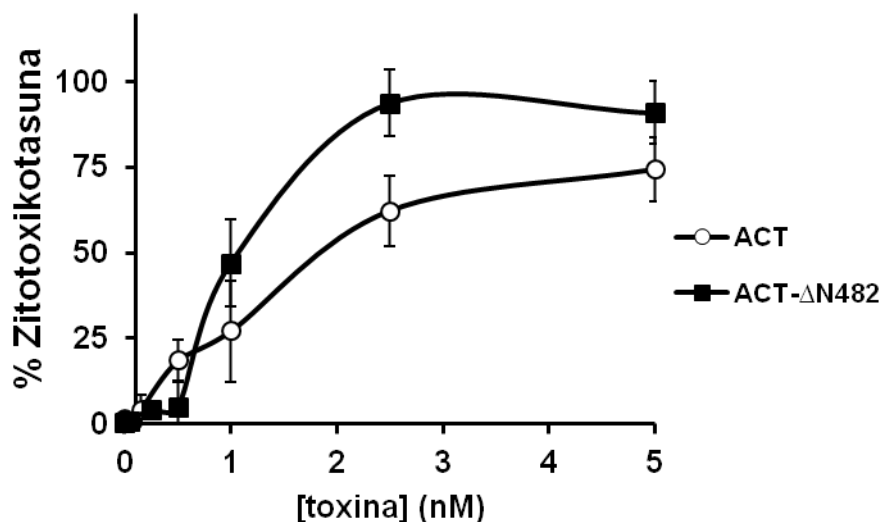
3.9 Irudian erakusten da bi inhibitzaile hauek ez dutela ACT- ΔN482 ak eragindako Ca^{2+} -ren sarrera inhibitu edo eraldatzen, mekanismo honetan L-motako kanalen parte hartzea baztertuz. Emaitz hau bat dator gure taldeak proposatutako ACTaren Ca^{2+} sarrera mekanismoarekin, hau da, ACTaren aktibitate katalitikoak PKA bidez L-moduko kanalak zabaltzen dituela eta hauek zelulan Ca^{2+} sarrera eragiten dutela (Martin et al., 2010). ACT- ΔN482 mutanteak AC domeinua ez edukitzean, ez du PKA aktibatzen eta L-motako kanalek ez dute toxina honek eragindako Ca^{2+} sarreran parte hartzen, inhibitzaileen efektu ezari azalpena emanez. Datuak batera hartuta, azalpen arrazonagarriena litzateke ACT-ren RTX domeinu hemolitikoak itu-zelulan sortutako poroak Ca^{2+} -rekiko iragazkorrek direla eta itu-zelularen Ca^{2+} intrazelularren igoera azkar bat eragiten dutela.



3.9 Irudia. ACT- ΔN482 ak eragindako kaltzio sarrera. Zelulak inhibitzaile bakoitzarekin 30 minutuz pre-inkubatuak izan ziren eta gero ACT- ΔN482 5 nM-rekin kaltzio intrazelularren igoera jarraitu zen 10 minutuz 37 °C-tan FURA 2-AM-ren fluoreszentzia jasoz. Inhibitzaile hauek erabili ziren: Nifedipina (10 μM) eta KT5720 (56 μM)

3.2.4 Mintz-iragazkortasunak makrofagoen lisia eragiteko gaitasuna

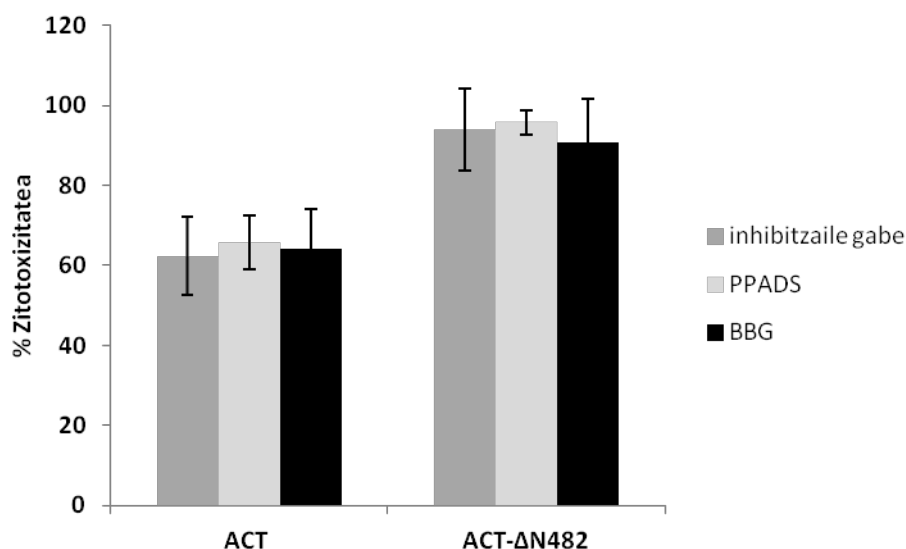
ACT- ΔN482 aren aktibitate poro-eratzailaren ezaugarriak aztertu eta gero, aktibitate honek makrofagoen lisia eragin dezakeen aztertu genuen. Horretarako toxinarekin tratatutako zelulen LDH entzima zitosoikoaren askapena neurtu genuen. Irudian ikusten den moduan (**3.10 Irudia**), ACT- ΔN482 ak makrofagoen lisia eta heriotza eragin dezake. ACT toxinarekin alderatuz, ikusi daiteke ACT- ΔN482 mutanteak 2 orduko inkubazioan ACT toxina baino gaitasun handiagoa duela makrofagoak lisatzeko, AC aktibitatea faltan eduki arren. Emaitz honen arrazoia mutanteak aktibitate poro-eratzaila handiago duelako izan daiteke, hemolisi saioetan ikusi genuen bezala.



3.10 Irudia. Toxinak eragindako zitotoxizitatea J774A.1 zeluletan. ACT eta ACT-ΔN482 kontzentrazio desberdinek eragindako zitotoxizitatearen azterketa LDH askapenaren neurketa bidez. Zelulak toxinarekin 2 orduz inkubatu ziren 37 °C-tan Optimen medioan . Zitotoxizitatearen % 100a zelulak Triton X-100 % 0,1 tratatuz lortu zen. Errore barrak hiru esperimentu independenteen desbideratze estandarra adierazten du

3.2..5 Kanale-purinergikoen parte-hartze eza makrofagoen mintz-iragazkortasunean

Beste RTX toxinekin ikusi da kanale purinergikoen bidezko zitotoxizitatea eragiten dutela, eratzen dituzten poroetatik askatutako ATP intrazelularra dela eta (Skals et al., 2009). Zelula barneko ATP-a kanporatua izatean kanale hauek zabaldu eta mintza Ca^{2+} bezalako ioientzako iragazkor bihurtzen dute, zelulen bideragarritasuna kaltetuz. Kanale hauek toxinaren ekintza-mekanismoan eraginik duten jakiteko, zelulak kanale hauen bi inhibitzaileekin aurre-inkubatu ziren (PPADS eta BBG) eta toxinak eragindako zitotoxizitatean inhibiziorik zegoen begiratu zen. **3.11 irudian** behatu daiteke ez dagoela zitotoxizitatearen aldaketa esanguratsurik inhibitzaileen efektuarengatik. Datu honek adierazten digu kanal-purinergikoez ez dutela ACT eta bere mutantearekin beste RTX familiko toxinetan jotzen duten eginkizuna jotzen. ACT eta ACT-ΔN482ren poroa beste RTX toxinena baino txikiagoa denez, seguraski ATP-ak ezin du iragazi , kanalen aktibazioa ezinezkoa eginez.



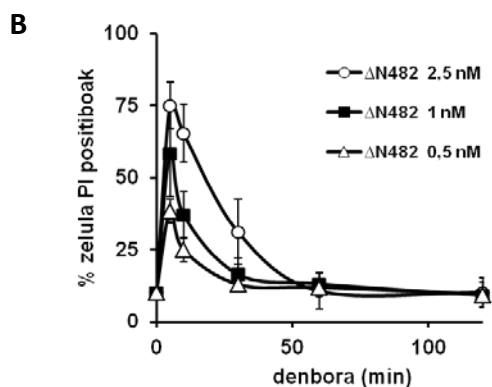
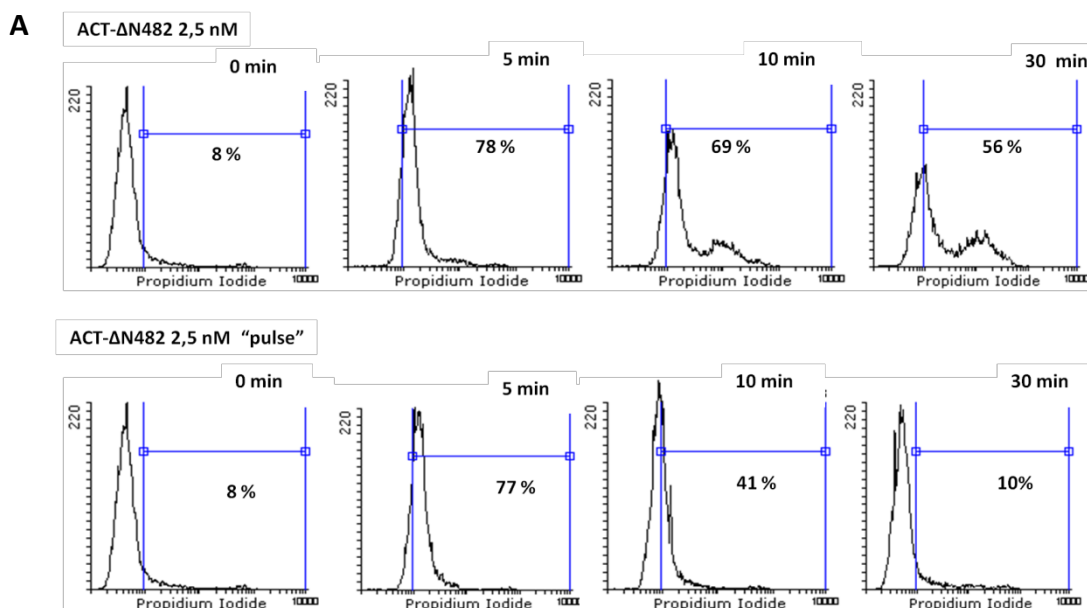
3.11 Irudia. Kanal purinergikoen inhibitzaileek toxinen zitotoxizitatean duten efektuaren azterketa. J774 zelulak PPADS (200 μ M) eta BBG (100 μ M) inhibitzaileekin inkubatu ziren ordu batez eta gero ACT 2,5 nM eta ACT- Δ N482 2,5 nM-ek eragindako zitotoxizitatea aztertu zen LDH askapena neurtuz. Zelulak toxinarekin 2 orduz inkubatu ziren 37 $^{\circ}$ C –tan Optimen medioan. Zitotoxizitate % 100a zelulak Triton X-100 (% 0,1) tratatuz lortu zen. Errore barrak hiru esperimentu independenteen desbideratze estandarra adierazten du

3.3. ACT- Δ N482-k eragindako mintz-iragazkortasunaren erreparazio mekanismoaren azterketa makrofagoetan

3.3.1 Makrofagoek ACT- Δ N482-k eragindako iragazkortasuna erreparatzeko gaitasuna dute

ACT- Δ N482ak bere itu-zelulen mintz-plasmatikoa propidio ioduroarekiko (PI) iragazkor bihurtu dezakeela jakinda, zelulak iragazkortasun hori erreparatzeko gaitasuna duen testatu genuen. Beste toxinekin egindako lanak erreferentzi moduan hartuta (Idone et al., 2008), **3.6 irudian** PI iragazkortasuna detektatzeko egindako saioa burutu genuen gure toxinekin. Zelulak mintzeko iragazkortasuna erreparatzeko gai direla frogatzeko, toxinak kontzentrazio sub-litiko batetan eragiten duen iragazkortasunaren igoera eta erreparazio mekanismoari esker ematen den beherakada detektatzea da helburua. Hau gure metodoekin detektatzea zaila da. Makrofagoak zitrometora eramateko pipeteatuz jailki beharrak iragazkortasun basal bat eragiten du (% 5-10 inguru), eta honek toxinak kontzentrazio sub-litikoek eragiten duen PI sarrera detektatzea asko zailtzen du. Hau ikusita, iragazkortasunaren erreparazioa detektatzeko estrategia desberdina diseinatu

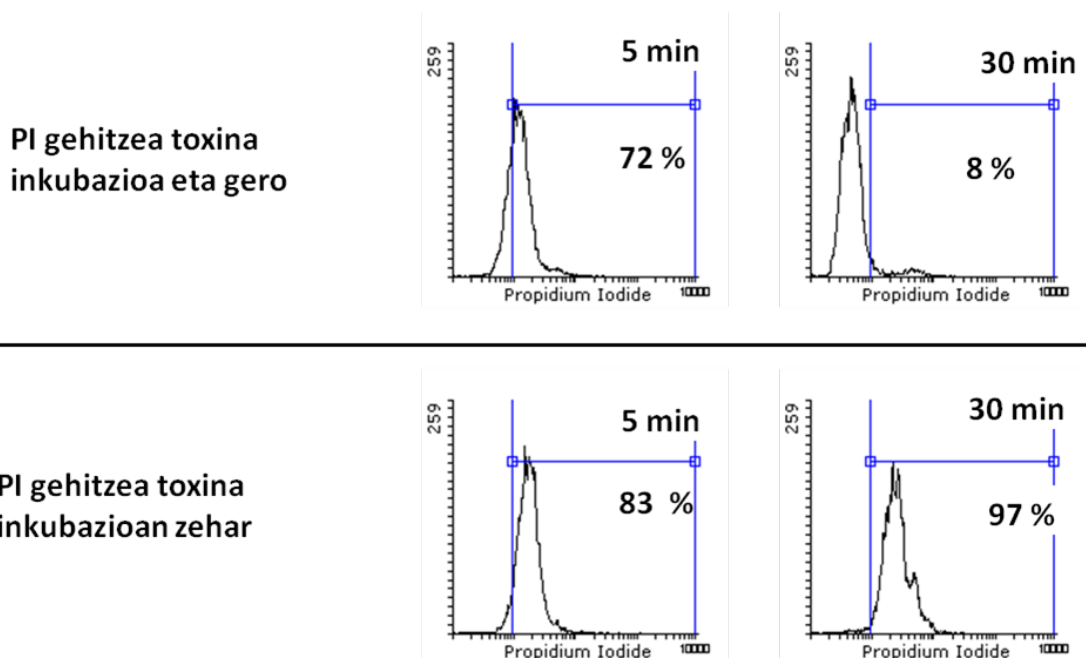
zen. Zelulak 5 minutuz PI-iragazkor bihurtzen dituen ACT- Δ N482 kontzentrazioekin inkubatu ziren, gero medioa garbitu eta iragazkortasun horren eboluzioa 2 orduz detektatzen joan zen. Modu honekin hasierako iragazkortasun maximo bat eragiten dugu zelulan, baina toxinadun medioa garbituz iragazkortasun honek eragindako kaltuari erantzuteko aukera ematen diogu zelulari. Toxinarekin inkubatzeko modu honi “pulse” deritzogu aurrerantzean, toxina medioan konstanteki dagoen saio arruntetik bereizteko.



3.12 Irudia. PI-iragazkortasun erreparazio saioa ACT- Δ N482 toxina mutantearekin. Zelulak ACT- Δ N482 kontzentrazio desberdinekin inkubatu ziren denbora desberdinetan 37 °C -tara, inkubazioa bukatzean PI gehitu zitzairen (50 μ g/ml) eta fluxuzko zitometria bidez aztertu ziren. “Pulse” deituriko metodoan zelulak toxinarekin 5 minutuz inkubatu ziren eta gero medioa garbitu zen, mintza erreparatzeko denbora desberdinak utziz. **A)** Bi inkubazio metodoen arteko alderaketa zelula-kopurua vs propidio ioduro señaleari irudikatzen duten histogrametan. Y ardatzak zelula kopurua adierazten du, eta X ardatzak PI-ren seinalea, eskala logaritmikoa **B)** ACT- Δ N482k eragindako iragazkortasunaren erreparazioa kontzentrazio desberdinetan “pulse” inkubazio metodoa erabiliz

3.12 irudian ACT-ΔN482 2,5 nM-ekin egindako saioaren histogramak azaltzen dira, non toxina medioan konstanteki laga, edo 5 minutuko “pulse” inkubazioak zelulen mintz iragazkortasunean duen efektua neurtu zen. Hasieran antzematen da zelula populazio gehiena PI-positibo bihurtzen dela (% 78). Toxina medioan etengabe duten zeluletan, iragazkortasunak jeitsiera bat du 10 minutuetara (69 %) baina zelulek ezingo dute kalte hori guztiz erreparatu eta heriotza jasango dute denbora aurrera joan ahala (30 minutuan % 97 PI positibo dira). Zelulak ACT-ΔN482rekin “pulse” erara inkubatu iragazkortasunaren eboluzioa desberdina dela ikusten da. Zelulak hasierako iragazkortasuna (% 77) 30 minutu eta gero, guztiz erreparatzeko gaitasuna dute, toxinarekin tratatu gabeko kontroletik bereizezina eginez (% 8). Emaitz hauetatik iradoki daiteke, jasandako kalte mailaren arabera, makrofagoek ACT-ΔN482ak eragindako hasierako mintz iragazkortasuna erreparatzeko gaitasun dutela.

Ondorio hau egiaztatzeko, saio berdina ACT-ΔN482 kontzentrazio desberdinekin burutu zen (**3.12 B irudia**). Erreparazioa ikusten den kontzentrazioak 0,5 nM, 1 nM eta 2,5 nM dira eta erreparazio prozesua lehenengo 30 minutuetan ematen da. 0,5 nM-etik beherako kontzentrazioak ez dute iragazkortasun detektagarririk sortzen hasierako minutuetan eta 2,5 nM-tik gorakoak ez dute erreparaziorik aurkezten.



3.13 Irudia. PI-iragazkortasun erreparazio saioa, PI medioan etengabe edukita. Zelulak ACT-ΔN482 2,5 nM-ekin 5 minutuz inkubatu eta gero 30 minututara PI-iragazkortasuna aztertu zen fluxu zitometriaz. Saio berdina inkubazio medioan ioduro propidiodia hasieratik utziz burutu zen. Irudian PI-positibo bezala sailkatutako zelulen

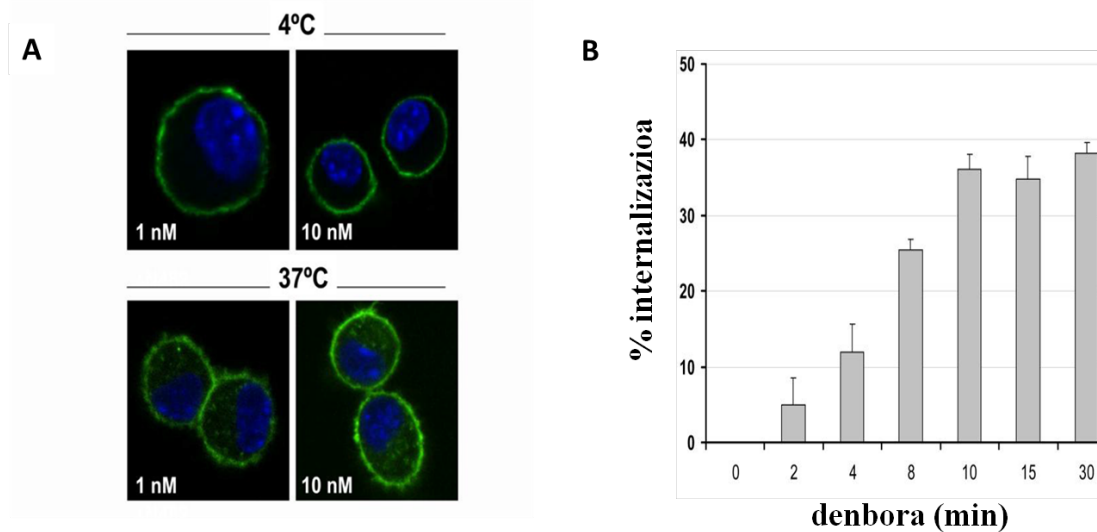
portzentaia adierazten da. Histogramaren Y ardatzak zelula kopurua adierazten du, eta X ardatzak ioduro propidioaren seinalea, eskala logaritmikoan. Histogramak hiru esperimendu independenteen adierazgarriak dira.

Saio honetan artefakturik ez dagoela zihurtatu beharra zegoen, posiblea baitzen hasieran PI positibo ziren zelulak 30 minutura hil eta detektatu ezin diren zelula hondakin bezala egotea. Hau egiaztatzeko, saio berdina baina PI medioan konstanteki edukita burutzea pentsatu zen. Modu honetan, inkubazio hasieran PI iragazkortasuna jasaten duten zelulak PI positibo bezala agertuko dira denbora tarte guztietan, bere mintza erreparatu arren. Hasierako iragazkortasuna ez edukitzearen kasuan 30 minutura PI negatibo bezala agertuko lirateke. Irudian (**3.13 Irudia**) ikusten da 30 minutuz ACT- Δ N482rekin tratatuak eta medioan PI konstanteki izan zuten zelulen populazio ia guztia PI positibo bezala agertzen dela. Baldintza berdinean baina PI-a 30 minutuak eta gero gehitutako laginean ordea, populazio ia guztia PI negatibo bezala agertzen da. Emaitz honek lehengo irudian iradokitakoa baieztatzen du: makrofagoek ACT- Δ N482-ek eragindako mintz-iragazkortasuna erreparatzeko gaitasuna dutela toxina kontzentrazio tarte batetan. Hau onartuta, hurrengo saioen helburua erreparazio hori burutzen duen mekanismoa azaltzea izan zen.

3.3.2 ACT- Δ N482ak sortutako iragazkortasunaren erreparazioa bat dator toxinaren endozitosi zinetikarekin

Toxina poro-eratzaille batek mintz-plasmatikoan sortu ditzakeen poroen aurrean, zelulak bi erreparazio-estrategia nagusi hartu ditzakela ikusi da: toxina exozitosi bidez mintz-plasmatikotik kanporatu edo endozitosi bidez barneratu. Gure taldearen aurreko ikerketetan (Martín et al., 2011) ACT toxinaren endozitosisia azkar eta kopuru esanguratsuetan ematen dela ikusi zen. Honek erreparazio-mekanismoa toxinaren endozitosian oinarritzen dela pentsarazten digu. Hau baieztatzeko, makrofagoetan ACT- Δ N482 era honetan endozitatua izaten den egiaztatu genuen. Honetarako bi teknika desberdin erabili genituen, mikroskopia konfokala eta fluxuzko zitometroa. Mikroskopia konfokala erabiliz toxina zelulan barneratua dela frogatu genuen. Hau **3.14 A irudian** ikusi daiteke, ACT- Δ N482 9D4 antigorputzarekin markatu genuen (kolore berdez) eta zelulen nukleoa Hoechst-rekin (kolore urdina). Kontrol bezala saioa 4 °C-tan burutu zen, non endozitosisia ez da ematen. 4 °C-tara ACT- Δ N482-ren fluoreszentzia

mintz-plasmatikoaren kanpoaldean agertzen da bakarrik . Saio berdina 37 °C -tan burutu zen eta irudian argi ikusten den bezala (**3.14 B Irudia**), toxinen parte handi bat zelula barnean bereizi daiteke endozitatua izan dela adieraziz. Seinale faltarengatik ezin izan ziren kontzentrazio baxuagoak erabili esperimentuetarako.



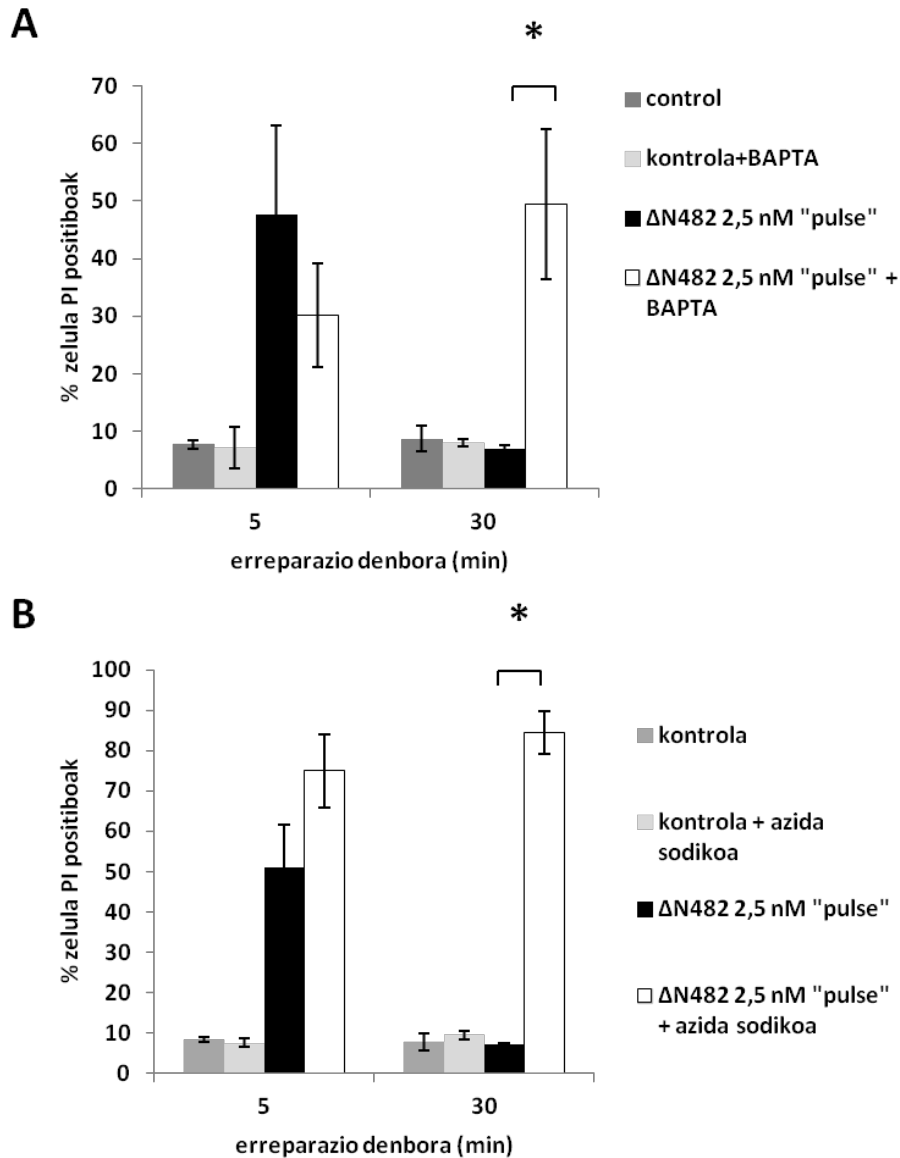
3.14 Irudia. ACT-ΔN482 toxina mutantearen endozitoziaren azterketa. A) Konfokal mikroskopiaren bidez ACT-ΔN482-ren (berdez) kokapen zelularren azterketa bi kontzentrazio (1 eta 10 nM) eta bi tenperatura desberdinetan (4 °C eta 37 °C). Nucleo zelularra Hoestch-ekin markatu zen (urdina). B) Fluxuzko zitometria bidez ACT-ΔN482 (5 nM) endozitosiaren jarraipena Teknika Experimentalen atalean azaltzen den bezala. Errore barrak hiru esperimentu independenteen desbideratze estandarra adierazten dute

Fluxuzko zitometroan, toxinen aurkako antigorputza gehituz eta seinale hori 4 °C -tan (endozitosi gabe) toxinarekin inkubatutako laginekin alderatuz, endozitatutako toxina-portzentaia kalkulatu daiteke. Datuetatik antzeman daiteke mintzeko ACT-ΔN482a lehenengo 30 minutuetan zehar endozitatua izaten dela konstanteki toxinen % 40 barneratzera iritsi arte (**3.14B**). Bi irudien emaitzetatik azpimagarria da ACT-ΔN482 endozitosiaren zinetika aurreko atalean ikusi den erreparazio zinetikarekin batera doala. Beraz, ondorioztadaiteke toxinak eragindako iragazkortasunaren desagertzearen zergatia mintz-plasmatikoan aurkitzen den toxinen endozitosisia dela. Hurrengo pausua endozitosi mekanismo honen karakterizazioa izan zen.

3.3.4 ACT-ΔN482ak aktibatutako erreparazio mekanismoa Ca²⁺ sarrera eta ATP kontzentrazio intrazelularren menpekoea da

Azken hamarkadan egindako ikerketetan, por- eratzailerak toxinen aurka zelulek garatu duten endozitosi mekanismoa talde askok aztertu dute (Corrotte et al., 2012, 2013; Idone et al., 2008; Tam et al., 2010). Aztertutako endozitosi mekanismoek partekatzen dituzten bi ezaugarri nagusiak hauek dira: mekanismoaren aktibazioarako Ca^{2+} extrazelularren sarrera egon beharra eta mekanismo osoak duen nahitaezko ATP kontsumoa.

ACT- Δ N482rekin tratatutako zelulen mintz-erreparazioa Ca^{2+} -ren menpekotasuna dela egiaztatzen da, PI-iragazkortasun saioa burutu gabe, baina zelulek BAPTA-AM Ca^{2+} kelatzailearekin 30 minutuz aurre-tratatuz. Saio honen helburua toxinen mintza zulatzean zelularen zitosolera sartzen den Ca^{2+} -a BAPTA-AMrengatik bahituta gelditzea da, horrela erreparazio mekanismoa ez aktibatzen. Irudian argi ikusi daitezenez (**3.15 Irudia**), BAPTArekin tratatutako zelulek toxinarekin inkubatzeko, iragazkortasunaren-erreparazioa ez da ematen, eta zelula gehienak PI-positibo bezala agertzen dira 30 minutu pasatu ondoren. Beraz, ACT- Δ N482ak aktibatutako mintz erreparazio mekanismoak Ca^{2+} sarrera bat behar du bere aktibazioa edo funtzionamendua ondo burutzeko.



3.15 Irudia. Kaltzioa bahitzeak eta ATPa agortzeak ACT-ΔN482ak eragindako iragazkortasunaren erreparazioan duten eraginaren azterketa. A) Zelulak BAPTA-AM-rekin (50 μM) aurreinkubatu ziren 30 minutuz, eta gero ACT-ΔN482 erabiliz (2,5 nM) PI-iragazkortasun saioa burutu zen Teknika experimentaletan azaltzen den moduan. B) Zelulak azida sodikoa (10 mM) eta 2-deoxiglukosa (20 mM) zuen glukosa gabeko medio batetan inkubatu ziren ordu batez, eta gero ACT-ΔN482 erabiliz (2,5 nM) PI -ragazkortasun saioa burutu zen Teknika experimentaletan azaltzen den moduan. Errore barrak hiru esperimentu independenteen desbideratze estandarra adierazten dute.

Endozitosia burutu eta erregulatu behar duen makineria proteikoak ATPa kontsumitzen du, zelula berneko edozein prozesu aktibok bezala. Hori dela eta, prozesu honen

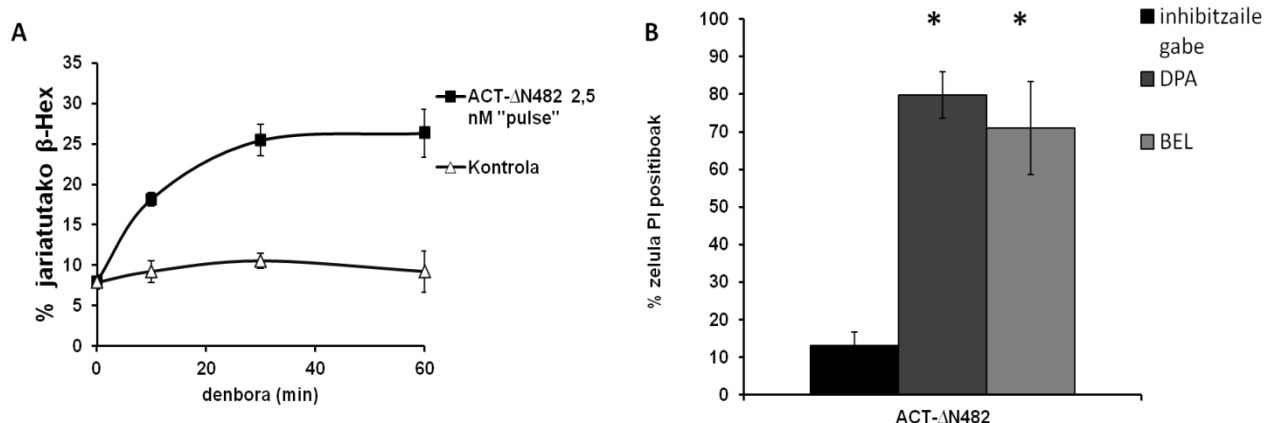
efizientzia, zelulak duen ATP edo energi mailaren menpe egongo da. Hau egiaztatzeko, PI-iragazkortasun saioa burutu zen, baina oraingoan zelulak ordu batez azida sodikoa eta desoxiglukosa zuen medio batekin inkubatuz. Azida sodikoak arnas katearen c zitokromo oxidasa (IV konplexua) proteina inhibitzen du, zelulak arnasketa aerobiotik lortu dezaken energia kopurua nabarmen murriztuz, eta zelulako ATP gordekinak guztiz kontsumitzea eraginez. Irudian (**3.15 B Irudia**) azaltzen da azida sodikoaz tratatutako zelulei ACT-ΔN482 gehitzean mintz-iragazkortasuna erreparatzeko gaitasuna galtzen dutela. Beraz, ACT-ΔN482ak aktibatutako erreparazio mekanismoa, Ca²⁺ sarreraz gain, ATP kontsumoaren menpe dagoela ondorioztatzen da.

3.3.4 Lisosomen exozitosisia eta esfingomielinasaren parte hartzea ACT-ΔN482ak aktibatutako erreparazio mekanismoan

Sarreran azaldu den bezala, kolesterol-menpeko zitolisinekin egindako ikerketetan, toxinen poro eraketaren aurrean zelulek duten erreparazio mekanismo interesgarri bat aurkitu zen (Tam et al., 2010). Laburbilduz, poroak eragindako kaltzio sarrerak lisosomen fusioa eragiten dute, eta hauek bere lumenean dagoen esfingomielinasa azidoa (ASM) entzima askatzen dute mintz-plasmaticoan, honen aktibitateari esker eratutako zeramida domeinuek toxinen endozitosisia eraginez. Ikusi zen erreparazio mekanismoak Ca²⁺ sarrera beharra eta zelularen ATP mailaren menpekotasuna zuela, ACT-ΔN482ak aktibatutako mekanismoan bezala. Hau dela eta, ASM lisosomalaren bidezko erreparazioak ACT-ΔN482ak makrofagoetan eragindako erantzunean parte hartzen duen egiaztatzeko saioak burutu ziren.

Lehenik eta behin, zelulak ACT-ΔN482rekin tratatzean lisosomen eta mintz-plasmaticoaren arteko fusioa gertatzen ote den aztertu genuen. Lisosoma-mintz plasmatico fusioak, lisosomaren lumenean dauden entzimen askapena zelularen kanpoaldera dakar. β-Hexosaminidasaren (lisosomen entzima markatzailea) sekrezioa jarraituz prozesu hau gertatu den frogatu daiteke. **3.16A irudian** zelulak ACT-ΔN482rekin tratatu eta gero β-Hexosaminidasaren sekrezio bat ematen dela ikusi zen. Gainera, entzima honen sekrezioa bat dator erreparazio-mekanismoaren zinetikarekin, sekrezioa hasierako minutuetatik ematen baita (toxinak iragazkortasun gehien eragindako minutuetan). Hala ere, prozesu hau iragazkortasuna erreparatzeko beharrezkoa den frogatu behar zen. Horretarako hurrengo saioan prozesu hau inhibititu edo kaltetu dezaketen inhibitzaileak erabili ziren: desipramina (DPA) eta bromoenol

laktona (BEL). Desipramina ASM entzimaren aktibitatearen inhibitzaile espezifikoa da, eta BEL-ak kaltzioarekiko independenteak diren fosfolipasak inhibituz lisosomak beste mintzekin fusionatzea ekiditen du. Bi inhibitzaile hauek kolesterol-menpeko toxinek aktibatutako erreparazio-mekanismoa inhibitzeko gaitasuna dutela frogatuta dago (Idone et al, Tam et al). Inhibitzaile hauekin egindako PI-iragazkortasun saioak argi erakusten dute DPA eta BEL-rekin tratatutako zelulek ACT- Δ N482ren iragazkortasuna erreparatzeko gaitasuna modu esanguratsuan galtzen dutela (**3.4B Irudia**). Datu guzti hauek kontuan hartuta, ondorioztatu daiteke ACT- Δ N482 toxinak makrofagoetan eragindako iragazkortasunak zelularen mintz-erreparazio mekanismo bat aktibatzen duela. Mekanismo honen aktibazio eta funtzionamendu egokiarentzako Ca^{2+} intrazelularren igoera eta ATP kontsumoa beharrezkoak direla, eta seguraski, mekanismoa lisosomen mintz-plasmaticoaren fusioarengatik ASM entzimak sortutako zeramidak eragindako endozitozian oinarrituta dagoela.

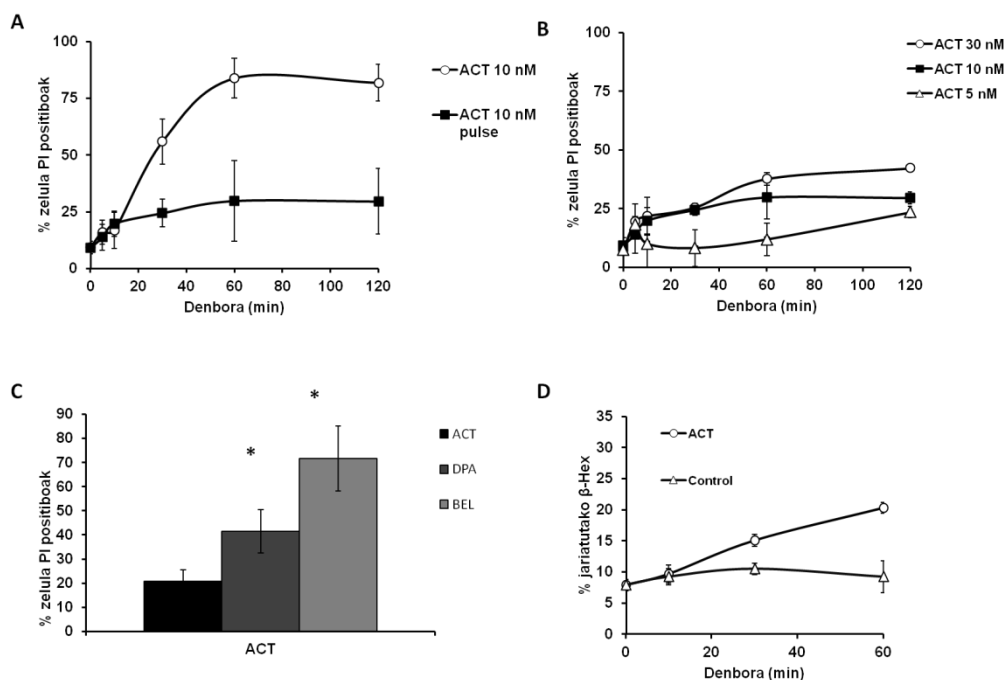


3.16 Irudia. Eduki-lisosomalaren sekrezioaren garrantzia ACT- Δ N482ak eragindako mintz-iragazkortasunaren erreparazioan. A) B-Hexosaminidasa entzima lisosomalaren sekrezioaren neurketa zelulak ACT- Δ N482 2,5 nM-rekin inkubatzean. B) PI-iragazkortasun erreparazio saioa ACT- Δ N482 2,5 nM-rekin. Zelulak desipramina (DPA) (30 μ M) eta bromoenol laktonarekin (BEL) (20 μ M) inkubatu ziren 30 minutuz saioa egin aurretik.

