



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

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

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

Hil bizirauteko: *Pseudomonas aeruginosa*ren Tse5 toxinak, poroak sortzen ditu zelula etsaien mintzetan

*Amaia Gonzalez Magaña,
Jon Altuna Alvarez,
Carmen Velázquez Álvarez,
María Queralt Martín,
Antonio Alcaraz González
eta David Albasa Jové*

363-370 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.46>

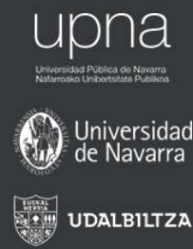
ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Hil bizirauteko: *Pseudomonas aeruginosa*ren Tse5 toxinak, poroak sortzen ditu zelula etsaien mintzetan

Amaia González-Magaña^{1,2}, Jon Altuna^{1,2}, Carmen Velázquez^{1,2},
María Queralto-Martín³, Antonio Alcaraz³, David Albesa-Jové^{1,2,4}

1. Biokimika eta Biologia Molekularra saila (UPV/EHU). 2. Biofisika Institutua (UPV/EHU, CSIC) eta Biofisika Bizkaia Fundazioa. 3. Biofisika Molekularren Laborategia, Fisika Departamentua, Jaume I Unibertsitatea (Castellon). 4. Ikerbasque, Basque Foundation for Science
amaia.gonzalezm@ehu.eus

Laburpena

Pseudomonas aeruginosa eragin kliniko handiko patogeno oportunista da. Bere birulentzia, hein handi batean, bakterioak dituen jariatze-sistemei zor zaie; horien artean, VI. Motako Sekrezio Sistema (T6SS) oso nabarmena da *P. aeruginosa*an. Xiringa moduko nanoaparatu honek, inguruko bakterioen barnean funtzio zelularrak eraso ditzaketen efektoreak jariatzen ditu. Hemen, hurbilketa biofisikoa erabiliz, *P. aeruginosa* injeztatuko Tse5 efektorearen mekanismo toxikoa karakterizatu dugu. Zehazki, Tse5ak bakterioen mintzetan poro ioi-selektiboak sortzeko gaitasuna duela erakusten dugu. Horrela, mikroorganismo lehiakideen mintzak despolarizatzen ditu, zelulen heriotza eraginez.

Gako-hitzak: Bakterio sekrezio sistema; *P. aeruginosa*; toxina poro-eragileak; Tse5 efektorea

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen of great clinical impact. Its virulence is largely due to the secretion systems possessed by the bacteria, among which the Type 6 Secretion System (T6SS) of P. aeruginosa stands out. This syringe like nanomachine injects effector proteins into competitor bacteria to subvert their key biological functions. Here, we describe the toxic mechanism of P. aeruginosa Tse5 effector, using a biophysical approach. In particular, we show the capacity of Tse5 to form ion-selective pores in bacterial bilayers, which results in membrane depolarisation and bacterial death.

Keywords: bacterial toxins; *P. aeruginosa*; pore-forming toxins; Tse5 effector

1. Sarrera eta motibazioa

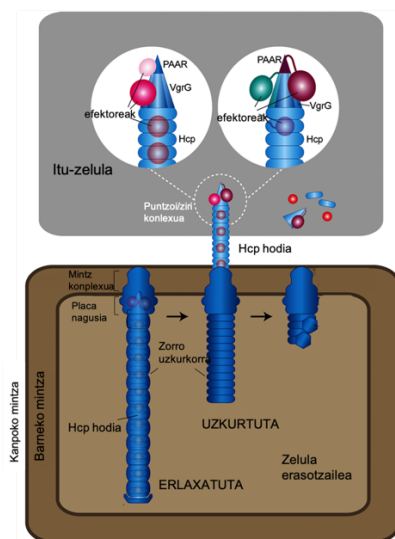
P. aeruginosa bakterio Gram-negatiboa pneumoniaren eragile nagusitakoa da munduan, batez ere, paziente immunodeprimituengan eta biriketako gaixotasunak dituzten pertsonengan. Antibiotikoen aurkako erresistentzia handia duenez, gero eta zailago bihurtzen ari da patogeno honek sortzen dituen infekzioak tratatzea. Horren ondorioz, MOEk (Munduko Osasun Erakundea) *P. aeruginosa* eragiten dituen infekzioei aurre egiteko tratamendu eta antibiotiko berrien garapenari lehentasuna eman behar diogula ohartarazi du (World Health Organization, 2017).

