

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana  
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

# GIB aurkako immunogeno eta inhibitzaileen garapena

Fab 10E8 antigorputzen erabilera

Egilea:  
Nagore Elu Arantzamendi

Zuzendaria:  
Jose Luis Nieva Escandón

## AURKIBIDEA

1. Sarrera .....	1. orr.
2. Helburuak .....	3. orr.
3. Material eta Metodoak .....	4. orr.
3.1. Fab 10E8-en adierazpena eta purifikazioa .....	4. orr.
3.2. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) .....	6. orr.
3.3. Western plapaketa .....	6. orr.
3.4. Neutralizazio saioa .....	7. orr.
3.5. Besikulen ekoizpena .....	8. orr.
3.6. Askapen saioa .....	8. orr.
3.7. Fusio saioa .....	9. orr.
4. Emaitzak eta eztabaida .....	10. orr.
4.1. Fab 10E8-en funtzionaltasunaren azterketa .....	10. orr.
4.2. Fab 10E8-en erabilgarritasunaren azterketa .....	11. orr.
5. Ondorioak .....	14. orr.
6. Bibliografia .....	15. orr.

## SARRERA

Hartutako Imunoeskasiaren Sindromea (HIES) Giza Imunoeskasiaren Birusak (GIB) eragindako gaixotasuna da. Gaixotasun hau orain dela 30 urte agertu zen eta ordutik ikertzen aritu arren, gaur egun ez dago ez birusa deuseztatzen duen tratamendurik, ez birusaren infekzioetik babesten gaituen txertorik. Are gehiago, azken datuek erakusten duten bezala, urtetik urtera HIESa duten indibiduen kopurua goraka doa<sup>1</sup>, nahiz eta gaixo hauen bizi kalitatea hobetzea lortu den.

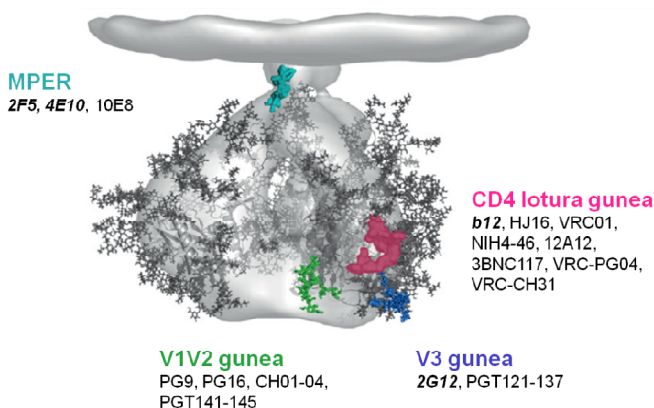
GIB birusak aurkezten dituen ekiditze-mekanismoak direla eta, txerto eraginkor bat lortzea erronka bat da, batez ere, sortzen diren birusaren aldaerek proteina antigeno ezberdinak azaltzen dituztenez, birus-sekuentzia barietate handia dagoelako. Antigorputzek antigeno bakar bat ezagutzen dute espezifikoki, beraz, ez dira gai izaten aldaketak jasan dituen birusaren antigenoak ezagutzeko<sup>2</sup>. Are gehiago, txertoak sortzeko erabili beharreko materialean ere arazoak daude. Birioi inaktibo edo atenuatuen erabilpena baztertuta dago beraien infekzio arrisku altuagatik. Aldiz, azpiunitateetan oinarritutako txertoak ez dira gai presio selektiboaren ondorioz eraldatutako birusaren infekzioa prebenitzeko<sup>3</sup>. Hortaz, erantzun immune naturala edo txerto bidez induzitutako erantzuna, ez dira eraginkorrak izan orain arte HIESaren tratamendurako<sup>2,3</sup>.

Hala ere, azken hamarkadetan jazotako aurkikuntza berri batek txertoen garapenerako atea ireki ditu: infektaturiko paziente batzuek birus aldaera ezberdinak neutralizatzeko ahalmena duten antigorputzak garatu dituzte<sup>2-5</sup>. Antigorputz hauei "Broadly Neutralizing Antibodies" (bNAb) deritze eta badirudi birusaren ekiditze-mekanismo horiek ez dutela funtzionatzen antigorputz hauen aurrean.

GIB birusaren eta T CD4<sup>+</sup> linfzitoen mintzen arteko fusioa *Env* glikoproteina osatzen duten gp120 kanpo-azalerako proteinaren eta gp41 transmintz-proteinaren bidez ematen da. Gp120 eta gp41 trimerotan antolatzen dira eta beraien artean modu ez-kobalentean ere lotzen dira heterodimero bat eratuz. Bi azpiunitateetatik gp41-ak birioia estaltzen duen bigeruzua lipidikoan kokatzen du fusio proteina bere transmintz-domeinuari esker. GIB birusaren infekzio zikloan gainazaleko gp120 azpiunitateak T linfzito zelulen CD4<sup>+</sup> errezeptorea eta CXCR4 edo CCR5 koerrezeptoreak ezagutzen ditu modu sekuentzialean, eta ondorioz, gp41 transmintz-azpiunitatea aktibatzen da, bi mintzen arteko fusioa eraginez<sup>6</sup>.

Infekzioaren lehenengo asteetan antigorputz ez-neutralizatzaileak sortzen dira *Env* glikoproteinako domeinu immunodominatzaileen aurka. Hilabete batzuk geroago, lehenengo antigorputz neutralizatzaileak detektatu daitezke, hauek normalean andui zehatz horren gp120-aren aurkako antigorputz autologoak direlarik. Azkenik, urte batzuk geroago, indibiduo batzuetan bNAb antigorputzak ekoizten dira<sup>12</sup>.

bNAb antigorputz hauek GIB birusaren gp120-gp41 fusio proteinaren epitoko jakin batzuetara bideratzen dira (1. irudia). Batetik, gp120-ra bideratutako bNAb-ek, CD4 lotura gunea (b12, VRC01), V1V2 gunea (PG9, PGT145) edo V3 gunea (2G12) ezagutu dezakete. Bestetik, gp41-en aurkako bNAb-ek (2F5, 4E10, 10E8, Z13e1 eta m66.6) MPER (*Membrane Proximal External Region*) domeinuan kokatutako epitopoak ezagutzen dituzte<sup>2,4,5,7-10</sup>. Hasiera batean karakterizatutako bNAb-ek

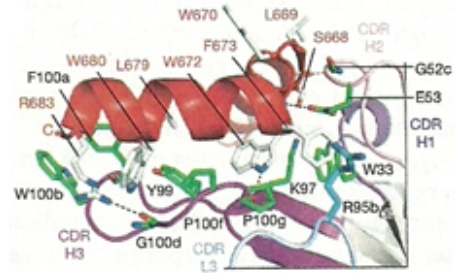


**1. Irudia:** bNAb-en epitopo ezberdinak gorritz (CD4LG), berdez (V1V2 gunea), urdinez (V3 gunea) eta zianez (MPER) koloreztatuta daude, bakoitzean jarduten duten antigorputzak adierazten direlarik.

estaldura-maila ona azaldu arren, hau da, GIB andui ezberdinen aurka egiteko gaitasun ona azaldu arren, adibidez, 4E10-ak<sup>9</sup>, ez dira bereziki onak andui horiek ahalmen handiz neutralizatzen. Aldiz, andui zehatz bat neutralizatzen oso potenteak diren bNAb batzuk, b12 kasu, ez dira oso onak estrukturalki moldatutako aldaerei aurre egiteko<sup>11</sup>.