3.4. ACT eta ACT- Δ N482ak eragindako mintz-iragazkortasunarekiko makrofagoek duten erantzunen arteko alderaketa

ACT- Δ N482ak eragindako iragazkortasuna eta zelulak honi erantzuteko duen mekanismoa aztertu eta sailkatu eta gero, gure helburua eredu hau ACTak eragiten duen

iragazkortasunarekin bat datorren aztertzea izan zen. Honetarako, zeluletan ACTak inkubazioaren lehenengo minutuetan eragiten duen PI-iragazkortasuna aztertu zen, toxina kontzentrazio desberdinetan, ACT- Δ N482rekin egin zen modu berdinean (**3.6 A Irudia**). ACTak kontzentrazio oso handiak behar ditu detektagarria den PI-iragazkortasun bat eragiteko. ACT- Δ N482rekin iragazkortasuna 0,5 nM-tik aurrera argi desberdindu zitekeen, ACTrekin ordea, 50 nM arte kontrolarekiko dauden desberdintasunak arbuiagarriak dira. Datu hauek bi interpretazio desberdin eduki ditzakete, batetik, izan daiteke ACTak propidio ioduroarekiko iragazkorrak diren poroak eratzeko gaitasunik ez edukitzea edo, bestetik, poro-eraketa zinetika ACT- Δ N482 baino askoz motelagoa izatea eta lehenengo 5 minutuetan poroa eratzeko gaitasunik ez edukitzea kontzentrazio oso altuak erabili arren. Hau aztertzeko, ACTak eragindako PI iragazkortasuna denbora tarte luzeagoan aztertu zen. ACT 10 nM kontzentrazioa aukeratu zen eta PI-iragazkortasuna aztertu zen denboran zehar, 2 orduz, horretaz gain toxina medioan konstante laga edo ACT- Δ N482rekin erabilitako “pulse” deituriko 5 minutuko inkubazioa egin zen. Emaitzetan azaltzen denez ACT 10 nM-ek zelulen populazio osoa PI-iragazkor bihurtzea eragiten du 2 orduko inkubazioan, iragazkortasun hau 30 minutura hasita (**3.17A Irudia**) . “Pulse” metodoa erabiltzean, ordea, ez da ACT- Δ N482rekin ikusten den iragazkortasun maximo bat ikusten, zelulak kontrola baino iragazkorragoak izan arren (% 20-30 inguru). Iragazkortasun hau egonkor mantentzen da inkubazioaren 2 ordutan jaitsiera edo igoera esanguratsurik gabe . Iragazkortasun maximo bat ez ikustea kontzentrazio urria erabiltzeagatik ez dela izan egiaztatzeko, “pulse” bidezko experimentua hiru kontzentrazio desberdinetan egin zen, 30, 20 eta 10 nM-tan. Irudian (**3.17 B irudia**) ikusten den bezala, kontzentrazioa igo ala iragazkortasuna igotzen doa baina konstanteki eta malda txikiarekin, ez dira ACT- Δ N482rekin ikusten ziren iragazkortasun maximoak detektatzen. Saio huetatik iradoki daiteke ACTak sortutako PI-iragazkortasunak ACT- Δ N482ak eragindakoaren jokabide edo mekanismo oso desberdina duela.



3.17 Irudia. ACT toxinak eragindako PI iragazkortasunaren azterketa. A) ACT 10 nM-k eragindako PI iragazkortasuna bi inkubazio metodoekin B) 5 minutuko ACT inkubazioak eragiten duen PI-iragazkortasuna toxina kontzentrazio desberdinetan. C) Desipramina (30 μ M) eta Bromoenol laktonaren (20 μ M) 30 minutuko aurre-inkubazioak duen eragina ACT toxinak eragindako PI-iragazkortasunean. Zelulak ACT 30 nM-rekin 5 minutuz inkubatu ziren eta PI iragazkortasuna 60 minututara neurtu zen D) B-Hexosaminidasa entzima lisosomalaren sekrezioaren neurketa zelulak ACTarekin.

Jokabide desberdin hau onartuta, ACT- Δ N482rekin erginkorrak diren inhibitzaileak ACTren kasuan efekturik duten aztertu genuen. Zinetikan zehar erreparazio prozesurik ez denez ikusten, esperimenturako erabilitako kontzentrazioa aukeratzeak zailtasunak ekarri zituen. ACT- Δ N482rekin egindako saioarekin konparagarria izateko antzeko baldintzak eragiten dituen toxina kontzentrazioa erabili zen, hau da, “pulse” bidezko inkubazioa eta ordu batera zelulen iragazkortasun txikia eragiten duen kontzentrazioa. Kontzentrazioa hau 30 nM izatea erabaki zen, eta inhibitzaileen kontzentrazio eta inkubazio denborak, ACT- Δ N482rekin egindako saioaren berdinak izan ziren. Irudian ikusten da Desipraminak eta Bromoenol laktonak ACTak eragiten duen PI-iragazkortasuna handitzea eragiten dutela (**3.17C Irudia**). Bromoenol laktonarekin efektua oso nabarmena da, zelula ia guztiak iragazkor bihurtuz. Desipraminarekin efektua urriagoa da baina estatistikoki esanguratsua Bi inhibitzaile hauek efektu estatistikoki esanguratsua 30 nM-ko kontzentrazioan bakarrik ikusi da.. Kontuan izan

behar da bromoenol laktonak lisosomen fusioa inhibitzean hemen deskribatutako baino prozesu gehiagotan parte hartu dezakeela parte, hau da, ez dela lehen azaldutako erreparazio mekanismoaren inhibitzaile espezifikoa eta prozesu askotan eragin dezakeela.

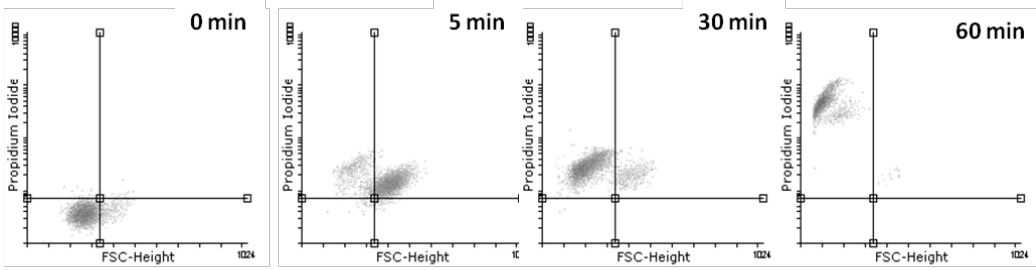
ACT- Δ N482rekin bezala B-Hexosaminidasaren sekrezioa neurtu zen medio extrazelularrera. ACT 30 nM-ekin β -Hexosamidasaren sekrezioa detektatzen da, baina kontzentrazio altu hauetan β -Hexosaminidasa sekrezioa toxinak eragindako lisiarengatik izan daiteke seguraski.

3.4.2 ACT eta ACT- Δ N482 toxinek eragindako mintz-iragazkortasunaren alderaketa PI iragazkortasun eta zelulen bolumen aldaketaren ikuspuntutik

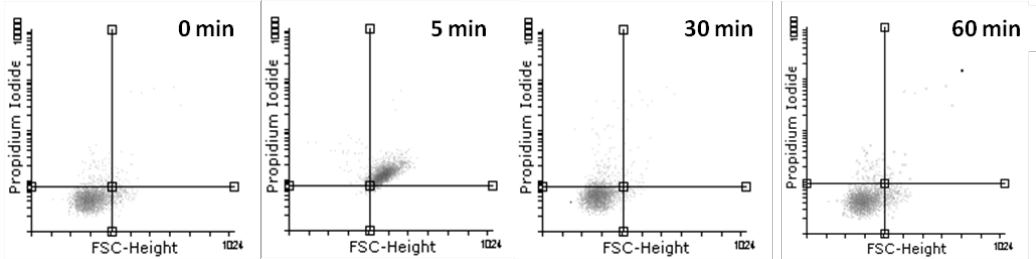
Arestian lortutako datuen arabera, PI iragazkortasunak ACTaren aktibitate poro-eratzailari buruz informazio urria ematen duela ikusi da. Horrenbestez, saioetan PI iragazkortasunarekin batera zelulak jasaten duten bolumen aldaketa aztertzea erabaki genuen. Zelulen mintzean poroak eratzean, zelula barneko eta kanpoko osmolaritatearen desberdintasunarengatik urak zelula barnean sartzeko joera dauka, zelularen bolumena handituz. Beraz, toxinarekin tratatu eta gero zelulak bolumen handipen bat jasateak bere mintzean poro iragazkorak daudela adierazi dezake. Zitometroan, zelularen bolumenaren informazioa FSC (Forward Scatter) baloreak ematen digu, eta balio hau PI seinalearekin kontrajarriz zelularen egoerari buruzko informazio hobea lor genezake. PI-iragazkor eta bolumen handipena jasaten duen zelulek bere mintzean talka osmotikoa eragiten ari diren PI-iragazkorak diren poroak zabalik edukiko dituela adierazten digu. PI-iragazkor baina tamaina txiki edo ertainak dituzten zelulek, heriotza jasan, edo bideragarritasuna galdu dutela adieraziko du, seguraski (zelulek osmolaritate desberdintasuna guztiz galtzean ez dute txoke osmotikorik edukiko). Azkenik, zelulek PI negatibo baina bolumen handipena badute, bere mintzean PI iragazkorak ez diren poroak dituztela ondorioztatuko dugu.

A

ACT-ΔN482 2,5 nM

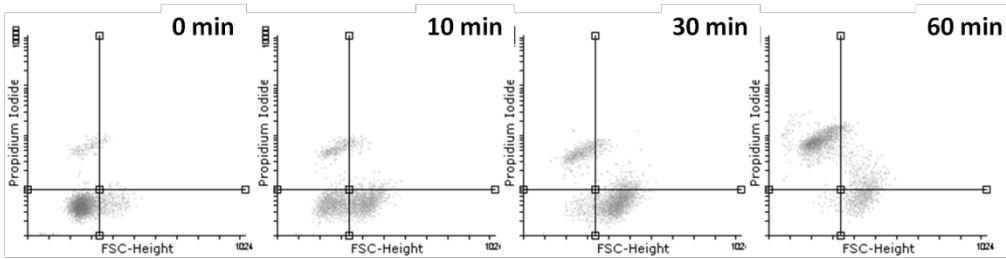


ACT-ΔN482 2,5 nM "pulse"

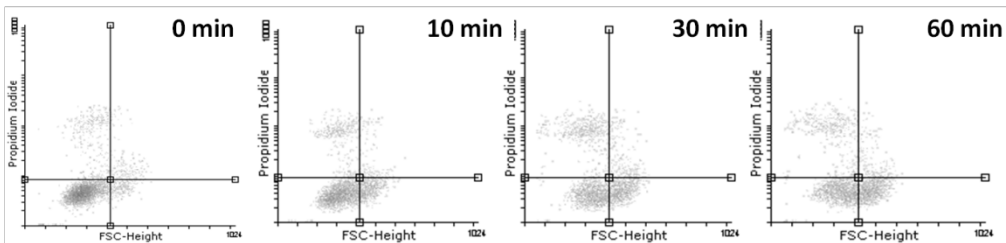


B

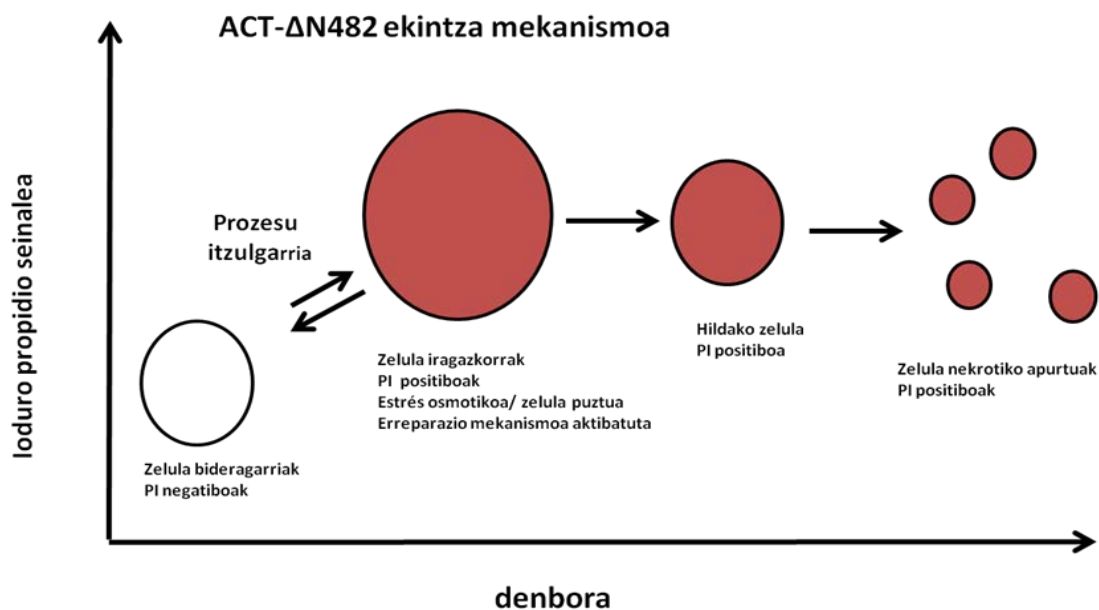
ACT 10 nM



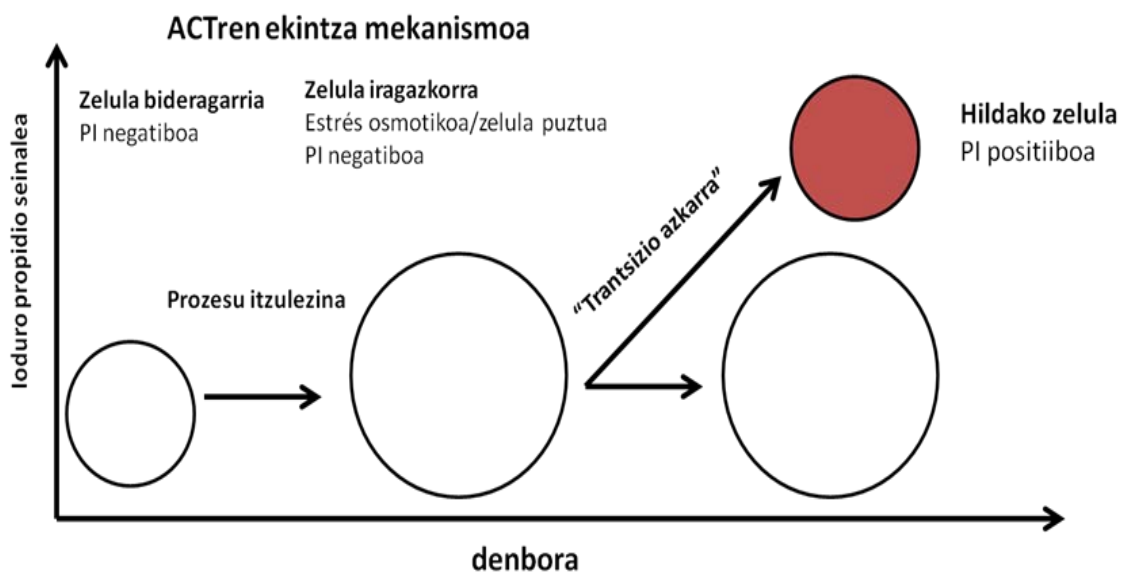
ACT 10 nM pulse



C



D



3.18 Irudia. ACT eta ACT- Δ N482-ren iragazkortasun-mekanismoen alderaketa. PI-iragazkortasun saioa teknika esperimentalen atalean azaltzen den bezala burutu zen. Zelulak toxina kontzentrazio desberdinekin bi inkubazio metodoekin tratatu ziren ordu betez, 37 °C -tara. Fluxu zitometriako datuak irudikatzeko orduan, PI seinalea (eskala logaritmikoan) Foward scatter (FSC) seinalearekin alderatu zen. FSC baloreak zelulen tamainuaren informazioa ematen du (eskala lineala). **A)** Zelulak ACT- Δ N482 2,5 nM-ekin tratatu ziren eta toxina medioan etengabe utzi, edo 5 minutuko “pulse” inkubazioak, zelulen PI-iragazkortasun eta bolumenean zuen efektua aztertu zen denbora ezberdinetan. **B)** 3.18A irudiko esperimentua ACT 10 nM-ekin burututa. **C eta D)** 3.18A eta B irudiko

datuetan oinarrituta, ACT- Δ N482ak eta ACTak itu zeluletan sortutako iragazkortasun mekanismoaren eskema. Kolore gorriak zelula PI-positiboa dela adierazten du.

Zelulak ACT 10 nM eta ACT- Δ N482 2,5 nM-rekin ordu batez inkubatu ziren eta denbora tarte desberdinetan bere PI seinalea eta FSC balioak aztertu ziren. Dentsitate-plot-etan ikus daiteke toxina bakoitzak zelulen populazioan eragiten duen aldaketan sekuentzia, heriotza zelularra eragin arte (**3.18 A eta B irudiak**). ACT- Δ N482aren kasuan, lehenengo 5 minutuetarako populazio gehiena PI-positiboa eta bolumen handikoa bihurtzen da. 30 minutu pasa ondoren, populazioak bolumen normala berreskuratzen du, baina PI positiboa izaten jarraitzen du, bideragarritasuna galdu dutela adieraziz. Inkubazio ordu osoa pasatzerakoan, zelula-hil eta zelula-hondakinen arteko nahasketa bat den seinale altuko PI positibo/ tamaina-txiki ezaugarriak dituen populazio bat ikusten da. Arestian azaldu den bezala, zelulak ACT- Δ N482rekin “pulse” moduan inkubatzen badira, hasierako iragazkortasuna itzulgarria da. Hau **3.18A irudian** argi ikusten da, zelulak 5 minutura PI iragazkor eta bolumen handituarekin aurkitzen dira, eta 30 minututara kontrol-zelulen antzeko egoerara itzuli dira. Beraz, hasierako iragazkortasunaren kalte-mailaren arabera, estres osmotikoa erreparatua izan daiteke. Ezin bada erreparatu, zelulak nekrosi azkar batez hiltzen dira. Prozesu hau irudikatzen duen eskema **3.18C irudian** azaltzen da.

ACTarekin zelulek jasaten dituzten aldaketak desberdinak dira, ACT- Δ N482rekin alderatuz (**3.18B Irudia**). Lehenengo aldaketak 10 minututara agertzen dira, non zelulak bolumen handipena jasaten duten, baina PI-iragazkaitz mantenduz. 30 minutura, populazio ia osoak 10 minututan aurkeztutako ezaugarri berberak mantentzen ditu. Ordu batera zelulak heriotza jasaten hasten dira, PI positiboa eta tamainu txiki-ertaina duen populazioa agertuz, gainerako zelulek 30 minutuko populazioaren ezaugarriak mantentzen jarraitzen dituztelarik. PI positibo eta tamainu handiko zelulak ere detektatzen dira, baina ez dute zinetikaren edozein puntutan populazioaren portzentai nabarmen bat osatzen, ACT- Δ N482rekin gertatzen den bezala. Beraz, ACT rekin tratatutako zelulek, 10. minututik aurrera PIrekiko iragazkorak ez diren poroek eragindako talka-osmotiko bat jasaten dute, eta 30 minututatik aurrera zelula hauek bideragarritasun gabeko zelula PI positibo/tamaina-txiki bihurtzen joango dira ondo detektatu ezin den trantsizio azkar batetan. Saio berdina ACT “pulse” metodoaz inkubatzean, ez da mekanika desbedinik ikusten (**3.18 Irudia**). Toxinak zeluletan

eragiten dituen aldaketek sekuentzia berdina jarraitzen dute. Desberdintasun bakarria inkubazio motz honekin zelulak heriotza-tasa txikiagoa dutela da. Emaiza hauekin ondorioztatu daiteke, ACTren inkubazioarekin eragindako hasierako iragazkortasuna PI iragazkaitz diren poroiez eraginda dagoela, eta prozesu itrzulezina dela, itu-zelulen heriotza eraginez. **3.18D irudian** prozesu honen eskema irudikatzen da.

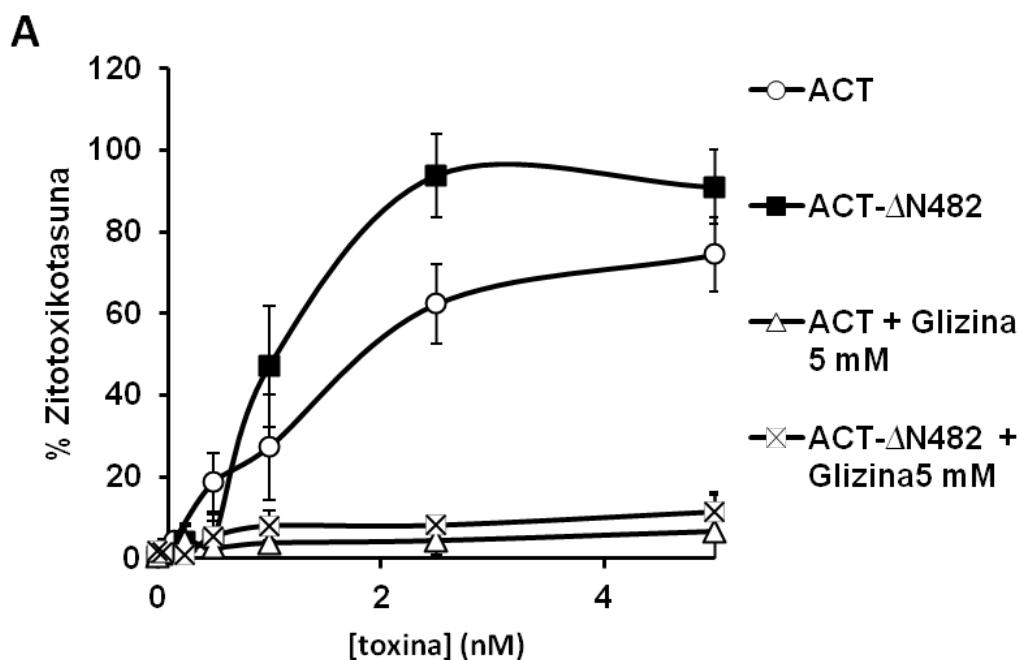
Ez dago argi zinetikaren momenturen baten ACTak PI-iragazkorrak diren poroak eratzeko gaitasunik ote duen (ACT- Δ N482ak erazten dituenaren antzekoak). Teorikoki, ACTaren AC domeinuak jasaten duen mozketak ACT- Δ N482aren antzeko proteinak mintzean agertzea eragingo luke, eta hauek PI-iragazkorrak diren poroak eratzeko gaitasuna eduki beharko lukete. Hipotesi honekin jarraituz, poro hau eratzeko orduan AC domeinuak sortutako ATP deplezioarengatik erreparazio-mekanismoa inhibituta egongo litzake, zelulak poro handi honi erantzuteko gaitasuna galduz eta heriotza modu bizkorrean gertatuz. Hau gertatuko balitz, egoera horren detekzioa ez zen posible izango metodologia esperimental honekin, gertaera oso bizkorra izango litzake eta. Atal honetako hurrengo pausua hipotesi hau testatzeko metodologia bat aurkitzean oinarritu zen.

3.4.3 Glizinarene ezaugarri zelula-babesgarrien erabilpena ACTak eragindako iragazkortasuna aztertzeke zelularen lisi osoa ekidinez.

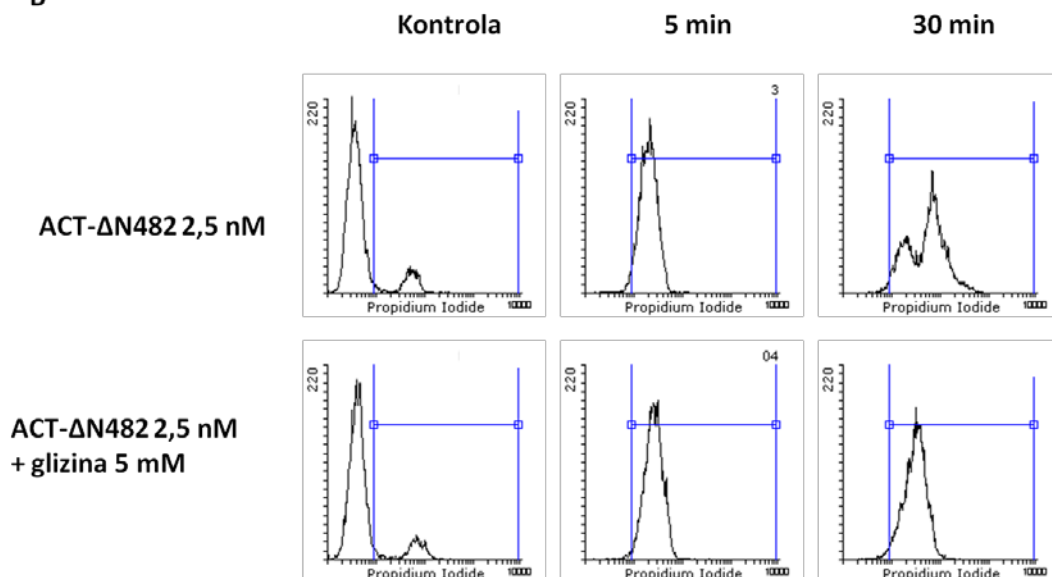
Aurreko hamarkadan egindako lanetan frogatu zen glizina aminoazidoa, 5 mM-etik gorako kontzentrazioetan gehitzean zelulen lisia eta mintz-plasmatikoaren apurketa ekiditu edo moteltzeke gaitasuna zuela (Weinberg et al., 2016). Glizinarene ezaugarri babesgarri honen zergatia guztiz ondo ulertu ez arren, erabilgarria izan da zelula mota desberdinetan, lan honetan erabiltzen diren J774 makrofagoak barne. Metodologia honen bidez, zelulek ez dute tamainu handiko barneko osagaien kanporaketa baimentzen (LDH entzima zitosolikoa adibidez), baina bai PI bezalako molekula eta ioi txikiak (Fink et al., 2008). Beraz, metodo honen bidez ACTaren efektuarengatik zelulen apurketa ekiditu edo moteldu daiteke, PI-iragazkorra den poroa detektatzeko baldintza hobekoak lortuz, lisia gertatu baino lehenagoko denbora-tarte handiagoa emanaz. Helburu honekin, arestian egindako PI-iragazkortasun esperimentuak errepikatu genituen baina oraingoan medio zelularrean 5 mM glizina gehituz.

Lehenik eta behin, glizinak gure sisteman duen efektua aztertu genuen. Horretarako LDH askapena neurtzen duen zitotoxizitate froga burutu genuen. Irudian (3.20 Irudia) argi ikusten da glizina 5 mM medioan gehitzeak ACT eta ACT- Δ N482 toxinek 2 ordutan eragiten duten LDH askapena ia guztiz ekiditen duela. Emaitza honekin ez dugu adierazi nahi glizinak toxinek eragiten duten heriotza ekiditen duenik, heriotza horren ondorioz mintz-plasmatikoan agertu beharko ziren makro-apurketen agerpena ekiditu edo moteldu egiten duela baizik.

Hurrengo pausuan, glizinidadun medioak ACT- Δ N482ak eragiten duen PI iragazkortasunean eraginik duen aztertu genuen. Histogramek erakusten duten bezala (3.19B Irudia), ACT- Δ N482-k lehenengo 5 minutuetan eragindako PI sarrera ez da aldatzen glizinidadun medioan. 30 minutuko inkubazioa eta gero ikusi daiteke glizina gabeko zelulek zelula-hilen PI seinalea hartzen dutela, baina ez glizina duten zelulek, 10 minutuetan lortutako seinale antzekoa mantenduz. Datu honetatik ondoriozta daiteke glizinidadun medioarekin ACT- Δ N482-k sortutako poro PI-iragazkorra zabalik mantentzen dela, aldaketa nabarmenik gabe, metodo hau poroaren efektua isolatzeko egokia dela frogatuz.



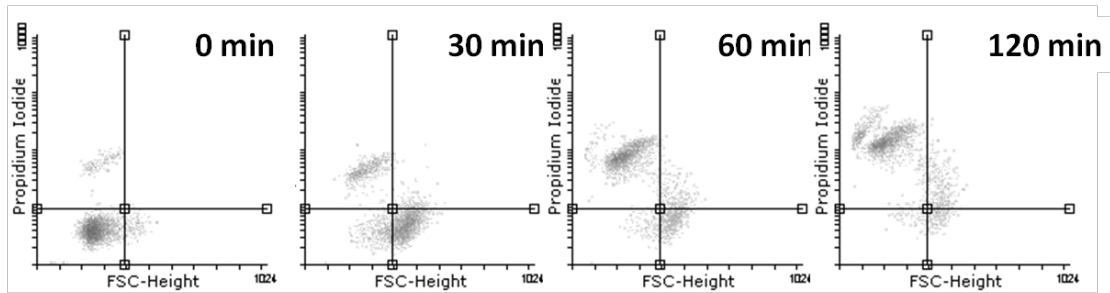
B



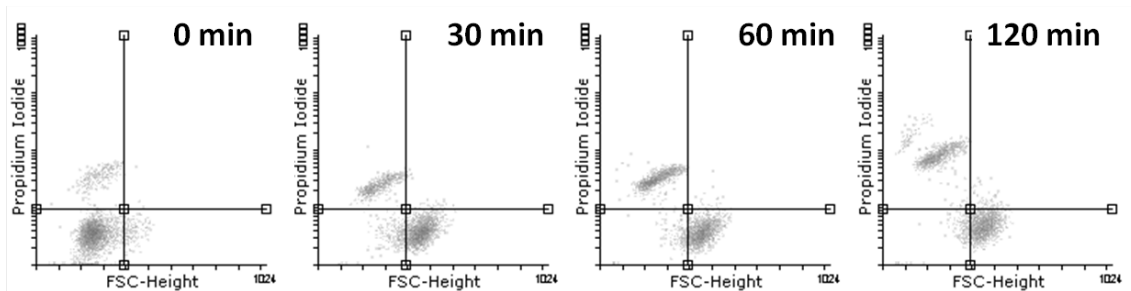
3.19 Irudia. Glizinareen eragina toxinen zitotoxizitate eta PI-iragazkortasunean . A) Glizina (5 mM) gehitutako eta gehitu gabeko medioan ACT eta ACT-ΔN482 kontzentrazio desberdinek eragindako zitotoxizitatearen azterketa, LDH askapena neurtuz. Zelulak toxinarekin 2 orduz inkubatu ziren 37 °C -tan. Zitotoxizitatearen % 100a zelulak Triton X-100 (% 0,1) tratatuz lortu zen. Errore barrak hiru esperimentu independenteen desbideratze estandarra adierazten du **B)** Glizinareen eragina ACT-ΔN482ak eragindako PI-iragazkortasunean. Zelulak Glizina (5 mM) gehitutako eta gehitu gabeko medioan ACT-ΔN482arekin (2,5 nM) inkubatu ziren, eta PI-iragazkortasuna neurtu zen fluxuzko zitometroan. Histogramaren Y ardatzak zelula kopurua adierazten du, eta X ardatzak propidium ioduroaren seinalea, eskala logaritmikoan. Histogramak hiru esperimentu independenteen adierazgarri dira.

Hurrengo irudian (**3.20 Irudia**) ACTrekin eragindako PI-iragazkortasun saioa erakusten da, ohiko medioa eta glizinidadun medioa alderatuz. Ikusi daiteke glizinidadun medioan ezaugarri bideragarri dauzkaten zelula askoz gehiago agertzen direla, zelulek talka-osmotikoa (FSC balorearen igoera) zinetika berberarekin jasan arren. Hala ere, zelulak bolumen handiarekin 2 ordutan egon arren, ez dira PI-iragazkorak bihurtzen ACT-ΔN482rekin bezala. PI negatibo/bolumen-handi egoeran mantentzen dira, heriotza jasan arte. Datu honetatik ondorioztatu daiteke ACTak bere iragazkortasun-mekanismoan zehar ez dituela zelularen mintz plasmatikoa PI-iragazkorak diren poroak eratzen. Beraz, ACT-ΔN482ak mintz plasmatikoa eragiten duen poro mota eta honek aktibatzen duen erreparazio mekanismoa ez dira ACTarekin ematen, toxina basatiak eragiten duen iragazkortasun mota bere domeinu hemolitiko isolatuak eragiten duenaren ezaugarri desberdinak dituelako.

ACT 5 nM



ACT 5 nM + glizina 5 mM



3.20 Irudia. . Glizinarene efektua ACT toxinak eragindako PI-iragazkortasun eta bolumen aldaketan.

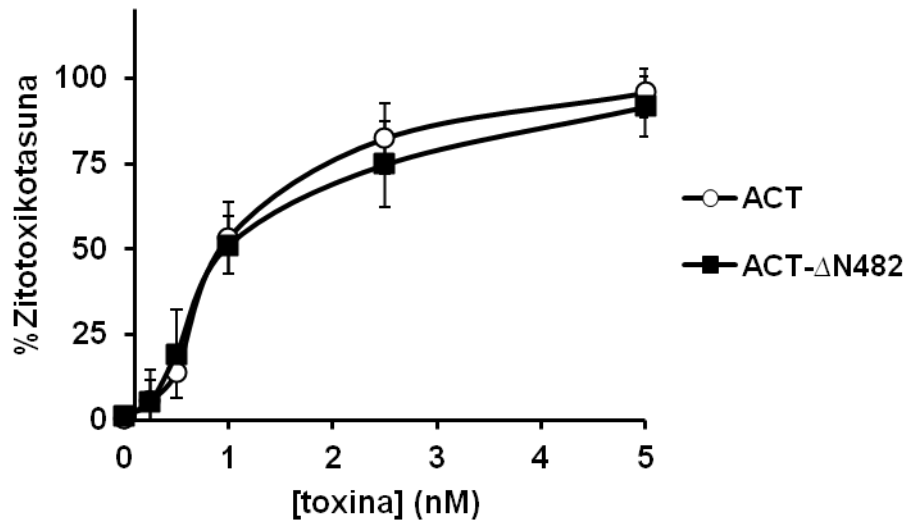
Glizinarene eragina ACTak eragindako PI-iragazkortasun eta bolumen zelularrean (FSC balorea). Zelulak glizina (5 mM) gehituko eta gehitu gabeko medioan ACTarekin (5 nM) inkubatu ziren, eta PI-iragazkortasuna neurtu zen fluxuzko zitometroan . Dentsitate-plotak hiru esperimendu independenteen adierazgarri dira.

4. Emaitzak: ACT toxinak eragindako heriotza zelularren azterketa

4. ACT toxinak eragindako heriotza zelularren azterketa

4.1 ACT eta ACT- Δ N482 mutanteak J774A.1 makrofagoetan eragindako toxikotasuna

Atal honen helburua ACT toxinak makrofagoetan eragiten duen heriotza zelularren ezaugarriak aztertzea eta poro-eratzailer aktibitateak prozesu honetan duen garrantzia ulertzea da. Lehenik eta behin, ikerketa honetarako garrantzitsuak diren faktore batzuk finkatu behar ziren: ACT eta ACT- Δ N482 ze kontzentrazioekin inkubatu zelulak eta zenbat denboratan zehar (Khelef et al., 1993) . Aurretik ikusi zen heriotza apoptotikoak toxinaren zitotoxizitatean garrantzia duela. Prozesu hau denbora tarte luzeetan ematen denez toxinaren efektua lau orduz aztertzea erabaki zen, beste ikerketa batzuetan erabilitako baldintzak errepikatuz (Hewlett et al., 2006) . Inkubazio-denbora finkatuta, toxina kontzentrazioa aukeratu ahal izateko zelulak ACT eta ACT- Δ N482 kontzentrazio desberdinekin 4 orduz inkubatu eta heriotza zelularra LDH askapen modura neurtuz kalkulatu zen, heriotza zelularra % 50ean eragiten duen toxina kontzentrazioak aukeratuz (EC₅₀). Irudian (**4.1 Irudia**) ikusten den modura, toxina basatia eta bere mutanteak antzerako heriotza eragiten dute lau orduz, kontzentrazioaren menpeko efektua antzekoa izanik. Bi toxinek 1 nM kontzentrazioan antzerako ehuneko heriotza eragiten dituzte, % 50 ingurukoa. Kontzentrazio horretatik aurrera bi toxinek kalte handiak eragiten dituzte, zelula populazioaren % 75 baino gehiago lisatuz. Kontzentrazioarekiko menpekotasuna aztertuta, toxinak 1 nM kontzentrazioan eragiten duen heriotza- mekanismoaren ezaugarriak aztertzea erabaki genuen, kontzentrazio hau zelulen % 50 inguru hiltzen dituelako 4 orduz eta mutanteak efektu antzekoak dituelako kontzentrazio honetan.



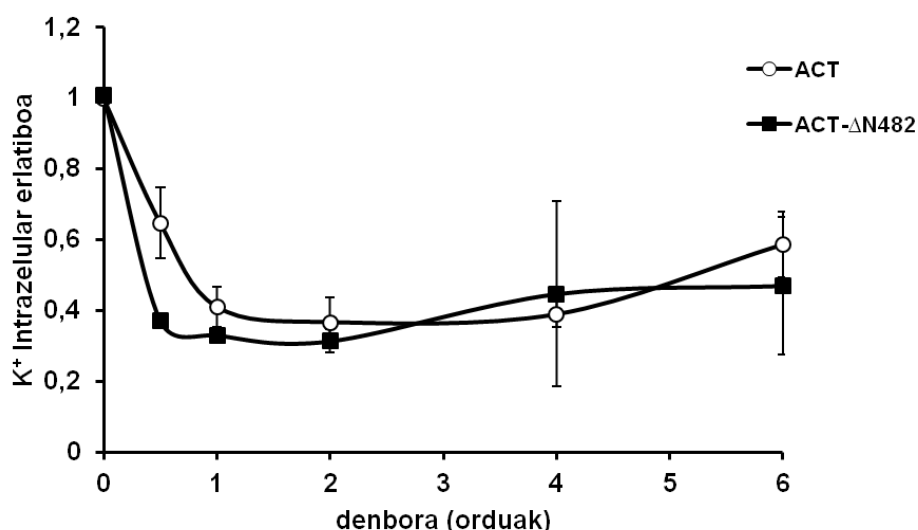
4.1 Irudia. Toxinak eragindako zitotoxizitatea JJ74 zeluletan. ACT eta ACT-ΔN482 kontzentrazio desberdinek eragindako zitotoxizitatearen azterketa LDH askapenaren neurketa bidez. Zelulak toxinarekin 4 orduz inkubatu ziren 37 °C- tan HBSS medioan . Zitotoxizitatearen % 100a zelulak Triton X-100 % 0,1 tratatuz lortu zen. Errore barrak hiru esperimentu independenteen desbideratze estandarra adierazten du

ACT toxinak itu-zeluletan 3 efektu nagusi eragiten ditu : cAMP igoera, ATP agorpena eta desoreka ionikoa. cAMP igoerak zelularen bideragarritasunerako beharrezkoak diren seinalizazio bidezidorren desregulazioa dakar . Aktibitate katalitiko honek zelula barneko ATPa xahutu dezake, zelulan hilgarria izan daitekeen estres energetikoa eraginez. Poro-eratzaille aktibitateak zelularen mintzean ioi desberdinekiko iragazkorak diren poroak eratzen ditu, hirugarren kapituluaz aztertu dugun modura. Ioiekiko iragazkortasun honek zelula barneko ioi kontzentrazioak desorekatzen ditu, zelulako prozesuak kaltetuz eta lisia eragin dezakeen talka osmotikoa eraginez. Kapitulu honetako hurrengo ataletan toxinak zeluletan eragindako kalteen garrantzia aztertuko dugu, gehienbat poro-eratzaille aktibitatearen efektuetan arreta jarritz.