Bakterio horren patogenotasunaren mekanismo giltzarrietako bat VI. motako jariatze-sistema da (Ingelesezt *Type VI Secretion System* edo *T6SS*), horren bidez, efektoreak jariatzen baititu inguruko bakterio lehiakideen barnean. Beraz, T6SS sistemak egokitasun abantaila ematen du, sekrezio sistema hau duten bakterioen biziraupena sustatzeaz gain, nitxo ekologikoak kolonizatzeke erraztasuna ematen baitie (Bingle et al., 2008; Cianfanelli et al., 2016; Pukatzki et al., 2009). T6SS xiringa baten itxurako nano-gailua da, guztira 14 proteinak osatuta. Bakterioen barnean mihiztatzen da eta kontrakzio prozesu bati esker, efektoreak jariatzen ditu bakterio etsaien barnean. Injekzioa gauzatu ahal izateko sekrezio sistemaren osagaiak konplexu hauetan

antolatzen dira: zorro uzkurkorra, plaka nagusia, mintz-konplexua, barne-hodia eta puntzoi/ziri-konplexua (1.irudia) (Basler, 2015; Brunet et al., 2015; Durand et al., 2015; Kudryashev et al., 2015; Shneider et al., 2013; Zoued et al., 2014). Barne-hodia, Hcp deituriko proteinez osatuta dago (ingelesez *Haemolysin co-regulated* protein izenetik dator). Proteina horien polimerizazioak sortzen duen barne-hodi egituraren efektoreak kargatzen dira. Hodiaren goiko partean ziri konplexua dugu, VgrG deituriko proteinen trimero batek osatuta, forma konikoan hartzen duen PAAR sekuentzia bati lotuta egon daitekeena. Punta hori bakterio erasotzailearen eta itu-zelularen mintzak zeharkatzeko lagungarria dela uste da. Hortaz, zorro uzkurkorrak konformazio erlaxatuta eta uzkurtua har dezake, eta, hala, barne tubulua injekta daiteke efektoreekin zein puntzoi konplexuarekin batera, zelula-mintzak zeharkatuz (1.irudia). Toxinak jariatu bezain laster, konplexu osoa desegin egiten da eta ziklo berria hasi daiteke. T6SS efektoreak Hcp hodiaren barruan kapsulatu daitezke edota VgrG-PAAR puntarekin elkar eragin dezakete. Are garrantzitsuagoa, bakterioek efektore bakoitzarekin batera dagokion immunitate-proteina adierazten dute, auto-intoxikaziotik babesteko edo zelula ahizpak ere babesteko (Russell et al., 2012).

*P. aeruginosa*k hiru T6SS talde independente ditu bere genomak (H1, H2 eta H3-T6SS) (Boyer et al., 2009; Filloux et al., 2008). Orain arte ezagutzen diren H1-T6SSen menpeko efektoreek, jarduera anti-prokariotoa dute, hau da, beste bakterioen funtsezko egiturak edo funtzioak kaltetzen dituzte eurak gailentzearen. Azken hamarkadan, aurrerapauso nabariak egin dira T6SSren ezagutzan, baita bakterioen arteko lehian eta birulentzian duen garrantzia ulertzeko. Hala ere, jariatutako toxina gehienek identitateak eta funtzioak ezezagunak dira oraindik. Aipatu bezala, T6SSen mendeko efektoreen funtzio biologiko/molekularra, eta egitura ikertzeak, T6SSak patogenesisian eta bakterien lehian duen eginkizuna ulertzen ere lagunduko digu. Gainera, toxina horien egitura, funtzioa eta itu-zelularra deszifratzeak ikuspegi paregabea ematen digu antimikrobiano berriak garatzeko erronkan.

1. irudia. Bakterio Gram-negatiboen VI.Mota Sekrezio Sistemaren (T6SS) irudikapena (Coulthurst et al, 2019)



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

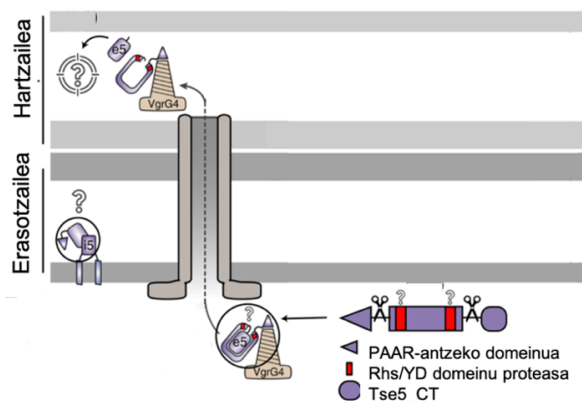
Lan honetan, Tse5 efektorearen (PA2684) (ingelesez *T6SS exported effector Tse5*) funtzio molekularra biofisikoki aztertzea proposatzen dugu. Tse5 *P. aeruginosa*ko anduien artean kontserbatuta dagoen H1T6SSen mendeko efektorea da, fibrosi kistiko eta bronkiektasia duten gaixoetatik isolatuta. Bi laborategik aurkitu zuten aldi berean,

2014. urtean, eta *E.coli* bakterioetan toxikoa zela deskribatu zuten (Hachani et al., 2014; Whitney et al., 2014). Dena dela, bere funtzioa, itu-zelularra eta mekanismo molekularra ezezagunak izan dira, gaur arte.