Alabaina, oraintsu, bNAb berriak isolatu eta karakterizatu dira eta aldaera ezberdinei aurre egiteko gai izateaz gain, neutralizazio potentzia altua erakusten dute. Antigorputz hauen artean aipagarrienetakoa 10E8 antigorputza da. Antigorputz hau bereziki interesgarria suertatu da hainbat arrazoigatik: 4E10-a baino 5-10 aldiz ahaltsuagoa da, GIB birusaren aldaera ugari neutralizatzen da eta efizientzia handiagoz batzen da *Env* proteinara<sup>7</sup>. Are gehiago, frogatu da gainerako MPER-ekiko espezifikoak diren antigorputzak ez bezala, 10E8 ez dela ez lipidoetara, ez beste giza auto-antigenoetara modu espezifikoan batzen<sup>12</sup>, beraz, MPER-ean oinarritutako txertoaren diseinua burutu ahal izango da arazo immunerik azaldu gabe.

10E8 antigorputzak gp41 azpiunitateko MPER peptidoarekin konplexua eratzean 10E8-a lotzeko beharrezko epitopo minimoa <sup>671</sup>NWFDITNWLWYIR<sup>683</sup> sekuentzia da<sup>7</sup>. Ikusi da azken hiru aminoazidoak (Tyr 681, Ile 682 eta Arg 683) berebiziko garrantzia dutela 10E8 antigorputzaren loturan eta beste hondar espezifiko batzuk (Asn 671 eta Arg 683) beharrezkoak direla antigorputz honen neutralizazio-funtzioan (2. irudia). Are gehiago, MPER peptidoko Arg 683 aminoazidoak antigorputzeko CDR-H3 begiztaren 100b posizioan dagoen triptofanoarekin (W100b) interakzionatzen du, hortaz, pentsa daiteke triptofano hau oso garrantzitsua dela antigorputzaren neutralizazio-funtzioan<sup>7,12</sup>. 4E10 antigorputzaren kasuan ere CDR-H3 begizta funtziorako garrantzitsua dela ikusi da<sup>13</sup>, beraz, esan daiteke 10E8 eta 4E10-ak amankomunean dutela CDR-H3-ko aminoazido garrantzitsuen kontserbazioa.



2. **Irudia:** CDR-H3 begizta (morea) eta MPER peptidoaren (gorria) egitura. Arg 683 eta W100b aminoazido garrantzitsuen posizioak ikusi daitezke.

## HELBURUAK

Gp41-era bideraturiko 10E8 antigorputzak GIB-1 birusa neutralizatu ahal izateko hautagai ona dirudenez, helburu nagusia 10E8 bezalako bNAb-ak ekoitzarazten dituen txerto baten garapena lortzea da. Horretarako, 10E8-ak ezagutzen duen epitopoa imitatzen duten peptido edo proteinak erabiliz (mimotopoak), sistema immunea behartu nahi da, antigorputz mota hori ekoitzi dezan<sup>3</sup>. Lehen aipatu den bezala, 10E8-aren epitopoa gp41-en MPER domeinuaren sekuentziaren parte da eta domeinu honek mintz lipidikoaren interfasean kokatzeko joera dauka<sup>14</sup>. Beraz, pentsatu daiteke mintzaren konposaketak edo honen menpeko ezaugarri materialek (kurbatura, kohesioa...) egitura zehatz bat eman diezaiokeela MPER-ari, honek antigorputzen epitopoaren ezagumenduan garrantzia izan dezakeelarik. Hori dela eta, lipido-peptido formulazioak (FPL-ak) erabiltzea proposatzen da mimotopo bezala, sistema immuneak ezagutu eta horren aurkako 10E8 antigorputz neutralizatzaileak sortu ditzan.

Etorkizunean txerto eraginkor bat lortzeko bide horri jarraituz, lan honetan bi helburu nagusi bete nahi dira: batetik, bakterioetan DNA birkonbinatuaren teknologiaz ekoiztutako Fab 10E8-en **funtzionalitatea** aztertzea, horretarako, epitopoa ezagutzeko eta pseudobirusen bidezko infekzioa ekiditeko duten gaitasuna aztertuz. Bestetik, Fab 10E8-en **erabilgarritasuna** aztertu nahi da, immunogeno gisa erabili daitezkeen mimotopoak ezagutzeko duten gaitasuna baloratuz eta gaitasun horretan CDR-H3-an aurkitzen den W100b aminoazidoak duen garrantzia aztertuz.

## MATERIAL ETA METODOAK

**Materialak.** GIB-1 HXB2 anduiaren gp41-eko MPER domeinuan oinarritutako CpreTM peptidoa (KKK<sup>671</sup>NWFDITNWLWYIKLFIMIVGGLV<sup>693</sup>KK), CpreTM mutantea (KKK<sup>671</sup>NAADITNWLWYIKLFIMIVGGLV<sup>693</sup>KK), MPER peptidoa (KK<sup>664</sup>DKWASLWNWFDITNWLWYIKLFIMIVG<sup>691</sup>KKK) eta NpreTM peptidoa (<sup>656</sup>NEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIK<sup>683</sup>), fase solidoko sintesi bidez sintetizatu dira Fmoc kimika erabiliz eta HPLC-z purifikatu dira Pompeu-Fabra Unibertsitateko Proteomika Unitatean (Bartzelona). 1-palmitoil-2-oleil-3-fosfatidilkolina (POPC edo PC) eta kolesterola (CHOL) *Avanti Polar Lipids*-etik eskuratu dira. N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-1,2-dihexadekanolil-3-fosfoetanolamina (NBD-PE), 1,2-dihexadekanolil-3-fosfatidiletanolamina (Rho-DHPE), azido 8-aminoftaleno-1,3,6-trisulfonikoa (ANTS) eta *p*-xilenobis(piridinio)bromidua (DPX) fluoroforoak *Molecular Probes*-etik lortu dira. *E.coli* K12 anduiaren ingeniaritzatik lortutako *T7 SHuffle* zelulak eta pETColaDUET plasmidoa *New England Biolabs*-etik lortu dira. Zuzendutako mutagenesirako hasleak eta iodoazetamida *Sigma-Aldrich*-etik eskuratu dira. Proteasa inhibitzailea (EDTA-free) *Roche*-tik lortu da. Lisozima *Hampton*-etik eskuratu da. TZM-bi zelulak *AIDS Research and Reference Reagent Program*-etik lortu dira. Askapen saioan erabilitako PD-10 zutabea *Amersham Biosciences*-etik lortu da. ELISA-ko antigorputz sekundarioa eta Western-eko antigorputz primarioa (Anti-His) *Thermo Fisher Scientific*-etik lortu dira.

### 1. Fab 10E8-en adierazpena eta purifikazioa.

Fab 10E8 WT (Wild Type): Lehendabizi, pETColaDUET plasmidoan Fab 10E8-aren sekuentzia txertatu da. Plasmido honek T7 promotore bakar baten menpe dauden bi Klonaziorako Gune Anitz (MCS, Multiple Cloning Site) ditu, kanamizinarekiko erresistentzia azaltzen duelarik. MCS1-ean antigorputzaren kate astunaren sekuentzia txertatu da eta N-muturrean histidina isatsa izango du. MCS2-an antigorputzaren kate arina kodetuko da eta C-muturrean 15 aminoazidoz osatutako S-tag peptidoa izango du. Modu horretan, etiketa bi horiei esker, purifikatutakoak bi kateak dituela bermatzen da.