4.2 Toxinak eragindako estres ionikoaren efektuen azterketa zelula barneko [K⁺]neurtuz

4.2.1 ACT eta ACT-ΔN482ren efektua J774A.1 zelulen potasio intrazelularren mailan.

Hirugarren kapituluan ACT toxinak, bere poro-eratzailer aktibitatearen bidez, itu-zelulen mintza iragazkor bihurtzeko duen gaitasuna aztertu genuen. Lortutako emaitzetatik ondorioztatu genuen ACTak 1 nM inguruko kontzentrazioan zelulen mintzean poro txikiak eratzen dituela, potasioarekiko iragazkorak baina kaltzioarekiko iragazgaitzak. Beraz, toxinak kontzentrazio honetan eragiten duen estres ionikoa eta haren efektuak aztertzeko hoberena potasio irteerak eragiten dituen efektuetan sakontzea izango da, kaltzioak baino informazio gehiago emango digulako. Helburu honekin, zelulak ACT eta ACT- Δ N482 1 nM-rekin inkubatu eta 4 orduz denbora tarte desberdinetan zelula barneko potasio maila neurtu zen ICP-AES (Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy) teknikaren bidez. Irudian ikusten da (**4.2 Irudia**) bi toxinek zelulen K^+ intrazelularraren jaitsiera azkarra eragiten dutela, jaitsiera hau inkubazioko lehenengo minutuetatik hasita. ACTren kasuan, jaitsiera honek ordu bateko inkubazioan lortzen du minimoa (tratatu gabeko zelulen potasio intrazelularraren % 40) eta lau ordutan zehar ehuneko horretan mantentzen da. ACT- Δ N482ren kasuan zinetika ACTak eragiten duenaren antzekoa da, baina azkarragoa. Zelulak 30 minututara % 40-ra jaisten dira. Datu hauetatik ondorioztatzen da ACT eta ACT- Δ N482 1 nM-ko kontzentrazioan itu-zeluletan estres ioniko nabarmena eragiten dutela. Potasioa, zelularen barne prozesuen erregulazio eta funtzionamendurako garrantzi handiko ioia da, bere kontzentrazio intrazelularra ohikoaren % 40-an egoteak zelulan kalte handiak eragin ditzake.

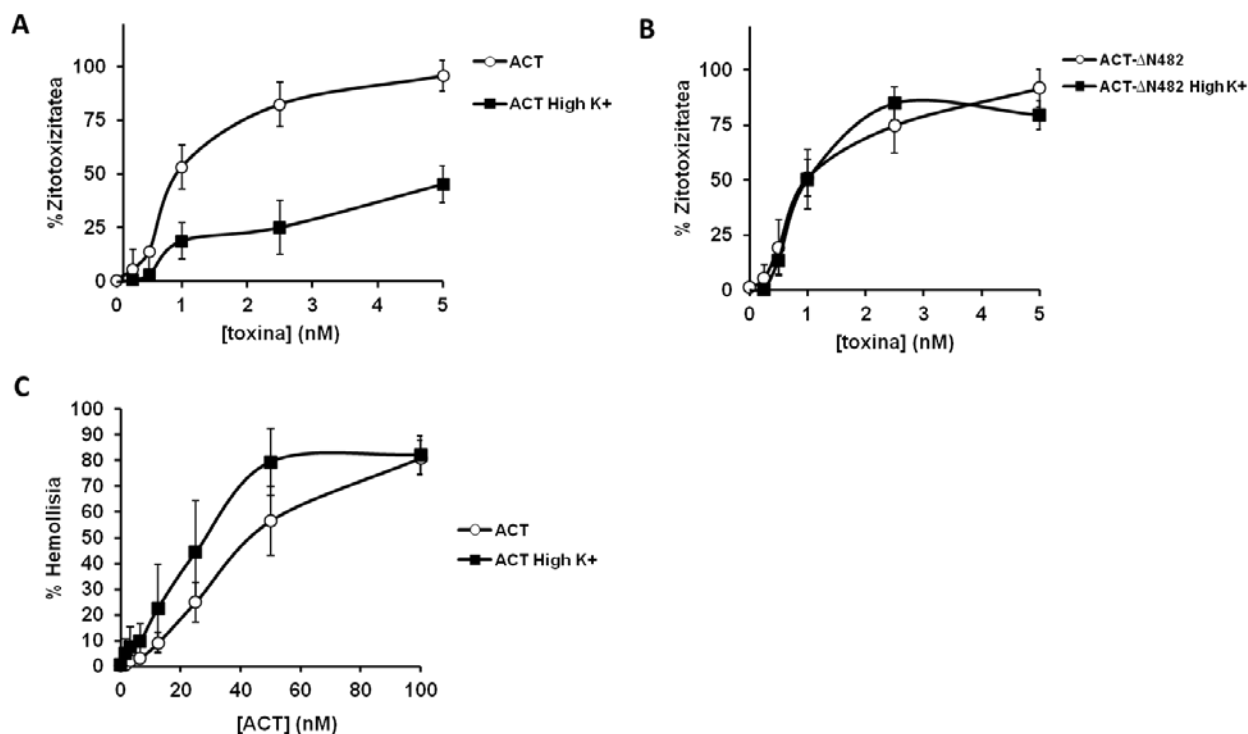


4.2 Irudia. ACT eta ACT- Δ N482-ren efektua JJ74.A zelulen potasio intrazelularraren mailan. Zelulak ACT eta ACT- Δ N482 1 nM-rekin tratatu ziren 6 orduz eta K^+ kantitateak ICP-AES bidez aztertu ziren teknika esperimentaletan azaltzen den bezala. Lortutako potasio kontzentrazioak tratatu

gabeko kontrolaren potasio kontzentrazioaren arabera azaltzen dira . Errore barrak hiru esperimentu independenteen desbideratze estandarra adierazten du.

4. 2.2. K⁺ irteeraren garrantzia ACTak eragindako LDH askapenean

Hurrengo helburua, potasio kontzentrazioaren desoreka honek itu-zelulen heriotza eragiteko orduan garrantzia duen jakitea izan zen. Horretarako, zelula barnetik potasioa irtetea ekiditen duen potasio kontzentrazio altuko medio batekin inkubatu genituen zelulak. “High K⁺ medium” deitutako medio honetan KCl eta NaCl kontzentrazioak ordezkatu egin ziren (150 mM KCl eta 5 mM NaCl), horrela zelula barneko eta kanpoko K⁺ kontzentrazioak antzerakoak dira eta mintzean poroak eratzean potasioak ez du kanporantz irteteko joerarik. NaCl kontzentrazioa aldatuz tanpoian osmolaritatea berdin mantentzen da HBSS medioarekin alderatuz. **4.1 irudian** egindako saio berdina burutu genuen baina zelulak “High K⁺” medioan inkubatuz eta HBSS medio arruntean lortutako emaitzekin alderatuz. Irudian (**4.3 Irudia**) ikusten da ACTrekin inkubatutako zelulen kasuan, K⁺ irteera ekiditeak toxinen zitotoxizitatea nabarmen inhibitzen duela. ACT-ΔN482rekin inkubatutako zeluletan ordea, ez da desberdintasun esanguratsurik ikusten bi medioen artean. Seguru aski, toxina mutanteak eratutako poroa kaltzioarekiko iragazkor izateak bere toxikotasun mekanismoan potasioak duen garrantzia ordezkutzen du. Emaidza honetatik ondorio hau atera dezakegu: ACT toxina eragindako K⁺ irteerak berebiziko garrantzia duela toxina bere itu-zelulen heriotza eragiteko gaitasunean. Honek azalpen desberdinak izan ditzake. Batetik, izan daiteke toxinen poroa iragazten duen ioi garrantzitsuenaren irteera ekiditean, toxina eragiten duen talka osmotikoaren potentzia jaistea eta honengatik zelulak lisi-osmotikorik ez jasatea. Bestetik, K⁺ irteera ekidituz Na⁺/K⁺ ponparen lana murriztu egiten da, honek duen ATP gastua asko murriztuz eta zelulak energi hori bideragarritasuna mantentzeko prozesuetan erabili dezake. Azkenik, ikusita dago potasio irteerak zelularen heriotza-programatuen aktibazio eta funtzionamendu egokian berebiziko garrantzia duela (Bischofberger et al., 2012) , beraz, irteera hau ekiditeak ACTak aktibatzen duen heriotza-programatu baten inhibizioa ekarri dezake. Hipotesi hauek testatzeko esperimentu desberdinak burutu genituen .



4.3 Potasio altuko medioak toxinen zitotoxizitatean duen eragina. A) ACTak HBSS eta “High K⁺” medioan eragiten duen LDH askapena 4 ordutako inkubazioan kontzentrazio desberdinak erabiliz. B) ACT-ΔN482ak HBSS eta High K⁺ medioan eragiten duen LDH askapena 4 ordutako inkubazioan kontzentrazio desberdinak erabiliz. Zitotoxizitate % 100 zelulak Triton X-100 % 0,1 tratatuz lortu zen. C) ACT eta ACT-ΔN482 mutantearen aktibitate hemolitikoaren azterketa HBSS eta High K⁺ medioan inkubatuz. Eritrozito soluzio estandarizatu toxinen diluzio seriatu batekin inkubatu zen 4 orduz 37 °C-tan. Hemolisi portzentaia eritrozitoek askatutako hemo-taldea neurtuz determinatu zen, espektrofotometro bidez absorbantzia 412 nm-tan neurtuz. Hemolisi % 100 eritrozitoak Triton X-100 % 0,1 inkubatuz lortu zen. Errore barrak hiru experimentu independenteen arteko desbiazio estandarra adierazten dute

4.2.3 K⁺ irteeraren garrantzia ACTak eragindako lisi-osmotikoan

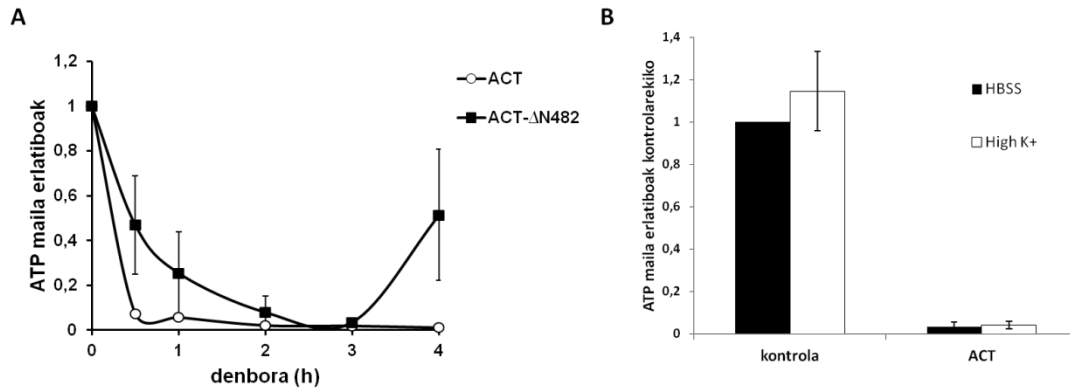
Potasio irteera ekiditeak ACTak eragiten duen lisi-osmotikoa inhibitzen duen egiaztatzeko, “High K⁺” medioa hemolisi saioan erabili genuen. Toxinak eragindako hemolisi prozesuan aktibitate katalitikoak garrantzi gutxi du eta toxikotasun gehiena toxinen poro-eratzailerik aktibitateak eragindako talka osmotikoarengatik izaten da (Ehrmann et al., 1991) Hemolisi saioa lehengo atalean egin zen moduan egin zen baina eritrozitoak HBSS eta “High K⁺” medioarekin inkubatuz 4 ordutara. Emaitzetan (**4.3 Irudia**) ikusten da “High K⁺” medioak ez duela ACTak eragindako hemolisia

inhibitzen. Beraz, datu hauetan oinarrituta, iradoki daiteke K^+ irteera eragozteak ez duela toxinak eragiten duen talka osmotikoa modu esanguratsuan murrizten.

4.3. Toxinak eragindako estres energetikoaren azterketa.

4.3.1 Toxinak eragindako estres energetikoaren azterketa ATP intrazelularraren neurketaz.

Lehen azaldu dugun modura, toxinaren AC aktibitateak zelulan estres energetikoa eragiten du ATP mailaren murrizketarengatik. Hala ere, poro-eratzaille aktibitateak sortutako desoreka ionikoa konpontzeak ere ATP gastu handiak ekar ditzake. ACT- Δ N482 erabiliz, poro-eratzaille aktibitateak eragin dezakeen estres energetikoa kalkula dezakegu, mutante honek ez duelako AC domeinurik. Helburu honekin, zelulak 4 orduz ACT eta ACT- Δ N482 1 nM-ekin inkubatu ziren eta denbora tarte desberdinetan zelulak zuten ATP mailak neurtu ziren Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay (Promega) kit komertziala erabiliz. Irudian (**4.4 Irudia**) ikus daiteke ACT 1 nM-ek zelulen ATP mailak balore minimotan uzten dituela 30 minututan eta ATP maila hauek inkubazioaren lau orduetan berdin jarraitzen dutela. ACT- Δ N482rekin ATP maila minimoetara jaisten da baita ere, baina zinetika motelagoarekin. Zelulen ATP maila minimora bi orduetara iristen da. ACTrekin gertatzen ez den bezala, ACT- Δ N482rekin ATP mailak berreskuratu egiten dira inkubazioaren lau ordu pasa eta gero. Datu hauek adierazten dute zelulak ACT 1 nM-rekin inkubatzeak ATParen agortze bortitza eragiten duela, zelula barneko ATP mailak minimoan mantenduz modu itzulezinean saioak irauten duen 4 orduetan gutxienez. ATParen agortze hau ez da toxinaren aktibitate katalitikoarengatik bakarrik gertatzen. ACT- Δ N482-ren datuak erakusten dutenez, poro-eratzaille aktibitateak bere kabuz ATP murrizketa bat eragin dezake. Toxina basatiarekiko dagoen desberdintasun garrantzitsuena da, ATP murrizketa hau itzulgarria izan daitekeela.



4.4 Irudia. ACT eta ACT-ΔN482-ren efektua J774 zelulen ATP intrazelular mailan. A) Zelulak ACT eta ACT-ΔN482 1 nM-rekin tratatu ziren 4 orduz eta ATP kantitateak teknika experimentaletan azaldu bezala neurtu ziren.. Lortutako ATP kontzentrazioak tratatu gabeko kontrolaren ATP kontzentrazioaren arabera azaltzen dira .B) “High K⁺” medioaren efektua toxinak eragindako ATParen agortzean deplezioan. Zelulak HBSS eta “High K⁺” medioan lau orduz ACT 1nM inkubatu ziren eta ATP mailak alderatu ziren. Errore barrak hiru esperimendu independenteen desbideratze estandarra adierazten du

Aurreko eta oraingo saioretan ikusi dugunez, ACT-ΔN482ek itu zeluletan eragiten dituen efektuak toxina basatiak eragiten dituenaren oso desberdinak dira. Potasio irteera ekiditeak ez du mutanteak eragiten duen toxikotasunean eraginik eta gainera, eragiten duen ATParen agortzea itzulgarria da. Desberdintasun hauek kontuan hartuta ez dirudi ACT-ΔN482ren mekanismo zitotoxikoaren ezaugarriak aztertzeak toxina basatiaren mekanismoari buruz informazio erabilgarririk eman dezakeenik. Hau kontuan hartuta hurrengo saioretan toxina mutantea ez erabiltzea erabaki zen.

4.3.2 K⁺ irteeraren garrantzia ACT toxinak eragindako ATParen agortzean

Arestian lortutako emaitzak ulertzeko helburuarekin jarraituz, K⁺ irteera ekiditeak ACTren toxikotasunean duen efektu inhibitzailearen zergatia aztertzen jarraituko dugu. K⁺ irteera ekiditeak zelulak toxinarekin inkubatzeko jasaten duen estres energetikoa murriztea eragiten duen egiztatuko dugu. Zelulak 4 orduz ACT 1 nM-rekin tratatu ziren HBSS medioan eta “High K⁺” medioan eta ATP mailak neurtu ziren. Irudian (**4.3 Irudia**) ikusi daiteke “High K⁺” medioak ez duela ACT 1 nM-ek eragindako ATParen agortze-mailan eragiten, bi medioetan ATP mailak minimoan aurkitzen bait dira. Beraz, potasio irteera eragozteak ez du zelulak toxinari aurre egiteko behar duen ATP gastua

modu esanguratsuan murrizten. Ioi honen irteerak ez badu toxinak eragindako talka-osmotikoan eta ATParen agortzean eragin handirik, iradoki daiteke potasio irteerak zelula heriotzara eramaten duen bidezidor programaturen baten aktibatzaile izan daitekeela. Orain arteko ikerketen arabera, ACT toxinak eragiten duen heriotza-programatu bakarria apoptosia da. Kontzentrazio altuetan zelulak nekrosi bidez hiltzen ditu, baina hau prozesu pasibo eta kontrol gabeko bat modura sailkatzen da. Honetan oinarrituta hurrengo saioetan prozesu honen azterketan sakonduko dugu.

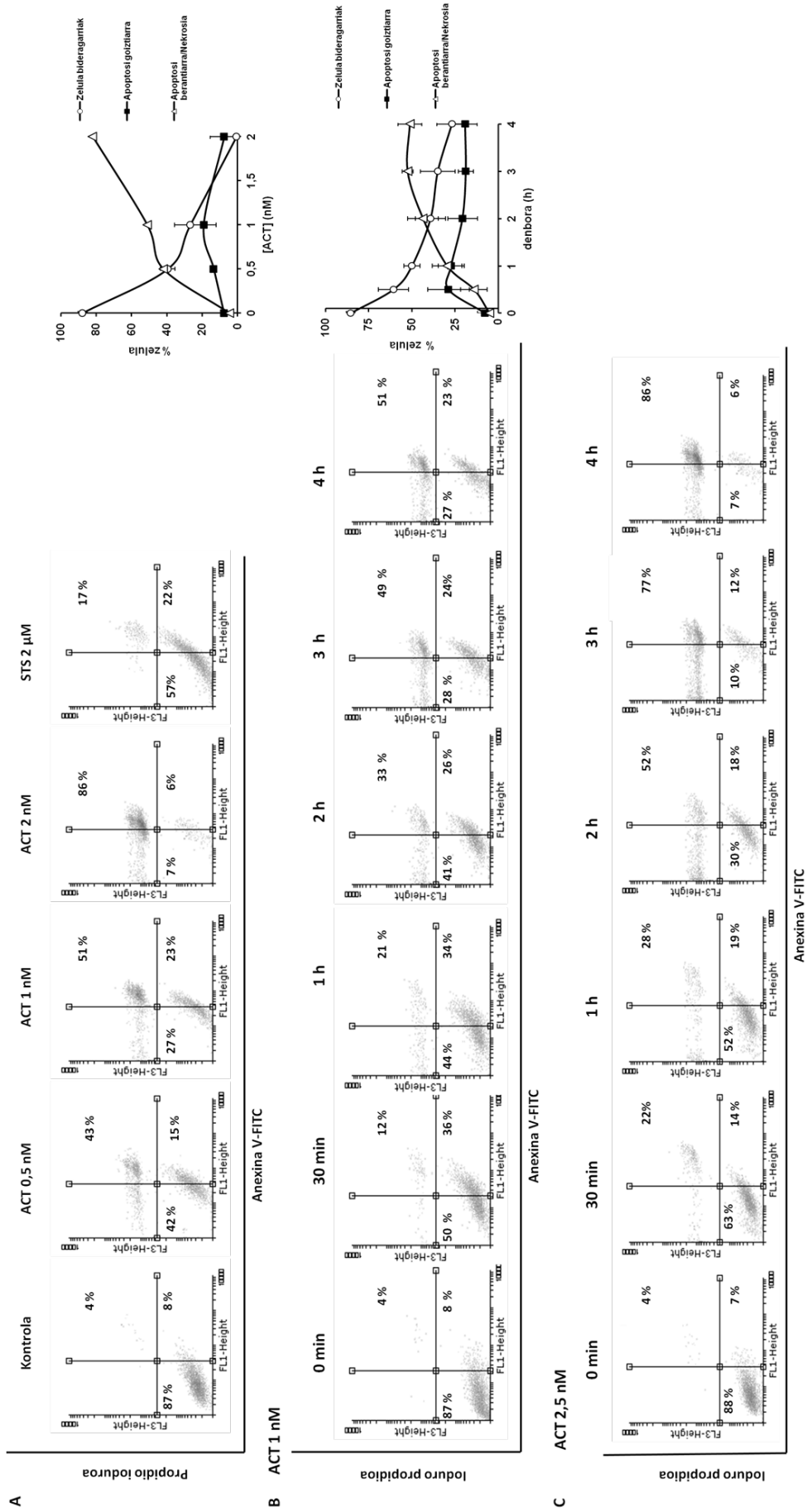
4.4 ACT toxinak eragindako makrofagoen apoptosia

4.4.1 ACT toxinak eragindako apoptosi prozesuaren karakterizazioa.

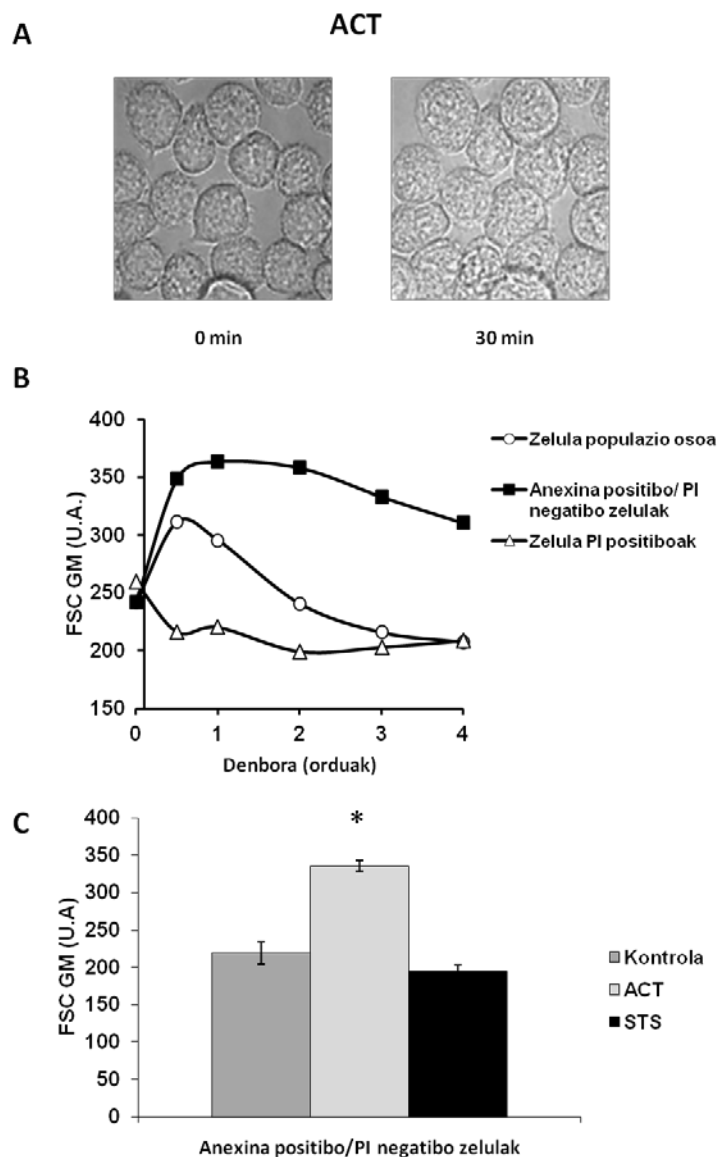
Toxinak eragiten duen apoptosia aztertzeko, Anexina V-FITC eta propidio ioduro (PI) bidezko markaketa egin zitzaizen toxinarekin inkubatutako zelulei. Anexina V zelula apoptotikoek bere mintz plasmatikoko kanpoaldean duten fosfatidil serinari (PS) batzen zaio, apoptosi prozesuaren hasierako pausuetan dauden zelulak identifikatzea ahalbidetuz. PI markaketa bidez hilda dauden zelulak bereizi daitezke, baina ezin da jakin zelula hauek apoptosi prozesuarengatik edo nekrosi bidez hil diren. Kontuan hartu behar da esperimendu honetan PI kontzentrazioak lehengo atalean egindako saioetakoa baino txikiagoak direla (inkubazio denborak luzeagoak dira) , beraz, saio hauetako PI markaketak ez dira lehengo ataleko PI-iragazkortasun datuekin alderagarriak. Apoptosi bidezko heriotza prozesuak denbora tarte luzeak behar ditu, saio honetan lehengo saioetan erabili dugun lau orduko inkubazioa egin da beste ikerketetan denbora tarte honetan toxinak eragin ditzakeen efektu apoptotikoak ikusi ahal izan direlako (Hewlet et al, 2006). Zelulak ACT toxinaren hiru kontzentrazio desberdinekin inkubatu ziren (0.5, 1 eta 2.5 nM), eta apoptosiaren kontrol positibo modura staurosporina (STS) erabili zen, ikerketa askotan eraili den apoptosi-eratzailerik. Irudian ikusten denez (**4.5 Irudia**), ACT toxinarekin tratatutako zelulek apoptosiaren markatzaileak erakusten dituzte saio honetan erabilitako baldintzetan. Apoptosi goiztiar bezala agertzen diren zelulen ehuneko handiena 1 nM-ko inkubazioarekin lortzen da (% 23). 2,5 nM-ko kontzentrazioan zelula gehienak PI-positibo bezala agertzen dira eta ez da posible apoptosi edo nekrosi bidez hil diren jakitea. 0,5 nM-ko kontzentrazioan apoptosiaren markaketa duten zelulak agertzen dira baina 1 nM-rekin agertzen direnak baino gutxiago (% 15). Staurosporina kontrolarekin saioko zelula apoptotikoak identifikatzeko

Anexina V- markaketa egokia zela egiaztatu genuen. Saio honetan lortutako datuetatik egiaztatzen da ACT toxinak, 1 nM-ko kontzentrazioan, heriotza apoptotikoaren ezaugarriak sorrarazten dituela bere itu-zeluletan. Hala ere, ezin da esan baldintza hauetan apoptosis toxinak zelulen heriotza eragiteko duen modu nagusia dela, irudietan ikusten delako tratatutako populazioaren ehuneko handiena nekrosi/apoptosi berantiarraren ezaugarriak dituela. Beraz, ezin da baztertu zelula ehuneko guzti hori apoptosis ez den beste prozesuren batengatik hiltzea. Hau hobeto aztertzeko, ACT 1 eta 2,5 nM-rekin tratatutako zelulen ezaugarrien eboluzioa inkubazioaren denbora-tarte desberdinetan aztertu zen. ACT 1 nM-ekin ikusten denez (**4.5 Irudia**), inkubazioko lehenengo 30 minutuetan zelula apoptosi goiztiarren (Anexin+/PI-) maximoa lortzen da (%36arekin), zelula nekrotikoen (PI+) portzentaia oraindik urria izanik (% 12). Denbora honetatik aurrera, apoptosi goiztiarreko zelulak murriztuz doaz PI positiboak igotzen doazen heinean, hirugarren ordura lehen aztertutako lau orduko antzeko baloreak lortu arte. ACT 2,5 nM-ekin zelula apoptosi goiztiar positiboan agerpen bat ikusten da (% 14-19) baina populazio ia osoa modu nekrotiko azkarrean hiltzen dela ikusten da (%86 PI positibo 4 ordutara). Bi kontzentrazio hauen zinetikak erakusten digute zelulak ezaugarri apoptotikoak erakutsi arren heriotza eta mintz iragazkortasuna modu azkarrean eta ugarian aurkezten dutela, ezaugarri hauek heriotza nekrotikoarenak izanik. Hau hobeto ulertzeko saio hauetan zelulek jasaten dituzten bolumen aldaketak aztertu genituen.

Apoptosi prozesua modu egokian eramateko zelularen bolumen murrizketa beharrezko ezaugarria da, nekrosi bidezko heriotzan, ordea, mintz iragazkortasunak eragindako ur sarrerek zelulen bolumen handipena dakar prozesuaren hasieran eta ezaugarri hau heriotza mota hau identifikatzeko erabiltzen da. Irudian ikus daitekeenez (**4.6 Irudia**) ACTrekin tratatutako anexin positiboak diren zelulek bolumen handipen bat jasaten dute inkubazio denbora guztietan. Aitzitik, estaurosporinarekin tratatutako zelula anexin positiboek ez dute bolumen handipen hau jasaten. Bolumen murrizpena jasaten duten populazioa PI positiboena da. Nekrosi bidezko heriotzaren azkeneko faseetan, mintzaren apurketa handiak direnean, zelularen barneko konposatuak kanporatu egiten dira kanpo eta barne medioaren osmolaritatea berdinduz, horregatik jada ez dago ur fluxurik eta zelularen bolumena txikitu egiten da. Zitometroaz lortutako emaitza hauek egiaztatzeke zelulei mikroskopio bidez argazkiak atera zitzaizkien, jasaten duten bolumen handipena egiaztatuz(**4.6 Irudia**).



4.5 Irudia. ACTak eragindako apoptosiaren ezaugarriak. A) J774 zelulak ACT kontzentrazio desberdinekin inkubatu ziren 4 orduz eta Annexin-V/propidio Ioduro markaketarekin fluxuzko zitometro bidez beraien ezaugarri apoptotikoak aztertu ziren. Dentsitate-plot-ean agertzen diren ehunekoak grafikoaren koadrante bakoitzean agertzen den zelula ehunekoari dagokio. Goi-eskuin koadranteko datuak goiko bi koadranteen ehunekoen batura adierazten du (PI positibo diren zelula guztiak). Dentsitate-plot-en emaitzak grafiko-linealean irudikatu ziren ere. B) Annexin-V/PI markaketaren zinetika zelulak ACT 1 nM-rekin inkubatzean. C) Annexin-V/PI markaketaren zinetika zelulak ACT 2,5 nM-rekin inkubatzean..



4.6 Irudia. ACTak eragindako zelulen heriotza eta bolumen handipena. A) Mikroskopia optiko bidez ACT-rekin 30 minutuz tratatutako zelulen argazkiak. Zelulak 37°C tara mantendu ziren. B) Fluxu zitometriaren bidez ACT 1 nM-rekin tratatuz Annexin V-FITC/ Propidio Ioduro bidez aztertutako zelulen bolumen aldaketan (FSC seinalea) eboluzioa inkubazio denboran zehar. Populazio osoaren bolumen aldaketa apoptosi goiztiar eta apoptosi berantiar/nekrotiko populazioarekin alderatu zen. C) ACT eta

staurosporinarekin 4 orduz tratatu eta gero apoptosi goiztiar ezaugarriak dituzten zelulen bolumenaren alderaketa. Errore barrak hiru esperimentu independenteen desbideratze estandarra adierazten du

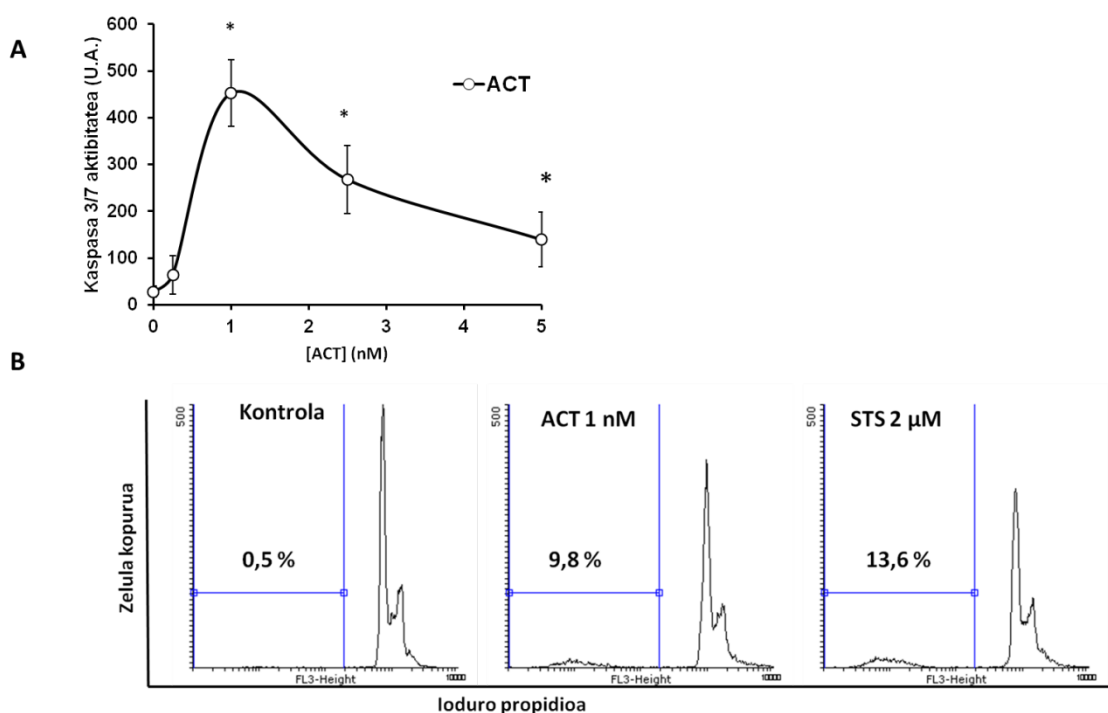
4.4.2 ACT toxinak eragindako kaspasen aktibazioa eta DNAREN degradazioa

Aurreko saioan zelula apoptotiko goiztiarrak sailkatzeko erabili dugun PS esposizioaren azterketa ez da apoptosiaren behin-betiko ezaugarri bat. Zelularen kaltzio intrazelularren igoerak flipasen aktibitatean eragin dezake PS-ren esposizioa eraginez, ezaugarri hau itzulgarria izanik. Arrazoi honengatik apoptosi ezaugarriak beste markatzaile desberdinez aztertzea erabaki zen. Aztertutako beste apoptosi-markatzaileak kaspasa-3-ren aktibazioa eta DNA nuklearraren degradazioa izan ziren.

Kaspasa-3 eta -7 apoptosi prozesuaren efektore modura sailkatuta daude, beraz, hauen aktibazioak apoptosi prozesua egoera itzulezinean sartu dela adierazten du. Zelulak ACT toxinarekin lau orduz kontzentrazio desberdinekin inkubatu ziren eta zelulen Kaspasa 3 eta 7-ren aktibitatea neurtu zen (detekziorako erabilitako substratua bi entzimentzako balio du). Irudian ikusten denez (**4.6 Irudia**) kaspasa 3/7-ren aktibitate maximoa 1 nM-ko kontzentrazioarako lortzen da, kontzentrazio handiagoetan ordea, aktibitate hau ezin da kontroletik bereizi. Aipatzekoa da kaspasa-3/7-ren aktibitatearen grafikoa bat datorrela **4.5A Irudian** aztertutako kontzentrazioaren arabera apoptosi-goiztiarraren markaketarekin, lehengo saioko datuak indartuz.

Kaspasa 3 eta 7-ren aktibazioaren ondorioz zelula barneko endonukleasen aktibitatea igotzen da eta ondorioz zelulak bere DNA degradatu egiten du, ezaugarri hau apoptosi prozesuaren markatzaile kontsideratuz. Propidio ioduroaren bidezko Sub-G1 (zelula hipodiploideak) populazioaren azterketaren bidez, gure populazioan DNA degradazioa jasaten ari diren zelulak dauden aztertu dezakegu. Irudian ikusten da ACT 1 nM-rekin (**4.7 Irudia**) tratatutako zeluletan zelula hipodiploideen kopuruaren handipen esanguratsu bat dagoela tratatu gabeko zelulekin alderatu ezker. Kontrol positibo bezala estaurosporinarekin tratatutako zelulak erabili ziren, non ACTak eragindakoaren antzeko efektu bat ikusten da. Saio honen datuak lehen lortutako datuekin bat datoz, hau da, makrofagoak ACT toxinarekin 1 nM-ko kontzentrazioan lau orduz inkubatuta heriotza apoptotikoa ematen dela. Hala ere, saio honetan lortutako zelula diploideen ehunekoak ezin dira kontuan hartu beste saioen datuekin alderatzeko. Saioa burutzeko

teknika esperimentalengatik errazagoa da zelula hipodiploideak benetakoak baino ehuneko txikiagoetan detektatzea saioan.