Dirudienez, Tse5ak VgrG4ren puntarekin elkar eragiten du bere PAAR antzeko motiboaren bitartez, H1T6SS bidez jariatuta izateko itu-zeluletan. Gainera, bakterioek Tse5 ekoitzi ahal, Tsi5 (PA2683) immunitate proteina ere adierazten dute, bere burua toxikotasunetik babesteko (Hachani et al., 2014; Whitney et al., 2014). Izan ere, VgrG4, Tse5 eta Tsi5en sekuentziak elkarrekin kodifikatuta agertzen dira beti bakterioaren genomak eta promotore berdinen menpe daude, hau da, batera adierazten dira. Iragarpen tresna bioinformatikoi esker Tsi5ak bi transmintz domeinu dituela ezagutzeaz gain, *Western-blot* eta lokalizazio azpi-zelularreko esperimenduek Tse5 mintz zitoplasmatikoan txertatu daitekeela frogatu dute (Hachani et al., 2014; Whitney et al., 2014). Hortaz, Tse5 mintzeko proteina integrala dela dirudienez, gure hipotesia Tse5ak bere funtzio toxikoa zelula mintzean betetzen duela da, bai zelula mintza iragazkortuz, bai potentziala aldatuz (**2.irudia**).

Tse5en azterketa bioinformatikoak hiru eremu bereizi aurrean ditu. Alde batetik, N-muturrean, proteina jariatzeko beharrezko den garraiorako domeinua (Tse5-NT). Honek, PAAR (Pro-Ala-Ala-Arg) antzeko motiboa du, VgrG4 puntarekin elkar eragiteko. Bestetik, Rhs izeneko (ingelesez *Rearrangement hot spot*) erdiko domeinu kontserbatua, YD (Tyr-Asp) sekuentzia errepikapenez osatuta. Azkenik, Tse5en C-muturrean domeinu toxikoa dago (hemendik aurrera Tse5-CT, ingelesez *C-terminal izenetik*), jardura toxikoa daukana, alegia. Tse5-CTak ez dauka inolako homologiarik ezagutzen diren proteinekin eta itxuraz, beste bi domeinuetatik askatu behar da bere funtzioa bete ahal izateko.

2. irudia. Tse5 efektoreari buruzko ikerketaren egoera. (Whitney et al., 2014)-tik moldatuta



Esan bezala, Tse5ak bere funtzio toxikoa mintzean betetzen duela berresteko eta bere funtzioa aztertzeko, hona hemen ikerketaren helburuak:

1. Tse5-CTren purifikatzea, ikerketa biofisikoak egin ahal izateko.
2. Tse5-CTak bakterio Gram-negatiboen mintzetan sartzeko joera aztertzea. Horretarako monogerruza lipidiko batean txertatzeko gaitasuna neurtuko da monogerruza esperimenduekin.
3. Tse5-CT toxina poro eragilea den ikertzea, elektrofisiologia esperimenduek bitartez.