Horrela, 10E8 Fab-en **adierazpena** emateko, *T7 SHuffle* zelula kompetenteak elektroporazioz pETColaDUET plasmido horrekin transformatu dira. Jarraian, kanamizina antibiotikodun plakan erein dira eta hazitako kolonia horietako baten *overnight*-a (O/N) jarri da antibiotiko berdinarekin (1:1000). O/N horren 1:50 diluzioa egin eta zelulak 37 °C-tan utzi dira hazten 0,8-ko dentsitate optikoa lortu arte. Horrela, bakterioak hazkuntza fase

exponentzialean daudenez (proteinak adierazteko fase egokian) 0,4 mM IPTG-rekin induzitu eta 36 orduz 18 °C-tan utzi dira Fab-a adierazi dezaten.

**Purifikazioari** dagokionez, zelulak jaso eta zentrifugatu egin dira 15 minutuz 8000 xg-tara. Jalkina 25 mL "Lisi tanpoi"-tan (50mM HEPES pH 7,5, 100mM iodoazetamida, 500mM NaCl, proteasa inhibitzaile pastila bat (EDTA-free), 5mM imidazol, 1mg/mL lisozima, Dnasa eta %5 glizerol) birsuspenditu eta 4 °C-tan irabiatzen utzi da 30 minutuz, lisozimak bakterioen pareta apurtu dezan, eta ondoren, *French-Press* teknika erabili da zelulak hobeto apurtzeko. Jarraian, histidina isatsean oinarrituta, **Nikel bidezko afinitate purifikazioa** egin da. Gainjalkin filtratua 0,5 mL Ni<sup>2+</sup> bolatxorekin inkubatu da ordu batez giro tenperaturan. Bolatxoak zutabera gehitu ostean, zutabea 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl eta 35 mM Imidazol pH 8-ra duen indargetzailearen 30 mL-rekin garbitu da metalekiko afinitatea duten eta inespezifikoki itsatsi diren proteinak kentzeko. Jarraian, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl eta 500 mM Imidazol pH 8-ra dituen indargetzailearen 5 mL-rekin eluitu da, 1mL-tako frakzioak jasoz. Imidazolak histidina isatsarekin lehiatzen du nikelagatik, beraz, imidazol kontzentrazio altuetan oreka Imidazol-Ni<sup>2+</sup> konplexura desplazatuko da, His etiketa duen proteina askatuko delarik. Frakzioen absorbantzia neurtu da 280nm-tan, balio altuena duena pH 7.4-ra dagoen 10mM TRIS eta 300mM NaCl dituen indargetzailearekin gau osoz dializatzen utziz. Horrela, imidazol arrastoak kendu eta hurrengo urratserako tanpoi egokitan egongo da lagina. Azkenik, **afinitate kromatografia** egin da 4E10 epitopoa kobalentekei immobilizatua duen zutabe batekin. Dializatutakoa zutabera gehitu ostean, 50 mL 10 mM TRIS-HCl eta 500 mM NaCl pH 7.5era duen indargetzailearekin garbitu da, gatz bidez interakzio inespezifikoak kentzen direlarik. Ondoren, 20 mL 10 mM TRIS-HCl pH 7.5era dagoen indargetzailearekin garbitu da. Jarraian, 6 mL 100 mM Glizina pH 2.5era dagoen indargetzailearekin eluitu da, pH horretan proteina desnaturalizatu eta askatu egiten baita. 1 mL-tako frakzioak 80 µL 1M TRIS-HCl pH8.8 duten *ependorf*-etan bildu dira, eluzioaren ondoriozko pH azidoa neutralizatu eta Fab-en agregazioa ekiditeko. Eluzio-frakzioen absorbantzia neurtu da 280 nm-tan eta balio altuenak dituztenak gau osoz %10era glizerola daukan PBS indargetzailean dializatzen utzi dira 4 °C-tan, glizerolak Fab-ak agregatzea ekiditen duelarik.

Prozedura hau burutuz Fab 10E8 adierazten dela eta purifikatu daitekeela frogatuta, kantitate handiagoan purifikatzeko zelula bolumen handiagoak hazi dira (2L) eta prozesuko zenbait puntu aldatu dira purifikazio prozedura optimizatzeko: "Lisi tanpoia"-ren imidazol kontzentrazioa igo da (25 mM) interakzio ez-espezifikoak ekiditeko eta 4E10 epitopoen oinarritutako afinitate kromatografia egin beharrean, **S-tag bidezko afinitate purifikazioa**

burutu da. Horretarako, Ni<sup>2+</sup> bidezko purifikaziotik lortutako eluzioa %10era glizerola daukan PBS indargetzailetan dializatzen utzi da. Ondoren, zutabe huts batera pasa eta 2 mL S-tag erretxin gehitu zaizkio. Zutabea PBS-arekin garbitu ostean, 3M MgCl<sub>2</sub>, 75mM HEPES/NaOH, pH 7.5 duen tanpoiarekin eluitu da, gatz kontzentrazio handiak interakzio elektrostatikoak ekiditen dituelarik. Jasotako 2 mL-tako frakzioen absorbantzia neurtu da 280 nm-tan eta balio altuenak dituztenei %10 glizerol gehitu eta PBS %10 glizerol tanpoiarekin O/N 4 °C-tan dializatu dira, erabilpen eguneraino gorde direlarik.

Fab 10E8 mutantea (Fab 10E8 W100bA): Fab 10E8 antigorputz mutanteak *zuzendutako mutagenesi* bidez sortu dira. Horretarako, lehendabizi hasleen diseinua burutu da. Behin hasleak diseinatuta, PCR bat burutu da eta produktua agarosazko gel batez emaitza positiboa dela ziurtatu ondoren, Dnp I entzimarekin digeritu da lagina, katea originala degradatu eta mutatuarekin soilik geratzeko. Lagin hau sekuentziatu eta sekuentzia egokia duela ziurtatu ostean, aurrez azaldutako adierazpen eta purifikazio prozedura burutu da.

**2. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).** Fab 10E8 antigorputzaren funtzionaltasuna eta espezifikotasuna aztertzeko ELISA zuzena erabili da, kolorimetriaren neurketa bidez, antigorputzak euskarri solido batean immobilizatutako bere epitopoa ezagutzeko gai den ikusiz. 96 putzuko plaka MPER domeinuan oinarritutako CpreTM peptidoarekin eta CpreTM mutantearekin inkubatu da (1.37μM, 100 μL) O/N giro tenperaturan. Ondoren, %0.05-era Tween 20 duen PBS tanpoiz garbitu da plaka (200 μL/putzu) eta lotura inespezifikoak ekiditeko %3-ra behi-seroko albumina (BSA, Bovine Serum Albumin) duen PBS tanpoiarekin (300μL/putzu) blokeatzen utzi da 2 orduz. Berriz bi aldiz garbitu ondoren, Fab 10E8 antigorputzen diluzio seriatuak gehitu dira (%1 BSA eta %0.02 Tween 20 dituen PBS tanpoitan) plakara (100 μL/putzu) eta 4 orduz utzi da inkubatzen giro tenperaturan. Garbiketa tanpoiarekin beste behin garbitu ostean, giza IgG Fab-ak ezagutzen dituen fosfatasa alkalinoarekin konjugatuta dagoen antigorputz sekundario batekin inkubatzen da (100 μL/putzu) 50 minutuz. Hiru aldiz garbitu eta 4-nitrofenil fosfato disodio gatz hexahidratoarekin inkubatzen da 30 minutuz (50μL/putzu). Horrela, fosfatasa alkalinoak nitrofenil fosfatoarekin erreazionatzen du produktu kromogeniko bat emateko. Erreakzioa geldiarazten da NaOH 3 M erabiliz (50μL/putzu) eta produktua 405 nm-ko absorbantzia neurtuz kuantifikatzen da Bio-Tek Sinergy HT plaka irakurgailu batean.