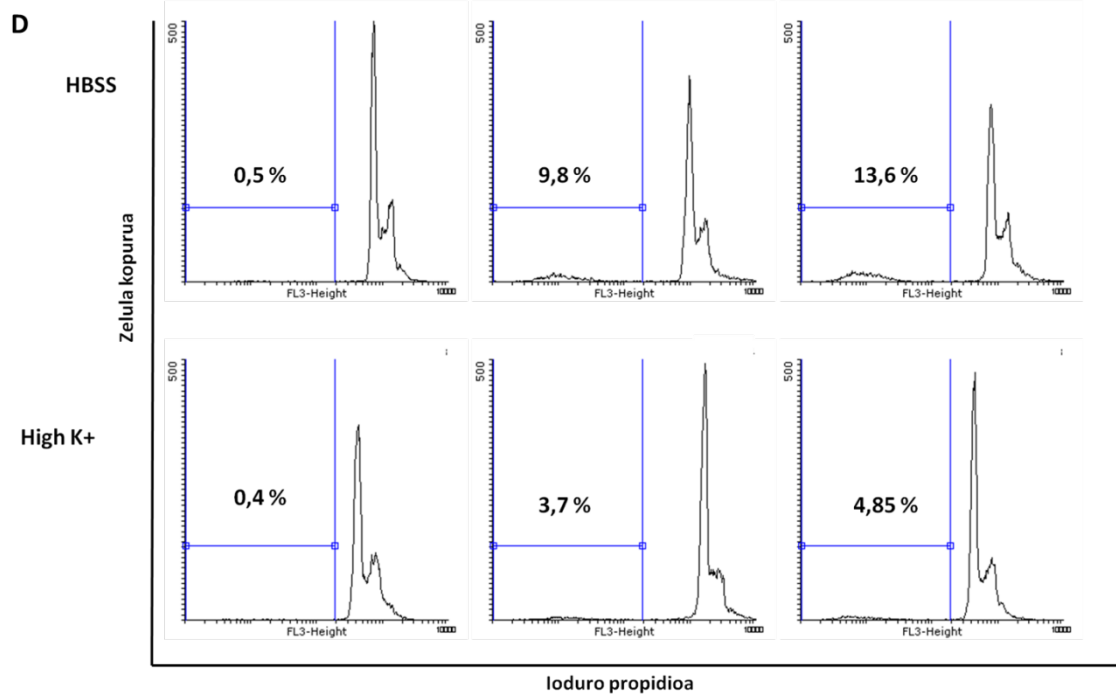
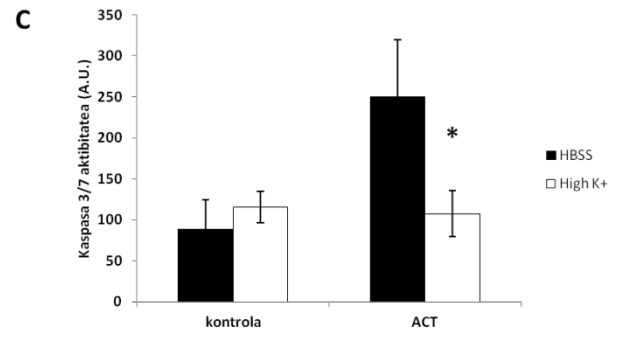
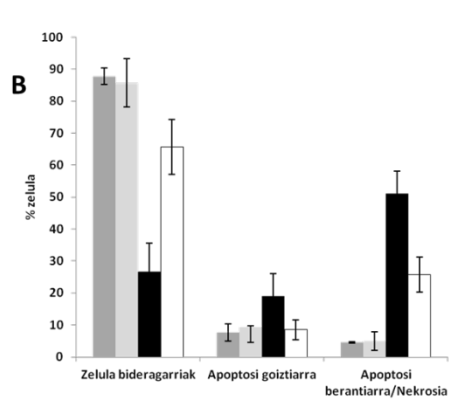
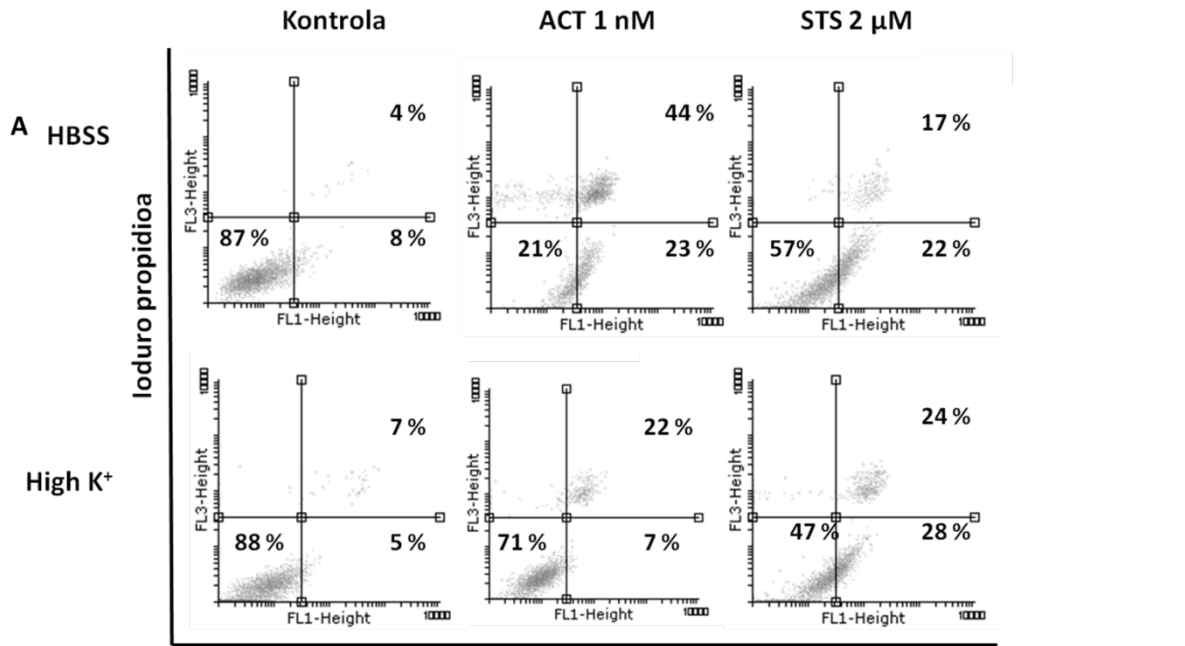


4.7 Irudia. Kaspasa 3/7-ren aktibazioa eta DNA degradazioa ACTren eraginez. **A)** Kaspasa 3 eta 7ren aktibitatearen neurketa ACTren kontzentrazio desberdinetan 4 orduz tratatutako zeluletan. Aktibitatea kaspasa hauen substratu fluoreszentea (Z-DVED-R110) erabiltzen duen Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega, Madison, WI, EEUU) kita erabiliz neurtu zen **B)** ACT eta estaurosporinarekin 4 orduz tratatutako zelulen populazio hipodiploidearen azterketa fluxu zitometroaren bidez. Ziklo zelularren G1 faseko seinaletik ezkeraldera dauden zelulak zelula hipodiploide bezala kuantifikatu ziren eta haien portzentaia grafikan adierazten da. Y ardatzak zelula kopurua adierazten du eta X ardatzak propidio ioduroaren seinalea (FL3 detektorea) eskala logaritmikoan. Histogramak hiru esperimentu independenteen adierazle dira

4.4.3 K⁺ irteeraren garrantzia ACT toxinak eragindako apoptosisian

Aurreko saioetan ikusi genuen K⁺ irteera bidezko ACTak eragindako toxikotasuna, ezin dela ioi honen irteerak estres ioniko eta energetikoan duen eraginengatik azaldu. Apoptosiak ACTren toxikotasunean duen garrantzia aztertu eta gero, K⁺ irteera eragozteak prozesu honetan eraginik duen aztertu genuen. Aurreko atalean apoptosis aztertzeke egindako saioak errepikatu egin ziren, baina oraingoan zelulak toxinarekin

“High K⁺” medioan inkubatu ziren. Irudian egindako hiru saioetan ikusten denez (**4.8 Irudia**), “High K⁺” medioak ACTak sortarazten dituen ezaugarri apoptotikoen inhibizioa eragiten du modu esanguratsuan. “High K⁺” medioan toxinarekin tratatutako zelulak apoptosi berantiar ezaugarri gutxiago dituzte, kaspasa 3/7 aktibazioa ez da ematen eta zelula hipodiploide kopuruaren murrizpena ematen da. Honek, K⁺ irteerak ACTak eragindako apoptosi prozesuan berebiziko garrantzia duela adierazten du, toxinak eragindako apoptosi prozesua martxan jartzeko beharrezko baldintzetako bat dela adieraziz. Horretaz gain, “High K⁺” medioak toxinak eragindako ezaugarri nekrotikoen inhibizioan eragina ere badu, ACT 1 nM eta 2,5 nM-ek eragindako mintz iragazkortasuna modu nabarmenean murriztuz. Arestian ikusi dugunez medio honek ez du toxinak eragindako talka osmotikoa murrizten eta horregatik zelulak bolumen handipena jasaten jarraitzen dute. Datu hauetatik iradoki daiteke potasioaren irteerak toxina bidezko ezaugarri apoptotiko eta nekrotikoen eraketan garrantzi handia duela.

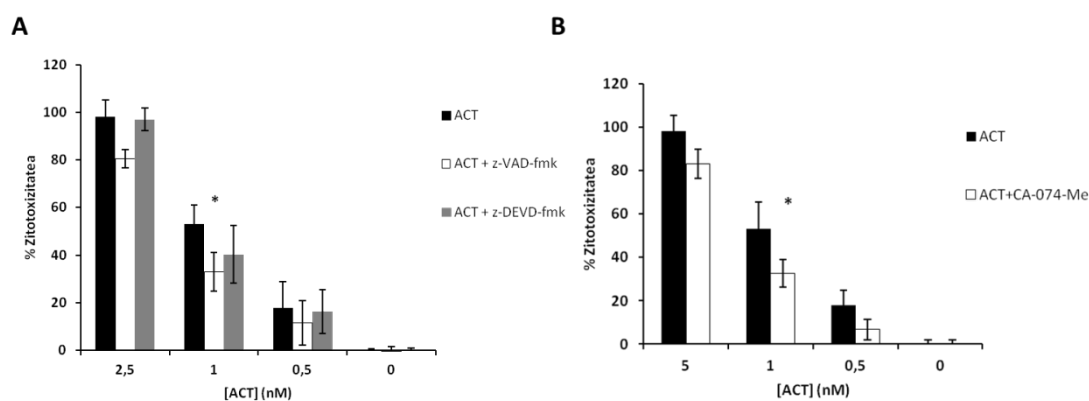


4.7 Irudia. High K+ medioaren eragina toxinak eragindako apoptosian. A) Fluxu zitometro bidezko Annexin V-FITC/PI azterketa HBSS eta “High K+” medioan ACT eta estaurosporinarekin (STS) 4 orduz tratatutako zeluletan. B) 4.6A Irudiko ACT 1nM datuen barra grafika bidezko adierazpena errore barrak erakutsiz. C) ACTrekin HBSS eta “High K+” medioan tratatutako zelulen kaspasa 3/7 aktibitateen alderaketa. D) ACT eta estaurosporinarekin HBSS eta “High K+” medioan 4 orduz tratatutako zelulen populazio hipodiploidearen azterketa fluxu zitometroaren bidez. Ziklo zelularren G1 faseko seinaletik ezkerraldera dauden zelulak zelula hipodiploide bezala kuantifikatu ziren eta bere portzentaia grafikan adierazten da. Y ardatzak zelula kopurua adierazten du eta X ardatzak ioduro propidioaren seinalea (FL3 detektorea) eskala logaritmikoan. Histogramak hiru esperimentu independenteen adierazle dira

4.4.4. Kaspasen aktibazioaren garrantzia ACT toxinak eragindako heriotza zelularrean

Ikusi dugunez ACTak eragindako heriotza zelularrak ezaugarri apoptotiko eta nekrotikoak dituela, prozesu bakoitzak zelularen heriotzean zer nolako garrantzia duen aztertzen saiatuko gara. Apoptosia, seinalizazio bidezidorek gidatutako heriotza programatua denez, konposatu kimiko desberdinez inhibititu daiteke. Nekrosia teorikoki prozesu pasiboa eta kontrolik gabekoa denez ezin da biokimikoki inhibititu bere sorrera eragiten duen estimulua kendu edo murrizten ez bada. Apoptosia inhibitzeko kaspasen inhibitzaileak askotan erabili dira. Gure kasuan, kaspasa-3-aren aktibazioa ematen dela jakinda, zelulak kaspasen z-VAD-fmk inhibitzaile orokorrarekin eta z-DEVD-fmk kaspasa-3ren inhibitzaile espezifikoarekin inkubatu ziren. Irudian ikus daiteke (**4.8 Irudia**) z-VAD-fmk bidez ACTak eragindako heriotzaren inhibizioa ematen dela, baina inhibizio hau ez da ikusten z-DEVD-fmk –rekin. Harritzekoa izan arren, emaitza honek adierazten digu kaspasa-3 aktibatuta egon arren ez duela zelularen heriotzean eraginik. Aztertuta dago z-VAD-fmk inhibitzaileak kaspasak ez diren katepsina lisosomalaren inhibizioa eragin dezakeela (Turk and Stoka, 2007). z-VAD-fmk-rekin ikusitako inhibizioa kaspasetan edo katepsinetan duen eraginarengatik dela jakiteko, saio berbera CA-074-Me inhibitzailearen presentzian burutu genuen. Hau katepsina B-ren inhibitzailea da, katepsinak lisosoma barnean daude baina mintz-lisomalaren iragazkortasuna ematen denean zitosolera askatzen dira eta zelula barneko konposatuak hidrolizatzen dituzte zelularen heriotza eraginez. Irudian ikus daiteke CA-074-Me-rekin ACTak eragindako heriotzaren inhibizio bat ematen dela, inhibizio hau z-VAD-fmk-rekin ematen denaren antzekoa denez iradoki daiteke z-VAD-fmk-ren efektua

katepsinetan duen eragin ez-espezifikoarengatik ematen dela. Seguraski, datu guzti hauek batuz, ACTak eragindako heriotza kaspasekiko independentea eta katepsina lisosomal eta K^+ sarrerarengatik areagotua den apoptosi-nekrosi ezaugarriak dituen heriotza motarengatik ematen da. Apoptosi eta nekrosi ezaugarriak izaten dituen heriotza motari aponekrosi bezala deritzo bibliografian (Formigli et al., 2000).



4.8 Irudia. Kaspasa eta katepsinen inhibitzaileen efektua ACTak eragindako zitotoxizitatean. A)

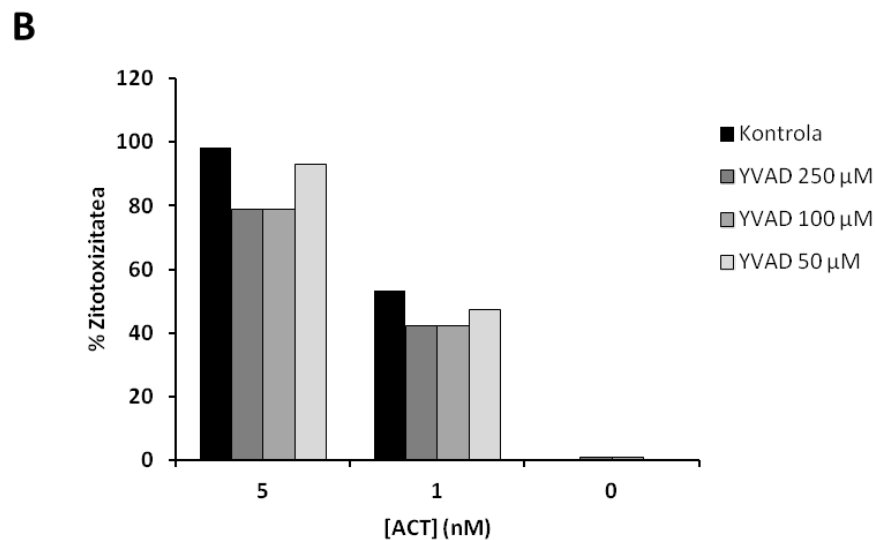
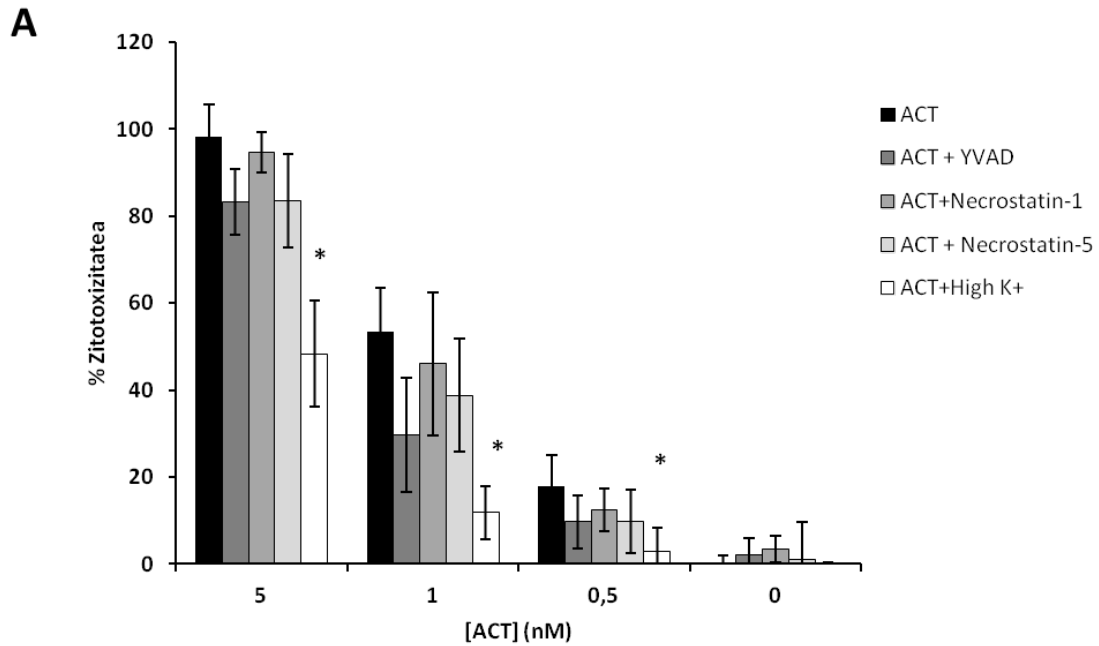
J774 zelulak z-VAD-fmk (kaspasen inhibitzaile orokorra) eta z-DEVD-fmk (kaspasa 3 eta 7ren inhibitzaile espezifikoa) inhibitzaileekin inkubatu ziren ordu batez eta gero ACT kontzentrazio desberdinek eragindako zitotoxizitatea aztertu zen LDH askapena neurtuz. B) Saio berdina zelulak Ca-074-Me (Katepsina B-ren inhibitzailea) erabiliz. Zelulak toxinarekin 4 orduz inkubatu ziren 37° C tan. Zitotoxizitate % 100 zelulak Triton X-100 % 0,1 tratatuz lortu zen. Errore barrak hiru esperimentu independenteen desbideratze estandarra adierazten du

4.5 K^+ irteeraren bidez aktibatzen diren heriotza nekrotiko programatuen garrantzia ACTren mekanismo zitotoxikoan

Azken urteetan nekrosi ezaugarriak dituzten baina programatutako bidezidor bat erabiltzen duten heriotza programatuak deskribatu dira, “piroptosis” eta “nekroptosis” adibidez. Ikerketa ugarietan ikusi da heriotza-programatu hauek poro-eratzaille toxinengatik aktibatuak izan daitezkeela eta toxinak eragindako K^+ irteerak berebiziko garrantzia duela beraien aktibazioan. Ikusi dugunez ACTak eragiten duen heriotza-motak ezaugarri nekrotikoak eta K^+ irteeraren menpekota dela, arrazoizkoa dirudi nekrosi-programatu hauek toxinarengatik aktibatuak izatea. Horregatik toxinak eragindako heriotza mekanismo hauen menpekota den aztertu genuen.

4.5.1 Piroptosiaren parte-hartze eza toxinaren toxikotasunean

Piroptosia ezaugarri nekrotikoak dituen kaspasa-1 -ek bideratutako heriotza programatua da. Gorputzak patogenoen aurkako hantura erantzun baten bidez erantzuteko erabiltzen du. Zelulen mintza iragazkor bihurtzen da eta zelulen bolumen handipena gertatzen da, ezaugarri askoren artean. Apoptosiarekin ere ezaugarri batzuk partekatzen ditu, DNAREN degradazioa kasu. Ikusi da prozesu honen aktibazioan K^+ irteera beharrezkoa dela, eta K^+ irteera eragiteko gaitasuna duten poro-eratzaille toxinek heriotza programatu honen aktibazioa eragin dezaketeela (Miao et al., 2011). Heriotza mota honek izan ditzakeen ezaugarriak ACTrekin tratatutako zeluletan ikusten direnez, toxinak mekanismo hau aktibatu dezakeen aztertu genuen. Mekanismo osoa kaspasa-1en aktibazioaren menpe dagoenez, zelulak kaspasa-1en substratu inhibitzailea den Ac-YDAD-cmk-rekin inkubatu genituen. Inhibitzaileak ez du efekturik testatutako ACT kontzentrazioetan (**4.9 Irudia**). Eraitza honetaz zihur egoteko saio berdina YVAD kontzentrazio desberdinekin egin genuen, inhibitzaileak efektu esanguratsurik ez duela zihurtatuz.. Honek, baldintza hauetan toxinak eragindako K^+ irteerak piroptosi mekanismoa aktibatu dezakeen hipotesia baztertzera garamatza.



4.9 Irudia. Potasio irteerak aktibatzen dituen nekrosi-bideratu mota desberdinen eragina ACT-ren zitotoxizitatean . A)JJ74 zelulak AC-YVAD-cmk (100 μM), Necrostatina-1 (25 μM), Necrostatina-5 (50 μM) inhibitzaileekin inkubatu ziren ordu batez eta gero ACT kontzentrazio desberdinek eragindako zitotoxizitatea aztertu zen LDH askapena neurtuz. Zelulak toxinarekin 4 orduz inkubatu ziren 37 °C-tan.B) Ac-YVAD-cmk inhibitzaile kontzentrazio desberdinen efektua toxinak eragindako toxikotasunean. Inhibitzaileen efektua alderatzeko Hih K+ medioaren efektuaren datueak ere adierazten dira. Zitotoxizitate % 100 zelulak Triton X-100 % 0,1 tratatuz lortu zen. Errore barrak hiru esperimentu independenteen desbideratze estandarra adierazten du.

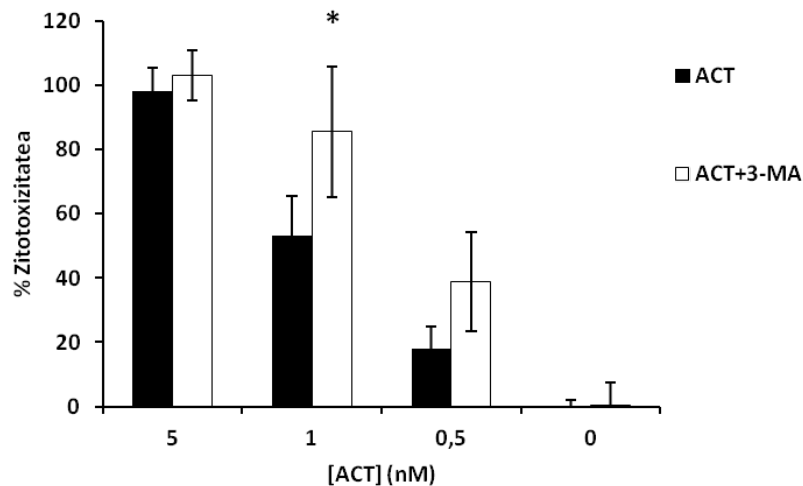
4.5.2 Nekroptosiaren eragina ACTren zitotoxizitatean

Nekroptosia, nekrosi ezaugarriak dituen RIP familiako proteinek bideratutako heriotza programatu mota bat da. Aurreko ikerketetan ikusi da toxina poro-eratzailleek heriotza mota hau eragiteko gaitasuna dutela (Kitur et al., 2015). Gainera, ikusi zen poro-eratzaille toxina hauek eragindako K^+ irteera blokeatzeak mekanismo honen inhibizioa dakarrela. Datu hauekin ACTak heriotza mota hau sor dezakeen aztertzea erabaki genuen. Horretarako zelulak RIP kinasen bi inhibitzaile desberdinekin inkubatu genituen, Nekrostatina 1 eta 5. Bi inhibitzaile hauek toxinak poro-eratzailleak aktibatutako nekroptosia inhibitzeko gaitasuna dutela ikusi da (González-Juarbe et al., 2015). Irudian ikusi daiteke (**4.9 Irudia**) inhibitzaile hauek ez dutela efekturik ACT toxinak eragindako zitotoxizitatean saio honetan erabilitako toxina kontzentrazioetan, beraz, baieztatu daiteke nekroptosiak ez duela parte hartzen ACTak baldintza hauetan eragindako heriotz zelularrean.

4.6 Autofagiaren garrantzia ACTak eragindako heriotza zelularrean

Aurreko saioetan ikusi dugunez, ACT toxinak bere itu zeluletan estres energetiko bortitza eragin dezake ATParen agortzearen bidez. Zelulek energi murrizketa hauek jasaten dituztenean autofagia mekanismoa aktibatzen dute, zelula beraren organulu eta material desberdina katabolizatuz energia lortzeko (Choy and Roy, 2013). Hala ere, eztabaida dago autofagiak heriotza zelularrean eduki dezakeen eginkizunari buruz. Orain dela urte askotik ezagutzen da heriotza programatu mota bat non zelulak ezaugarri autofagikoak dituzten. Zelula mota honi “Autophagy-related cell death” deritzo, eta uste da gehiegizko autofagia batengatik gertatzen dela. Toxina poro-eratzailleek itu-zeluletan prozesu autofagikoa aktibatzeke gaitasuna dutela ikusi da, eragiten duten K^+ irteerarengatik aktibatua. Prozesu hau, zelulak toxina edo patogenoaren aurka erantzuteko eta bere biziraupena bermatzeko erabiltzen duen biziraupen-mekanismo bat dela onartzen da. Hala ere, gure toxinen kasuan estres energetikoa bortitza eta iraunkorra izateak autofagia heriotza zelularrearen eragile izatea zentzuzko hipotesia dirudi. Hau aztertzeke, makrofagoak 3-MA autofagiaren inhibitzailearekin (Sigma) aurreinkubatu ziren eta ondoren ACTrekin inkubatu ziren lehengo saioetan egin zen bezala. Grafikoan ikus daiteke (**4.10 Irudia**) 3-MA-k ez duela heriotza inhibitzen, are gehiago, inhibitzailearen eraginez zelula gehiago hiltzen dira

toxinaren presentzian. Datu honek saio honetarako proposatutako hipotesia baztertzeraz behartzen gaitu. Bestalde, iradoki daiteke autofagiak ACTren efektuak jasaten dituzten zeluletan biziraupena bermatzen duen prozesua dela, bere inhibizioak toxina bidezko heriotza modu esanguratsuan handiarazten bait du.



4.10 Irudia. Autofagiaren inhibizioak ACT-ren zitotoxizitatea indartzen du toxina kontzentrazio baxuetan. J774 zelulak 3-MA (5 mM) inhibitzailearekin inkubatu ziren ordu batez eta gero ACT kontzentrazio desberdinek eragindako zitotoxizitatea aztertu zen LDH askapena neurtuz. Zelulak toxinarekin 4 orduz inkubatu ziren 37. Zitotoxizitate % 100 zelulak Triton X-100 % 0,1 tratatuz lortu zen. Errore barrak hiru esperimentu independenteen desbideratze estandarra adierazten du

Laburbilduz, atal honetan lortutako emaitzen arabera esan genezake ACTrekin tratatutako makrofagoak aponekrosi modura definitu daiteken heriotza- programaturaz hiltzen direla, hau da, energi falta edo gehiegizko estres batengatik nekrosian bukatzen duen betegabeko apoptosi prozesuaz (Formigli et al., 2000). Toxinak eragindako K^+ irteera heriotzaren eragile nagusia dela esan daiteke, eta bertan proteasa lisosomalek parte hartuko lukete. Azkenik aipatu, toxinak eragindako ATP agorpen azkarraren efektuak murriztu edo gainditu asmoz autofagiaren aktibazioa ere eragiten duela, hala ere heriotza da zelulek duten azken patua..

5.Eztabaida orokorra eta ondorioak

5. EZTABAIDA OROKORRA ETA ONDORIOAK

Bi emaitza-atal hauetan ACT toxinarene poro-eratzaille aktibitateak bere ekintza-mekanismoan duen zereginaren azterketan sakondu dugu. ACTak bi aktibitate dituen, domeinu katalitiko ez duen mutantea (ACT- Δ N482) erabili dugu poro-eratzaille aktibitatearen efektuak modu isolatuan aztertu ahal izateko, eta honekin lortutako informaziotik toxina basatiari buruzko ezagutza hobetuz lortzeko. Helburu honetaz gain, gure taldeko ikerketek frogatu zuten ACTak mintza translokatzeko duenean, AC domeinua kalpainarengatik moztua izaten dela eta honek gure mutantearen sekuentzia antzekoa edukiko lukeen domeinu bat sortzen duela mintzean (Ostolaza et al., 2013). ACT- Δ N482rekin egindako lanek, moztu eta gero toxinarene zati honek aktibitate biologikorik mantentzen duen jakitea ahalbidetu dezakete. Tesi honetan ACTaren ekintza mekanismoaren bi arlo nagusi aztertu ditugu. Batetik, toxinak bere iturri zelulan mintzean eratzen dituen poroen ezaugarriak, poro horiek zeluletan eragiten dituzten efektuak eta haien ondorioz zelulan aktibatzen den defentsa mekanismoa aztertu dugu eta, bestetik, poro eraketak toxinak eragindako heriotza zelularrean duen garrantzia.

Lehenik eta behin, aukeratutako mutantearen poro-eratzaille aktibitatearen karakterizazioa burutu genuen toxina basatia erreferentzi moduan hartuz. Karakterizazio hau eritrozitoetan egin genuen, zelula mota hau askotan erabili izan delako toxinen aktibitate hemolitikoa aztertzeko eredu-sistema bezala, eta toxina basatiaren aktibitate katalitikoak aktibitate hemolitikoarengan eragin urria duelako (Rogel et al., 1991) (hemolisi gehiena toxinarene poroak eragindako lisi-osmotikoaren efektuarengatik dela onartzen da). Eritrozitoetan lortutako emaitzek adierazten digute ACT- Δ N482 mutanteak ahalmen hemolitikoa duela, eta aktibitate hemolitiko hau toxina basatiarena baino handiagoa dela orokorrean. Toxina basatiarekin alderatuz, ACT- Δ N482 hemolisinak potentzia litiko handiagoa duela ikusi dugu, eritrozitoen %50 hemolizatzeko behar duen toxina kontzentrazioa (EC_{50}) 3-4 aldiz txikiagoa izanik. Hemolisi-zinetikari dagokionez berriz, ACT- Δ N482 hemolisinak ez du toxina basatiaren berezkoa den lag-denborarik erakusten, eta lortzen duen abiadura maximoa askoz handiagoa da. Bi toxinen arteko desberdintasun hauek azaltzeko asmoz bi saio-mota burutu genituen, babes-osmotikoko saioak sakarosaren presentzian eta kanal purinergikoen inhibizioa. Azken saio mota hau burutu zen, ikusi delako beste RTX toxinek kanal hauek erabiltzen dituztela eragiten duten hemolisia eragotzeko (Skals et

al., 2009). Sakarosaren presentzian burututako saioen emaitzen arabera toxina biek antzeko tamainako poroak eratzen dituztela suposa daiteke, kasu bietan sakaridoak antzeko babes maila erakutsi bait zuen. Sakarosaren diametroa 0.92 nm ingurukoa dela kontutan hartuz esan daiteke ACTk eta ACT- Δ N482 hemolisinak eitzozitoetan eratutako poroak ≤ 1.0 nm izan behar dutela. Bestalde, esan genezake kanale purinergikoek ez dutela toxina bi hauek eragindako hemolisian parte hartzen. Honetaz gain, gure taldeko beste saioetan frogatu da mutanteak toxina basatiaren mintzera batzeko gaitasun antzekoa duela (argitaratu gabeko emaitzak).

ACT toxina basatiaren gaitasun hemolitikoari buruz lortutako datuak bat datoz lehendik bibliografian adierazitakoarekin, ACT-k ahalmen hemolitiko ahula eta hemolizatzen hasteko lag-denbora luze bat behar duen hemolisinak dela (Barry et al., 1991; Hewlett et al., 2006). Honexegatik, ACT- Δ N482 mutanteak toxina basatiarekiko erakutsitako potentzia hemolitikoa eta bizkortasuna ez zen esperotako emaitza. Toxina basati eta mutantearen artean dauden desberdintasunak interpretatzeko aukera desberdinak proposatzen ditugu: oligomerizazio gaitasun handiagoa edo poroaren biziraupen (lifetime) luzeagoa. Ikusi da ACTak oligomeroak eratzen dituela eritrozitoen mintzetan eta hemolisi gaitasun urria duten mutanteak oligomerizazio gaitasun urriagoa dutela (Vojtova-vodolanova et al., 2009). Beraz, izan daiteke ACT- Δ N482ak oligomerizazio gaitasun handiagoa izatea edo bizkorrago egitea, honek mutanteak azaltzen duen lag-denbora motzari azalpena emanez. Izan daiteke mutanteak AC domeinua ez izatean, toxinarekin "oligomerizazio guneak" eskuragarriago egotea, horrela monomeroen arteko batura erraztuz. Hau bat dator mutanteak erakusten duen lag-denbora motzekin ACTrekin alderatuz. ACTren monomero edo oligomeroaren ezaugarri estrukturaleri buruz oso informazio gutxi dago eta ez dakigu ze sekuentziak parte hartzen duten oligomerizazioan, baina zihurrena da sekuentzi hidrofobikoko alfa helizeek elkarrekintzan egotea oligomeroaren poroa eratzen. ACT- Δ N482ek oligomerizazio gaitasun handiagoa izango balu, AC domeinuaren presentziak prozesu hau oztopatzen duela esan nahiko luke. Hala ere, ikerketa honetan lortutako emaitzek ez dute hipotesi hau onartzeko datu nahikorik ematen, baina gai honi buruzko etorkizuneko ikerketarako abiapuntu izan daitezke. Beste taldeek egindako ikerketan (Basler et al., 2006) ikusi zen AC domeinua ezagutzen duen antigorputza toxinarekin inkubatuz ACT konformazio hiperhemolitiko bat hartzen zuela (CyaA+ 3D1). Proposatu hipotesiarekin jarraituz, interpretatu daiteke antigorputzarekin AC domeinua

“finkatzean” oligomerizazio gunea eskuragarri gelditzen dela, mutante hiperhemolitiko bat lortuz.

Beste aukera bat ACT- Δ N482ak eratutako poroek ACTrenak baino biziraupen handiagoa izatea da. ACT biziraupen motzeko (2 seg) poroak egiten dituen toxina da (Benz et al., 1994), baina gune hidrofobikoetan egindako mutazio puntualek hemolisi gaitasun handia duten mutanteak sortzen dituzte (CyaA-E581K,), poroaren biziraupen hori askoz luzeagoa zutelako poroaren tamaina berdina izan arren (Basler et al., 2007). Hau ACT- Δ N482ren ezaugarri hemolitikoak azaltzeko aukera bat izan daiteke. Orain dela gutxiko ikerketetan ikusi da (Masin et al., 2016) AC domeinua eta gune hidrofobikoa batzen duen 100 aminoazidoko sekuentzian (aa. 390-500) karga-aldaketa mutazioak egitean, toxinen translokazioa, gaitasun hemolitikoa, poroaren tamaina eta biziraupena aldatzen direla. Lan honetatik interpretatu daiteke sekuentzia honek toxinen poroa “estali” edo bere eraketa inhibitu dezakeela. ACT- Δ N482ak sekuentzia hau ez duenez poro-biziraupen luzeagoa izango luke, hemolisi gaitasun handiagoa izanez.

Aipatutako bi hipotesiak ez dira kontrajarriak. Poro biziraupenari buruz hitz egiten dugunean oligomero baten asoziazio-disoziazio oreka bat deskribatzen egotea posiblea da, poroaren biziraupena oligomeroak egonkor mantentzen diren denbora adieraziz. Hala ere, galdera hauei erantzuna emateko toxinen estruktura aztertzen duten teknikak erabiltzen dituen ikerketak burutu beharko liriateke eta hau ez dago tesi honen helburuen artean. Laburbilduz, emaitza hauetatik ondoriozta daiteke AC domeinuaren presentziak domeinu hemolitikoaren poro-eratzailerik ahalmena oztopatu edo inhibitu dezakeela. Honek azaldu dezake zergatik ACTren poro-eratzailerik aktibitatea beste RTX toxina baino ahulagoa den.

Behin ACT- Δ N482 mutantearen poro-eratzailerik aktibitatearen karakterizazioa eginda, aktibitate honen efektuak ACTren itu-zelula eredu bezala erabiltzen diren J774A.1 zeluletan aztertu genituen. Zelula hauek toxinen hartzaile espezifikoak (CD11b/CD18 integrina) adierazten duten makrofagoak dira eta oso erabiliak izan dira toxina honen azterketan (Bumba et al., 2010; Fiser et al., 2007; Martín et al., 2010; Wald et al., 2014). Gure emaitzak kontutan hartuz esan genezake ACT- Δ N482ak K^+ , Ca^{2+} eta propidio ioduroarekiko (PI) iragazkor bihurtzen duela itu-zelulen mintza, modu azkarrean (minutuak) eta toxina kontzetratioaren menpe. ACTak, ordea, testatutako kontzentratio

gehienetan K^+ rekiko soilik bihurtzen du iragazkor mintza, eta kontzentrazio handiak erabili arte ez du mintza Ca^{2+} eta PI-rekiko iragazkor bihurtzen. Kontuan hartu behar da, animalari erduetan egindako azken ikerketetan, ACT *in vivo* dituen kontzentrazio fisiologikoak 0,1-5 nM inguruan egon daitekeela proposatzen da (Eby et al., 2013).

PI molekula ez-fisiologikoa izan arren, bere mintzean zeharreko iragazkortasuna aztertu dugu toxina poro-eratzailen aktibitatea jarrartzeko asko erabilia izan delako eta honek gure lana beste ikerketekin alderatzea ahalbidetzen digulako (Idone et al., 2008; Tam et al., 2010). Aspalditik ezaguna da ACTak mintz-lipidiko artifizialetan ioiekiko iragazkorak diren poroak era ditzakela (Benz et al., 1994), beraz, tesi lan honetan ikusitako solutu ezberdinekiko iragazkortasunak toxinek mintz zelularrean eragindako poroengatik direla azalpen arrazonagarria dirudi; hala ere, ezin da baztertu zelulan dauden ioi-kanalak iragazkortasun hauetan parte hartzea toxinak eragindako aktibazioarengatik. Tesi honetan ACTarekin erlazionatuta dauden kanal ezagunen inplikazioa (Martín et al., 2010) aztertu dugu (kanale purinergikoak, L-motako Ca^{2+} kanalak eta PKA menpeko kanalak) eta beraien inplikazioa baztertuta gelditzen da ACT- Δ N482ak eragindako iragazkortasunean. Dena den, zelularen mintzean dauden ioi-kanal ugariengatik, hau zihurtatzeko ikerketa modu sakonagoan burutu beharko litzake.

ACT eta ACT- Δ N482ak makrofagoen mintzean eragindako iragazkortasunaren selektibotasun desberdinak azaltzeko azalpen desberdinak proposatu daitezke. Desberdintasun honen azalpen sinpleena ACT- Δ N482ak ACTak baino poro handiagoa egiten duela izango litzake; baina hau ez dago argi, atal honetan eritrozitoetan egindako babes-osmotikoko saioak bi poro tamainen arteko antzekotasuna adierazten du eta beste taldeek mutante berberarekin egindako saioetan ikusi da ACT- Δ N482ak ACTaren antzeko konduktantzia (35 ps) dituzten poroak eratzen dituela mintz-lipidiko artifizialetan (Chattip Kurehong 2015). Beste azalpen bat arestian aipatutako “linker sekuentzia” (Masin et al., 2016) egon daiteke. Sekuentzia honen aminoazidoen kargak garrantzia handia dute toxina basatiaren poro-eratzaille eta translokazio aktibitatean. Posiblea da sekuentzi honek toxinen poroa iragazten duten ioien selektibitatea erregulatzea, monobalenteak diren ioiak pasatzen utziz (K^+) eta ioi dibalenteak (Ca^{2+}) ez. Aipatzekoa da beste RTX familiako poro-eratzaille toxinak ez dutela “linker sekuentzia” hori eta Ca^{2+} eta PIrekiko iragazkorak diren poroak eratzeko gaitasuna dutela (Linhartová et al., 2010) ACT- Δ N482ren antzera. Beste azalpen bat lisi-

kontzentrazioa lortzeko toxina bakoitzak duen gaitasunean egon daiteke. Poro-eratzaille toxinek bere itu-zelulen mintzean kontzentrazio kritiko bat lortzean, mintzaren desegituraketa bat eragiten dute, mintzaren iragazkortasuna ez-selektiboa bihurtuz eta zelularen lisia eraginez. Adibide bezala, potasioarekiko bakarrik iragazkorak diren poroak eratzen dituzten β -orri toxinak adibidez (*S.aureus* α -toxina), kontzentrazio batetik gora kaltzio sarrera eragiten dute zeluletan, bere poroa Ca^{2+} rekiko iragazkaitza izan arren (von Hoven et al., 2016). Hemolisi saioetan ikusi dugunez ACT- Δ N482ak ACTak baino 3 aldiz poro-eratzaille aktibitate gehiago eduki dezake. Beraz, izan daiteke ACT- Δ N482rekin ikusten dugun kaltzio sarrera ACTren 3 aldiz kontzentrazio gehiagorekin ikusiko genuen Ca^{2+} sarrera inespezifikoa izatea. Hau ordea ez dirudi arrazoa denik, ACTak 5 nM-ko kontzentrazioan hasierako Ca^{2+} sarrera motz eta txiki bat besterik ez duelako eragiten, seguraski lehendik deskribatutako translokazio prozesuaren efektuarengatik (Basler et al., 2007).

Poro-eratzaille aktibitate desberdinen efektu finalak LDH askapen saioetan ikusten dira. Mutanteak AC aktibitatea eduki ez arren, makrofagoen heriotza ACTaren antzeko kontzentrazioetan lortzen du. Nolabait poro-eratzaille aktibitate areagotuak AC domeinuaren falta konpentsatu egiten du. Beste RTX toxinetan ikusi da ATP askapenaren bidez aktibatutako kanal purinergikoak toxinek eragindako heriotza zelularra areagotu dezakeela (Kelk et al., 2011). Lan honetan frogatu dugu kanal hauek ez dutela eraginik ACT eta bere mutanteak eragindako makrofagoen heriotzan.