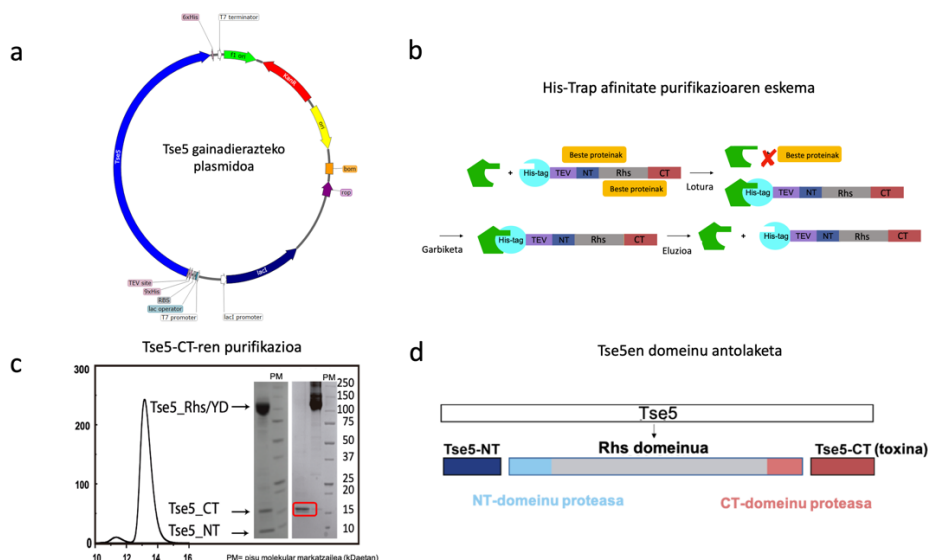
3. Ikerketaren muina

3.1 Tse5-CTren purifikazioa

Lehendabizi, Tse5-CT funtzio eta itu-zelularra aztertzeke, Tse5-CT proteina purua ekoiztu behar dugu. Tse5-CT hidrofobikoa denez, metodo arruntan bidez purifikatzea oso zaila da. Beraz, 146 kDa-eko Tse5 efektore osoa gainadierazi eta purifikatzea, eta hortik Tse5-CT peptidoa ateratzea erabaki dugu. Tse5 adierazteko, *Escherichia coli* Lemo21(DE3) zelula konpetenteak transformatu dira Tse5 proteinaren sekuentzia genetikoa duen plasmido batekin eta beharrezko antibiotikoak nahiz erramnosak duten LB plaketa erein dira. 3.a irudian plasmidoaren eskema ikusi daitekeenez, Tse5aren adierazpena T7 promotorearen menpe dago eta sekuentziaren aurrean histidina isatsa dauka, purifikazioa errazteko (**3.a irudia**). Isatsa moztu behar izanez gero, TEV sekuentzia ere gehitu da, TEV proteasak ezagutu eta moztu dezakeena. Gainera, kanamizina antibiotikoaren aurkako erresistentzia ematen dion genea ere badauka, plasmidoa barneratu duten bakteriak bakarrik hautatu ahal izateko. Lemo21(DE3) zelula konpetenteak erramnosarekin erregulatzen den plasmido gehigarria duten zelulak dira eta T7 promotorearen menpe dauden plasmidoen geneen adierazpena inhibitzeke gaitasuna daukate (Schlegel et al., 2012). Gure proteina toxikoa denez, bere adierazpen basala murrizteko ezin hobea da sistema hau. Proteinaren gainadierazpena sustatzeko, bakteriak kanamizina eta kloranfenikol antibiotikoak dituen LB kultibo-medioan hazten jarri dira 37°C-tan eta dentsitate optiko (DO)₆₀₀ = 0.8 balioetara heltzean, IPTG (ingelesez *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) induktorea gehitu zaie. Ondoren, kultiboen tenperatura 18°C-ra jaitsi eta 18 ordu inkubatzen utzi dira.

Zelulen lisiaren ostean, Tse5 frakzio disolbagarritik purifikatu da kromatografia sistema (ÄKTA FPLC; GE Healthcare) erabiliz eta gure proteina disoluzio indargetzailean edukiz. Lehenengo afinitate kromatografia urrats bat egin da (HisTrap HP zutabe batekin). Histidina isatsa zutabera itsatsiko da eta gainerako ezpurutasunetatik bananduko du gure intereseko proteina. Ondoren, gel iragazpenezko kromatografia (HiLoad Superdex 200 26/600 pg) egiten da (tamainaren arabera banatzen du), gainontzeko ezpurutasunak eta batez ere, oligomeroak kentzeko. **3.c irudian** ikus daitekeenez, gel iragazpenaren piko simetrikoak proteina purua dagoela adierazten digu. *SDS-PAGE*-ko gelean, aldiz, hiru zati bereiz daiteke, Tse5 proteinaren auto-ebakuntzaren ondorioz sortutakoak. Hiru zati hauek iragarritako 3 domeinuei dagokie: N-muturreko eremua (8 kDa), Rhs erdiko eremua (125kDa) eta Tse5-CT domeinu toxikoa (15 kDa) (**3d. irudia**).

3. irudia. a. Tse5 plasmidoren eskema **b.** HisTrap afinitate purifikazioaren eskema. **c.** Tse5-CT-ren purifikazioaren SDS **d.** Tse5 hiru domeinuz osatutako polipeptidoa da.