**3. Western Plapaketa.** Lagina SDS-PAGE elektroforesi bitartez pisu molekularren arabera banandu da. Poliakridamidazko gel honen edukia nitrozelulosazko mintz batera transferitu da elektroplapaketa erdi-lehorreko protokoloa jarraituz, %20 metanola duen %1



SDS tanpoitan. Mintza PBST tanpoian (PBS + %0,05 Tween 20) disolbatutako gantzik gabeko esnearekin (%5eko proportzioan) ordu batez blokeatu da. Jarraian, PBST tanpoian disolbatutako (1:5000) antigorputz primarioarekin (Anti-His) inkubatzeko utzi da ordu batez, zeinak HRP (Horseradish peroxidase) deituriko entzima daraman lotuta. Azkenik, entzimaren aktibitatearen ondorioz kemolumineszente izango den sustrato bat gehitu (SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate), mintza X-izpiko filmaren aurrean jarri eta AGFA Curix 60 batean errebelatu da.

**4. Neutralizazio saioa.** Saio honetan GIB-JRCSF-Env proteinadun eta VSV (Vesicular Stomatitis Virus)-Env proteinadun pseudobirusak erabili dira, TZM-bl zelulak infektatu direlarik. Zelula hauek HeLa zelula lerrotik deribatutako zelula eukariotoak dira eta modu egonkor batean CD4<sup>+</sup> errezeptore eta CCR5 koerrezeptore kantitate altuak adierazten dituzte, beraz, GIB-1 isolatu desberdinen infekzioekiko oso sentikorrak dira. Zelula hauek 37 °C-tan eta %5 CO<sub>2</sub>-tan mantendu dira M medioan (Dulbecco-k aldatutako Eagle media (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), % 10 txahal serum fetala (FBS, *Fetal Bovine Serum*), aminoazido ez esentzialak (1:100), sodio pirubatoa eta penizilina/estreptomizina antibiotikoak (1:100)).

Zelula horiek infektatzeko pseudobirusak HEK293T zelulak erabiliz ekoiztu dira; batetik, *gag/pol* eta *env* akastuneko GIB-1 genoma kodetzen duten bektoreekin kotransfektatu dira, partikula biriko berriak eratzeko egiturazko proteina guztiak kodetzen direlarik. Alabaina, mutazio konkretuei esker, birus infektiboen sorrera ekiditen da. Bestetik, GFP-dun bektore batekin kotransfektatu dira eta GFP plasmido kodetzailerik honi esker, infektatutako zelulek gainerako proteina biralak adierazi beharrean, GFPa adierazten dute. Beraz, pseudobirus hauek behin bakarrik dira gai infektatzeko.

Neutralizazio saioan, lehendabizi, infektibitate saio baten bidez determinatutako eta %10-%15-eko infekzioa eragiteko beharrezko pseudobirus kantitatea jartzen da 96-ko plaka batean (50 µL/putzu), horretarako antibiotiko gabeko M media erabiliz (M<sup>\*</sup>). Jarraian, PBS-tan disolbatutako Fab 10E8 edo Mab 10E8 antigorputzen diluzio seriatuak gehitzen dira plakara (50 µL/putzu), 1 h eta 30 minutuz inkubatzeko utziz. Ondoren, TZM-bl zelulak jaso, tripsina kentzeko zentrifugatu eta %20 antibiotiko eta 30 µg/mL DEAE-dextrano (birusa eta zelularen arteko lotura faboratzeko) dituen M<sup>\*</sup> medioan birsuspenditu dira. Jarraian, 11.000 zelula/putzu gehitu dira (100 µL) eta 48 orduz inkubatzeko utzi da. Denbora tarte horren ostean, M<sup>\*</sup> media aldatu eta 24 h igaro ondoren, zelulak jasotzen dira. Azkenik, fluxu zitometria bidez, infektatutako zelula kantitatea neurtu da adierazten duten GFP proteina fluoreszentearekin esker.

**5. Besikulen ekoizpena.** Besikula lamela-bakar handiak (LUV, Large Unilamellar Vesicles) erabili dira mintzaren modelo bezala, POPC:CHOL 4:1 (mol:mol) proportziodun konposizioan. Kloroformotan disolbatutako lipidoa N<sub>2</sub> fluxuaren bidez lehortu da, disolbatzaile organikoaren hondakinak guztiz kentzeko hutsean inkubatu delarik bi orduz. Jarraian, lipidoa disoluzio indargetzaile isosmotikoan (5mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.4, 200-220 mosm/Kg) disolbatzen da. Sortzen diren liposomen tamaina eta geruza kopurua txikitzeko hamar izozte/desizozte ziklo burutzen dira. Geruza bakarreko eta tamaina konkretuko besikulak lortzeko lagina 10 aldiz pasatzen da 0.1 µm-ko diametrodun poroak dituen filtro batetik, horretarako 200 psi-tako nitrogeno gas fluxuaren laguntzaz<sup>15</sup>. Azkenik, lortutako besikulen lipido kontzentrazioa kalkulatzeko fosfatoa determinatzen da<sup>16</sup>.

**6. Askapen saioa.** Teknika honen bidez peptidoek mintza iragazkortzeko duten ahalmena eta antigorputzek hau blokeatzeko duten gaitasuna aztertzen da. Horretarako besikuletan enkapsulatutako zunda bikote baten arteko fluoreszentiaren indargetze (*quenching*) dinamikoaz baliatzen da<sup>17</sup>. Azido 8-aminofaleno-1,3,6-trisulfoniko (ANTS) zunda fluoreszentea eta bere indargetzailea den *p*-xilenobis(piridinio)bromidua (DPX) LUV-en barne konpartimenduan koenkapsulatu dira DPX:ANTS 4:1 erlazioan. Baldintza hauetan ANTS-aren fluoreszentzia igorpen seinalea ia guztiz indargabetuta dago. Mintzaren iragazkortasuna handitzean, molekula hauek kanpo mediora askatu eta bertan diluitzen dira, eta ondorioz, ez da indargetzerik emango eta ANTS-aren fluoreszentzia intentsitatea handituko da.

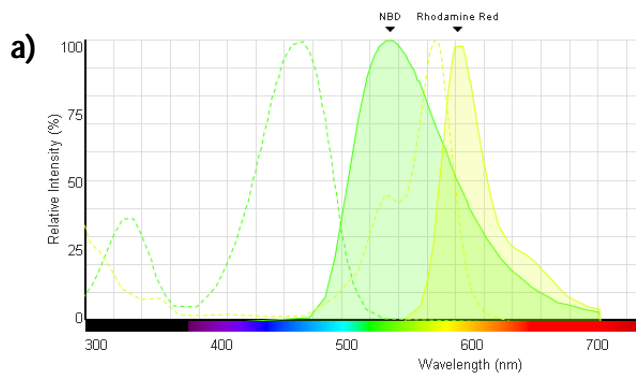
Zundak enkapsulatzeko, lipido pelikula lehorra zunda fluoreszenteak dituen indargetzailearekin (12.5 mM ANTS, 45 mM DPX, 20 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 7.4, 200-220 mosm/Kg) nahasten da. Soluzioan aske geratutako zundak kentzeko, PD-10 zutabearekin gel filtraziozko kromatografia egin da.