Aipatu beharra dago beste ikerketa batzuetan ACTren domeinu hemolitikoa modu isolatuan ikertzeko beste mutante bat erabili dela, ACTren 1-373 aminoazidoak falta dituen eta CyaA- Δ AC deiturikoa (Basler et al., 2006, 2007; Vojtova-vodolanova et al., 2009). Mutante honek toxina basatiaren antzerako ahalmen hemolitikoa (Basler et al., 2007) eta mintz lipidiko artifizialean ACTren antzeko konduktantzia baxuko poroak eratzen dituela (25 ps) ikusi da. Harritzekoa bada ere, mutante honek ez du makrofagoetan K^+ irteerarik ez Ca^{2+} sarrerarik eragiten (Dunne et al., 2010). Emaidza hauek atal honetan lortutako datuekin kontrajartzen dira, hemen ikusten delako ACTren domeinu hemolitikoak bere kabuz makrofagoen mintza iragazkortzeko gaitasuna duela.

ACT- Δ N482ak PI iragazkorak diren poroak eratzeak bere poro-eratzaille aktibitatearen jarraipen zehatza egitea ahalbidetzen du. Atal honetan ikusi da toxinak inkubazioaren lehenengo minutuetan PI sarrera garrantzitsu bat eragiten duela zelulak hilda egon ez

arren, seguraski toxinak berak sortutako porotik. Toxinadun medioa garbituz eta zelulak denbora tarte desberdinak utziz, ikusi zen mintzaren iragazkortasuna erreparatu egiten zela 10-30 minutu inguruan. Honek adierazten du makrofagoek ACT-ΔN482aren poroek eragindako iragazkortasuna erreparatzeko mekanismo azkarren bat dutela. Atal honetan egindako saio desberdinek frogatu dute mekanismo hori tesi honetako sarreran sakonki azaldu dugun lisosomen exozitosi bidezko endozitosi mekanismoaren (Tam et al., 2010). ezaugarriak dituela: Kaltzio sarrera eta ATParekiko menpekotasuna, toxina endozitosi azkarra, lisosomen exozitosisia ematea (β -Hexosaminidasa jariapena) eta esfingomielinasa azidoaren (ASM) eta lisosomen fusioaren inhibitzaileengatik (DPA eta BEL) inhibitua da. ACT toxinarekin ordea, ez dugu erreparazio erantzunik ikusi, toxina kontzentrazio oso litikoak (30 nM) erabiltzen diren kasua kenduta, hau da, toxinak Ca^{2+} sarrera eragiten duen kontzentrazioetan. Testatutako ACT kontzentrazio gehienetan toxinak PIrekiko duen iragazkortasun txikiak ez du baimendu ACT-ΔN482rekin ematen diren iragazkortasun maximoak detektatzea, toxina basatiak PI- iragazkortasun txiki eta konstante bat eragiten zuelako ACT-ΔN482ak eragiten duen maximoak detektatu gabe. Hori dela eta, toxinak eragindako iragazkortasuna jarraitzeko zelulen tamaina aldaketetan arreta jarri genuen. Mintzean poroak eraketak zelulari txoke-osmotikoa eragiten dio ura sartzea eraginez eta zelularen bolumena handituz. Ikusi da toxinak zelulak ACTrekin tratatzean bolumen handipen hau jasaten dutela baina PI-iragazkor bihurtu gabe, ACT-ΔN482rekin gertatze den bezala. ACTarekin PI-iragazkortasuna hildako morfologia duen eta inkubazio denboran zehar modu itzulezinean areagotzen doan populazioan ematen da bakarrik. Datu hauen arabera, ACTak ez luke makrofagoen mintzean PIarekiko iragazkorra den pororik eratuko eta ez du erreparazio mekanismorik aktibatuko. ACTak poro txikien bidez zeluletan txoke-osmotikoa eragingo luke baina zelulak soluto handiekiko iragazgaitz mantentzen jarraituko luke. Inkubazio denbora aurrera joan ahala, zelulak mintz erreparazio mekanismo faltarengatik ezingo luke estres hori jasan eta heriotza jasango luke bere mintza desegituratuz eta bolumen txikia lortuz, barne eta kanpoko solutuak libreki pasatzean ur sarrera gehiagorik ez dagoelako. Erreparazio mekanismoen ezaugarriak ACTak zelulan eragiten dituen efektuekin alderatuz, iradoki daiteke Ca^{2+} sarrera ez egoteak eta ACTaren aktibitate katalitikoak eragiten duen ATP murrizketa (Eby et al., 2012) izan daitezkeela erreparazio erantzun falta honen zergatia, testatutako kontzentrazio guztietan ACTak eragiten duen PI iragazkortasuna itzulezina izatea arrazoituz.

Eredu honen barnean posible izango litzake ACTak inkubazio denbora bat pasa ondoren mintzean ACT- Δ N482ak eratzen duen antzeko PI iragazkor poroak eratzea. Poro hauek eratuko ziren denborarako zelularen ATP gordekinak xahututa egongo lirateke ACTaren aktibitate katalitikoak sortzen duen ATP murrizketarengatik (Basler et al., 2006), honek zelularen erreparazio mekanismoak inhibituko lituzke eta erantzun ahalmen gabe zelulak lisia modu azkarrean jasango luke. “ACT- Δ N482 antzeko” poro hori detektatzeko PI-iragazkortasun saioak glizina 5 mM-ren presentzian egin ziren. Ikerketa askotan ikusi da glizina kontzentrazio honek zelulak lisia jasatetik modu oso eraginkorrean babesten duela. Oraindik argi ez dagoen arrazoiengatik zelulen mintzaren apurketa inespezifikoak babesten ditu glizina kontzentrazio honek (Weinberg et al., 2016; Zhong et al., 2003), autore batzuen ustez aminoazido honek zelularen mintza sendotu dezake baina beste talde batzuen datuen arabera zelularen “heriotza kanalak” inhibititu ditzake (Nishimura and Lemasters, 2001). Bestalde, glizina kontzentrazio honek PI-rekiko iragazkorak diren kanal diskretuen funtzioan ez duela eraginik ikusi da (Fink et al., 2008). Hemen ikusi dugunez baldintza hauek ez dute hasieran ACT- Δ N482ak eragiten duen PI-iragazkortasuna inhibitzen. Baldintza honetan egindako saioek erakutsi zuten ACTak eragindako zelula nekrotikoen agerpena murriztu arren ez zela PI iragazkor/bolumen handi populazioa detektatzen, ACT- Δ N482rekin gertatzen zen bezala. Aipatu behar da sistema honetan glizinareneko efektua babes-osmotiko bat eratzea bakarrik izango balitz, zelulak ez zutela bolumen handipena jasango, eta ezaugarri hau glizina gabeko medioaren antzera gertatzen da gure saioetan. Datu guzti hauek kontuan hartuta ondoriozta daiteke bere ekintza mekanismoan zehar ACTak ez duela ACT- Δ N482 mutantearen poro-eratzailerik ezaugarriak dituen antzeko proteinarik eratzen edo, eratzen badu, ez du gure saioetan detektagarria izateko eragin nahikorik. Detekzio gaitasun handiagoko esperimentuak burutu beharko lirateke toxina moztuak aktibitatearekin ez duela ziurtatzeko.

Mintz-iragazkortasun saioetik ateratako datuetatik ondorio nagusi hau atera daiteke: fisiologikoki eman daitezkeen kontzentrazioetan ACT toxinaren poro-eratzailerik aktibitatearen efektu nagusia K^+ irteera da, eta aktibitate honen eraginak aztertzerako orduan ioi honen barne zelulako aldaketetan oinarritu behar da, zelularen kaltzio sarrerarekiko erantzunak baztertuz eta potasio irteeran oinarritutakoak aztertuz. Kaltzio sarrera toxina kontzentrazio oso altuetan ematen da bakarrik; printzipioz, toxina kontzentrazio hauetan lortutako informazioa “*in vivo*” toxinak duen ekintza

mekanismotik urrun dagoela arrazoizkoa dela ematen du (Eby et al., 2013). ACTak bere itu-zelulak lisi-osmotiko hutsez eta era azkarrean hilko balitu, aktibitate katalitikoak ez zen beharrezkoa izango. Aurreko ikerketek, ordea, bi aktibitateak *B.pertussiren* infekzioa aurrera eramateko beharrezkoak direla frogatu zuten (Khelef et al., 1992), eta bakterioak ostalarian eragiten dituen efektuak ez dira toxina oso litikoak jariatzen dituzten bakterioen antzekoak (Los et al., 2013). Hala eta guztiz ere, ezin da baztertu bakteriotik oso gertu dauden makrofagoek lisi-osmotikoa eragite duten ACT kontzentrazio lokalak jasatea.

Nolabait interpreta daiteke adenilato ziklasa domeinu bat eta RTX poro-eratzaille domeinuaren fusioak ACT toxinarekin sorkuntza eman zuen prozesu ebolutiboan, poro-eratzaille domeinuaren gaitasunak AC domeinuarengatik inhibituak izan zirela, potentzi hemolitiko gutxiagoko toxina bat emanez. Hala ere, hemen ikusi den bezala, poro-eragile aktibitate ahulago bat zelularentzako kaltegarriagoa izan daiteke, intuizio kontrako ideia iruditu arren. Poro Ca^{2+} ez-iragazkorak eratzean zelularen kaltzio-menpeko erreparazio mekanismoa ezin da aktibatu mintzean dagoen toxina ezabatzeke. Orain arte K^+ iragazkor / Ca^{2+} iragazgaitz poroak eratzen dituzten toxinekin (α -toxina, VCC) egindako ikerketetan (Bischofberger et al., 2012), ikusi da toxina mintzetik ezabatzeke prozesua oso motela dela, 6-12h iraunez. Ikerketa gehiagoren faltan, ematen du zelulek ez dutela poro mota hauek eratzen dituzten toxinak mintzetik ezabatzeke mekanismo zehatzik. Honen aurrean zelularen estrategia, p38 eta beste kinasa batzuen bidezidoren bidez zelula energi-maila baxuko egoera metabolikoan jartzea izango litzake, energi gehiena desoreka-ionikoaren konponketan erabiltzeko. Modu honetan, zelulak toxina denborarekin mintzetik desagertzera "itxarongo" luke, zelulak berez bere mintz-plasmatikoa birziklatzeko duen endozitosi konstanteari esker (Gurcel et al., 2006). Orain arte uste zen erreparazio mekanismo azkarra poro handiak eratzen dituzten toxinentzako (LLO,SLO) eta motelagoa poro txikien toxinentzako (α -toxina, aerolisina) zela (Gonzalez et al., 2011a). Baina orain dela gutxi ikerketa batean ikusi da poroa kaltzioarekiko duen iragazkortasuna dela nolako erreparazio mekanismoa aktibatuko den erabakitzen duen faktore nagusia (von Hoven et al., 2017). Aipatzekoa da gure ikerketan erabilitako ACT- Δ N482 mutanteak beste RTX poro-eratzailen (HlyA, Ltx...) ezaugarri antzekoak dituela ikusi denez (Ca^{2+} eta PIrekiko iragazkortasuna), iradoki daitekeela toxina hauek Ca^{2+} menpeko erreparazio mekanismo berdina aktibatu dezaketela, oraindik ikertu ez den arlo honetan lagunduz.

ACTak mintzean eragindako kalteak itzulezinak zirela ikusita, iragazkortasun hesiaren etenak toxinaren itu-zeluletan eragiten dituen efektuak aztertzen murgildu ginen, toxinak eragindako heriotza zelularren mekanismo posibleak arakatu.

Emaitzen bigarren atalean ACTak J774 makrofagoetan eragiten duen heriotza mota aztertu genuen, aztertutako baldintzetan ACTak aponekrosi bezala definitu daiteken heriotza zelularra eragiten duela frogatu. Aponekrosia, energi faltarengatik edo gehiegizko kalteengatik, nekrosian bukatzen duen betegabeko apoptosi prozesua da (Formigli et al., 2000). Beraz, aponekrosia ez da heriotza mota independente bat bezala ulertu behar, akastun apoptosi bat definitzeko erabiltzen den terminoa izango litzake. ACTak eragindako heriotzak apoptosi eta nekrosi ezaugarriak partekatzen dituela ikusi dugu lan honetan: apoptosi ezaugarriak kaspasa-3/7ren aktibazioa, PSren esposizioa eta DNAREN degradazioa dira; ezaugarri nekrotikoak mintz osotasuna modu bizkorrean galtzea, zelulen puztea eta ATParen murrizketa itzulezina izango lirateke. Honetaz gain, K^+ irteera ACT toxinak eragindako heriotzaren eragile nagusia dela esan genezake eta lisosometako proteasak heriotza-mekanismoaren barne daudela aurkitu dugu. Azkenik, II. motako heriotza autofagikoak parte hartzen duenik ezeztatu genezake, are gehiago, inhibitzaile autofagikoekin lortutako emaitzetan oinarrituz esan daiteke autofagia, toxinaren aurrean zelulak biziraupena bermatzeko aktibatzen duela, eta ez heriotza eragiteko.

Lan honetatik ateratako ondorioek toxinaren mekanismo zitotoxikoa sakonago eta zehatzago ulertzen laguntzen dute. Orain arte, ACT apoptosi-eragile modura sailkatzen zen (Basler et al., 2006; Hewlett et al., 2006; Khelef and Guiso, 1995), noski, kontuan hartuta kontzentrazioa oso altuetan bere itu zelulen lisi osmotikoa eragin dezakeela. Baina kontutan izan behar da lan hauek antzina heriotza zelular motak apoptosi/nekrosi sailkapen sinplifikatuan oinarritzen zirenean argitaratu zirela. Azken urteetako ikerketek ordea erakutsi dute heriotza-zelularra uste baino prozesu konplexuagoa dela eta heriotza mota desberdinek ezaugarri berdinak partekatzen dituztela (Vanden Berghe et al., 2014). Hala ere, esan daiteke tesi-lan honetan aurkeztutako ondorioak beste ikerketen osagarriak direla eta ez dituztela autore hauen ondorioak arbuiazen. Aurreko ideiekin alderatuz tesi honetako emaitzek adierazten dutena da, ACTak deskateatutako apoptosi prozesua ez dela modu egokian burutzen, eta zelulak azkenik nekrosi antzeko

ezaugarriak dituen heriotza jasaten duela. Ezaugarri nekrotiko garrantzitsuena mintz osotasunaren galera goiztiarra da, eta hau gertatzen denean zelulatik askatutako osagaiak erantzun inflamatorioa eragiten dute (Scaffidi et al., 2002). Apoptosiarekin ordea, mintz osotasuna mantentzen da eta ez da erantzun inflamatoriorik aktibatzen. Beraz, ACTak apoptosia aktibatzen zuela ikustean erantzun anti-inflamatorio bat bezala ulertzen zen, baina prozesu apoptotikoa modu akastuan eramaten bada posiblea da erantzun pro-inflamatorio bat eratzea. Honek toxinak *Bordetella*-ren patogenesia duen zeregina ulertzen lagun dezake, horregatik interesgarria izango litzake hemen aztertutako baldintzetan zelulek zer motatako zitokinen jariatzea duten aztertzea edo HMG1 bezalako molekula pro-inflamatorioak askatzen dituzten aztertzea.

ACTak eragindako apoptosia betegabe gelditzearen arrazoia ez dugu hemen sakondu, baina ikerketa askotan lortutako ezagutzetan oinarrituta ondoriozta daiteke toxinak eragindako ATP murrizketak ez duela baimentzen apoptosi prozesua era egokian eramateko behar diren maila energetiko minimoak edukitzea. Kaspasen aktibazioaz gain, apoptosian zehar ATParen menpeko prozesu ugari daude: zelulen uzkurdura gertatzeko mintzeko ioi-kanalen aktibazioa, gorputz apoptotikoen sorrera edo prozesu osoan mintzaren osotasuna mantentzea. Ikerketa desberdinetan ikusi da apoptosia ezin dela burutu zelulen ohiko ATP mailak %20tik behera badaude (Eguchi et al., 1997; McConkey, 1998). Estres baten aurrean, zelulak duen ATP maila apoptosi edo nekrosi bidez erantzungo duen erabakitzen duen faktore garrantzitsuena da, maila energetiko batetik behera apoptosia eragingo lukeen estimulu berberak nekrosia eragiten duela frogatu da (Leist et al., 1997). Tesi-lan honetan ikusi dugu lau ordutako inkubazio tartetean ACTrekin tratatutako zelulen ATP maila %5etik behera dagoela, eta datu hau bat dator beste autoreek toxina kontzentrazio antzekoetan neurtutakoarekin (Eby et al., 2012). Informazio guzti hau batuz iradoki daiteke ACTak eragindako ATP murrizketa baldintzetan ez dela posiblea makrofagoak apoptosi prozesua era egokian eramatea. Ondorio hau indartuz, frogatuta dago toxinak eragindako ATP murrizketa faktore zitotoxiko garrantzitsua dela aktibitate katalitiko eta poro-eratzailaz gain (Hewlett et al., 2006). Azpimarragarria da tesi-lan honetan frogatu dugula ATP murrizketa hau ez dela soilik aktibitate katalitikoarengatik gertatzen, poro-eratzaille aktibitatea baino ez duen ACT- Δ N482 mutanteak ere konparagarria den ATP murrizketa eragiten bait du. . Honi kontrajarriz beste ikerketa batzuek adierazi dute toxinen poro-eratzaille aktibitateak ez duela ATP murrizketa esanguratsurik eragiten (Basler et al., 2006).

Autofagiaren inhibitzaileekin lortutako emaitzek adierazten digute toxinak eragiten duen ATP murrizketaren aurka egiteko makrofagoak autofagia prozesua aktibatzen duela, bere biziraupena bermatuz. Honek toxinen mekanismo zitotoxikoan energi murrizketak duen garrantzia azpimarratzen edo indartzen du. Pentsa liteke ACTak eragindako autofagiaren aktibazioak garrantzi handia izan dezakela *in vivo Bordetella*-ren infekzioan, azken urteetan jakin bait da zelulek, bakterio intrazelularren aurka defendatzeko estrategia modura, autofagia mekanismoa aktibatzen dutela (Delgado et al., 2009). Gai hau *B. pertussis* bakterioarekin egindako saioekin jorratzea interes handiko ikerketa izan daiteke.

Emaitzen lehenengo atalean lortutako toxina basatiaren poro-eratzailer aktibitateari buruzko ondorioak indartzuz, emaitzen bigarren atalean ikusi dugu K^+ irteera toxinen mekanismo zitotoxikoan faktore garrantzitsua dela. K^+ altuko medioarekin ioi honen irteera ekiditen denean, toxinak eragindako zitoxotizitatea ia erabat inhibitzen da, testatutako toxina kontzentrazio guztietan. Aurreko hainbat ikerketek toxinak eragindako Ca^{2+} sarreraren efektuak aztertu dituzten arren, lan honetan egindako saioetan frogatu dugu ACTak, *in vivo* aurki daitekeen kontzentrazioak kontutan hartuz, K^+ -rekiko iragazkorak soilik diren poroak eratuko lituzkela, eta beraz, K^+ irteera izango litzake ACTaren poro-eratzailer aktibitateak itu-zeluletan eragiten duen kalte garrantzitsua. Toxinaren 0,5 -1 nM kontzentrazio tartean K^+ irteera ekiditeak eragiten duen zitotoxikotasunaren ia erabateko inhibizioa apoptosi markatzaileen inhibizioarengatik azaldu daiteke. Atal honetan ikusi dugu K^+ altuko medioan ez dela kaspasa-3 aktibaziorik eta DNA degradaziorik ematen. Hau bat dator ikerketa ugarien emaitzekin, non ikusi zen K^+ irteerak apoptosiaren aktibaziorako garrantzia duela (Andersson et al., 2006; Maeno et al., 2000). Baldintza fisiologiko arruntetan zelula barnean dagoen K^+ kontzentrazioak (140 mM inguru) kaspasen eta endonukleasen aktibazioa inhibitzen du, eta efektu hau *in vitro* ere ematen da (Hughes and Cidlowski, 1999)). Honek K^+ altuko medioak ACT toxinak apoptosia eragiten duen kontzentrazioetan duen inhibizio efektua azaldu dezake, baina ez du azaltzen zergatik kontzentrazio guztiz nekrotikoetan (5 nM) inhibizioa ere ematen den. Datu honek adierazten du K^+ irteerak ACTak eragiten duen heriotza mota guztietan eragina duela, ez bakarrik apoptosian. Hau bat dator sarreran azaldutako apoptosi eta nekrosi prozesu jarrai bat kontsideratzearekin, hau da, estres mota berdinak (kasu honetan K^+ irteera) eragiten duen kalte mailaren arabera zelulan erantzun apoptotikoa edo nekrotikoa

aktibatuko du. Kaspasez gain, zelula barneko beste proteina asko K^+ kontzentrazioarekiko sentikorrek izan daitezke eta ioi honek zelularen mintz potentziala mantentzeko berebiziko garrantzia du, hau zelularen biziraupenerako beharrezko ezaugarria izanik. Gure datuak indartzen dituen ikerketa baten ikusi zuten, K^+ irteera ekiditeak monozitoen nekrosia inhibitzen zuela (Warny and Kelly, 1999).

Lan honetan eta beste ikerketa batzuetan ikusi denez, toxinak K^+ rekiko iragazkorrek diren poroak eratzen ditu (Benz et al., 1994; Gray et al., 1998; Wald et al., 2014), baina ezin dugu baztertu inkubazioan zehar itu-zelulako K^+ -kanal desberdinak zabalduak izatea. Kanal hauek zelularen estresaren aurkako erantzunentzako eta apoptosi prosezurako garrantzi handia dute (Lang and Hoffmann, 2012), eta kontuan hartu behar dugu K^+ altuko medioa erabiltzean kanal hauen eragina ere inhibitzen dugula. Kanal desberdinek ACT toxinaren mekanismo zitotoxikoan duten zeregina aztertzea etorkizunean egiteko ikerketa interesgarria izan daiteke.

Sarreran azaldu dugun modura nekrosiarekin zerikusia duten heriotzetan Ca^{2+} sarrerak zeregin garrantzitsua jokatzen du. Gure ondorioetan ez dugu adierazi nahi toxinak eragindako zitotoxikotasunaren zehar ez denik zelula barnean Ca^{2+} igoerarik ematen, areago, toxinaren ATP murrizketak mintzeko ioi kanaletan eragin dezakeen desregulazioarengatik oso probablea da Ca^{2+} igoera hau ematea. Gure datuekin adierazi nahi duguna da, Ca^{2+} igoera ACTak eragindako kalteen sekuentzia katean urbera egongo litzaken efektua izango zela, hemen testatutako baldintzetan toxinak ez duelako inkubazioko hasierako minutuetan Ca^{2+} sarrerarik eragiten, bai ordea K^+ irteera esanguratsu bat.

Azkeneko urteetan aurkitu diren nekrosi-programatu bidezko heriotzetan K^+ irteerak zeregin garrantzitsua du (Vanden Berghe et al., 2014). K^+ irteera beharrezkoa da piroptosis eragingo duen inflamasomaren aktibazioarako eta nekroptosis K^+ irteera eragiten duten poro-eratzailen toxinekin aktibatzen dela ikusi da. Heriotza mota hauek ACTarekin ikusi ditugun antzeko ezaugarriak sorrarazten dituztenez, toxinaren mekanismo zitotoxikoan bi prozesu hauek zereginik duten testatu genuen, bi kasuetan emaitza negatiboak lortuz. Emaitza hau ez zen esperotakoa izan, frogatuta dagoelako ACTak bere K^+ irteera bidez kaspasa-1en aktibazioa eragin dezakeela (Dunne et al., 2010), eta kaspasa hau piroptosiaren erregulatzaila garrantzitsua da. Hala ere, kaspasa-1en aktibazioak ez du beharrez piroptosis eragin behar, efektu hau bere

aktibazio mailaren arabera izango da (Miao et al., 2011). Adibidez, aktibazio maila baxuetan kaspasa honek biziraupenerako bideen aktibazioa eragin dezake (Gurcel et al., 2006). Beste ikerketa batzuetan ikusi da gehiegizko kalte lisosomal batek inflamasmaren inhibizioa eragin dezakeela, piroptosis ez den beste heriotza bat aktibatuz (Katsnelson et al., 2015). Noski, piroptosis heriotza programatua denez ATP beharrak ere ditu, beraz, posiblea da toxinak eragindako ATP murrizketarengatik heriotza mota hau ez aktibatzea.

Toxinak kaspasa-3 aktibatzen duela ikusi arren, kaspasa honen inhibitzaileak ez du eraginik zelulen heriotza kopuruan. Datu honetatik iradoki daiteke kaspasa efektore honek zeregin sekundarioa duela ACTak eragindako heriotzean. Izan daiteke kaspasa honen aktibazio nahikoa ematen denerako zelulak beste kalte batzuegandik heriotza jasaten egotea, adibidez, lisosoma mintzaren iragazkortasunarengatik askatutako katepsina B-ren efektuarengatik. Hau CA-074-Me katepsina Bren inhibitzaileak toxinaren zitotoxizitatean duen efektu inhibitzailean oinarrituz adierazten dugu. Kaspasen inhibitzaile orokorrak (z-VAD-fmk) ere CA-074-Me-ren antzeko efektu inhibitzailea du. Jakina da inhibitzaile honek (z-VAD-fmk) kaspasez gain proteasa lisosomalak ere inhibitu ditzakeela, hau jakinda, iradokitzen dugu inhibitzaile honen efektua ez-espezifikioa izan daitekeela. Interesgarria izango litzake inhibizio honetan gehiago sakontzea, proteasa lisosomal gehiagoren inhibizioarekin edo kaspasa desberdinen aktibazioa testatuta. Hala ere, katepsina edo kaspasen inhibitzaileen efektua estatistikoki esanguratsua izan arren ez du ehuneko handian toxinaren zitotoxizitatea inhibitzen, K^+ altuko medioak duen efektuarekin alderatuz. Honen arabera K^+ irteerak kaspasen aktibazioa eta LMP-az gain beste eraginengatik heriotza eragin dezakeela ondorioztatzen dugu. Hurrengo ikerketetan inhibitzaile hauek toxina kontzentrazio txikiago eta denbora tarte handiagotan erabili daitezke, inhibitzaile hauen efektua handiagoa bihurtzen den argitzeko. Datu guzti hauek batuz iradoki daiteke ACT toxinak faktore anitzen bidez zelularen heriotza aponekrotikoa eragiten duela, non K^+ irteera eta seguraski ATP murrizketa faktore eragile nagusiak diren.

ACT toxinarekin ikusitako ekintza mekanismo hau ezagutzen diren beste toxinekin alderatuz, gure emaitzak ulergarriagoak egin eta informazio gehiago lortzen lagundu diezaguke. Lehenengo puntua, beste RTX familiako toxinekin alderatzea izango litzake, baina emaitzen lehenengo atalean ikusi dugunez, ACTren poro-eratzaille aktibitatearen ezaugarriak beste RTX poro-eratzaille toxinen desberdinak dira, batik bat ACTak

eratzen duen poroa ez delako Ca^{2+} eta ATParekiko iragazkorra. Aitzitik, *Aggregatibacterren* leukotoxina-rekin (LtxAkt) egindako ikerketek hemen ikusitako antzeko mekanismoa deskribatu dute (DiFranco et al., 2012). Ikusi da LtxA-ek LMP bidezko heriotza eragiten duela bere itu-zeluletan, eta inkubazioaren hasieran apoptosiaren markatzaileak agertu arren, eragiten duen heriotza kaspasa inhibitzaileekiko independentea dela. Autore hauen iritziz toxinak berak lisosomen iragazkortasuna eragiten du, zitosolaren azidifikazioa gertatuz (Balashova et al., 2016). Sarreran azaldu dugunez, estres menpeko zeluletan seinale ugarik LMPa sortu dezakete eta ez du zertan toxinak berak lisosomaren mintza zulatu behar, baina ACTak gaitasun hau duen egiaztatzea etorkizun baterako proiektu interesgarria izan daiteke; printzipioz ez da ikusi pH azidoak toxinen poro-eratzailer aktibitatea areagotzen duenik, alderantziz, azidotasunak aktibitate hau kaltetu egiten du (Benz, 2016). Lan honetan ikusi dugun mekanismoaren ezaugarri antzekoenak eragiten dituen konposatua nigerizina dela esan daiteke. Nigerizina K^+ ionoforoa da eta kontzentrazio altuetan inkubatuz nekrosi ezaugarriak dituen heriotza sorrarazten du monozitoetan. Heriotza nekrotiko hau katepsina Bren inhibitzaileaz inhibitu daiteke (Hentze et al., 2003) eta modu ez espezifikoa z-VAD-fmk inhibitzailearekin (Warny and Kelly, 1999). Heriotza honen eragilea ionoforoak eragiten duen K^+ irteera izango litzake, K^+ altuko medioak bere efektuak inhibitzen dituelako (Warny and Kelly, 1999), eta aipatzekoa da kasu honetan kaspasa-1 aktibatuta dagoela baina ez duela heriotzan parte hartzen (Hentze et al., 2003) Hau ACTarekin ikusi dugun heriotza antzekoa da eta hemen proposatu dugun bezala, K^+ irteera toxinen zitotoxikotasunean faktore eragile garrantzitsuenetakoa den ideia bermatzen du. Honen harira, K^+ rekiko iragazkorak diren poroak egiten dituen *S.aureus*-en α -toxinak eragiten duen heriotza zelularrak hemen aztertutako mekanika antzekoa duela ere esan daiteke. Toxina honekin ere zelulak apoptosiaren ezaugarriak erakusten dituzte hasieran (DNA degradazioa, kaspasen aktibazioa) baina sortutako heriotza kaspasekiko independentea da eta mintz osotasuna era bizkorrean galtzen da nekrosian bezala (Essmann et al., 2003).

Eztabaida hau bukatzeko, tesi honetan lortutako datuetatik iradoki daitekeen ACT toxinen ekintza mekanismoa proposatzen dugu: ACT bere itu-zelulen mintzera batzen denean bere AC domeinua zitosolera translokatu eta bere aktibitate katalitikoarengatik zelulan ATP murrizketa bortitza eragingo du. Honekin batera, toxinen poro-eratzailer domeinuak K^+ iragazkorak diren poroak eratzen ditu mintzean, zelulatik ioi honen

irteera eraginez. Toxinaren poroak Ca^{2+} sarrerarik ez eragitean zelularen Ca^{2+} menpeko mintz erreparazio mekanismoa ez da aktibatuko, eta honek toxina zelularen mintzean denbora gehiago egotea ahalbidetuko du, K^+ irteera handiagoa eraginez. K^+ irteerak apoptosi prozesuaren makinaria aktibatuko du kaspasa-3aren aktibazioa emanez baina, ATP maila urriengatik, prozesu hau ez da modu egokian emango eta zelula puztu eta bere mintz osotasuna galduko du, nekrosi ezaugarriak dituen heriotza emanez. Apoptosi makinariaz gain, zehaztu gabeko arrazoiengatik lisosomaren mintza iragazkor bihurtuko da eta katepsina-B bezalako proteasak zelularen zitosolera askatuko dira, zelula barnean heriotzara eramango duten kalteak eraginez.

ONDORIOAK

Tesi honetan lortutako emaitzen arabera ondorio nagusi hauek proposatzen dira:

1. ACT- Δ N482 mutanteak ACT toxina basatiak baino potentzia litiko handiagoa du eritrozitoetan, hauen lisi azkarra eraginez, kanal-purinergikoen laguntzarik gabe. Honek, toxinarene domeinu hemolitiko isolatuak toxina osoak baino aktibitate poro-eratzaille handiagoa duela adierazten du, erazten dituen poroen tamaina “efektiboa” handiagoa izan daitekeela iradokiz.
2. ACT- Δ N482 mutanteak eta ACT toxina basatiak ezaugarri poro-eratzaille desberdinak dituzte makrofagoetan: lehenak K^+ eta Ca^{2+} -rekiko iragazkorrek diren poroak erazten ditu, bigarrenak K^+ -rekiko iragazkorrek soilik diren poroak
3. ACT- Δ N482 toxinak makrofagoetan eragindako iragazkortasuna itzulgarria da, zelula hauetan, Ca^{2+} eta ATParen menpekoa den mintzerreparazio mekanismo bat aktibatzen duelarik. Erreparazio mekanismoa lisosoma-mintz plasmatico fusioaren ondorioz ekoiztatuko ASM entzimak sortutako zeramidak eragindako poroen endozitosian oinarrituta dago.
4. ACT toxina basatiak, ez du ACT- Δ N482rekin ikusitako mintz-erreparazio mekanismorik aktibatzen. Testatutako baldintzetan, ACTak eragindako iragazkortasuna itzulezina da, zelulen heriotzara eramanez. Toxinak eragindako ATParen agortzea eta Ca^{2+} iragazkortasun eza erreparazio mekanismoa ez aktibatzearen arrazoiak izan daitezke.
5. ACTren ekintza mekanismoan zehar ez da ACT- Δ N482ak eragindako ezaugarriak dituen iragazkortasunik detektatzen. Honek, ACT moztu eta gero mintzean gelditzen den proteinaren efektuak lan honetan erabilitako kontzentrazioetan detektatzeko oso urriak direla adierazten du.
6. ACTak makrofagoetan heriotza aponekrotikoa eragiten du, hau da, bide apoptotikoa aktibatu arren, faktore desberdinengatik hau ez da egoki betetzen eta

zelulek ezaugarri nekrotikoak dituen heriotza jasaten dute. Toxinak eragiten duen ATP agortze itzulezina prozesu apoptotikoa betetzeko ezintasunaren arrazoia izan daiteke.

7. ACTak eragindako K^+ irteera makrofagoen heriotza eragiteko faktore nagusia da, bai ezaugarri apoptotikoen agerpenerako, baita heriotza nekrotikorako ere. Heriotza hau katepsina B bezalako proteasa lisosomalengatik areagotua dago eta toxinak eragindako estres energetikoaren aurrean, zelulen biziraupena bermatzeko autofagia aktibatzen dela esan genezake

6.Bibliografia

6. Bibliografia

- Aachoui, Y., Sagulenko, V., Miao, E.A., and Stacey, K.J. (2013). Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection. *Curr. Opin. Microbiol.* *16*, 319–326.
- Ahmad, J.N., Cerny, O., Linhartova, I., Masin, J., Osicka, R., and Sebo, P. (2016). cAMP signalling of *Bordetella* adenylate cyclase toxin through the SHP-1 phosphatase activates the BimEL-Bax pro-apoptotic cascade in phagocytes. *Cell. Microbiol.* *18*, 384–398.
- Alouf, J.E. (2003). Molecular features of the cytolytic pore-forming bacterial protein toxins. *Folia Microbiol. (Praha).* *48*, 5–16.
- Andersson, B., Janson, V., Behnam-Motlagh, P., Henriksson, R., and Grankvist, K. (2006). Induction of apoptosis by intracellular potassium ion depletion: Using the fluorescent dye PBFI in a 96-well plate method in cultured lung cancer cells. *Toxicol. Vitro.* *20*, 986–994.
- Andrews, N.W., Almeida, P.E., and Corrotte, M. (2014). Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair. *Trends Cell Biol.* *24*, 734–742.
- Babiychuk, E.B., and Draeger, A. (2015). Defying death: Cellular survival strategies following plasmalemmal injury by bacterial toxins. *Semin. Cell Dev. Biol.* *45*, 39–47.
- Bakás, L., Veiga, M.P., Soloaga, A., Ostolaza, H., and Goñi, F.M. (1998). Calcium-dependent conformation of *E. coli* alpha-haemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis. *Biochim. Biophys. Acta* *1368*, 225–234.
- Balashova, N., Dhingra, A., Boesze-Battaglia, K., and Lally, E.T. (2016). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin induces cytosol acidification in LFA-1 expressing immune cells. *Mol. Oral Microbiol.* *31*, 106–114.
- Barry, E.M., Weiss, A.A., Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Hewlett, E.L., and Goodwin, M.S. (1991). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J. Bacteriol.* *173*, 720–726.
- Basar, T., Havlíček, V., Bezousková, S., Halada, P., Hackett, M., and Sebo, P. (1999). The conserved lysine 860 in the additional fatty-acylation site of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase is crucial for toxin function independently of its acylation status. *J. Biol. Chem.* *274*, 10777–10783.
- Basler, M., Masin, J., Osicka, R., and Sebo, P. (2006). Pore-forming and enzymatic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect. Immun.* *74*, 2207–2214.
- Basler, M., Knapp, O., Masin, J., Fiser, R., Maier, E., Benz, R., Sebo, P., and Osicka, R. (2007). Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *J. Biol. Chem.* *282*, 12419–12429.
- Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K.M., and McKay, D.B. (1993). Three-dimensional structure of the alkaline protease of calcium binding parallel beta roll motif. *J. Biol. Chem.* *268*, 3357–3364.
- Beier, D., and Gross, R. (2008). The BvgS/BvgA phosphorelay system of pathogenic *Bordetellae*: structure, function and evolution. *Adv. Exp. Med. Biol.* *631*, 149–160.

- Bellalou, J., Ladant, D., and Sakamoto, H. (1990). Synthesis and secretion of Bordetella pertussis adenylate cyclase as a 200-kilodalton protein. *Infect. Immun.* *58*, 1195–1200.
- Bellier, A., Chen, C.-S., Kao, C.-Y., Cinar, H.N., and Aroian, R. V (2009). Hypoxia and the hypoxic response pathway protect against pore-forming toxins in *C. elegans*. *PLoS Pathog.* *5*, e1000689.
- Benz, R. (2016). Channel formation by RTX-toxins of pathogenic bacteria: Basis of their biological activity. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1858*, 526–537.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A., and Sebo, P. (1994). 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.
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P., Berghe, T. Vanden, Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 135–147.
- Bi, G.Q., Alderton, J.M., and Steinhardt, R.A. (1995). Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. *J. Cell Biol.* *131*, 1747–1758.
- Bischofberger, M., Gonzalez, M.R., and van der Goot, F.G. (2009). Membrane injury by pore-forming proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 589–595.
- Bischofberger, M., Iacovache, I., and van der Goot, F.G. (2012). Pathogenic pore-forming proteins: function and host response. *Cell Host Microbe* *12*, 266–275.
- Boya, P., and Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* *27*, 6434–6451.
- Boya, P., González-Polo, R.-A., Casares, N., Perfettini, J.-L., Dessen, P., Larochette, N., Métivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., et al. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 1025–1040.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.
- Brown, A.C., Boesze-Battaglia, K., Du, Y., Stefano, F.P., Kieba, I.R., Epand, R.F., Kakalis, L., Yeagle, P.L., Epand, R.M., and Lally, E.T. (2012). Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin cytotoxicity occurs through bilayer destabilization. *Cell. Microbiol.* *14*, 869–881.
- Bumba, L., Masin, J., Fiser, R., and Sebo, P. (2010). 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.
- Bumba, L., Masin, J., Macek, P., Wald, T., Motlova, L., Bibova, I., Klimova, N., Bednarova, L., Veverka, V., Kachala, M., et al. (2016). Calcium-Driven Folding of RTX Domain ??-Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts. *Mol. Cell* *62*, 47–62.
- Cannella, S.E., Ntsogo Enguéné, V.Y., Davi, M., Malosse, C., Sotomayor Pérez, A.C., Chamot-Rooke, J., Vachette, P., Durand, D., Ladant, D., and Chenal, A. (2017). Stability, structural and functional properties of a monomeric, calcium-loaded adenylate

- cyclase toxin, CyaA, from *Bordetella pertussis*. *Sci. Rep.* 7, 42065.
- Carbonetti, N.H. (2010). Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol.* 5, 455–469.
- Carbonetti, N.H., Artamonova, G. V, Andreasen, C., and Bushar, N. (2005). Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin provide a one-two punch for establishment of *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. *Infect. Immun.* 73, 2698–2703.
- Cervantes, J., Nagata, T., Uchijima, M., Shibata, K., and Koide, Y. (2008). Intracytosolic *Listeria monocytogenes* induces cell death through caspase-1 activation in murine macrophages. *Cell. Microbiol.* 10, 41–52.
- Charles, I.G., Dougan, G., Pickard, D., Chatfield, S., Smith, M., Novotny, P., Morrissey, P., and Fairweather, N.F. (1989). Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 3554–3558.
- Chen, C.-S., Bellier, A., Kao, C.-Y., Yang, Y.-L., Chen, H.-D., Los, F.C.O., and Aroian, R. V. (2010). WWP-1 Is a Novel Modulator of the DAF-2 Insulin-Like Signaling Network Involved in Pore-Forming Toxin Cellular Defenses in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 5, e9494.
- Chen, Q., Boulanger, A., Hinton, D.M., and Stibitz, S. (2013). Separation and Detection of Phosphorylated and Nonphosphorylated BvgA, a *Bordetella pertussis* Response Regulator, in vivo and in vitro. *Bio-Protocol* 3.
- Chenal, A., Guijarro, J.I., Raynal, B., Delepierre, M., and Ladant, D. (2009). RTX calcium binding motifs are intrinsically disordered in the absence of calcium: implication for protein secretion. *J. Biol. Chem.* 284, 1781–1789.
- Cherry, J., and Heininger, U. (2004). Pertussis and other *Bordetella* infections. *Textb. Pediatr. Infect. Dis.*
- Choy, A., and Roy, C.R. (2013). Autophagy and bacterial infection: an evolving arms race. *Trends Microbiol.* 21, 451–456.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 2110–2114.
- Collier, R.J. (2009). Membrane translocation by anthrax toxin. *Mol. Aspects Med.* 30, 413–422.
- Confer, D.L., and Eaton, J.W. (1982). Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* 217, 948–950.
- Cookson, B.T., Cho, H.L., Herwaldt, L.A., and Goldman, W.E. (1989). Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 57, 2223–2229.
- Corrotte, M., Fernandes, M.C., Tam, C., and Andrews, N.W. (2012). Traffic into the Lumen of MVBs for Degradation. *J. Biol. Chem.* 287, 483–494.
- Corrotte, M., Almeida, P.E., Tam, C., Castro-Gomes, T., Fernandes, M.C., Millis, B. a, Cortez, M., Miller, H., Song, W., Mangel, T.K., et al. (2013). Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. *Elife* 2, e00926.