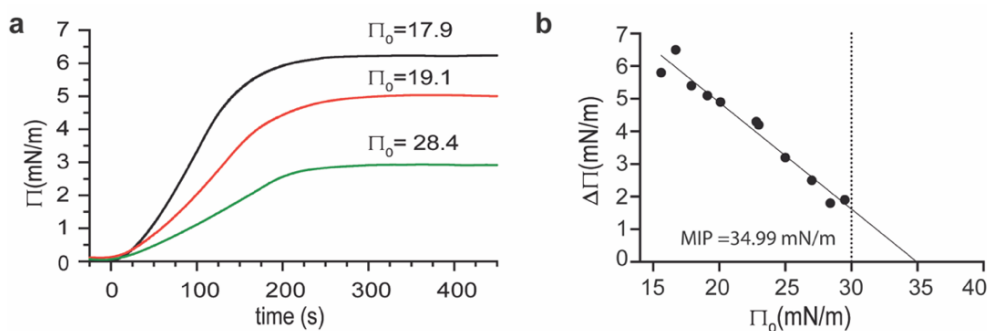
Lehenik, Tse5-CT beste bi zatietatik banandu ahal izateko 8M urean desnaturalizatu behar da Tse5 proteina purua. Ondoren, N-muturreko domeinua kentzeko, desnaturalizatutako proteina disoluzioa nikel erretxinarekin inkubatzen da (histidina isatsa duenez, itsatsita geldituko da

erretxinara eta beste bi peptidoak, aldiz, ez). Nahasketa zentrifugatu eta gero, erretxinatik banatzen dugu gainjalkina, Tse5-CT eta Rhs zatiekin. Azkenik, Rhs eta Tse5-CT peptidoak, amonio sulfatozko hauspeatze diferentziala eginez banatzen dira (Wingfield, 2016), 0.9 M eta 3M amonio sulfatorekin, hurrenez hurren. Behin Tse5-CT purifikatuta eta ur ultra puruarekin (MiliQ) zenbait garbiketa ziklo egin ostean (gatz hondakinak kentzeko), proteina liofilizatu eta konposatu organiko batean disolbatzen da. **3. irudiaren** eskuineko SDS-PAGE gelean, Tse5-CT proteina purua behatu daiteke.

3.2 Tse5-CT bakterio Gram-negatiboen mintz biologikoetan espontaneoki sar daiteke

Behin Tse5-CT proteina purifikatuta, monogeruza batean espontaneoki txertatzeko duen gaitasuna aztertu dugu, *Langmuir-Blodgett* teknika erabiliz (Maget-Dana, 1999; Pockels, 1926). Monogeruza prestatzeko, *E.coli* estraktu lipidikoa erabili dugu eta purifikatutako peptidoa gehitu ondoren, alboko presioaren aldaketa neurtu dugu. **4a irudian** Tse5-CT gehitzean albo presioaren igoera ikus daiteke denboran zehar, hasierako hainbat presioetatik abiatuz. Ohikoa denez, hasierako albo-presioa hazi ahala, peptidoaren txertaketa murriztu egiten da, albo presio kritiko batera heldu arte (Π_c). Izan ere, presioa altua denean, geruza oso paketatua dago eta ezin da ezer gehiago sartu. **4.b irudian**, grafikoaren puntuak esperimentu independenteei dagozkie ($n=11$). Zuzenaren erregresio linealak ($y = -0.3258x + 11.401$), txertaketa presio maximoaren edo MIP (ingelesez *Maximal insertion pressure*) balioa kalkulatzeko ahalbidetu digu, 34.99mN/m-koa, hain zuzen. Kontuan hartu behar da, mintz biologikoen kanpoko monogeruzaren lipidoen antolaketa 30/mN/m eta 35 mN/m bitarteko alboko azaleko presioetara hurbiltzen dela (**4b grafikoa**, puntu etenez adierazita) (Calvez et al., 2009; Demel et al., 1975). Hala bada, gure proteina gehitzean, alboko presioa kritikoa tarte horretako balioetan mugitzen bada mintz biologikoetan txertatzeko gai ohi dela esan nahi du. Datu horien arabera, Tse5 mintz biologikoetan espontaneoki txertatzeko gaitasuna daukala ondoriozta dezakegu.

4. irudia. Tse5-CT monogeruzetan txertatzeko gaitasun neurtzen da Langmuir-Blodgett esperimentuen bitartez.