Behin besikulak lortuta, 1 mL LUV, 100 µM lipido kontzentrazioan, kuartzozko kubeta batean sartzen da. 470 nm-tako *cut-off*-a duen filtroa laginaren eta emisioko monokromadorearen artean jarri ondoren, lagina 355 nm-tan kitzikatzen da eta ANTS-aren fluoreszentiaren igorpena 520 nm-tan neurtzen da espektrofluorimetro batean (Fluoromax-3 Jobin Yvon, Horiba). Fluoreszentzia egonkortzen denean (minutu bat inguru), peptidua (CpreTM, MPER edo NpreTM) gehitzen da eta 20 segundu geroago antigorputza gehitzen da, fluoreszentzian duen eragina aztertuz. Azkenik, 5 minutu pasa ostean, 25 µL %10 v/v Tritoi X-100 gehitzen da besikulen iragazkortasun osoa lortzeko. Horrela, peptidoak induzitutako askapena honako ekuazioaren bidez kalkulatu da:

$$\text{Askapen \%} = \left( \frac{F_i - F_0}{F_{\text{max}} - F_0} \right) \times 100$$

**F0:** ANTS/DPX duten besikulen hasierako fluoreszentzia. **Fi:** peptidoarekin 5 minutuz inkubatu osteko fluoreszentzia. **Fmax:** fluoreszentzia maximoa tritoia gehitu ostean.

**7. Fusio saioa.** Metodo honen bidez peptidoez eragindako besikulen fusioa eta antigorputzen bidezko fusioaren inhibizioa aztertu dira, N-NBD-PE (N-(7-nitro-benz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) fosfatidiletanolamina) eta N-Rh-PE (N-(lissamine Rhodamine B sulfonyl) fosfatidiletanolamina)-ren artean ematen den RET (Resonance Energy Transfer) fenomenoan oinarrituz<sup>18</sup>. Hau da, NBD-ren emisio espektroa ( $\lambda_{\text{kitz}} = 460 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 539 \text{ nm}$ ) Rh-ren kitzikapen espektroarekin gainjartzen da, ( $\lambda_{\text{kitz}} = 550 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ ), beraz distantzia konkretu batera edo gutxiagora badaude, NBD kitzikatu ostean igorritako energia Rh-ak xurgatuko du, bera kitzikatu eta uhin-luzera altuagoan igorriko duelarik (3. irudia). Populazio hau markatu gabeko populazio batekin nahastean, fusioaren ondorioz, zunden artean dagoen distantzia handitu egingo da, Rh-ren fluoreszentiaren igorpen seinalea gutxituz eta NBD-arena handituz.



**b)**

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

**3. Irudia:** a) NBD-PE-ren (berdez) eta Rodaminaren (horiz) kitzikapen eta emisio espektro gainjarriak. b) FRET ekuazioa, non  $R_0$ -k Förster distantzia eta  $r$ -k NBD-PE eta Rodaminaren arteko distantzia adierazten duten.

Saio honetarako besikulen prestaketan, N-NBD-PE eta N-Rh-PE lipidodun hiru populazio ezberdin sortu behar dira: A) mintzean zunda bakoitzaren %0.6 mol dituztenak, B) zunda bakoitzaren %0.06 mol dituztenak eta C) markatu gabeko besikulak.

1 mL-tan 90  $\mu\text{M}$  C besikula kuartzozko kubeta batean jarri eta honen eta igorpenaren monokromadorearen artean 515 nm-ko *cut-off*-a duen filtroa jartzen da, lagina 450 nm-tan kitzikatuz eta igorpena 539 nm-tan neurtuz. Minutu bat pasatu ostean, peptido kopuru zehatz bat gehitzen da. Beste minutu bat pasa ondoren, antigorputza gehitzen da (Fab 10E8 WT, Fab 10E8 mutantea edo Fab 4E10) eta minutu batez utzi ondoren, A besikulen 10  $\mu\text{M}$  gehitzen dira, NBD-ren fluoreszentsian duen eragina jarraituz ( $F_i$ ). Fusio portzentajea kalkulatzeko, B populazioko 100  $\mu\text{M}$ -ek ematen duen fluoreszentsia neurtzen da, fusioaren %100 ( $F_{\text{max}}$ ) kontsideratzen delarik. Bestalde, 90  $\mu\text{M}$  C besikula 10  $\mu\text{M}$  A besikulekin nahasten da fluoreszentsia minimoaren balioa lortzeko ( $F_0$ ):

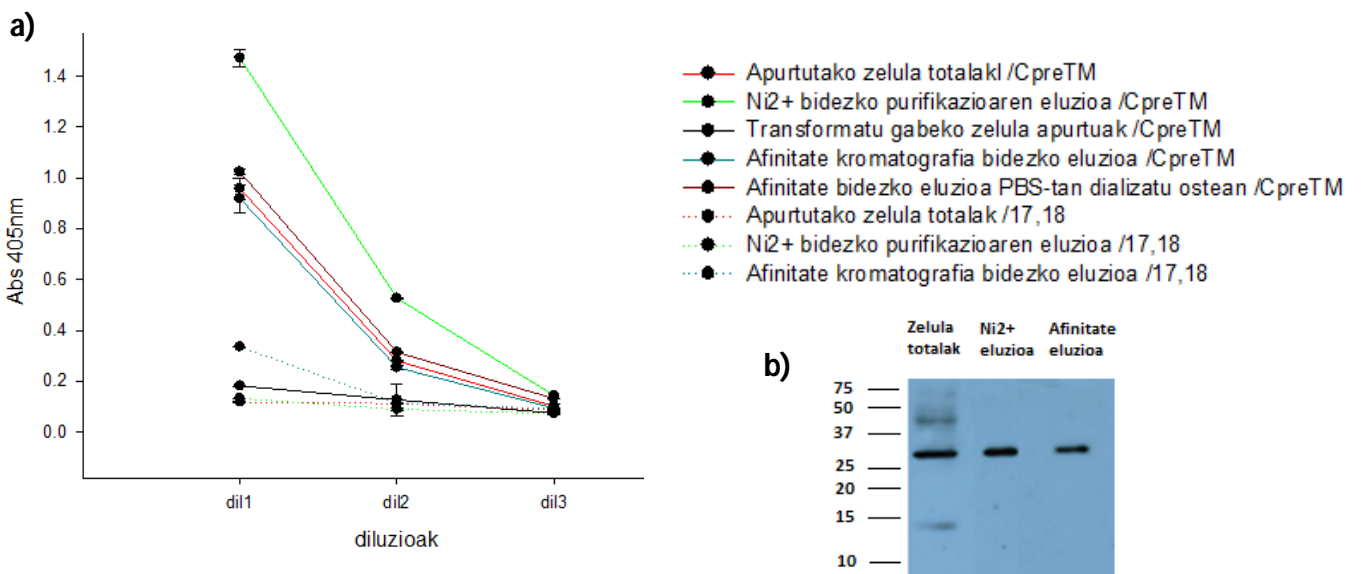
$$\text{Fusio \%} = \left( \frac{F_i - F_0}{F_{\text{max}} - F_0} \right) \times 100$$

## EMAITZAK ETA EZTABAIDA

### Fab 10E8-en funtzionaltasunaren azterketa

10E8 antigorputzak epitopoa ezagutzeko eta pseudobirusen bidezko infekzioa ekiditeko gai direla ikusi den arren<sup>7</sup>, DNA birkonbinatuaren teknologiaz ekoiztako Fab 10E8-ak gaitasun hori baduten ikusi nahi izan da. Horretarako, lehendabizi, Fab 10E8 birkonbinatuak lortzeko adierazpen eta purifikazio prozedura zehatz bat jarraitu da; histidina isatsean oinarritutako nikel bidezko purifikazioaren bidez eta S-tag bidezko purifikazioari esker, purifikatutakoek kate astuna eta arina dutela bermatuko da, eta afinitate bidezko purifikazioan antigorputz horiek egitura egokia hartu dutela eta aktiboak direla ziurtatuko da.