- Degiacomi, M.T., Iacovache, I., Pernot, L., Chami, M., Kudryashev, M., Stahlberg, H., van der Goot, F.G., and Dal Peraro, M. (2013). Molecular assembly of the aerolysin pore reveals a swirling membrane-insertion mechanism. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 623–629.
- Delgado, M., Singh, S., De Haro, S., Master, S., Ponpuak, M., Dinkins, C., Ornatowski, W., Vergne, I., and Deretic, V. (2009). Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunol. Rev.* *227*, 189–202.
- DiFranco, K.M., Gupta, A., Galusha, L.E., Perez, J., Nguyen, T.V.K., Fineza, C.D., and Kachlany, S.C. (2012). Leukotoxin (Leukothera??) targets active Leukocyte Function Antigen-1 (LFA-1) protein and triggers a lysosomal mediated cell death pathway. *J. Biol. Chem.* *287*, 17618–17627.
- Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D.-C., and Shao, F. (2016). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* *535*, 111–116.
- Draeger, A., Monastyrskaya, K., and Babiychuk, E.B. (2011). Plasma membrane repair and cellular damage control: the annexin survival kit. *Biochem. Pharmacol.* *81*, 703–712.
- Dunne, A., Ross, P.J., Pospisilova, E., Masin, J., Meaney, A., Sutton, C.E., Iwakura, Y., Tschopp, J., Sebo, P., and Mills, K.H.G. (2010). Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*. *J. Immunol.* *185*, 1711–1719.
- Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* *11*, 1050–1062.
- Eby, J.C., Ciesla, W.P., Hamman, W., Donato, G.M., Pickles, R.J., Hewlett, E.L., and Lencer, W.I. (2010). Selective translocation of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin across the basolateral membranes of polarized epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 10662–10670.
- Eby, J.C., Gray, M.C., Mangan, A.R., Donato, G.M., and Hewlett, E.L. (2012). Role of CD11b/CD18 in the process of intoxication by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* *80*, 850–859.
- Eby, J.C., Gray, M.C., Warfel, J.M., Paddock, C.D., Jones, T.F., Day, S.R., Bowden, J., Poulter, M.D., Donato, G.M., Merkel, T.J., et al. (2013). Quantification of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* in vitro and during respiratory infection. *Infect. Immun.* *81*, 1390–1398.
- Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* *57*, 1835–1840.
- Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Gordon, V.M., Gray, L.S., and Hewlett, E.L. (1991). Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *FEBS Lett.* *278*, 79–83.
- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., and Leclerc, C. (2003). Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J. Biol. Chem.* *278*, 38514–38521.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* *35*, 495–516.

- Essmann, F., Bantel, H., Totzke, G., Engels, I.H., Sinha, B., Schulze-Osthoff, K., and Jänicke, R.U. (2003). Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death Differ.* *10*, 1260–1272.
- Fedele, G., Bianco, M., and Ausiello, C.M. (2013). The virulence factors of *Bordetella pertussis*: talented modulators of host immune response. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. *61*, 445–457.
- Fernandez-Prada, C., Tall, B.D., Elliott, S.E., Hoover, D.L., Nataro, J.P., and Venkatesan, M.M. (1998). Hemolysin-positive enteroaggregative and cell-detaching *Escherichia coli* strains cause oncosis of human monocyte-derived macrophages and apoptosis of murine J774 cells. *Infect. Immun.* *66*, 3918–3924.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* *1757*, 1371–1387.
- Fink, S.L., Bergsbaken, T., and Cookson, B.T. (2008). Anthrax lethal toxin and *Salmonella* elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 4312–4317.
- Fiser, R., Masín, J., Basler, M., Krusek, J., Spuláková, V., Konopásek, I., and Sebo, P. (2007). Third activity of *Bordetella* adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b⁺ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *J. Biol. Chem.* *282*, 2808–2820.
- Formigli, L., Papucci, L., Tani, a, Schiavone, N., Tempestini, a, Orlandini, G.E., Capaccioli, S., and Orlandini, S.Z. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell. Physiol.* *182*, 41–49.
- Friedman, R.L., Nordensson, K., Wilson, L., Akporiaye, E.T., and Yocum, D.E. (1992). Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.* *60*, 4578–4585.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S. a, Abrams, J.M., Adam, D., Alnemri, E.S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., et al. (2014). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 1–16.
- García-Linares, S., Rivera-de-Torre, E., Morante, K., Tsumoto, K., Caaveiro, J.M.M., Gavilanes, J.G., Slotte, J.P., and Martínez-del-Pozo, Á. (2016). Differential Effect of Membrane Composition on the Pore-Forming Ability of Four Different Sea Anemone Actinoporins. *Biochemistry* *55*, 6630–6641.
- Geuijen, C.A., Willems, R.J., Hoogerhout, P., Puijk, W.C., Meloen, R.H., and Mooi, F.R. (1998). Identification and characterization of heparin binding regions of the Fim2 subunit of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* *66*, 2256–2263.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., and Danchin, A. (1988). Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* *7*, 3997–4004.
- Gmira, S., Karimova, G., and Ladant, D. (2001). Characterization of recombinant

- Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins carrying passenger proteins. *Res. Microbiol.* *152*, 889–900.
- Golstein, P., and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* *32*, 37–43.
- Gonzalez, M.R., Bischofberger, M., Frêche, B., Ho, S., Parton, R.G., and van der Goot, F.G. (2011a). Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell. Microbiol.* *13*, 1026–1043.
- Gonzalez, M.R., Bischofberger, M., Frêche, B., Ho, S., Parton, R.G., and Van der Goot, F.G. (2011b). Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell. Microbiol.* *13*, 1026–1043.
- González-Juarbe, N., Gilley, R.P., Hinojosa, C.A., Bradley, K.M., Kamei, A., Gao, G., Dube, P.H., Bergman, M.A., and Orihuela, C.J. (2015). Pore-Forming Toxins Induce Macrophage Necroptosis during Acute Bacterial Pneumonia. *PLOS Pathog.* *11*, e1005337.
- Gordon, V.M., Leppla, S.H., and Hewlett, E.L. (1988). 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.
- Gouaux, E. (1997). The long and short of colicin action: the molecular basis for the biological activity of channel-forming colicins. *Structure* *5*, 313–317.
- de Gouw, D., Diavatopoulos, D.A., Bootsma, H.J., Hermans, P.W.M., and Mooi, F.R. (2011). Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol. Rev.* *35*, 441–474.
- Goyard, S., Sebo, P., D'Andria, O., Ladant, D., and Ullmann, a (1993). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Zentralbl. Bakteriolog.* *278*, 326–333.
- Grassmé, H., Jendrossek, V., Riehle, A., von Kürthy, G., Berger, J., Schwarz, H., Weller, M., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2003). Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat. Med.* *9*, 322–330.
- Gray, M., Szabo, G., Otero, A.S., Gray, L., and Hewlett, E. (1998). Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *J. Biol. Chem.* *273*, 18260–18267.
- Gray, M.C., Ross, W., Kim, K., and Hewlett, E.L. (1999). Characterization of binding of adenylate cyclase toxin to target cells by flow cytometry. *Infect. Immun.* *67*, 4393–4399.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* *260*, 3440–3450.
- Guermontprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D., and Leclerc, C. (2001). 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.
- Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y.-S., Gibbs, C.S., Mrksich, M., and Tang, W.-J. (2005). Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J.* *24*, 3190–3201.

- Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J., and van der Goot, F.G. (2006). Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* 126, 1135–1145.
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Hewlett, E.L. Internal Lysine Palmitoylation in Adenylate Cyclase Toxin from *Bordetella pertussis*.
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Hewlett, E.L. (1994). Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* 266, 433–435.
- Hackett, M., Walker, C.B., Guo, L., Gray, M.C., Van Cuyk, S., Ullmann, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Hewlett, E.L., and Sebo, P. (1995). 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.
- Havlíček, V., Higgins, L., Chen, W., Halada, P., Šebo, P., Sakamoto, H., and Hackett, M. (2001). Mass spectrometric analysis of recombinant adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* strain 18323/pHSP9. *J. Mass Spectrom.* 36, 384–391.
- Heiss, L.N., Lancaster, J.R., Corbett, J.A., and Goldman, W.E. (1994). Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 267–270.
- Henderson, M.W., Inatsuka, C.S., Sheets, A.J., Williams, C.L., Benaron, D.J., Donato, G.M., Gray, M.C., Hewlett, E.L., and Cotter, P. a (2012). Contribution of *Bordetella* filamentous hemagglutinin and adenylate cyclase toxin to suppression and evasion of interleukin-17-mediated inflammation. *Infect. Immun.* 80, 2061–2075.
- Hengartner, M.O., Ellis, R., and Horvitz, R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494–499.
- Hentze, H., Lin, X.Y., Choi, M.S.K., and Porter, a G. (2003). Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death Differ.* 10, 956–968.
- Heveker, N., and Ladant, D. (1997). Characterization of mutant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins with reduced affinity for calmodulin. Implications for the mechanism of toxin entry into target cells. *Eur. J. Biochem.* 243, 643–649.
- Hewlett, E.L., Gray, L., Allietta, M., Ehrmann, I., Gordon, V.M., and Gray, M.C. (1991). Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity. *J. Biol. Chem.* 266, 17503–17508.
- Hewlett, E.L., Donato, G.M., and Gray, M.C. (2006). Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP! *Mol. Microbiol.* 59, 447–459.
- Hildebrand, A., Pohl, M., and Bhakdi, S. (1991). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Dual mechanism of binding to target cells. *J. Biol. Chem.* 266, 17195–17200.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241–251.
- Hotze, E.M., and Tweten, R.K. (2012). Membrane assembly of the cholesterol-

- dependent cytolysin pore complex. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1818*, 1028–1038.
- von Hoven, G., Rivas, A.J., Neukirch, C., Klein, S., Hamm, C., Qin, Q., Meyenburg, M., Fuser, S., Saftig, P., Hellmann, N., et al. (2016). Dissecting the role of ADAM10 as a mediator of *Staphylococcus aureus* α -toxin action. *Biochem. J.* *473*, 1929–1940.
- von Hoven, G., Rivas, A.J., Neukirch, C., Meyenburg, M., Qin, Q., Parekh, S., Hellmann, N., and Husmann, M. (2017). Repair of a Bacterial Small β -Barrel Toxin Pore Depends on Channel Width. *MBio* *8*, e02083-16.
- Hughes, F.M., and Cidlowski, J.A. (1999). Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo. *Adv. Enzyme Regul.* *39*, 157–171.
- Hunt, S., Green, J., and Artymiuk, P.J. (2010). Hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA) and related toxins. *Adv. Exp. Med. Biol.* *677*, 116–126.
- Hunter, D.R., and Haworth, R.A. (1979). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* *195*, 453–459.
- Iacovache, I., van der Goot, F.G., and Pernot, L. (2008). Pore formation: an ancient yet complex form of attack. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 1611–1623.
- Idone, V., Tam, C., Goss, J.W., Toomre, D., Pypaert, M., and Andrews, N.W. (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* *180*, 905–914.
- Imre, G., Heering, J., Takeda, A.-N., Husmann, M., Thiede, B., zu Heringdorf, D.M., Green, D.R., van der Goot, F.G., Sinha, B., Dötsch, V., et al. (2012). Caspase-2 is an initiator caspase responsible for pore-forming toxin-mediated apoptosis. *EMBO J.* *31*, 2615–2628.
- Iwaki, M., Ullmann, A., and Sebo, P. (1995). Identification by in vitro complementation of regions required for cell-invasive activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Mol. Microbiol.* *17*, 1015–1024.
- Jaiswal, J.K., Andrews, N.W., and Simon, S.M. (2002). Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *J. Cell Biol.* *159*, 625–635.
- Jaiswal, J.K., Chakrabarti, S., Andrews, N.W., and Simon, S.M. (2004). Synaptotagmin VII restricts fusion pore expansion during lysosomal exocytosis. *PLoS Biol.* *2*, E233.
- Janko, C., Jeremic, I., Biermann, M., Chaurio, R., Schorn, C., Muñoz, L.E., and Herrmann, M. (2013). Cooperative binding of Annexin A5 to phosphatidylserine on apoptotic cell membranes. *Phys. Biol.* *10*, 065006.
- Javadov, S., and Kuznetsov, A. (2013). Mitochondrial Permeability Transition and Cell Death: The Role of Cyclophilin D. *Front. Physiol.* *4*.
- Jimenez, A.J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., and Perez, F. (2014). ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science* *343*, 1247136.
- Jonas, D., Walev, I., Berger, T., Liebetrau, M., Palmer, M., and Bhakdi, S. (1994). Novel path to apoptosis: Small transmembrane pores created by staphylococcal α -toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect. Immun.* *62*, 1304–1312.

- Jones, A.M., Boucher, P.E., Williams, C.L., Stibitz, S., and Cotter, P.A. (2005). Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Mol. Microbiol.* 58, 700–713.
- Kamanova, J., Kofronova, O., Masin, J., Genth, H., Vojtova, J., Linhartova, I., Benada, O., Just, I., and Sebo, P. (2008). RhoA Inhibition and Unproductive Ruffling 1.
- Kao, C.-Y., Los, F.C.O., Huffman, D.L., Wachi, S., Kloft, N., Husmann, M., Karabrahimi, V., Schwartz, J.-L., Bellier, A., Ha, C., et al. (2011). Global Functional Analyses of Cellular Responses to Pore-Forming Toxins. *PLoS Pathog.* 7, e1001314.
- Karimova, G., Fayolle, C., Gmira, S., Ullmann, a, Leclerc, C., and Ladant, D. (1998). Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the in vivo delivery of CD8(+) T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12532–12537.
- Karst, J.C., Barker, R., Devi, U., Swann, M.J., Davi, M., Roser, S.J., Ladant, D., and Chenal, A. (2012). Identification of a region that assists membrane insertion and translocation of the catalytic domain of *Bordetella pertussis* CyaA toxin. *J. Biol. Chem.* 287, 9200–9212.
- Karst, J.C., Ntsogo Enguéné, V.Y., Cannella, S.E., Subrini, O., Hessel, A., Debard, S., Ladant, D., and Chenal, A. (2014). Calcium, acylation and molecular confinement favor folding of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase CyaA toxin into a monomeric and cytotoxic form. *J. Biol. Chem.*
- Katsnelson, M.A., Rucker, L.G., Russo, H.M., and Dubyak, G.R. (2015). K⁺ Efflux Agonists Induce NLRP3 Inflammasome Activation Independently of Ca²⁺ Signaling. *J. Immunol.* 194, 3937–3952.
- Kearney, C.J., and Martin, S.J. (2017). An Inflammatory Perspective on Necroptosis. *Mol. Cell* 65, 965–973.
- Kebaier, C., Chamberland, R.R., Allen, I.C., Gao, X., Broglie, P.M., Hall, J.D., Jania, C., Doerschuk, C.M., Tilley, S.L., and Duncan, J.A. (2012). *Staphylococcus aureus* α -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. *J. Infect. Dis.* 205, 807–817.
- Kelk, P., Abd, H., Claesson, R., Sandström, G., Sjöstedt, A., and Johansson, A. (2011). Cellular and molecular response of human macrophages exposed to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Cell Death Dis.* 2, e126.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Khelef, N., and Guiso, N. (1995). Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol. Lett.* 134, 27–32.
- Khelef, N., Sakamoto, H., and Guiso, N. (1992). Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb. Pathog.* 12, 227–235.
- Khelef, N., Zychlinsky, A., and Guiso, N. (1993). *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* 61, 4064–4071.
- Kilgore, P.E., Salim, A.M., Zervos, M.J., and Schmitt, H.-J. (2016). Pertussis:

- Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 449–486.
- Kitur, K., Parker, D., Nieto, P., Ahn, D.S., Cohen, T.S., Chung, S., Wachtel, S., Bueno, S., and Prince, A. (2015). Toxin-induced necroptosis is a major mechanism of *Staphylococcus aureus* lung damage. *PLoS Pathog.* 11, e1004820.
- Kloft, N., Busch, T., Neukirch, C., Weis, S., Boukhallouk, F., Bobkiewicz, W., Cibis, I., Bhakdi, S., and Husmann, M. (2009). Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 503–506.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914–919.
- Korostoff, J., Wang, J.F., Kieba, I., Miller, M., Shenker, B.J., and Lally, E.T. (1998). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. *Infect. Immun.* 66, 4474–4483.
- Krause, K.H., Fivaz, M., Monod, A., and van der Goot, F.G. (1998). Aerolysin induces G-protein activation and Ca²⁺ release from intracellular stores in human granulocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 18122–18129.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., El-Deiry, W., Golstein, P., Green, D., et al. (2009). Classification of Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3–11.
- Krysko, O., de Ridder, L., and Cornelissen, M. (2004). Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells as evidenced by immunogold labeling technique. *Apoptosis* 9, 495–500.
- Kurehong, C., Kanchanawarin, C., Powthongchinn, B., Katzenmeier, G., and Angsuthanasombat, C. (2015). Membrane-pore forming characteristics of the bordetella pertussis cyaa-hemolysin domain. *Toxins (Basel)*. 7, 1486–1496.
- Ladant, D., and Ullmann, A. (1999). Bordetella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* 7, 172–176.
- Ladant, D., Michelson, S., Sarfati, R., Gilles, a M., Predeleanu, R., and Bârzu, O. (1989). Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of Bordetella pertussis adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 264, 4015–4020.
- Lang, F., and Hoffmann, E.K. (2012). Role of ion transport in control of apoptotic cell death. *Compr. Physiol.* 2, 2037–2061.
- Lang, F., Shumilina, E., Ritter, M., Gulbins, E., Vereninov, A., and Huber, S.M. (2006). Ion Channels and Cell Volume in Regulation of Cell Proliferation and Apoptotic Cell Death. In *Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation*, (Basel: KARGER), pp. 142–160.
- Laoide, B.M., and Ullmann, A. (1990). Virulence dependent and independent regulation of the Bordetella pertussis cya operon. *EMBO J.* 9, 999–1005.
- Lavrik, I.N., Golks, A., and Krammer, P.H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* 115, 2665–2672.
- Lecoq, H., Prévost, M.C., and Gougeon, M.L. (2001). Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: A reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay.

Cytometry 44, 65–72.

Leist, B.M., Single, B., Castoldi, A.F., and Kühnle, S. (1997). A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. *185*, 1481–1486.

Lieberthal, W., Menza, S.A., and Levine, J.S. (1998). Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am. J. Physiol.* 274, F315–27.

Lin, A., Loughman, J.A., Zinselmeyer, B.H., Miller, M.J., and Caparon, M.G. (2009). Streptolysin S inhibits neutrophil recruitment during the early stages of *Streptococcus pyogenes* infection. *Infect. Immun.* 77, 5190–5201.

Linhartová, I., Bumba, L., Mašín, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J., Procházková, K., Adkins, I., Hejnová-Holubová, J., Sadílková, L., et al. (2010). RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1076–1112.

Los, F.C.O., Kao, C.-Y., Smitham, J., McDonald, K.L., Ha, C., Peixoto, C.A., and Aroian, R. V. (2011). RAB-5- and RAB-11-Dependent Vesicle-Trafficking Pathways Are Required for Plasma Membrane Repair after Attack by Bacterial Pore-Forming Toxin. *Cell Host Microbe* 9, 147–157.

Los, F.C.O., Randis, T.M., Aroian, R. V, and Ratner, A.J. (2013). Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 173–207.

Maeno, E., Ishizaki, Y., Kanaseki, T., Hazama, A., and Okada, Y. (2000). Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 9487–9492.

Martín, C., Requero, M.-A., Masin, J., Konopasek, I., Goñi, F.M., Sebo, P., and Ostolaza, H. (2004). Membrane restructuring by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin, a member of the RTX toxin family. *J. Bacteriol.* 186, 3760–3765.

Martín, C., Gómez-Bilbao, G., and Ostolaza, H. (2010). *Bordetella* adenylate cyclase toxin promotes calcium entry into both CD11b⁺ and CD11b⁻ cells through cAMP-dependent L-type-like calcium channels. *J. Biol. Chem.* 285, 357–364.

Martín, C., Uribe, K.B., Gómez-Bilbao, G., and Ostolaza, H. (2011). Adenylate cyclase toxin promotes internalisation of integrins and raft components and decreases macrophage adhesion capacity. *PLoS One* 6, e17383.

Masin, J., Basler, M., Knapp, O., El-Azami-El-Idrissi, M., Maier, E., Konopasek, I., Benz, R., Leclerc, C., and Sebo, P. (2005). Acylation of Lysine 860 Allows Tight Binding and Cytotoxicity of *Bordetella* Adenylate Cyclase on CD11b-Expressing Cells †. *Biochemistry* 44, 12759–12766.

Masin, J., Fiser, R., Linhartova, I., Osicka, R., Bumba, L., Hewlett, E.L., Benz, R., and Sebo, P. (2013). Differences in Purinergic Amplification of Osmotic Cell Lysis by the Pore-Forming RTX Toxins *Bordetella pertussis* CyaA and *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIA: the Role of Pore Size. *Infect. Immun.* 81, 4571–4582.

Masin, J., Osickova, A., Sukova, A., Fiser, R., Halada, P., Bumba, L., Linhartova, I., Osicka, R., and Sebo, P. (2016). Negatively charged residues of the segment linking the enzyme and cytolysin moieties restrict the membrane-permeabilizing capacity of adenylate cyclase toxin. *Sci. Rep.* 6, 29137.

- Masuda, M., Betancourt, L., Matsuzawa, T., Kashimoto, T., Takao, T., Shimonishi, Y., and Horiguchi, Y. (2000). Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella dermonecrotizing* toxin. *EMBO J.* *19*, 521–530.
- Masure, H.R. (1992). Modulation of adenylate cyclase toxin production as *Bordetella pertussis* enters human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 6521–6525.
- Mattoo, S., and Cherry, J.D. (2005). Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies Molecular Pathogenesis , Epidemiology , and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Su.
- May, A.K., Gleason, T.G., Sawyer, R.G., and Pruett, T.L. (2000). Contribution of *Escherichia coli* alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. *Infect. Immun.* *68*, 176–183.
- McConkey, D.J. (1998). Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol. Lett.* *99*, 157–168.
- McCoy, A.J., Koizumi, Y., Higa, N., and Suzuki, T. (2010). Differential regulation of caspase-1 activation via NLRP3/NLRC4 inflammasomes mediated by aerolysin and type III secretion system during *Aeromonas veronii* infection. *J. Immunol.* *185*, 7077–7084.
- McNeil, P.L., and Steinhardt, R.A. (2003). Plasma Membrane Disruption: Repair, Prevention, Adaptation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *19*, 697–731.
- Metkar, S.S., Marchioretto, M., Antonini, V., Lunelli, L., Wang, B., Gilbert, R.J., Anderluh, G., Roth, R., Pooga, M., Pardo, J., et al. (2015). Perforin oligomers form arcs in cellular membranes: a locus for intracellular delivery of granzymes. *Cell Death Differ.* *22*, 74–85.
- Miao, E.A., Rajan, J. V., and Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol. Rev.* *243*, 206–214.
- Miyake, K., and McNeil, P.L. (1995). Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *J. Cell Biol.* *131*, 1737–1745.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069–1075.
- Mocarski, E.S., Guo, H., and Kaiser, W.J. (2015). Necroptosis: The Trojan horse in cell autonomous antiviral host defense. *Virology* *479–480*, 160–166.
- Mouallem, M., Farfel, Z., and Hanski, E. (1990). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: intoxication of host cells by bacterial invasion. *Infect. Immun.* *58*, 3759–3764.
- Nicaud, J.M., Mackman, N., Gray, L., and Holland, I.B. (1985). Characterisation of HlyC and mechanism of activation and secretion of haemolysin from *E. coli* 2001. *FEBS Lett.* *187*, 339–344.
- Nishimura, Y., and Lemasters, J.J. (2001). Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia. *Cell Death Differ.* *8*, 850–858.
- Osicka, R., Osickova, A., Hasan, S., Bumba, L., Cerny, J., and Sebo, P. (2015). *Bordetella* adenylate cyclase toxin is a unique ligand of the integrin complement receptor 3. *Elife* *4*, 1–28.

- Ostolaza, H., Uribe, K.B., and Etxebarria, A. (2013). Calpain-Mediated Processing of Adenylate Cyclase Toxin Generates a Cytosolic Soluble Catalytically Active N-Terminal Domain. *8*, 20–23.
- Otero, A.S., Yi, X.B., Gray, M.C., Szabo, G., and Hewlett, E.L. (1995). Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J. Biol. Chem.* *270*, 9695–9697.
- Paccani, S.R., Finetti, F., Davi, M., Patrussi, L., D’Elios, M.M., Ladant, D., and Baldari, C.T. (2011). The *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin binds to T cells via LFA-1 and induces its disengagement from the immune synapse. *J. Exp. Med.* *208*, 1317–1330.
- Parton, R.G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 185–194.
- Peraro, M.D., and van der Goot, F.G. (2015). Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat. Rev. Microbiol. advance on*, 77–92.
- Perkins, D.J., Gray, M.C., Hewlett, E.L., and Vogel, S.N. (2007). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin (ACT) induces cyclooxygenase-2 (COX-2) in murine macrophages and is facilitated by ACT interaction with CD11b/CD18 (Mac-1). *Mol. Microbiol.* *66*, 1003–1015.
- Petrie, E.J., Hildebrand, J.M., and Murphy, J.M. (2017). Insane in the membrane: a structural perspective of MLKL function in necroptosis. *Immunol. Cell Biol.* *95*, 152–159.
- Ponder, E., and Heilbrunn, L. (1956). *The Dynamics of Living Protoplasm*.
- Porta, H., Cancino-Rodezno, A., Soberón, M., and Bravo, A. (2011). Role of MAPK p38 in the cellular responses to pore-forming toxins. *Peptides* *32*, 601–606.
- Potez, S., Luginbühl, M., Monastyrskaya, K., Hostettler, A., Draeger, A., and Babiychuk, E.B. (2011). Tailored protection against plasmalemmal injury by annexins with different Ca²⁺ sensitivities. *J. Biol. Chem.* *286*, 17982–17991.
- Pretorius, E., and Bornman, M.S. (2005). Calcium-mediated apoptosis plays a central role in the pathogenesis of estrogenic chemical-induced neurotoxicity. *Med. Hypotheses* *65*, 893–904.
- Ralph, P., Moore, M.A., and Nilsson, K. (1976). Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J. Exp. Med.* *143*, 1528–1533.
- Reddy, A., Caler, E. V, Andrews, N.W., and Haven, N. (2001). by Ca²⁺ -Regulated Exocytosis of Lysosomes. *106*, 157–169.
- Rivers-Auty, J., and Brough, D. (2015). Potassium efflux fires the canon: Potassium efflux as a common trigger for canonical and noncanonical NLRP3 pathways. *Eur. J. Immunol.* *45*, 2758–2761.
- Rodríguez, A., Webster, P., Ortego, J., and Andrews, N.W. (1997). Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J. Cell Biol.* *137*, 93–104.
- Rogel, A., and Hanski, E. (1992). Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J. Biol. Chem.* *267*, 22599–22605.

- Rogel, A., Meller, R., and Hanski, E. (1991). Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis. *J. Biol. Chem.* *266*, 3154–3161.
- Russo, T.A., Davidson, B.A., Genagon, S.A., Warholic, N.M., Macdonald, U., Pawlicki, P.D., Beanan, J.M., Olson, R., Holm, B.A., and Knight, P.R. (2005). *E. coli* virulence factor hemolysin induces neutrophil apoptosis and necrosis/lysis in vitro and necrosis/lysis and lung injury in a rat pneumonia model. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *289*, L207-16.
- Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 623–635.
- Satchell, K.J.F. (2007). MARTX, Multifunctional Autoprocessing Repeats-in-Toxin Toxins. *Infect. Immun.* *75*, 5079–5084.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* *418*, 191–195.
- Schnupf, P., and Portnoy, D.A. (2007). Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microbes Infect.* *9*, 1176–1187.
- Sebo, P., Glaser, P., Sakamoto, H., and Ullmann, A. (1991). High-level synthesis of active adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* in a reconstructed *Escherichia coli* system. *Gene* *104*, 19–24.
- Segawa, K., and Nagata, S. (2015). An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol.* *25*, 639–650.
- Selwa, E., Laine, E., and Malliavin, T.E. (2012). Differential role of calmodulin and calcium ions in the stabilization of the catalytic domain of adenylyl cyclase CyaA from *Bordetella pertussis*. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *80*, 1028–1040.
- Sheahan, K.-L., Cordero, C.L., and Satchell, K.J.F. (2007). Autoprocessing of the *Vibrio cholerae* RTX toxin by the cysteine protease domain. *EMBO J.* *26*, 2552–2561.
- Short, E.C., and Kurtz, H.J. (1971). Properties of the Hemolytic Activities of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* *3*, 678–687.
- Skals, M., Jorgensen, N.R., Leipziger, J., and Praetorius, H.A. (2009). -Hemolysin from *Escherichia coli* uses endogenous amplification through P2X receptor activation to induce hemolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 4030–4035.
- Snyder, I.S., and Koch, N.A. (1966). Production and characteristics of hemolysins of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *91*, 763–767.
- Stanley, P., Koronakis, V., and Hughes, C. (1998). Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 309–333.
- Strasser, A., Cory, S., and Adams, J.M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J.* *30*, 3667–3683.
- Subrini, O., Sotomayor-Pérez, A.C., Hessel, A., Spiaczka-Karst, J., Selwa, E., Sapay, N., Veneziano, R., Pansieri, J., Chopineau, J., Ladant, D., et al. (2013). Characterization of a membrane-active peptide from the *bordetella pertussis* CyaA toxin. *J. Biol. Chem.* *288*, 32585–32598.

- Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prévost, M.C., et al. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* *192*, 571–580.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 621–632.
- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M.C., Flannery, A., He, X., Schuchman, E., Tabas, I., and Andrews, N.W. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J. Cell Biol.* *189*, 1027–1038.
- Tanaka, K., Caaveiro, J.M.M., Morante, K., González-Mañas, J.M., and Tsumoto, K. (2015). Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid. *Nat. Commun.* *6*, 6337.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (1998). Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from E.coli: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J.* *17*, 6487–6496.
- Tilley, S.J., Orlova, E. V, Gilbert, R.J.C., Andrew, P.W., and Saibil, H.R. (2005). Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* *121*, 247–256.
- Togo, T., Krasieva, T.B., and Steinhardt, R.A. (2000). A decrease in membrane tension precedes successful cell-membrane repair. *Mol. Biol. Cell* *11*, 4339–4346.
- Turk, B., and Stoka, V. (2007). Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Lett.* *581*, 2761–2767.
- Vandenesch, F., Lina, G., and Henry, T. (2012). Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *2*, 12.
- Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T., Krysko, D. V, Festjens, N., and Vandenabeele, P. (2008). Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr. Mol. Med.* *8*, 207–220.
- Veneziano, R., Rossi, C., Chenal, A., Devoisselle, J.-M., Ladant, D., and Chopineau, J. (2013). Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin translocation across a tethered lipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 20473–20478.
- Vojtova, J., Kamanova, J., and Sebo, P. (2006). Bordetella adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Curr. Opin. Microbiol.* *9*, 69–75.
- Vojtova-vodolanova, J., Basler, M., Osicka, R., Knapp, O., Maier, E., Cerny, J., Benada, O., Benz, R., and Sebo, P. (2009). Oligomerization is involved in pore formation by Bordetella adenylate cyclase toxin. *FASEB* 2831–2843.
- Waalwijk, C., MacLaren, D.M., and de Graaff, J. (1983). In vivo function of hemolysin in the nephropathogenicity of Escherichia coli. *Infect. Immun.* *42*, 245–249.
- Wald, T., Petry-Podgorska, I., Fiser, R., Matousek, T., Dedina, J., Osicka, R., Sebo, P., and Masin, J. (2014). Quantification of potassium levels in cells treated with Bordetella adenylate cyclase toxin. *Anal. Biochem.* *450*, 57–62.
- Warny, M., and Kelly, C.P. (1999). Monocytic cell necrosis is mediated by potassium depletion and caspase-like proteases. *Am. J. Physiol.* *276*, C717–C724.

- Wehbi, V.L., and Taskén, K. (2016). Molecular Mechanisms for cAMP-Mediated Immunoregulation in T cells – Role of Anchored Protein Kinase A Signaling Units. *Front. Immunol.* 7, 222.
- Weinberg, J.M., Bienholz, A., and Venkatachalam, M.A. (2016). The role of glycine in regulated cell death. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2285–2308.
- Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (1999). The Induction of Apoptosis by Bacterial Pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 155–187.
- Welch, R.A. (1991). Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 5, 521–528.
- Westrop, G.D., Hormozi, E.K., Da Costa, N.A., Parton, R., and Coote, J.G. (1996). Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin: proCyaA and CyaC proteins synthesised separately in Escherichia coli produce active toxin in vitro. *Gene* 180, 91–99.
- Worsham, L.M.S., Langston, K.G., and Ernst-Fonberg, M. Lou (2005). Thermodynamics of a protein acylation: activation of Escherichia coli hemolysin toxin. *Biochemistry* 44, 1329–1337.
- Xiong, Z.-G., Zhu, X.-M., Chu, X.-P., Minami, M., Hey, J., Wei, W.-L., MacDonald, J.F., Wemmie, J.A., Price, M.P., Welsh, M.J., et al. (2004). Neuroprotection in Ischemia. *Cell* 118, 687–698.
- Yamashima, T. (2004). Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved “calpain-cathepsin cascade” from nematodes to primates. *Cell Calcium* 36, 285–293.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 12, 814–822.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47–59.
- Zha, X., Pierini, L.M., Leopold, P.L., Skiba, P.J., Tabas, I., and Maxfield, F.R. (1998). Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis. *J. Cell Biol.* 140, 39–47.
- Zhong, Z., Wheeler, M.D., Li, X., Froh, M., Schemmer, P., Yin, M., Bunzendaul, H., Bradford, B., and Lemasters, J.J. (2003). L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 6, 229–240.
- Zong, W., and Thompson, C.B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 20, 1–15.

ERANSKINA

Adenylate Cyclase Toxin promotes bacterial internalisation into non phagocytic cells

César Martín^a, Asier Etxaniz^a, Kepa B. Uribe^a, Aitor Etxebarria^a, David González-Bullón^a, Jon Arlucea^b, Félix M. Goñi^a, Juan Aréchaga^b and Helena Ostolaza^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular and Unidad de Biofísica (CSIC, UPV/EHU), Universidad del País Vasco, Apto. 644, 48080 Bilbao, Spain.

^b Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad del País Vasco, Apto. 644, 48080 Bilbao, Spain

*Corresponding author: e-mail: elenaamaya.ostolaza@ehu.es; Phone: +34 946015538; Fax:+34 946018500.

Bordetella pertussis causes whooping cough, a respiratory infectious disease that is the fifth largest cause of vaccine-preventable death in infants. Though historically considered an extracellular pathogen, this bacterium has been detected both *in vitro* and *in vivo* inside phagocytic and non-phagocytic cells. However the precise mechanism used by *B. pertussis* for cell entry, or the putative bacterial factors involved, are not fully elucidated. Here we find that adenylate cyclase toxin (ACT), one of the important toxins of *B. pertussis*, is sufficient to promote bacterial internalisation into non-phagocytic cells. After characterization of the entry route we show that uptake of “toxin-coated bacteria” proceeds *via* a clathrin-independent, caveolae-dependent entry pathway, allowing the internalised bacteria to survive within the cells. Intracellular bacteria were found inside non-acidic endosomes with high sphingomyelin and cholesterol content, or “free” in the cytosol of the invaded cells, suggesting that the ACT-induced bacterial uptake may not proceed through formation of late endolysosomes. Activation of Tyr kinases and toxin-induced Ca²⁺-influx are essential for the entry process. We hypothesize that *B. pertussis* might use ACT to activate the endocytic machinery of non-phagocytic cells and gain entry into these cells, in this way evading the host immune system.

INTRODUCTION

Whooping cough, caused by the Gram-negative bacterium *Bordetella pertussis*, remains an important public health concern, as highlighted by the increasing number of disease outbreaks worldwide and the rise in infant mortality despite widespread (>90%) vaccination programs^{1,2}. *B. pertussis* was regarded as a noninvasive pathogen that caused disease through the action of various potent virulence factors^{3,4}. The successful persistence of this pathogen has been mainly attributed to its ability to interfere with various aspects of the immune system, from the inhibition of complement- and phagocyte-mediated killing to the suppression of T- and B-cell responses^{3,5}. However, a number of reports have noted that virulent *B. pertussis* may exist and even replicate inside phagocytic and non-phagocytic cells, both *in vitro* and *in vivo*⁶⁻¹¹, suggesting that *B. pertussis* may have developed mechanisms of cell invasion to evade an active host immune response. The precise mechanism used by *B. pertussis* for cell entry, or the putative bacterial factors involved in invasion are not yet fully understood.