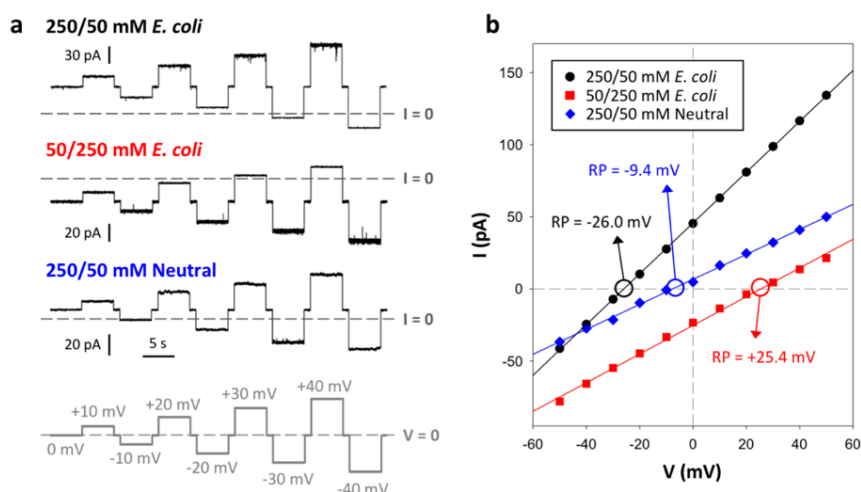


3.3 Tse5ek intoxikatutako bakterioen mintzetan poro ioi-selektiboak sor ditzake

Ondoren, elektrofisiologia esperimentuak egitea erabaki dugu, Tse5-CTek mintzean zehar ioiak garraiatzeko pororik sor dezakeen aztertzeko. Bi-geruza lauak eratzeko Montal-Mueller teknikan oinarritu gara (Montal & Mueller, 1972). Horretarako, bi monogeruza prestatu dira bi konpartimentuzko (*cis* eta *trans*) tefloizko zelda batean eta lipidoa gehitu da. Konpartimentuak 100 μm inguruko zulo bat duen tefloi film batez banatzen dira eta disoluzio indargetzailez betetzen dira. Modu horretan, disoluzioen maila zuloaren gainetik igotzean, mintz lau bi-geruzen aposiziotik sortzen da. Liofilizatutako Tse5-CT DMSO (ingelesez *dimethyl sulfoxide*) konposatu organikoan disolbatu ondoren, bi-geruza lau ko sistemen *cis* aldean gehitu, boltajea ezarri eta korranteak neurtu ditugu. Saiakerak egiteko *E.coli* estraktu lipidiko polarra erabili da (bakterio Gram-negatiboen eredu moduan, batez ere, karga negatibozko lipidoz osatuta) eta kontrolak egiteko, aldiz, DOPE (ingelesez *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*) lipido neutroa.

Korronteak 5mM Hepes pH 7,4 soluzio indargetzailean eta baldintza asimetrikoetan neurtu dira, mintzaren egoera imitatzeko (bakteria Gram-negatiboen zitoplasmak eta periplasmak konposizio kimiko desberdina baitute). Beraz, gatz konzentrazio asimetrikoa ezarri egin dira esperimentuak; hau da, 250 mM KCl *cis*/50 mM KCl *trans* (**5a irudia**, 250/50 mM) edo 50 mM KCl *cis*/250 mM KCl *trans* (**5a irudia**, 50/250 mM) erabiliz. Kasu guztietan, Tse5 aldean gehitu ostean, espontaneoki txertatzen da mintzean, korronte aski egonkorak sortuz (**5.a irudia**). **5b grafikoan**, zenbait esperimentu adierazgarrien korrontea eta ezarritako boltajearen ($I - V$) erlazioa erakusten da. Korronte horiek joera ohmikoa dutela erakusten digu, hau da, kanalaren konduktantzia ($G = I/V$) ez da aldatzen aplikatutako tentsioaren magnitudearekin eta polaritatearekin. Gainera, proteina beti *cis* aldean gehitzen da, beraz gradientearen norabideak Tse5-aren txertatzeko gaitasunean ez duela eraginik izaten erakusten digu. Horrez gain, esperimentu hauek ioi-selektibitatea aztertzea ere ahalbidetzen digute. Selektibitatea kuantifikatzeko RP (ingelesez *reversal potential*) parametroa kalkulatu da, hau da, ezarri beharreko boltajea korrontea 0 izateko mintz gradiente baldintzetan (Ovchinnikov, 1981). Anioien eta katioien mugikortasuna berdina denez KCl-ren kasuan, boltajea aplikatu barik agertzen den korronteak (**5.b irudiko** $I-V$ kurbaren interzeptatze bertikala), poroaren selektibitatea ere adierazten digu. Kalkulatutako RP balioak negatiboak dira baldintza guztietan, Tse5-ek eragindako poroak nolabaiteko katioi selektibitatea dutela erakutsiz. Are gehiago, lipido neutroen esperimentuetan selektibitatea baxuagoa denez, Tse5 poroen sorreran parte hartzen duela frogatzen du (eta ez lipidoak bakarrik).

5.irudia. Elektrofisiologia esperimentuak Tse5 toxinarekin.