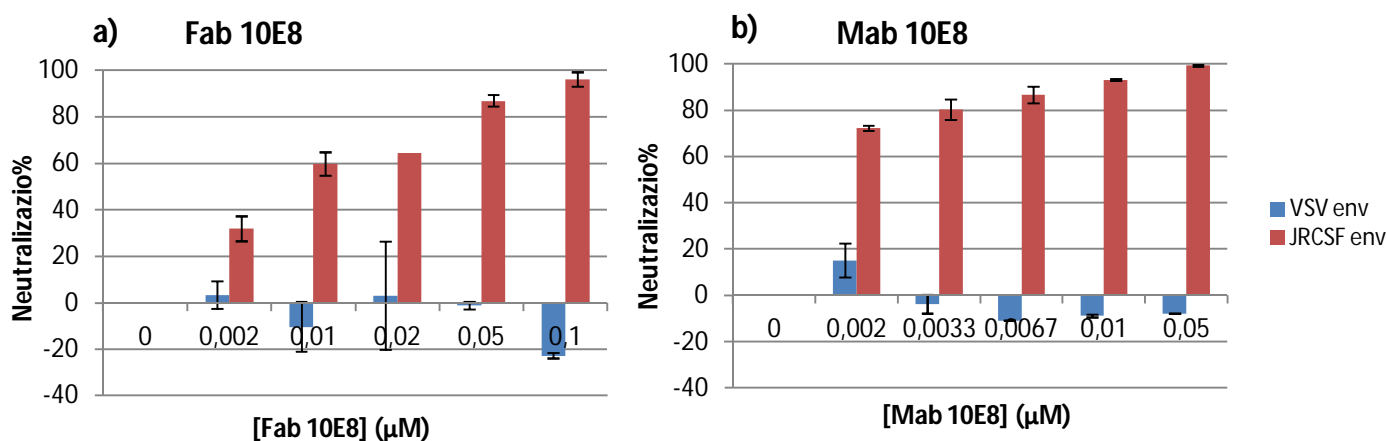
Purifikatutako Fab 10E8 birkonbinatuen aktibitatea neurtzeko, lehenengo eta behin, **ELISA saioa** burutu da. Modu horretan, Fab 10E8 birkonbinatuek MPER domeinuaren sekuentzia espezifiko bat duen peptidoa (CpreTM) plakan immobilizatuta ezagutzen duen ikusi nahi izan da. Are gehiago, CpreTM peptido mutantea erabiliz, ezagumendu hori espezifikoa dela ere frogatu nahi izan da. Emaitzek erakutsi bezala, purifikazio prozeduran zehar hartutako lagin ezberdinetako Fab 10E8-ek (kontrol gisa apurtutako zelula totalak, nikel bidezko purifikazioan lortutako eluzioa, afinitate kromatografian lortutako eluzioa eta kontrol negatibo gisa transformatu gabeko zelulen lagina) seinale positiboa ematen dute CpreTM peptidoarekin, aldiz, seinalea negatiboa da CpreTM mutantearekin (4. irudia).



**4. Irudia:** a) ELISA saioaren emaitzak, non apurtutako zelula totalak, Nikel bidezko purifikazioaren eluzioak eta afinitate kromatografiaren bidezko eluzioak (PBS-tan dializatu aurretik eta ostean) seinale positiboa ematen duten CpreTM peptidoarekin. Aldiz, ez dute CpreTM peptido mutantea (C17,18Ala) ezagutzen. b) Western Blot, Fab 10E8-ak zelula totalen frakzioan eta nikel bidezko edo afinitate bidezko eluzioetan aurkitzen direlarik.

Emaitzak aztertzean, kontuan izan behar da teknika honek bere mugak dituela: peptidoak plakari lotzean hartzen duen egitura mintzean duenarekiko oso desberdina izan daiteke, antigorputzentzako ezintasun esterikoak egon daitezke... Hala ere, esan daiteke adierazitako eta purifikaturiko Fab 10E8 birkonbinatuak ondo tolestu direla eta dagokien epitopoa modu espezifikoan ezagutzen dutela.

Jarraian, Fab 10E8 birkonbinatuak JRCSF pseudobirusen infekzioa inhibitzeko gai direla frogatzeko **neutralizazio saioa** burutu da. Fab 10E8 kontzentrazio ezberdinak JRCSF eta VSV pseudobirusen infekzioa zenbateraino inhibitzeko gai diren ikusi da. Emaitzei erreparatuz esan daiteke, Fab 10E8 antigorputz birkonbinatuak badutela JRCSF pseudobirusen bidezko infekzioa inhibitzeko ahalmena (5. irudia). Are gehiago, inhibizio hori espezifikoa dela ere ziurtatu da, ez baitira gai VSV pseudobirusaren infekzioa inhibitzeko. Hala ere, esan behar da Fab 10E8 antigorputzak Mab 10E8-ekin alderatuz gero, ahulagoak direla, agian Mab-ek bi paratopo aurkezten dituztelako edo mintzean hobeto ainguratzen direlako.

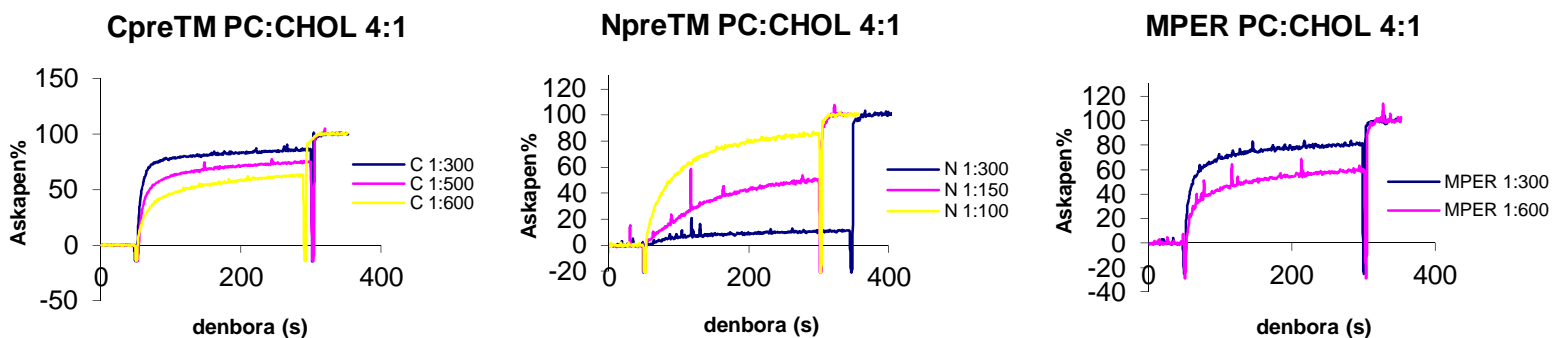


**5. Irudia:** JRCSF eta VSV pseudobirusen bidezko infekzioaren neutralizazio portzentajeak Fab 10E8 (a) eta Mab 10E8 (b) antigorputzen kontzentrazio ezberdinen bidez. Ikusten da biak dutela infekzioa neutralizatzeko gaitasuna, baina Mab 10E8-a eraginkorragoa da.