B. pertussis expresses an ample repertoire of virulence factors: adhesins such as filamentous hemagglutinin (FHA), fimbriae, and pertactin^{12,13}, as well as various toxins including tracheal cytotoxin, dermonecrotic toxin, pertussis toxin, and adenylate cyclase toxin (ACT; also known as CyaA)^{12,13}. Whether these adhesins and toxins contribute to *B. pertussis* invasivity is not still fully clear, as contradictory results have been described to date. While some authors reported that adhesins such as FHA or pertactin, and toxins such as pertussis toxin induced *B. pertussis* invasion in HeLa 229 cells, A549 cells or Hep-2 cells^{7,14,15}, others reported that pertussis toxin or FHA were not involved in the invasion process^{6,10,16}. The involvement of ACT in *B. pertussis* invasion also remains obscure. Early reports had suggested that ACT was not involved in invasion, as mutant *B. pertussis* strains lacking ACT were capable of invading HeLa 229 cells, others have suggested that ACT inhibits bacterial invasion in human tracheal epithelial cells (HTE) and in HeLa cells^{6,7} and other group did not find evidence for a significant inhibitory effect of ACT in the entry of *B. pertussis* into A549 cells¹⁰.

ACT is a 200 kDa protein with two functional domains: a N-terminal adenylate cyclase enzymatic domain (AC domain) and a C-terminal hemolysin domain (Hly domain)¹⁷ with characteristic glycine/aspartate-rich Ca²⁺-binding repeats typically present in the members of the RTX (Repeats in Toxin) family of proteins, including ACT¹⁷⁻²⁰. The hemolysin domain mediates binding to CD11b/CD18, the ACT receptor^{21,22} and direct translocation of the AC catalytic domain into the cell cytosol¹⁷. Upon

activation by cellular calmodulin, this translocated domain catalyzes conversion of ATP to cAMP^{17,23}. ACT exerts, via cAMP generation, immunosuppressive and immunoregulatory effects on both the innate and adaptive immune systems²⁴⁻²⁹. Though CD11b/CD18 expressing-myeloid cells are the most susceptible ACT targets, non-immune cells, such as epithelial cells, are also susceptible to toxin activity, though at higher toxin concentrations³⁰. Although it has classically been accepted that the unregulated increase in intracellular cAMP levels underlies ACT's cytotoxic activity, this toxin exhibits other functions, not all of which cause cell death³¹.

Recently, our group has reported that purified ACT is internalised by both phagocytic (J774A.1 macrophages) and non-phagocytic cells (CHO-K1) through activation of different entry pathways depending on the cell type³². In the context of infection by *B. pertussis* it is thought that upon ACT secretion an "atmosphere" of active toxin molecules is formed around the bacteria³³. In the present study, we sought to determine whether the ACT molecules surrounding the bacteria might be able to induce the internalisation of *B. pertussis* into non-phagocytic cells. For this purpose, we employed two bacterial strains, *B. pertussis* strain BP18323 which expresses the *bgv*-regulated virulence factors including ACT³⁴, and a non-virulent strain that lacks the *bgv* determinant, and therefore cannot express the *bgv*-regulated virulence factors (strain BP18323H)³⁵. We "coated" the non-virulent bacteria (BP18323 H) with the toxin by attaching purified ACT to the cell surface, and to assess invasion we incubated non-phagocytic CHO-K1 cells with the "toxin-coated" bacteria. We show here that purified ACT is sufficient to promote internalisation of live bacteria into non-phagocytic CHO-K1 cells, and that internalised bacteria survive within the cells.

RESULTS

ACT and *B. pertussis* induce cellular actin rearrangements

Bacterial uptake is normally preceded by perturbations of the cellular cytoskeleton, as documented for the invasive pathogenic species *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*³⁶. *B. pertussis* can invade non-phagocytic epithelial cell lines and professional phagocytes cells (e.g. macrophages and neutrophils)⁶⁻¹¹. We therefore explored the effect of ACT on the cell architecture. ACT toxin can bind and intoxicate, with different efficiency, a variety of cell types, including both macrophages and neutrophils which express the specific ACT receptor $\alpha M\beta 2$ integrin, as well as cells that do not express it. The $\alpha M\beta 2$ integrin is a bona fide phagocytic receptor for professional phagocytes with a central role in microbial uptake; ligand binding to the integrin may activate phagocytosis. Therefore, we used here CHO-K1 cells to discern whether ACT *per se* (not the toxin-integrin interaction) is able to activate signaling that promotes bacterial endocytosis. Besides, the non-phagocytic cell line has been previously used by our laboratory for ACT characterization³².

Exposure of CHO-K1 cells to purified free ACT (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 min) had a prominent effect on the cellular actin cytoskeleton (Fig. 1). While control, untreated CHO-K1 cells (cells in vehicle buffer) exhibited phalloidin-stained, long actin filaments (Fig. 1a), in ACT-treated cells phalloidin-labeled actin adopted a non-fibrillar structure, and was evenly distributed in some cells (Figs 1b and 1c). In other cells, actin localized predominantly to sub-plasma membrane positions (Figs 1b and 1c). Membrane protrusions were also seen (Figs. 1b and 1c). This actin restructuring effect was more evident in the cells incubated with higher ACT concentrations (Fig. 1c). A field view showing that these results are representative of a large population is shown in Supplementary Figure S1.

CHO-K1 cells exposed to *B. pertussis* (multiplicity of infection (moi) of 100 bacteria per cell, similar to the used by others^{6,37}), adopted a morphology very similar to the cells treated with purified ACT (Fig. 1d) in which the phalloidin-bound material became evenly distributed or located underneath the plasma membrane (Fig. 1d) (Panel d of Figure 1 is shown at a higher magnification relative to the panels a-c, to better visualise the bacteria stained by Hoechst). Cell viability remained >80% for the incubation periods tested (36 h) (not shown). These observations provided the first clue that ACT could be involved in bacterial invasion.

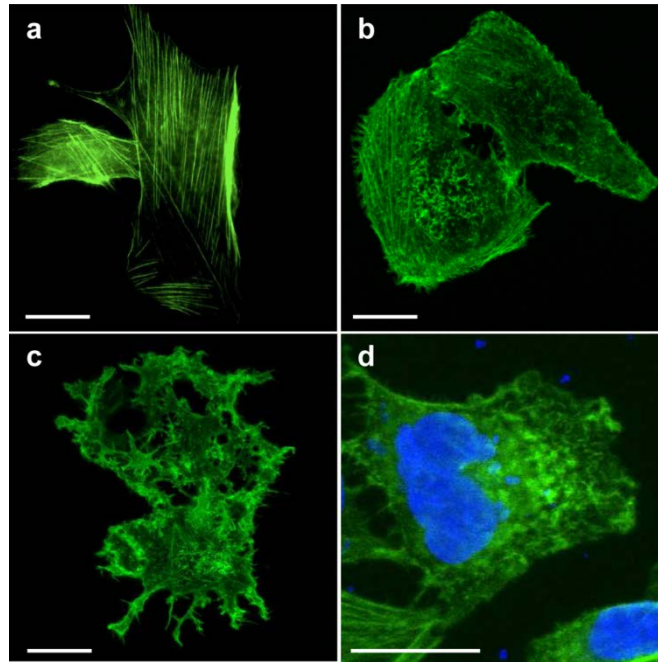


Figure 1. Reorganization of the cell cytoskeleton induced by ACT, or by *B. pertussis*. Exposure of CHO-K1 cells to purified ACT or to *B. pertussis* (*B. pertussis* 18323H strain) visibly affected cellular actin microfilament organization. CHO-K1 cells were treated with purified ACT or with *B. pertussis* (BP18323 strain, m.o.i 100), fixed, permeabilized and stained with Alexa Fluor® 488 phalloidin to visualise actin cytoskeleton and with Hoechst to visualise DNA as described in *Methods*. (a) Control. Untreated CHO-K1 cells (b) CHO-K1 cells incubated with 2 µg/mL ACT (c) CHO-K1 cells incubated with 5 µg/mL ACT (d) CHO-K1 cells incubated with *B. pertussis* (m.o.i 100) are shown at higher magnification in order to better visualise the bacteria stained by Hoechst. Representative confocal images from three independent experiments are shown. Scale bars, 20 µm

“ACT-coated” non-virulent *B. pertussis* are internalised by non-phagocytic cells

To assess the possibility of bacterial internalisation following cytoskeletal rearrangement, we performed a bacterial invasion assay using the method of gentamicin survival³⁸. This assay has been demonstrated to be effective in invasion assays with *B. pertussis*^{6,37}.

As wild type *B. pertussis* produces several adhesins and toxins that could contribute to invasion, to determine whether ACT is sufficient or not to induce bacterial entry we used a *bgv*-negative mutant *B. pertussis* (strain BP18323H) that cannot express *bgv*-regulated virulence factors, including ACT. These bacteria were coated with purified ACT toxin as described in *Materials and Methods*. Typically, 1×10^6 bacteria were incubated with 20 µg/mL of ACT, and after washing the unbound protein, resultant ACT-coated bacteria had $\approx 0.55 \pm 0.31$ µg of toxin/ 10^6 bacteria. The catalytic activity of bacteria-bound ACT was tested (*Materials and Methods*), and it was found

that the enzymatic activity of bacterial preparations containing different amounts of bound toxin in the range 0.04-0.71 μ g, was linearly bound to the bacteria (Supplementary Figure S2). We designated these treated bacteria “**ACT-coated bacteria**”, and employed them in subsequent experiments.

CHO-K1 cells were exposed to these “ACT-coated bacteria” (moi 100 bacteria per cell) and the invasion assay was performed. We visualised by electron microscopy ultrathin sections of ~100 CHO-K1 cells at various stages of bacterial internalisation (Fig. 2a). The bacteria were first adsorbed onto the cell membrane, developing contacts with the target cell and membrane extensions were visible close to the bacteria (Fig. 2a, left upper panel). In other sections, cells containing intracellular bacteria inside endosomes were observed (Fig. 2a, middle panel). At higher magnification it can be observed both intracellular bacteria surrounded by the endosome membrane and “free” bacteria that were devoid of a surrounding membrane (Fig. 2a, middle and right lower panel).. The control of “non-coated” bacteria (non-virulent BP18323H strain, without ACT bound) showed negligible bacterial uptake when co-incubated with cells (Supplementary Figure S3).

To verify that parental *B. pertussis* (BP18323 strain) naturally expressing ACT was also capable to enter these cells and in order to have a reference of the efficiency of the internalisation relative to the “ACT-coated bacteria” we performed the invasion assay with the virulent *B. pertussis* (BP18323 strain) (moi 100 bacteria per cell). The analysis by electron microscopy of ultrathin sections of infected CHO-K1 cells are shown in Fig.2b. Similar steps of internalisation were observed for the wild type bacteria, with bacteria first adsorbed onto the cell membrane (Fig. 2b left upper panel), and internalised bacteria inside endosomes (Fig. 2b middle upper panel) as well as “free” bacteria in the cytosol (Fig. 2b right panels), similarly to the observations with “ACT-coated bacteria” (Fig. 2a).

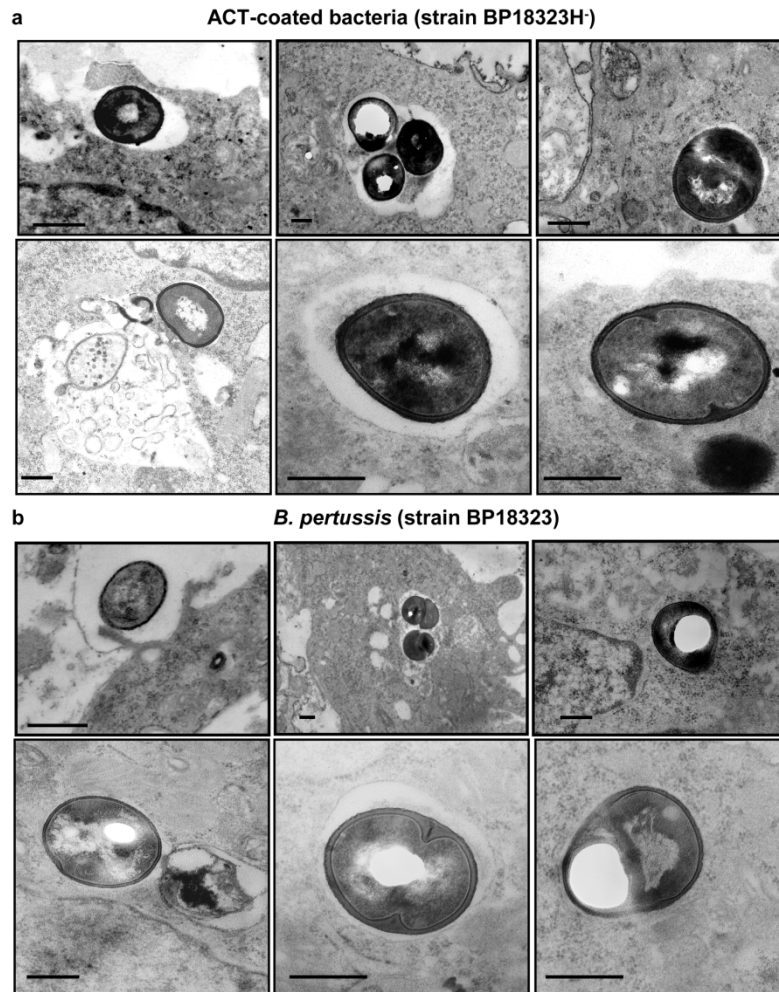


Figure 2. “ACT-coated bacteria” or virulent *B. pertussis* are taken up by non-phagocytic cells. Incubation of CHO-K1 cells with “ACT-coated bacteria” (a) or with virulent *B. pertussis* (BP18323 strain) (b), results in bacterial internalisation, as visualised by electron microscopy. A detailed analysis of electron micrographs taken from infected CHO-K1 cells shows the different steps of the invasion process: first the bacteria were attached onto the cell membrane (upper left panel, 2a and 2b), then internalised, with some of the bacteria appearing inside vesicles, surrounded by a membrane (upper middle panels, 2a and 2b), and some of them appearing “free” in the cytosol (upper right panels, 2a and 2b). Representative images of three independent experiments are shown. Scale bars, 0.5 μm . The bacterial invasion assay and electron microscopy analysis were performed as described in *Methods*.

Quantification of the number of intracellular bacteria revealed that there were fewer virulent bacteria than “ACT-coated bacteria” inside cells (Fig. 3a), suggesting that other toxic effectors expressed by the parental bacterium reduced invasiveness, or, perhaps more likely, induced a higher rate of cell mortality. cAMP concentration in cells incubated with wt *B. pertussis* is significantly higher than in cells incubated with “ACT-

coated bacteria “ indicating that the higher intoxication caused by the parental bacteria may kill CHO-K1 cells (Supplementary Figure S4). The efficacy of bacterial uptake after 6 h incubation was $1.2 \pm 0.1\%$ for parental *B. pertussis* and $2.2 \pm 0.1\%$ for the “ACT-coated bacteria”. Similar values (0.4-2.8%) had been reported by others in invasion assays with *B. pertussis* in macrophages¹¹ and in epithelial cells³⁹. Importantly, invaded CHO-K1 cells remained viable for at least 36 h although an increasing number of live bacteria were observed inside cells suggesting that the internalised bacteria can survive and multiply in the invaded cells (Fig. 3b). The set of data shown in Figs. 2 and 3 suggested that ACT can promote *B. pertussis* internalisation.

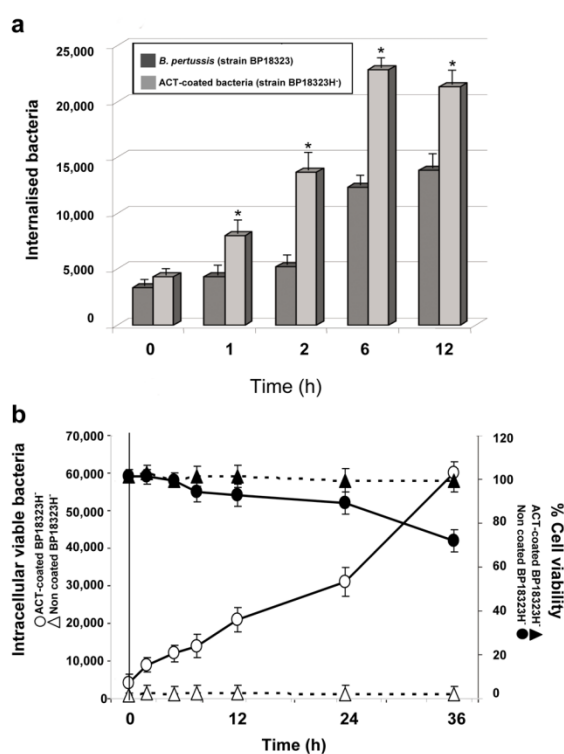


Figure 3. Quantification of the number of internalised bacteria and viability of the bacteria-containing cells. CHO-K1 cells were incubated with virulent *B. pertussis* (BP18323 strain) or with “ACT-coated bacteria”, and invasion was followed as described in *Methods*. The number of internalised bacteria at different times of invasion (0.5-12 h) was quantified as described in *Methods*. Time = 0 h represents the invasion occurring after 2 h cell incubation with bacteria, washing and killing of extracellular bacteria by gentamicin (**a**). Cell viability of CHO-K1 cells and number of internalised bacteria were determined for each time-point (0.5-36 h) as described in *Methods*. Time = 0 h represents the invasion occurring after 2 h cell incubation with bacteria, washing and killing of extracellular bacteria by gentamicin. For comparison the viability and the number of intracellular bacteria for control CHO-K1 cells incubated with non-coated bacteria (strain 18232H) are shown (**b**). Internalisation of “ACT-coated bacteria” only induced a slight to moderate decrease in the cell viability of the infected CHO-K1 cells,

and most of the internalised bacteria could grow after infection. Data shown are the mean \pm SD of at least three independent experiments performed in triplicate, with * $p < 0.01$.

Characterization of the entry route of ACT-coated *B. pertussis*

To determine the main features of the entry pathway followed by the “ACT-coated bacteria” we pre-treated CHO-K1 cells with several endocytosis inhibitors and performed the invasion assay. The common inhibitors of clathrin-mediated endocytosis (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chlorpromazine or high-sucrose medium) did not significantly affect invasion (Fig. 4), while treatment with 10 mM methyl- β -cyclodextrin, a drug that disrupts cholesterol-enriched membrane domains, reduced bacterial uptake by ~50% (Fig. 4). Nystatin (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), another cholesterol-depleting compound, exerted an even more profound inhibitory effect on bacterial uptake (Fig. 4), suggesting that cholesterol-rich domains may be involved in the invasion process, a hypothesis that is in full agreement with previous data obtained with purified ACT^{32,40}. Vehicle controls using DMEM or DMSO did not cause any difference in internalisation (Supplementary Figure S5).

In the lipid-raft dependent invasion processes of other pathogens, activation of tyrosine kinases has been found to be crucial⁴⁰⁻⁴². For ACT we had previously observed that its internalisation depends on the activation of this family of kinases⁴⁰, so we next studied their contribution to invasion by *B. pertussis*. Pre-incubation of the CHO-K1 cells with the tyrosine-kinase inhibitor genistein (100 μM) inhibited invasion about 60% (Fig. 4). Okadaic acid (1 μM), which inhibits tyrosine phosphatases, reversed the effect (Fig. 4), indicating that activation of tyrosine kinases is also critical for invasion by *B. pertussis*. Thus, the “ACT-coated bacteria” are endocytosed by a clathrin-independent, raft-dependent and tyrosine kinase dependent pathway.

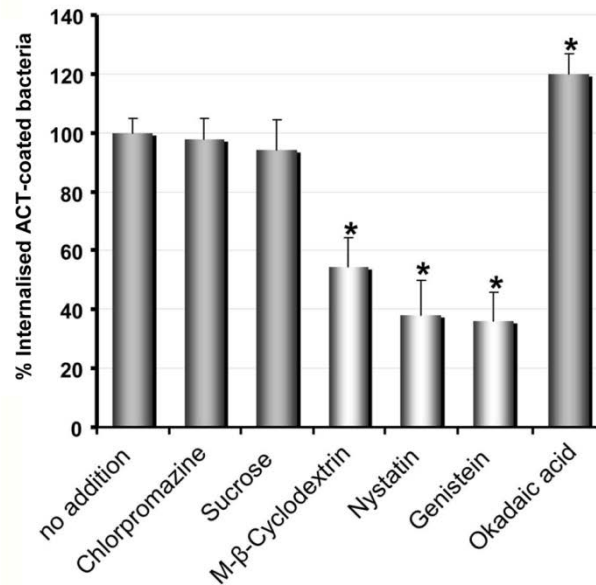
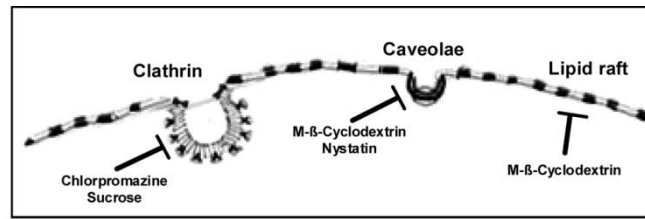


Figure 4. Characterization of the invasion pathway of “ACT-coated bacteria”. Several inhibitors of the different possible entry routes were analyzed and it was concluded that “ACT-coated bacteria” exploits a clathrin-independent, cholesterol-dependent (caveolae-dependent) entry pathway to invade CHO-K1 cells, and that it requires the activation of tyrosine kinases. CHO-K1 cells were pre-incubated with chemical inhibitors (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chlorpromazine, 450 mM sucrose, 10 mM methyl- β -cyclodextrin, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nystatin, 100 μM genistein and 1 μM okadaic acid) for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, then cell invasion was assayed as described in *Methods*. Chlorpromazine, sucrose and methyl- β -cyclodextrin were dissolved in DMEM, nystatin, genistein and okadaic acid, were dissolved in DMSO. Controls showing that vehicle buffer has no effect on internalisation are shown in supplementary Fig. S5. The data were normalized to the control sample (*no addition*) and expressed as per cent of control entry. Data shown are the mean \pm SD of at least three independent experiments performed in quintuplicate, with $*p < 0.01$.

Characterization of bacteria-containing endosomes

Detection of intracellular viable bacteria upon CHO-K1 cell invasion (Fig. 3b) suggested that classical endolysosomal fusion is likely avoided in the entry pathway followed by ACT-coated-bacteria. To explore this possibility we evaluated the features of bacteria-containing endosomes; endosome-containing intact CHO-K1 cells as well as purified endosomes isolated from CHO-K1 cells infected with “ACT-coated bacteria” were studied by different techniques (Fig. 5). Electron microscopy of ultrathin sections

of invaded CHO-K1 cells (Fig. 5a) revealed that *B. pertussis*-containing vesicles were Rab-5 positive (early endosomal marker) for as long as 2 h, as determined by the use of anti-Rab-5 immunogold-labeled antibodies (Fig. 5a). The same samples were LAMP-1 negative (late endosomal marker) at all tested time points (Fig. 5a), supporting the hypothesis that the vesicles containing “ACT-coated bacteria” were non-acidic.

Immunoblotting of the membrane fractions of endosomes purified from the infected CHO-K1 cells after different periods of infection (5-120 min) revealed the simultaneous presence of ACT, Cav-1 (a major protein forming membrane caveolae), and Rab-5 (The same amount of protein was loaded in each case) (Fig. 5b). Confocal microscopy of endosomes purified from the infected cells (Fig. 5c) corroborated the co-localisation of ACT and Rab-5 on the membranes of bacteria-containing endosomes. Bacterial DNA was stained with the fluorescent marker Hoechst in order to visualise bacteria in the endosomes (Fig. 5c). Results very similar to those shown in Fig. 5c were obtained by infecting the CHO-K1 cells with the parental virulent *B. pertussis* (Supplementary Fig. S6).

Table I: Lipid composition of purified endosomal membranes purified after ACT-coated bacteria incubation with CHO-K1 cells

	Cholesterol		Sphingomyelin		Phospholipids	
% lipid composition	47.2	± 3.4	31.8	± 2.1	22.9	± 7.5

Table I: Lipid composition of purified endosomal membranes purified after ACT-coated bacteria incubation with CHO-K1 cells. Lipids were purified and quantified as previously described⁶⁰

Analysis of the lipid composition of purified endosomal membranes confirmed a high content of cholesterol and sphingomyelin in these membranes (Table I), in good agreement with our previous observation that methyl- β -cyclodextrin and nystatin, two cholesterol-depleting agents, substantially inhibit bacterial invasion (Fig. 4).

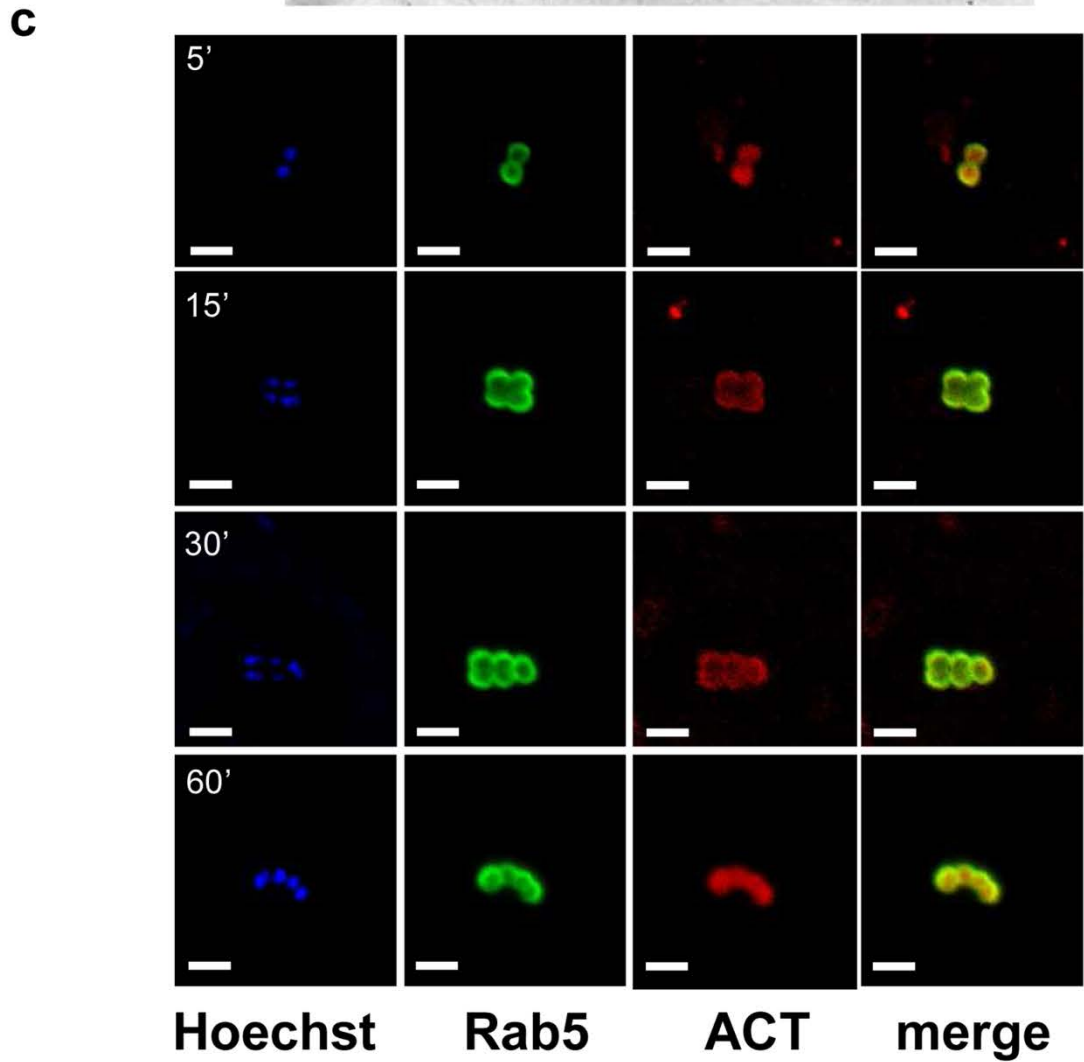
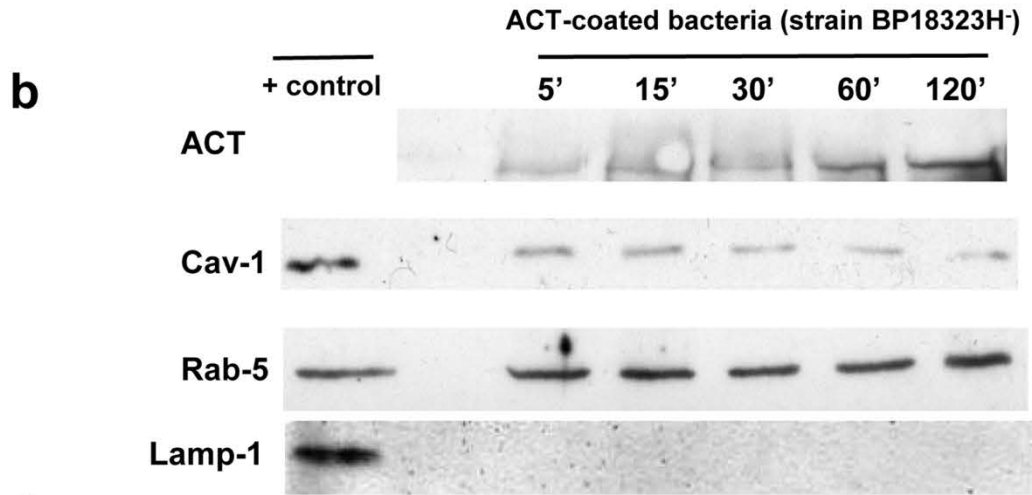
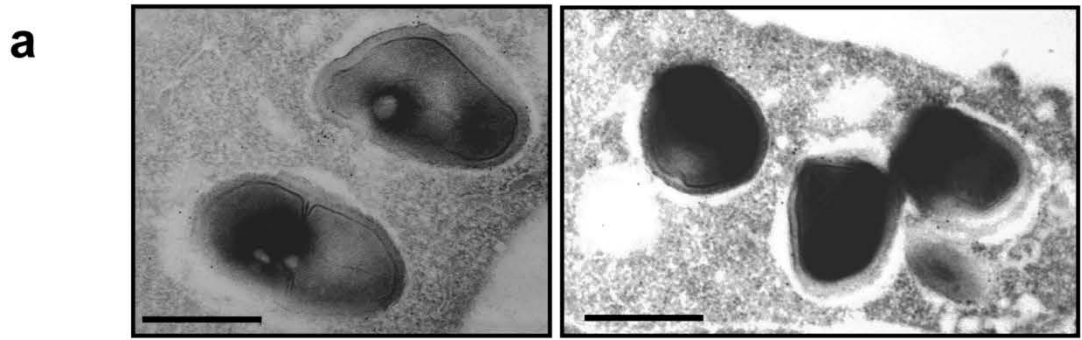


Figure 5. Characterization of bacteria-containing endosomes. Ultrathin cuts of infected cells (a) or endosome membranes isolated from the infected cells at different times of incubation (5-120 min) and submitted to SDS-PAGE electrophoresis (b), or purified endosomes isolated and purified from the infected cells (c), were respectively analysed by electron microscopy (a), by Western blot (b) or by confocal microscopy (c). Common markers of the different endocytic stages were used for the respective analysis: gold-labelled anti-Rab-5 Ab for the electron microscopy (a), or anti-**Rab-5** Ab, as early endosome marker; anti-**LAMP-1** Ab as late endosomal marker, and anti-**Cav-1** Ab as caveolae marker, in the Western blot assay. Equal protein amounts were loaded for each sample in the SDS-PAGE previous to the Western blot assay (b). For confocal analysis DNA was stained with Hoechst, Rab-5 was stained with a FITC-labelled secondary Ab, and ACT was stained with a Texas Red®-labelled secondary Ab (c). From the combination of all the data it was concluded that “ACT-coated *B. pertussis*” resides in Cav-1 positive, Rab-5 positive and LAMP-1 negative non-acidic compartments in the infected CHO-K1 cells. Representative images of three independent experiments are shown. Black scale bars, 1 µm; white scale bars, 2.5 µm

ACT is sufficient to promote cell invasion

Fluorescent polymeric particles (latex beads) coated with ACT were used to unambiguously determine whether ACT, in the absence of any other bacterial factor, is sufficient to induce bacterial invasion of non-phagocytic cells. To test this hypothesis our invasion assay was modified to include green fluorescent beads of 1 µm in diameter (similar to the size of *B. pertussis*) externally coated with purified ACT (following a protocol similar to that used to coat live bacteria). Identical particles coated with bovine serum albumin (BSA) instead of ACT were used as a negative control of invasion. Confocal z-stack images of CHO-K1 cells incubated with ACT-coated or BSA-coated beads were taken (Fig. 6). In this assay with fluorescent beads, to ensure that the ACT-coated beads are inside the cells, internalisation was visualised at high resolution and by z-stack image acquisition, due to the impossibility to quench the fluorescence signal of the fluorescent beads attached to the cell membrane. Cell nuclei were stained with Hoechst. ACT-coated beads adhered to the cell surface (Fig. 6b), likely before their internalisation, and the green fluorescence signal corresponding to engulfed ACT-coated beads was clearly visible in the interior of the cells (Fig. 6c). In the negative control, this is, cells incubated with BSA-coated beads (Fig. 6a), the green fluorescence was only visible outside the cells, in some cases attached to the cell surface (Fig. 6a), suggesting that ACT was necessary and sufficient to promote the engulfment of the latex beads by CHO-K1 cells. We conclude that ACT by itself promotes the bacterial invasion of non-phagocytic cells.

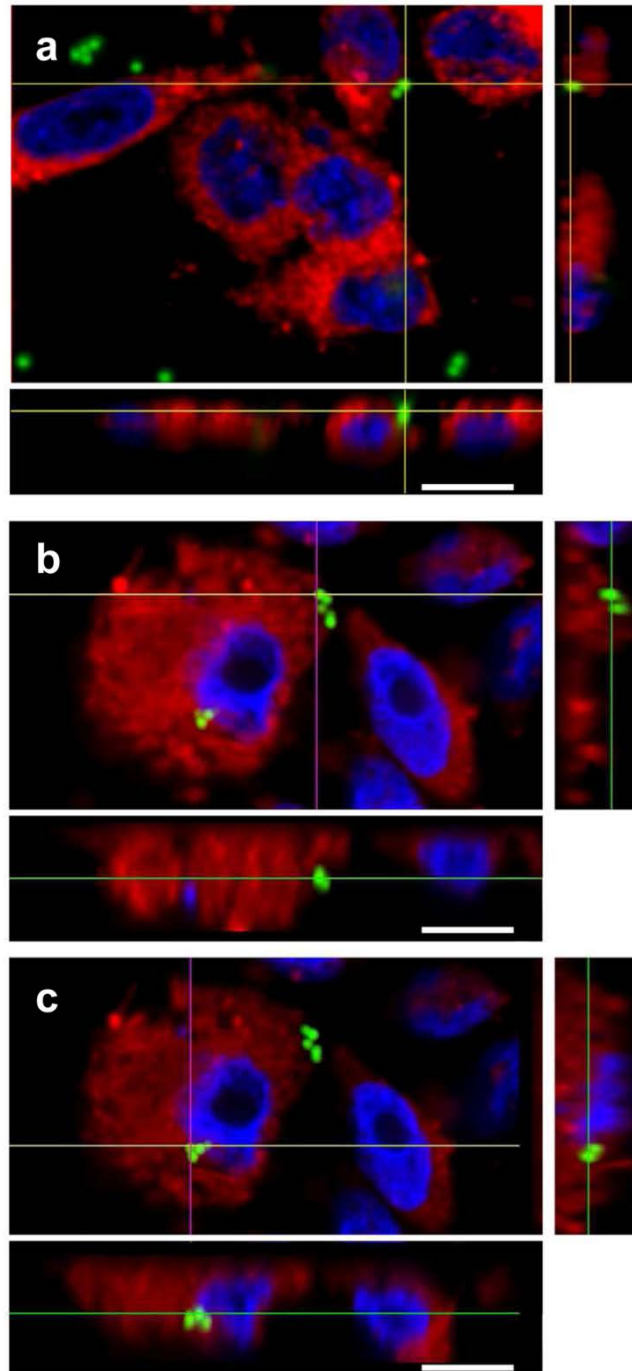


Figure 6. ACT is sufficient to promote internalisation of “toxin-coated beads”. CHO-K1 cells were incubated with fluorescent “ACT-coated beads” (green fluorescence) and invasion assay and confocal microscopy analysis were performed as described in *Methods*. In control cells treated with BSA-coated beads the fluorescent beads were outside the cells (**a**), analysis of the microscopy images revealed the presence of some fluorescent “ACT-coated” beads just “attached” or adhered to cell membranes (**b**) while other beads were clearly detected inside the cells (**c**). For Z-stack confocal analysis, cell membranes were stained with DiI (*red*) and DNA with Hoechst (*blue*). Representative images of three independent experiments are shown. Scale bars, 10 μm .

Ca²⁺ influx is required for the bacterial uptake

In previous work from this laboratory we had observed that the internalisation of purified ACT required elevation of intracellular Ca²⁺ ³². We had also previously noted that this toxin induces rapid Ca²⁺ influx through activation of PKA-dependent L-type Ca²⁺ channels ⁴³. Hence, we explored whether Ca²⁺ was also necessary for the ACT-mediated bacterial uptake, and for that we used two pharmacological inhibitors. Pre-incubation of the CHO-K1 cells with nifedipine (10 µM), inhibitor of L-type Ca²⁺ channels, reduced bacterial entry by ~50% (Fig. 7). Pre-treatment of CHO-K1 cells with KT5720 (56 nM), which specifically inhibits cAMP-dependent protein kinase A (involved in the activation of L-type channels), resulted in a similarly decreased invasion (Fig. 7). These results strongly suggest that Ca²⁺ influx induced by ACT is necessary for the uptake of the “ACT-coated bacteria”.

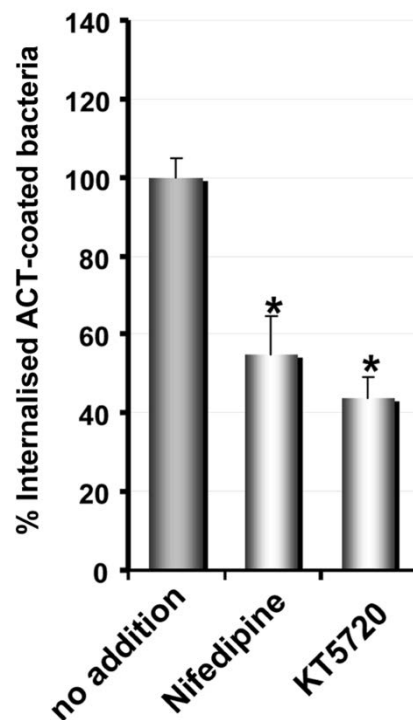


Figure 7. ACT-induced Ca²⁺ influx is necessary for the uptake of “ACT-coated bacteria”. CHO-K1 cells were pre-incubated for 30 min at 37°C with nifedipine (10 µM), an inhibitor of L-type Ca²⁺ channels, or with KT5720 (56 nM), which specifically inhibits cAMP-dependent protein kinase A (involved in the activation of L-type channels), then the pretreated cells were exposed to “ACT-coated bacteria”, and the invasion assay was performed as described in *Methods*. The data were normalized to the control cells (no inhibitor addition) and expressed as per cent of control entry. Data shown are the mean ± SD of at least three independent experiments performed in quintuplicate, with *p<0.01.

DISCUSSION

A number of studies have provided evidence that *B. pertussis* is capable of cell invasion using both primary cell cultures and cell lines⁶⁻¹¹. However the precise mechanism used by *B. pertussis* for cell entry, or the putative bacterial factors involved in invasion are not yet fully understood. In this work we have found that adenylate cyclase toxin (ACT), a major virulence factor secreted by *B. pertussis*, promotes invasion of this pathogenic bacterium into CHO-K1 non-phagocytic cells, in a Ca²⁺- and Tyr-kinase-dependent manner.