4. Ondorioak

Lan honek *P. aeruginosa*k jariatzen duen Tse5 efektorearen funtzio toxikoa hobeto ulertzen lagundu digu, oro har. Proteina gainadieraztea eta purifikatzea lortzeaz gain, itu-zelulen mintzean txertatzeko eta katioiak garraiatzeko joera duten poroak sortzen dituela ikusi dugu. Izan ere, gure emaitzek, Tse5ak itu-zelulak despolarizatzeko gaitasuna erakusten zuten zitometria esperimentuekin bat egiten dute (González-Magaña et al., 2022). Neurtutako ioi-garraioa Tse5-Cek intoxikatutako zelula lehiakideak despolarizatzeko duen mekanismo molekularra dela ondorioztatu dezakegu. Jakina denez, bakterio Gram-negatiboen zitoplasmak periplasmak baino karga negatiboagoa dauka eta despolarizazioa barneko karga negatibo horren galera baino ez da. Zer esanik ez, mintzaren potentzial aldaketa zelularen funtsezko funtzioetan eragin dezake eta zelulen heriotza gauzatu (Benarroch & Asally, 2020).

Horretaz gain, Tse5 proteina purifikatzean hiru zatitan banatuta dagoela ikusi ahal izan dugu. Antza denez, Rhs erdiko domeinuak, beste toxina batzuetan agertzen diren bi eremu kontserbatu

ditu bere bi muturretan, eta Tse5-NT eta CT peptidoak askatzeko ezinbestekoak direla dirudi. Hala ere, ebakuntza puntua kontserbatuta egon arren, hondar katalitikoak ez dira oraindik aurkitu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunean, aipatutako domeinu proteolitikoak bermatzea eta N- zein C- muturrak askatzearen arduradunak diren hondar katalitikoak identifikatzea gustatuko litzaiguke. Horrek N-zein C-domeinuen toxikotasunean duten garrantzia eta euren funtzio espezifikoak ulertzen lagunduko digu. Horretaz gain, Tse5-aren egitura atomikoa ebazteko asmoa dugu, bere mekanismo molekularrean sakontzeko eta sortzen dituen poroen antolamendua ulertzeko oso baliagarria izango delako.

Mintzaren potentzialak funtsezko funtzio zelular ugari erregulatzen ditu, besteak beste, pH-homoeostasia, garraioa, higikortasuna, antibiotikoen erresistentzia, zelulen zatiketa, komunikazio elektrikoa eta abar. Horrela, ba, mintzaren despolarizazioa estrategia oso eraginkorra da beste mikroorganismoekin lehiatzeko eta biziraupena bermatzeko ingurune polimikrobianoetan (Benarroch & Asally, 2020). Argi dago, Tse5ren ikerketa, etorkizunean antibiotiko berrien garapenerako oso baliagarria izan dakigukeela.

6. Erreferentziak

- Basler, M. (2015). Type VI secretion system: Secretion by a contractile nanomachine. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1679).
<https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0021>
- Benarroch, J. M., & Asally, M. (2020). The Microbiologist's Guide to Membrane Potential Dynamics. *Trends in Microbiology*, 28(4), 304–314. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2019.12.008>
- Bingle, L. E., Bailey, C. M., & Pallen, M. J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 11, Issue 1, pp. 3–8). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.01.006>
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., & Attree, I. (2009). Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, 10(1), 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-104>
- Brunet, Y. R., Zoued, A., Boyer, F., Douzi, B., & Cascales, E. (2015). The Type VI Secretion TssEFGK-VgrG Phage-Like Baseplate Is Recruited to the TssJLM Membrane Complex via Multiple Contacts and Serves As Assembly Platform for Tail Tube/Sheath Polymerization. *PLoS Genetics*, 11(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005545>
- Calvez, P., Bussi eres, S.,  ric Demers, & Salesse, C. (2009). Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers. *Biochimie*, 91(6), 718–733.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.03.018>
- Cianfanelli, F. R., Monlezun, L., & Coulthurst, S. J. (2016). Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. In *Trends in Microbiology* (Vol. 24, Issue 1).
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.005>
- Coulthurst, S. (2019). The Type VI secretion system: A versatile bacterial weapon. *Microbiology (United Kingdom)*, 165(5), 503–515. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000789>
- Demel, R. A., Geurts van Kessel, W. S. M., Zwaal, R. F. A., Roelofsen, B., & van Deenen, L. L. M. (1975). Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *BBA - Biomembranes*, 406(1), 97–107.
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(75\)90045-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(75)90045-0)
- Durand, E., Nguyen, V. S., Zoued, A., Logger, L., P hau-Arnaudet, G., Aschtgen, M. S., Spinelli, S., Desmyter, A., Bardiaux, B., Dujeancourt, A., Roussel, A., Cambillau, C., Cascales, E., & Fronzes, R. (2015). Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex. *Nature*, 523(7562), 555–560. <https://doi.org/10.1038/nature14667>
- Filloux, A., Hachani, A., & Bleves, S. (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, 154(6), 1570–1583.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/016840-0>
- González-Magaña, A., Altuna, J., Queralt-Martín, M., Largo, E., Velázquez, C., Mont nchez, I., Bernal, P., Alcaraz, A., & Albesa-Jov , D. (2022). The *P. aeruginosa* effector Tse5 forms membrane pores