#### Fab 10E8-en erabilgarritasunaren azterketa

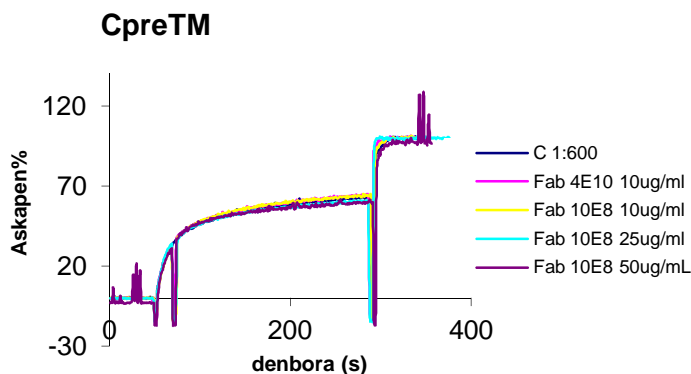
Fab 10E8 birkonbinatuak gai izan behar dira birusaren infekzioa ekiditeko, baina horrez gain, gai izan behar dira txertoan mimotopo gisa erabiliko diren konstruktoetan beraien epitopoa ezagutu eta lotzeko, immunizaziorako birus atenuatuen txertaketa alboratuta baitago. Hori dela eta, Fab 10E8 birkonbinatuak beraien epitopoa duten peptidoak ezagutzeko gai diren edo ez ikusi nahi da askapen eta fusio saioak burutuz, oso ikertua den 4E10 antigorputzarekin ere konparatu delarik.

Horretarako, lehenik eta behin **askapen saioa** burutu da, non Fab 10E8 birkonbinatuek gp41-ean oinarritutako MPER peptido ezberdinek (CpreTM, MPER eta NpreTM) mintza iragazkortzeko duten ahalmena blokeatzeko gaitasuna testatzen den. Saio hau burutu ahal izateko, lehendabizi, peptidoek mintza iragazkortzeko eta askapenaren %60-a indultzeko behar diren kantitateak zehaztu dira (6. irudia). Titulaketa hauetan oinarrituz peptido:lipido proportzio erabilgarriak 1:600 CpreTM, 1:150 NpreTM eta 1:600 MPER direla erabaki da.



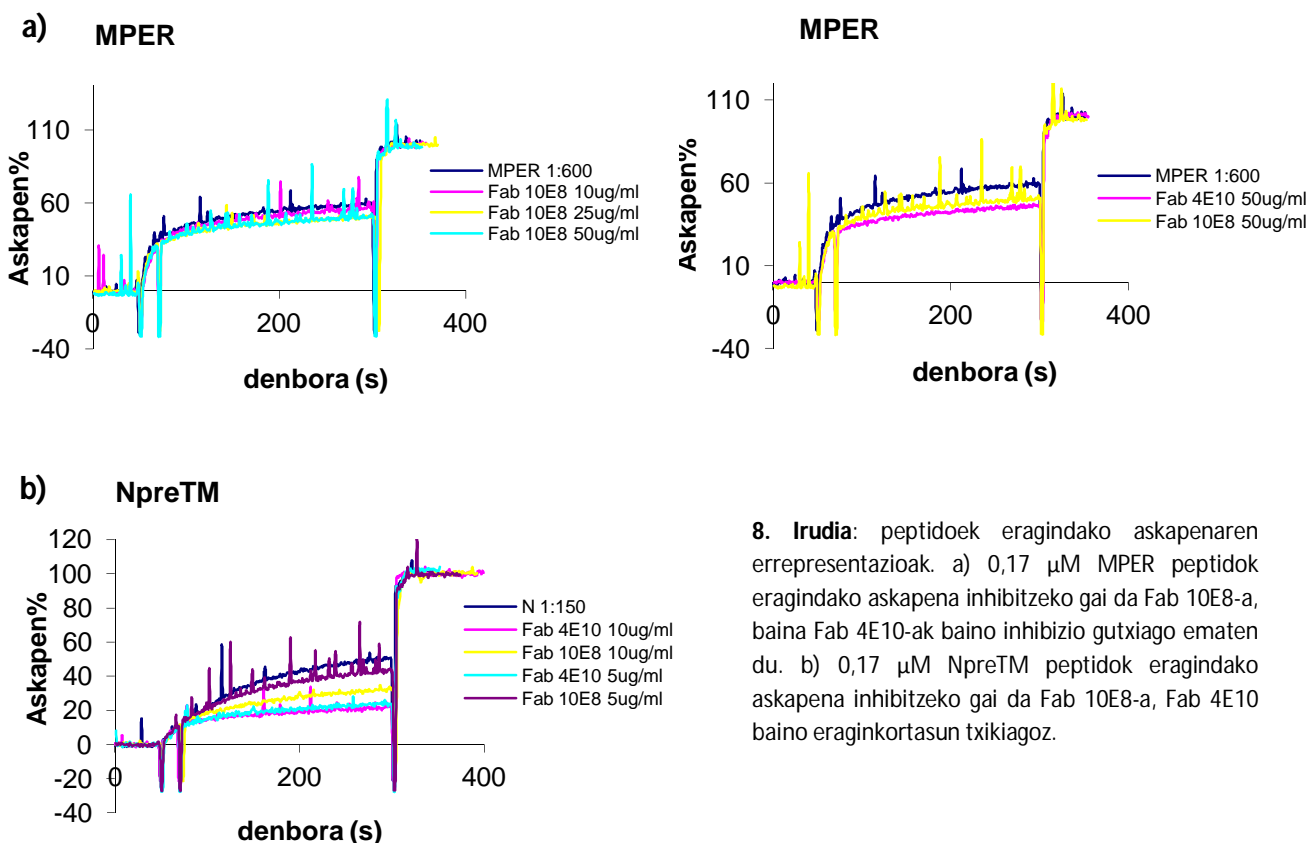
**6. Irudia:** askapenaren %60-a indultzeko beharrezko peptido kantitatea zehazteko egindako titulaketak. Peptido kantitate erabilgarriak 0,17  $\mu\text{M}$  CpreTM , 0,66  $\mu\text{M}$  NpreTM eta 0,17  $\mu\text{M}$  MPER direla erabaki da.

Hortik abiatuz, CpreTM peptidoaren kasuan ikusten denaren arabera, Fab 10E8, Fab 4E10 bezala, ez da gai PC:CHOL 4:1-eko konposizioan peptidoak eragindako askapena inhibitzeko, antigorputza gehitu ondorengo fluoreszentzia aldaketak antigorputzik gabekoaren patroi berdina jarraitzen baitu (7. irudia).



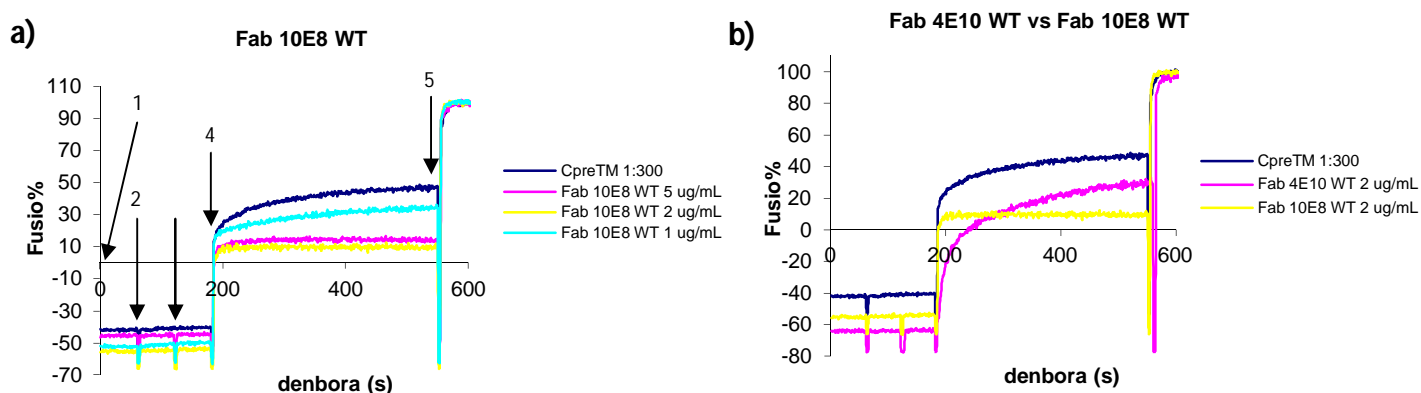
**7. Irudia:** CpreTM peptidoak eragindako askapena eta Fab 10E8 edo Fab 4E10 antigorputz kontzentrazio ezberdinek burututako askapenaren inhibizioa. Antigorputz hauek ez dira gai 0,17  $\mu\text{M}$  CpreTM peptidok PC:CHOL 4:1 konposizioan eragindako askapena inhibitzeko.