ACT, as other members of the RTX family, is a large hydrophobic-amphipathic toxin, with a high tendency to aggregation. In the context of *B. pertussis* infection it has been suggested that ACT proteins might form an atmosphere of active toxin molecules around the bacterial cell³³. Here we have somehow “mimicked” this situation by “coating” the surface of live bacteria with low ACT concentrations. The *B. pertussis* strain used here for ACT-coating (strain BP18323H) does not express bgv-regulated virulence factors, including filamentous hemagglutinin (FHA), which was reported to retain ACT on the bacterial surface by physical association with it hindering ACT from reaching and intoxicating the target cell^{44,45}. In the “ACT-coated” bacteria used here the toxin attached to the bacterial surface is cAMP-producing and thus, active. We propose that ACT is associated to the bacterial surface through hydrophobic and/or electrostatic interactions mediated by its hydrophobic and RTX domains, and that this weak association keeps or preserves ACT in an active conformation, allowing its detachment from the bacterial outer membrane and subsequent insertion into close host cell membranes, eventually leading to ACT-mediated bacterial invasion.

For known invasive bacterial pathogens, bacterial entry into non-phagocytic cells relies on the binding of bacterial factor(s) to component(s) of the host cell surface. For *Shigella flexneri*, the interaction of Ipa proteins with $\alpha 5\beta 1$ integrin promotes entry of the bacteria into epithelial cells⁴⁶. In the case of *Yersinia*, the outer membrane protein invasin binds to $\beta 1$ integrin receptors, leading to bacterial entry⁴⁷. For *Listeria monocytogenes* host E-cadherin serves as a receptor for the bacterial protein internalin (InlA) to enter human enterocyte-like epithelial cell line Caco-2 and some other epithelial cells⁴⁸. In sharp contrast, we find here that ACT-mediated bacterial

internalization does not necessarily require a toxin-receptor interaction, as both the virulent parental *B. pertussis* BP18323 bacteria and the non-virulent ACT-coated bacteria (BP18323H strain), and even ACT-coated latex beads are similarly taken up by CHO-K1 cells, a non-phagocytic cell line that does not express the ACT receptor, the β 2 integrin CD11b/CD18. Consistent with this, it was observed that ACT itself is internalized both by receptor-bearing cells³² and by cells that do not express the CD11b/CD18 toxin-receptor³², suggesting that the hydrophobic-amphipathic nature of ACT is enough to allow productive attachment to a variety of host cell membranes.

Consistent with the idea that bacterial uptake requires host cytoskeleton rearrangements including F-actin or microtubules^{36,49} we observe here that the cell actin cytoskeleton is prominently remodeled upon contact with parental *B. pertussis*, with a visible destruction of actin filaments and the formation of membrane protrusions. A very similar effect, that is concentration dependent, is also observed upon incubation of CHO-K1 cells with purified ACT, thus suggesting that the toxin itself triggers the required signals to rearrange the actin filaments. Restructuring of the cell actin cytoskeleton may be caused by different signaling events. Modifications in the intracellular Ca^{2+} and cAMP-mediated signalling have been involved in perturbations of the actin cytoskeleton homeostasis in different cells^{50,51}. ACT generates rises in cAMP levels in the cytosol of the target cells¹⁷ and induces intracellular Ca^{2+} rises⁴³, thus both factors may be involved in the effects on the cytoskeleton observed here. In support of this we observe an important reduction in bacterial entry under conditions in which the ACT-induced Ca^{2+} -influx is inhibited.

We find that ACT-coated bacteria follow a cholesterol-dependent, caveolae-dependent entry pathway in which bacteria-containing vesicles remain as early endosomes (Cav-1-positive, Rab-5-positive, LAMP-1-negative), thus avoiding fusion with lysosomes. This mechanism is part of the virulence strategies of several invasive bacteria, allowing them to evade intracellular death⁴¹. Our observations are in agreement with earlier studies indicating that *B. pertussis* survives in non-acidic compartments of human macrophages¹¹ or in respiratory epithelial cells³⁹.

We show evidences that internalisation of ACT-coated bacteria shares several features with the endocytosis of the purified toxin, namely the requirement for Ca^{2+} -influx and the involvement of tyrosine kinases³². This suggests that a similar common

entry route is activated and is involved in both processes. Tyrosine kinases are key signaling molecules involved in diverse processes of nucleated cells. In the internalisation of the purified ACT by the CHO-K1 cells we discovered that phosphorylation of key components of the endocytic machinery involved in the caveolae-mediated ACT uptake is required³². Recently, tyrosine kinases have been involved in F-actin restructuring at the *Listeria monocytogenes* entry site⁵², suggesting that these signaling proteins may be key collaborators in bacterial internalisation processes. Ca²⁺ influx was also reported to be essential for *L. monocytogenes* entry into nonphagocytic cells⁴².

Determination of the intracellular bacteria taken up by CHO-K1 cells indicates that ACT-mediated internalisation of *B. pertussis* is not as efficient as the entry of other well known “invasive” bacteria such as *Listeria* or *Salmonella*. Nevertheless, pathogenic *B. pertussis* produces other factors such adhesins which have been reported to contribute to invasion¹⁰ and that might increase the efficiency of bacterial uptake *in vivo*. Human cell invasion may not be the main *B. pertussis* pathogenic pathway, but the fact that it expresses virulence factors such as ACT that are able to induce the engulfment of bacteria led us to speculate that during the infection process non-phagocytic cells could be a favorable medium to evade the host immune system, increasing the viability and persistence in the host.

In contrast to invasion by the invasive bacterium *Listeria monocytogenes* and other bacterial species⁵³, the clathrin-mediated endocytosis machinery does not seem to be involved in the ACT-promoted engulfment of *B. pertussis*, at least in the non-phagocytic cells (CHO-K1 cells) tested here. However we cannot discard the possibility that in immune cells such as neutrophils and macrophages (which express the CD11b/CD18 integrin), a clathrin-dependent route will be involved in the uptake of ACT-coated bacteria, as we previously observed for the endocytosis of purified ACT by J774A.1 macrophages⁴⁰.

ACT is a hemolysin, thus the presence of “nude” free bacteria devoid of a vesicular membrane in the target cell interior led us to hypothesize that the endosome membranes might be directly permeabilized by ACT, allowing the entrapped bacteria to escape from the internalisation vesicles. In agreement with this hypothesis we found that the endosomes purified from the infected cells were permeable to the dye DAPI which penetrates and stains the bacterial DNA, strongly suggesting that the endosomal membranes are permeabilized by ACT. Lipid analysis of the bacteria-containing vesicle

membranes purified from the infected cells reveals a high content of sphingomyelin and cholesterol, two lipids typically found in membrane raft-domains. In previous investigations we determined that cholesterol facilitates ACT-induced permeabilization of liposomes⁵⁴. This suggests that cholesterol-rich domains may favor the ACT permeabilizing activity in the endosome membrane.

Few pathogenic bacterial species have developed the capacity to induce their own uptake into non-phagocytic cells, which confers significant advantages for pathogenesis, survival, or both. The observation that *B. pertussis* employs such a mechanism of cell entry suggests that it offers a selective advantage, for example extended protection from the host's immune system to allow the protracted release of toxins or effectors and to maintain a persistent infection. Given that ACT is highly immunogenic⁵⁵, we think that the inclusion of ACT into new vaccine preparations and the design of specific inhibitors to block ACT-promoted invasion are promising steps for future whooping cough treatments.

METHODS

Antibodies and reagents

Anti-adenylate cyclase toxin RTX domain mouse monoclonal antibody (MAb 9D4) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-Rab-5 and anti-LAMP-1 from Cell Signalling technology (USA); anti-caveolin-1, sucrose, ficoll, methyl- β -cyclodextrin, nystatin, nifedipine, chlorpromazine, and genistein from Sigma-Aldrich (St Louis, MI, USA); KT5720, calpeptin, and Okadaic acid from Calbiochem (Merck, Germany); Fluospheres[®] sulphate microspheres (latex beads), Hoechst, anti-mouse Texas Red[®], anti-rabbit FITC, Vibrant DiI and Alexa Fluor[®] phalloidin from Invitrogen, Molecular Probes (Carlsbad, CA, USA). Bacto[™] proteose peptone, Difco[™] Bordet Gengou Agar base from BD Biosciences (Spain). Gentamicin was from Gibco Thermo Fisher Scientifics, USA.

Bacterial strains and culture conditions

Bacterial strains used in this study (*B. pertussis* 18323H and 18323H)^{37,38} were cultured on BG agar (BD Biosciences, Spain) supplemented with 15% defibrinated sheep blood (Microlab-Pronadisa, Laboratorios Conda, Bilbao, Spain) for 48h at 37°C. The two bacterial strains were kindly provided by Dr. Nicole Guiso, Institute Pasteur, Paris, France.

Cell culture

CHO-K1 cells (ATTC, number CCL-61) were cultured at 37°C in DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS, and 4 mM L-glutamine in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

ACT expression and purification

ACT was expressed in *Escherichia coli* XL-1 blue cells (Stratagene) transformed with pT7CACT1 plasmid, kindly provided by Dr. Peter Sebo (Institute of Microbiology of the ASCR, v.v.i., Prague, Czech Republic) and purified and characterized as previously described^{54,56,57}.

Binding of purified ACT to *Bordetella pertussis* 18323H

Bordetella pertussis 18323H was grown in BG liquid medium for 48 h at 37°C under constant stirring until O.D. (650 nm)= 1.0 which is equivalent to $\approx 2.5 \times 10^7$ bact/mL, then, centrifuged at 6,000 x g for 5 min, resuspended in DMEM culture medium and incubated with different initial concentrations (5-100 $\mu\text{g}/10^6$ bacteria) of ACT. The mixture (ACT and bacteria) was incubated in eppendorf tubes on a rotating wheel at

room temperature for 1 h, then bacteria were centrifuged at 1,000 x g for 5 min and washed 5 times with fresh medium to remove unbound toxin before co-incubation with CHO-K1 cells. Quantification of the real amount of ACT bound to the bacteria (triplicate) was performed by western blot using as standard known purified ACT concentrations. For bacterial invasion assays the preparation typically contained 0.55µg ACT bound /10⁶ bacteria (which corresponded to ≈ 20 µg of ACT incubated with 10⁶ bacteria). This ACT concentration was used as CHO-K1 cell viability was minimally affected during co-incubation under these conditions.

Measurement of cAMP

cAMP produced by ACT-coated bacteria (*Bordetella pertussis* 18323H) (incubation of 5-100 µg ACT/10⁶ bacteria) was assayed for 10 min at 37°C with 2 nM CaM in AC reaction buffer (30 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM MgCl₂ and 100 µM CaCl₂), then the reaction was started by addition of 5 mM ATP. After 10 min at 37°C with continuous stirring, the reaction was stopped with 0.1 M HCl. The cAMP production was calculated by the direct cAMP EIA kit (Enzo lifesciences).

Bacterial invasion assays

Bacterial invasion assays were performed according to the method of gentamicin survival⁵⁸. CHO-K1 cells in DMEM were incubated with virulent *B. pertussis* strain 18323H or ACT-coated *B. pertussis* 18323H at a multiplicity of infection (moi) of 100 bacteria per cell and centrifuged at 700 x g for 10 minutes at 21°C. Cells were then placed for 2 h at 37°C and 5% CO₂. After incubation cells were washed with DMEM, and subsequently incubated with fresh gentamicin-containing DMEM (100µg/ml gentamicin), for an additional 1 h. Cells were repeatedly washed and then lysed with 0.1% Triton X-100. The number of viable bacteria inside the cells was assessed by plating on BG agar plates supplemented with 15% sheep blood and counting the colonies grown. The % of internalised bacteria was calculated as the number of CFU/total added bacteria x100. Each experiment was done in triplicate, and triplicates were performed 3 or more times independently. Control experiments to assess the efficacy of antibiotic bactericidal activity were performed in parallel, briefly, samples 2 x 10⁸ bacteria were incubated with DMEM containing gentamicin (100 µg/ml) for 1 h at 37°C and then plated on BG agar. This antibiotic exposure resulted in 99.999% decrease in CFU.

Confocal microscopy

CHO-K1 cells were grown to sub-confluency on Permax Lab-Tek chambers in DMEM, supplemented with 10% (v/v) FBS, L-glutamine, penicillin and streptomycin. Purified ACT (2 and 5 μ /ml) or ACT-coated bacteria (20 μ /ml) were added to the medium and incubated with the cells for 2 h. Cells were washed in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, fixed in 3.7% formaldehyde, and permeabilized in the presence of acetone for 3 min at -20°C . To visualise actin cytoskeleton and DNA cells were stained with Alexa Fluor®488 phalloidin and Hoechst, respectively. For ACT-coated latex beads cellular localisation, beads were incubated with CHO-K1 cells for 2 h, then cells were washed in PBS, fixed and cellular membranes were labelled with vibrant DiI to allow a better detection of internalised latex beads. Z-stack images were obtained in a 0.2 μ m slides and fluorescent latex beads and Vibrant DiI were visualised under a 488 or 546 excitation laser beam, respectively. To visualise endosomes containing wt *Bordetella pertussis* or ACT-coated bacteria, isolated endosomes were adsorbed to polylysine-coated cover slids and then fixed in 3.7% formaldehyde, and permeabilized in the presence of acetone for 3 min at -20°C . Endosomes were stained with anti-RTX and anti-Rab5 primary monoclonal antibodies followed by incubation with FITC- and Texas Red® conjugated secondary antibodies, respectively. Cells were then incubated for 10 min with Hoechst to visualise nuclei. Samples were visualised under a confocal microscope (Olympus FV500) with sequential excitation and capture image acquisition.

Electron microscopy and immunogold labelling

ACT-coated bacteria were added to CHO-K1 cell cultures and co-incubated for 2 h. Cells washed with PBS buffer pH 7.4 were fixed in 2% glutaraldehyde and 0.1% tannic acid in 0.1 M sodium cacodylate. After post-fixation in 1% OsO₄ samples were dehydrated and embedded in Polarbed 814 epon resin. For immunogold labelling cells fixed in 3% formaldehyde plus 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate were dehydrated in ethanol, then incubated in a mixture containing equal parts (v/v) ethanol and white LR at 20 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, followed by 24 h in pure resin at 20 $^{\circ}\text{C}$. After two further incubations in fresh resin, the samples were transferred into resin-filled gelatin and allowed to harden at 50 $^{\circ}\text{C}$. Sections of 60 to 80 nm were transferred onto nickel grids coated with Formvar film, blocked in PBS with 5% BSA, and incubated with primary antibodies. After washes with PBS-BSA, the grids were placed on droplets of gold-labeled secondary antibodies and then washed. Staining for contrast was

performed in a saturated aqueous solution of uranyl acetate for 5 min, followed by lead citrate for 5 s. Specimens were examined in a Philips 208S EM at 80kV.

Cytotoxicity assay

Cell viability of CHO-K1 cells incubated with bacteria was determined by the lactate dehydrogenase (LDH) release assay as described by Bergmeyer and Bernt⁵⁸, using the LDH Cytotoxicity assay kit (Innoprot, Spain). % Cytotoxicity = (Experimental - Blank)/Control - Blank) x 100.

Preparation of ACT-coated beads

Coating of latex beads with purified ACT was performed by incubation of 10^6 beads with 80 μg ACT or BSA in DMEM on a rocker for 1 h at room temperature. Quantification of the ACT bound to the beads was performed by western blot using purified ACT as standard. Approximately $5.1 \mu\text{g} \pm 1.9$ of ACT/ 10^6 beads was determined. ACT or BSA-coated latex beads were washed three times in PBS, pH 7.4, then cells were incubated with the coated beads (Bead/CHO-K1 = 10) at 37°C and 5% CO₂ for 2 h, after which they were washed twice with DMEM, and processed for immunofluorescence analysis.

Western blotting

Proteins were separated electrophoretically on 8.5% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membrane. The membranes were then blocked overnight at 4°C, and after 2 h of incubation with the corresponding primary antibodies, membranes were washed and exposed to the secondary antibodies for 1 h at room temperature. Proteins were detected using the enhanced chemiluminescence detection system (ECL®, Amersham Biosciences).

Isolation of bacteria-containing endosomes from infected CHO-K1 cells

CHO-K1 cells were grown to 80% confluence in 175T culture flask in DMEM as described above. Then, bacteria were added at a moi of 100 bacteria per cell. At different incubation times, medium containing free bacteria was discarded and cell monolayers were washed extensively with PBS at 37°C to remove non-internalised bacteria. Then, bacteria containing-endosomes were isolated by discontinuous sucrose density gradient as described by Lürhmann and Haas⁵⁹.

Statistical Analysis

Significant differences between experimental groups were determined using Student's *t* test. For all analysis a *p*-value of less than 0.01 was considered statistically significant.

REFERENCES ACKNOWLEDGMENTS

Technical and human support provided by SGIker (Analytical and High-Resolution Microscopy in Biomedicine Service of UPV/EHU) and Rocío Alonso for excellent technical assistance are gratefully acknowledged. We also thank Dr. N. Guiso from the Pasteur Institute (Paris, France) for the *Bordetella pertussis* strains BP18323 and non-virulent *bgv* negative BP18323H. This study was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project BFU 2012-36241), and the Basque Government (Grupos Consolidados IT849-13 and ETORTEK Program). K.B.U and D.G.B. were recipients of a fellowship from the Bizkaia Biophysics Foundation. A.E.G. was a recipient of a research contract (INNPACTO 2010) and A.E.L. was a recipient of a fellowship from the University of the Basque Country (UPV/EH). A patent with reference N/Ref.: P1683USPC (2004) was approved.

Author Contributions: C.M. conceived and carried out experiments, analysed and interpreted data; A.E., K.B.U., A.E., D.G.B. and J.A. carried out experiments; F.M.G. and J.A. analysed and interpreted data; H.O. conceived, analysed and interpreted data and wrote the manuscript. All authors approved the submitted manuscript.

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

- 1 Guiso, N. Bordetella pertussis: why is it still circulating? *The Journal of infection* 68 Suppl 1, S119-124, doi:10.1016/j.jinf.2013.09.022 (2014).
- 2 Mooi, F. R., Van Der Maas, N. A. & De Melker, H. E. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiology and infection* 142, 685-694, doi:10.1017/S0950268813000071 (2014).
- 3 de Gouw, D., Diavatopoulos, D. A., Bootsma, H. J., Hermans, P. W. & Mooi, F. R. Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS microbiology reviews* 35, 441-474, doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00257.x (2011).
- 4 Friedman, R. L. Pertussis: the disease and new diagnostic methods. *Clinical microbiology reviews* 1, 365-376 (1988).
- 5 Higgs, R., Higgins, S. C., Ross, P. J. & Mills, K. H. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal immunology* 5, 485-500, doi:10.1038/mi.2012.54 (2012).
- 6 Bassinet, L. et al. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infection and immunity* 68, 1934-1941 (2000).
- 7 Ewanowich, C. A., Sherburne, R. K., Man, S. F. & Pepler, M. S. *Bordetella parapertussis* invasion of HeLa 229 cells and human respiratory epithelial cells in primary culture. *Infection and immunity* 57, 1240-1247 (1989).
- 8 Friedman, R. L., Nordensson, K., Wilson, L., Akporiaye, E. T. & Yocum, D. E. Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infection and immunity* 60, 4578-4585 (1992).
- 9 Hellwig, S. M., Hazenbos, W. L., van de Winkel, J. G. & Mooi, F. R. Evidence for an intracellular niche for *Bordetella pertussis* in broncho-alveolar lavage cells of mice. *FEMS immunology and medical microbiology* 26, 203-207 (1999).
- 10 Ishibashi, Y., Relman, D. A. & Nishikawa, A. Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous

- hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microbial pathogenesis* 30, 279-288, doi:10.1006/mpat.2001.0432 (2001).
- 11 Lamberti, Y. A., Hayes, J. A., Perez Vidakovics, M. L., Harvill, E. T. & Rodriguez, M. E. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infection and immunity* 78, 907-913, doi:10.1128/IAI.01031-09 (2010).
 - 12 Fedele, G., Bianco, M. & Ausiello, C. M. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: talented modulators of host immune response. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 61, 445-457, doi:10.1007/s00005-013-0242-1 (2013).
 - 13 Weiss, A. A. & Hewlett, E. L. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annual review of microbiology* 40, 661-686, doi:10.1146/annurev.mi.40.100186.003305 (1986).
 - 14 Leininger, E. et al. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesins pertactin and filamentous hemagglutinin. *Infection and immunity* 60, 2380-2385 (1992).
 - 15 Roberts, M. et al. Construction and characterization of *Bordetella pertussis* mutants lacking the vir-regulated P.69 outer membrane protein. *Molecular microbiology* 5, 1393-1404 (1991).
 - 16 Lee, C. K., Roberts, A. L., Finn, T. M., Knapp, S. & Mekalanos, J. J. A new assay for invasion of HeLa 229 cells by *Bordetella pertussis*: effects of inhibitors, phenotypic modulation, and genetic alterations. *Infection and immunity* 58, 2516-2522 (1990).
 - 17 Ladant, D. & Ullmann, A. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in microbiology* 7, 172-176 (1999).
 - 18 Hewlett, E. L. et al. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity. *The Journal of biological chemistry* 266, 17503-17508 (1991).
 - 19 Rhodes, C. R. et al. Structural consequences of divalent metal binding by the adenylyl cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Archives of biochemistry and biophysics* 395, 169-176, doi:10.1006/abbi.2001.2553 (2001).
 - 20 Welch, R. A. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Molecular microbiology* 5, 521-528 (1991).

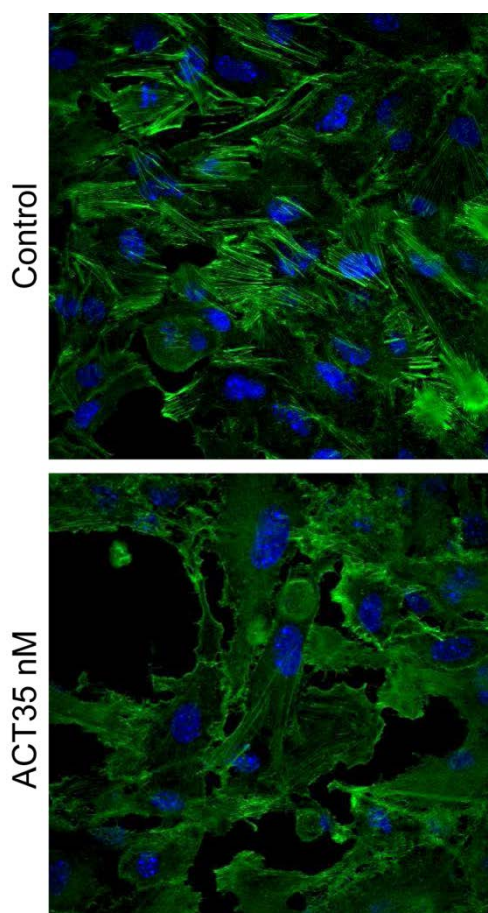
- 21 El-Azami-El-Idrissi, M. et al. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *The Journal of biological chemistry* 278, 38514-38521, doi:10.1074/jbc.M304387200 (2003).
- 22 Guernonprez, P. et al. The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the $\alpha(M)\beta(2)$ integrin (CD11b/CD18). *The Journal of experimental medicine* 193, 1035-1044 (2001).
- 23 Wolff, J., Cook, G. H., Goldhammer, A. R. & Berkowitz, S. A. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 3841-3844 (1980).
- 24 Confer, D. L. & Eaton, J. W. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* 217, 948-950 (1982).
- 25 Fedele, G. et al. *Bordetella pertussis* commits human dendritic cells to promote a Th1/Th17 response through the activity of adenylate cyclase toxin and MAPK-pathways. *PloS one* 5, e8734, doi:10.1371/journal.pone.0008734 (2010).
- 26 Leef, M., Elkins, K. L., Barbic, J. & Shahin, R. D. Protective immunity to *Bordetella pertussis* requires both B cells and CD4(+) T cells for key functions other than specific antibody production. *The Journal of experimental medicine* 191, 1841-1852 (2000).
- 27 Mills, K. H., Barnard, A., Watkins, J. & Redhead, K. Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Infection and immunity* 61, 399-410 (1993).
- 28 Paccani, S. R. et al. Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Infection and immunity* 76, 2822-2832, doi:10.1128/IAI.00200-08 (2008).
- 29 Rossi Paccani, S. et al. The adenylate cyclase toxins of *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis* promote Th2 cell development by shaping T cell antigen receptor signaling. *PLoS pathogens* 5, e1000325, doi:10.1371/journal.ppat.1000325 (2009).
- 30 Eby, J. C., Gray, M. C., Mangan, A. R., Donato, G. M. & Hewlett, E. L. Role of CD11b/CD18 in the process of intoxication by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Infection and immunity* 80, 850-859, doi:10.1128/IAI.05979-11 (2012).

- 31 Gray, M. C. & Hewlett, E. L. Cell cycle arrest induced by the bacterial adenylate cyclase toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. *Cellular microbiology* 13, 123-134, doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01525.x (2011).
- 32 Uribe, K. B. et al. Ca²⁺ influx and tyrosine kinases trigger *Bordetella* adenylate cyclase toxin (ACT) endocytosis. Cell physiology and expression of the CD11b/CD18 integrin major determinants of the entry route. *PloS one* 8, e74248, doi:10.1371/journal.pone.0074248 (2013).
- 33 Vojtova, J., Kamanova, J. & Sebo, P. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Current opinion in microbiology* 9, 69-75, doi:10.1016/j.mib.2005.12.011 (2006).
- 34 Pittman, M. Genus *Bordetella*. In *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, Voll (Krieg NR, Holt JG, Eds.) pp.383-393. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. (1984).
- 35 Khelef, N., Sakamoto, H. & Guiso, N. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microbial pathogenesis* 12, 227-235 (1992).
- 36 Alonso, A. & Garcia-del Portillo, F. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 7, 181-191 (2004).
- 37 Gueirard, P., Bassinet, L., Bonne, I., Prevost, M. C. & Guiso, N. Ultrastructural analysis of the interactions between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and human tracheal epithelial cells. *Microbial pathogenesis* 38, 41-46, doi:10.1016/j.micpath.2004.08.003 (2005).
- 38 Miller, V. L. & Falkow, S. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infection and immunity* 56, 1242-1248 (1988).
- 39 Lamberti, Y., Gorgojo, J., Massillo, C. & Rodriguez, M. E. *Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathogens and disease* 69, 194-204, doi:10.1111/2049-632X.12072 (2013).
- 40 Martin, C., Uribe, K. B., Gomez-Bilbao, G. & Ostolaza, H. Adenylate cyclase toxin promotes internalisation of integrins and raft components and decreases macrophage adhesion capacity. *PloS one* 6, e17383, doi:10.1371/journal.pone.0017383 (2011).

- 41 Moulder, J. W. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiological reviews* 49, 298-337 (1985).
- 42 Bonazzi, M. et al. Clathrin phosphorylation is required for actin recruitment at sites of bacterial adhesion and internalization. *The Journal of cell biology* 195, 525-536, doi:10.1083/jcb.201105152 (2011).
- 43 Martin, C., Gomez-Bilbao, G. & Ostolaza, H. Bordetella adenylate cyclase toxin promotes calcium entry into both CD11b⁺ and CD11b⁻ cells through cAMP-dependent L-type-like calcium channels. *The Journal of biological chemistry* 285, 357-364, doi:10.1074/jbc.M109.003491 (2010).
- 44 Gray, M. C., Donato, G. M., Jones, F. R., Kim, T. & Hewlett, E. L. Newly secreted adenylate cyclase toxin is responsible for intoxication of target cells by *Bordetella pertussis*. *Molecular microbiology* 53, 1709-1719, doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04227.x (2004).
- 45 Zaretzky, F. R., Gray, M. C. & Hewlett, E. L. Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Molecular microbiology* 45, 1589-1598 (2002).
- 46 Watarai, M., Funato, S. & Sasakawa, C. Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with $\alpha 5\beta 1$ integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *The Journal of experimental medicine* 183, 991-999 (1996).
- 47 Isberg, R. R. & Leong, J. M. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60, 861-871 (1990).
- 48 Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R. M. & Cossart, P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84, 923-932 (1996).
- 49 Chu, W. H. & Lu, C. P. Role of microfilaments and microtubules in the invasion of EPC cells by *Aeromonas hydrophila*. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 52, 180-182, doi:10.1111/j.1439-0450.2005.00842.x (2005).
- 50 Brunig, I., Kaech, S., Brinkhaus, H., Oertner, T. G. & Matus, A. Influx of extracellular calcium regulates actin-dependent morphological plasticity in dendritic spines. *Neuropharmacology* 47, 669-676, doi:10.1016/j.neuropharm.2004.07.038 (2004).

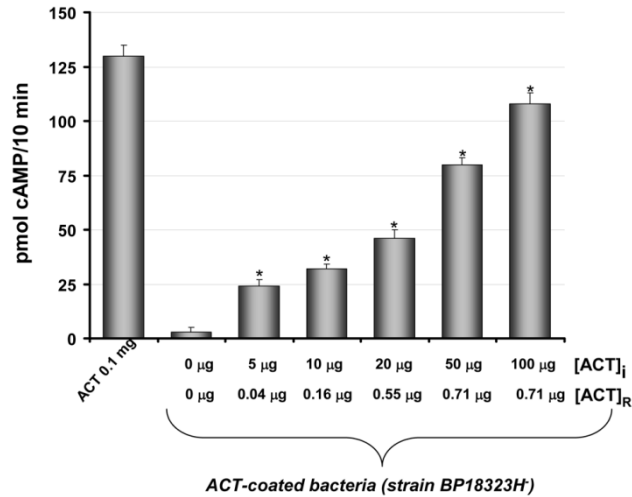
- 51 Downey, G. P. et al. Biophysical properties and microfilament assembly in neutrophils: modulation by cyclic AMP. *The Journal of cell biology* 114, 1179-1190 (1991).
- 52 Stavru, F., Archambaud, C. & Cossart, P. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunological reviews* 240, 160-184, doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00993.x (2011).
- 53 Veiga, E. et al. Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection. *Cell host & microbe* 2, 340-351, doi:10.1016/j.chom.2007.10.001 (2007).
- 54 Martin, C. et al. Membrane restructuring by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin, a member of the RTX toxin family. *Journal of bacteriology* 186, 3760-3765, doi:10.1128/JB.186.12.3760-3765.2004 (2004).
- 55 Jones, S. et al. Protein coated microcrystals formulated with model antigens and modified with calcium phosphate exhibit enhanced phagocytosis and immunogenicity. *Vaccine* 32, 4234-4242, doi:10.1016/j.vaccine.2013.09.061 (2014).
- 56 Karimova, G., Dautin, N. & Ladant, D. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *Journal of bacteriology* 187, 2233-2243, doi:10.1128/JB.187.7.2233-2243.2005 (2005).
- 57 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).
- 58 Bergmeyer, H. & Bernt, E. *Methoden der enzymatischen Analyse*, 3rd edn. Verlag Chemie. Weinheim. pp 607-612. (1974).
- 59 Luhrmann, A. & Haas, A. A method to purify bacteria-containing phagosomes from infected macrophages. *Methods in cell science : an official journal of the Society for In Vitro Biology* 22, 329-341 (2000).
- 60 Ruiz, J. I. & Ochoa, B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. *Journal of lipid research* 38, 1482-1489 (1997).

Supplementary Figures

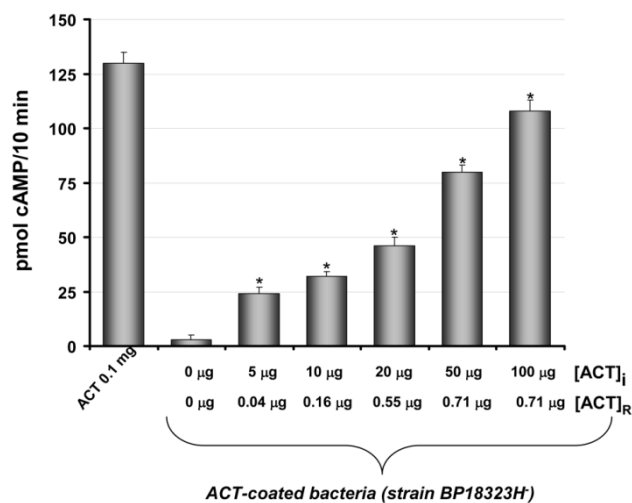


Supplementary Figure S1. Reorganisation of the cell cytoskeleton induced by ACT.

Exposure of CHO-K1 cells to purified ACT visibly affected cellular actin microfilament organization. CHO-K1 cells were treated with purified ACT (2 µg/mL), fixed, permeabilized and stained with Alexa Fluor® 488 phalloidin to visualize actin cytoskeleton and with Hoechst to visualize DNA as described in *Methods* Section. **(A)** Control. CHO-K1 cells treated with vehicle buffer **(B)** CHO-K1 cells incubated with 2 µg/mL ACT. Representative confocal images from three independent experiments are shown.

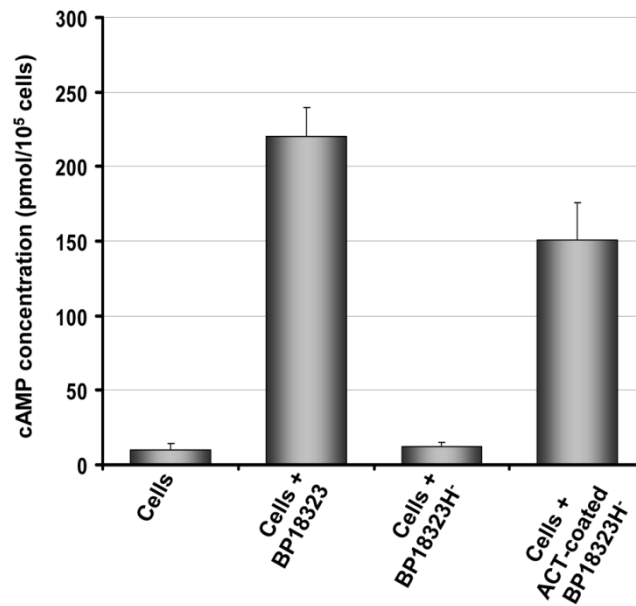


Supplementary Figure S2. Adenylate cyclase enzymatic activity of “ACT-coated bacteria”. The adenylate cyclase activity vs the amount of toxin bound to non-virulent *B. pertussis* (strain BP18323H), was measured as described in *Methods* Section. We incubated bacteria (1×10^6 bacteria) with different initial concentrations of pure ACT (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $[\text{ACT}]_i$) for 60 min under constant stirring to favor contact. Bacteria were washed to eliminate unbound toxin and the “attached” ACT was quantified as described in *Methods* Section. Quantification of the real amount of ACT bound to the bacteria, $[\text{ACT}]_R$, was performed in three independent experiments and the obtained values ranged from 0.04 to 0.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ μg of toxin bound per 10^6 bacteria. Data shown are the mean \pm SD of at least three independent experiments.

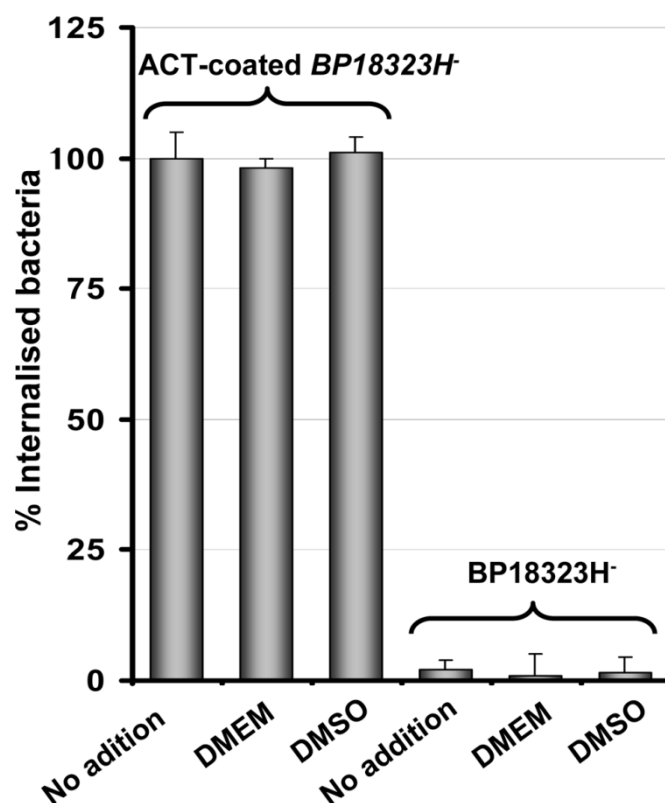


Supplementary Figure S3. Quantification of the number of internalized bacteria.

CHO-K1 cells were incubated with wt *B. pertussis*, with “ACT-coated bacteria” or with non-virulent strain BP18323⁻ for 2 h and invasion was followed as described in *Methods* Section. The number of internalized bacteria was quantified as described in *Methods* Section. Data shown are the mean \pm SD of at least three independent experiments.



Supplementary Figure S4. cAMP concentration in CHO-K1 cells incubated with wt *B. pertussis*, or “ACT-coated bacteria” or with uncoated strain BP18323H⁻ for 2 h. Bacterial invasion was followed as described in *Methods* Section. cAMP concentration was quantified as described in *Methods* Section. Data shown are the mean \pm SD of at least three independent experiments.



Supplementary Figure S5. Effect of vehicle solvents used in the characterization of the invasion pathway shown in Figure 4. CHO-K1 cells were pre-incubated for 30 min at 37 °C with the vehicles in which the chemical inhibitors were dissolved. Then cell invasion was assayed as described in *Methods* Section. Chlorpromazine, sucrose and methyl- β -cyclodextrin were dissolved in DMEM, nystatin, genistein and okadaic acid, were dissolved in DMSO. The data were normalized to the control sample (*no addition*) and expressed as per cent of control entry. Data shown are the mean \pm SD of at least three independent experiments performed in quintuplicate.

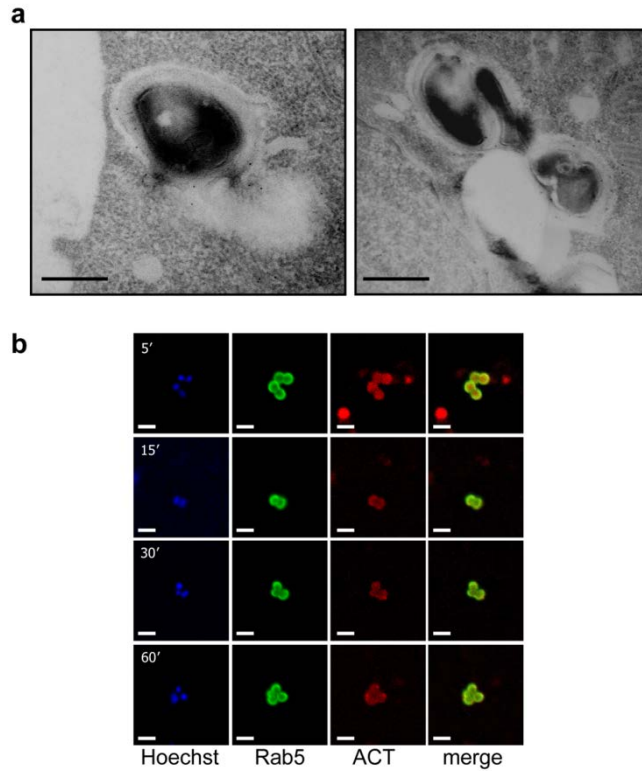


Figure S6. Endosomes purified from the infected cells were permeable to the dye DAPI. Confocal microscopy analysis of purified endosomes isolated from CHO-K1 cells infected with “ACT-coated bacteria” shows that bacteria-containing endosomes were permeable to the usually impermeable dye DAPI, which reached the endosome interior compartment and stained bacterial DNA. CHO-K1 cells were infected with “ACT-coated bacteria” and endosomes were purified and analysed as described in *Methods* Section, except that the permeabilization step with acetone was omitted.