- disrupting the membrane potential of intoxicated bacteria. *Communications Biology*, 5(1), 1189. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04140-y>
- Hachani, A., Allsopp, L. P., Oduko, Y., & Filloux, A. (2014). The VgrG Proteins Are “à la Carte” Delivery Systems for Bacterial Type VI Effectors. *Journal of Biological Chemistry*, 289(25), 17872–17884. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.563429>
- Kudryashev, M., Wang, R. Y. R., Brackmann, M., Scherer, S., Maier, T., Baker, D., Dimaio, F., Stahlberg, H., Egelman, E. H., & Basler, M. (2015). Structure of the Type VI secretion system contractile sheath. *Cell*, 160(5), 952–962. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.037>
- Maget-Dana, R. (1999). The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. In *Cyaan Magenta Geel Zwart Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 77747). www.elsevier.com/locate/bba
- Montal, M., & Mueller, P. (1972). *Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties* (Vol. 69, Issue 12).
- Ovchinnikov, Y. A. (1981). Ion Channels of Excitable Membranes. In *Science and Scientists: Vol. Third Edit* (Third Ed., pp. 235–241). Sinauer Associates Inc. https://doi.org/10.1007/978-94-009-7755-6_30
- Pockels, A. (1926). The Measurement of Surface Tension with the Balance. *Science*, 64(1656), 304. <https://doi.org/10.1126/science.64.1656.304.a>
- Pukatzki, S., McAuley, S., & Miyata, S. (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Current Opinion In Microbiology*.
- Russell, A. B., Singh, P., Brittnacher, M., Bui, N. K., Hood, R. D., Carl, M. A., Agnello, D. M., Schwarz, S., Goodlett, D. R., Vollmer, W., & Mougous, J. D. (2012). A widespread bacterial type VI secretion effector superfamily identified using a heuristic approach. *Cell Host and Microbe*, 11(5), 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.007>
- Schlegel, S., Löfblom, J., Lee, C., Hjelm, A., Klepsch, M., Strous, M., Drew, D., Slotboom, D. J., & de Gier, J. W. (2012). Optimizing membrane protein overexpression in the Escherichia coli strain Lemo21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, 423(4), 648–659. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.07.019>
- Shneider, M. M., Buth, S. A., Ho, B. T., Basler, M., Mekalanos, J. J., & Leiman, P. G. (2013). PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, 500(7462), 350–353. <https://doi.org/10.1038/nature12453>
- Whitney, J. C., Beck, C. M., Goo, Y. A., Russell, A. B., Harding, B. N., de Leon, J. A., Cunningham, D. A., Tran, B. Q., Low, D. A., Goodlett, D. R., Hayes, C. S., & Mougous, J. D. (2014). Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Molecular Microbiology*, 92(3), 529–542. <https://doi.org/10.1111/mmi.12571>
- Wingfield, P. T. (2016). *Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate*. 1–10. <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13>. Protein
- World Health Organization. (2017). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis. In *WHO reference number: WHO/EMP/IAU/2017.12*.
- Zoued, A., Brunet, Y. R., Durand, E., Aschtgen, M. S., Logger, L., Douzi, B., Journet, L., Cambillau, C., & Cascales, E. (2014). Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(8), 1664–1673. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.018>

7. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau Amaia González Magañari esleitutako Margarita Salas diru-laguntzari esker (Unibertsitate Sistema Espainiarra Birkualifikatzeko laguntzen deialdia 2021-2023, EUROPAR BATASUNAK-NEXT GENERATION EU-K FINANTZATUTA) eta David Albasa-Jovek jasotako Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioko CTQ2016-76941-R, Eusko Jaurlaritzako IT709-13 eta BBVA Fundazioaren IT1745-22 proiektuei esker idatzi da.

Eskerrak eman nahi dizkiot Jon Altunari lan honen alderdi esperimentalean nahiz artikulua garapenean egindako lanagatik; María Queralteri eta Antonio Alcarazi, bere laguntza ezinbestekoa izan delako elektrofisiologia esperimentuak egiteko, baita datuak aztertu zein aurkezteko. David Albasa-Joveri, ideia planteatu eta proiektua zuzentzeagatik; Azkenik, eskerrak eman nahi nizkion Biofisika Institutuari eta Jaume I Unibertsitateari esperimentuak egiteko beharrezko espazioa eta baliabideak eskaintzeagatik.

Artikulu hau “González-Magaña et al., 2022” nazioarteko artikulutik eratorri da.