Aldiz, MPER eta NpreTM peptidoak erabili diren kasuetan, Fab 10E8-a PC:CHOL 4:1 konposizioan peptidoek eragindako askapena inhibitzeko gai dela ikusten da, antigorputza gehitzean fluoreszentziaren gorakada gutxitzen delako (8. irudia). Are gehiago, Fab 10E8 kontzentrazioa handitu ahala, inhibizio gehiago ikusten da. Alabaina, konposizio lipidiko horretan eta peptido horiekin Fab 4E10-ak hobeto ezagutzen du bere epitopoa Fab 10E8-ak baino: NpreTM-ren kasuan, Fab 4E10-aren 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -ko kontzentrazioarekin %80-ko inhibizioa lortzen den bitartean, Fab 10E8-aren 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -rekin %60-ko inhibizioa lortzen da.



**8. Irudia:** peptidoek eragindako askapenaren errepresentazioak. a) 0,17  $\mu$ M MPER peptidok eragindako askapena inhibitzeko gai da Fab 10E8-a, baina Fab 4E10-ak baino inhibitzio gutxiago ematen du. b) 0,17  $\mu$ M NpreTM peptidok eragindako askapena inhibitzeko gai da Fab 10E8-a, Fab 4E10 baino eraginkortasun txikiagoz.

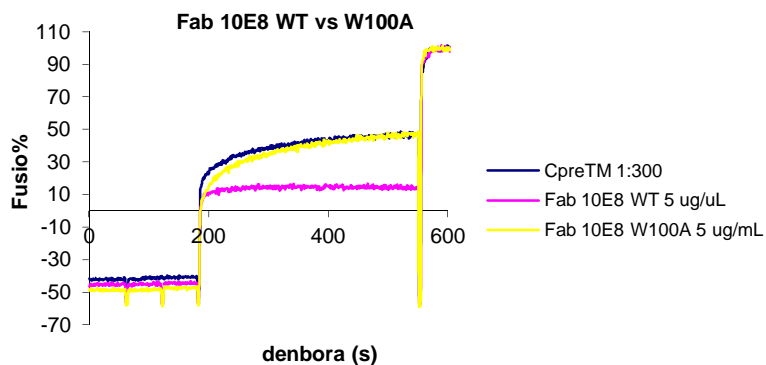
Fab 10E8 birkonbinatuen erabilgarritasuna aztertzeko buruturiko bigarren saioa **fusio saioa** da. Saio honen bidez Fab 10E8-a CpreTM peptidoak eragindako liposomen arteko fusioa inhibitzeko gai den edo ez ikusi nahi da eta gaitasun hori Fab 4E10-arekin konparatu. Horretaz gain, jakina da 4E10 antigorputzean funtziorako garrantzitsua den begizta bat dagoela<sup>13</sup>, beraz, ikusi nahi da 10E8 antigorputzeko CDR-H3 begizta ere garrantzitsua ote den. Modu horretan, antigorputza lotzeko eta neutralizatorako beharrezkoa dela ikusi den W100b aminoazidoaren mutazioak fusioa inhibitzeko gaitasunean duen eragina ere aztertu da.



**9. Irudia:** 0,33  $\mu$ M CpreTM peptidok eragindako besikulen arteko fusioaren errepresentazioa. a) Fusio saioaren pasuak: 1) LUV-en C populazioa, 2) 0,33  $\mu$ M CpreTM peptidoa, 3) Fab 10E8 antigorputza, 4) LUV-en A populazioa, 5) Tritioia. Ikusten da Fab 10E8 gai dela peptidoak eragindako fusioa inhibitzeko, inhibitzio honek dosiarekiko menpekotasuna duelarik. b) Kontzentrazio berdinean (2  $\mu$ g/mL) Fab 10E8-ak fusioaren inhibitzio portzentaje altuagoa erakusten du Fab 4E10-ak baino.

Alde batetik, ikusi da Fab 10E8 birkonbinatua gai dela CpreTM peptidoaren 1:300 diluzioak eragindako liposomen arteko fusioa modu eraginkorren inhibitzeko, fluoreszentiaren gorakada guztiz oztopatzen baitu (9. irudia); Fab 10E8-aren 2 µg/mL-ko kontzentrazioarekin fusioaren %90a inhibitzea lortzen da. Are gehiago, ikusten da Fab 4E10-a baino eraginkorragoa dela, kontzentrazio horrekin (2 µg/mL), Fab 4E10-ak %75-eko fusio-inhibizioa aurkezten baitu.

Beste aldetik, Fab 10E8 WT-ak ez bezala, CDR-H3 begiztako W100a aminoazidoa mutaturik duen Fab 10E8-ak ez du CpreTM peptidoak 1:300 diluzioan eragiten duen fusioa inhibitzeko gaitasunik (5 µg/mL-tan behintzat), fusioaren inhibitzioan duen garrantzia frogatuz.



**10. Irudia:** Fab 10E8 WT eta Fab 10E8 W100A-ak CpreTM peptidoak eragindako fusioa inhibitzeko duten gaitasunen arteko konparaketa. Ikusten da kontzentrazio berean (5 µg/mL) mutantea ez dela gai fusioa inhibitzeko.

## ONDORIOAK

Etokizunean txerto eraginkor bat lortzeko, beharrezkoa da, batetik, birus horren aurka efizienteak diren antigorputzak karakterizatzea, eta bestetik, gure gorputza antigorputz hauek ekoiztera behartzeko gaitasuna izatea.

Hori dela eta, orain arte 10E8 IgG-en funtzioaren testatzeak emaitza ona eman dituen arren<sup>7</sup>, Fab 10E8-en funtzionalitatea aztertu nahi izan da, ekoizteko errazagoak direla kontuan hartuta, IgG-en erabilpena baino kostu eta erabilera errazagoa izango baitute. Modu horretan ziurtatu ahal izan da Fab 10E8 birkonbinatu hauek gai direla beraien epitopoa plakan modu espezifikoan ezagutzeko eta pseudobirusek eragindako zelula eukariotoen infekzioa modu espezifiko eta eraginkorren inhibitzeko; hots, funtzionalki aktiboak direla bermatu da.

Bestalde, sistema immunea antigorputz mota hauek ekoiztera bultzatzeko, beharrezkoa da Fab 10E8 birkonbinatu hauek epitopoa daramaten lipido-peptido formulazioak (FLP) ezagutu eta lotzeko gaitasuna izatea. Horrela, lan honen bidez ziurtatu da antigorputz hauek erabilgarriak direla; MPER eta NpreTM peptidoek POPC:CHOL 4:1 konposiziodun mintzean eragindako perturbazioak inhibitzen dituzte eta konposizio lipidiko berean CpreTM peptidoak eragindako mintzen arteko fusioa inhibitzeko gaitasuna ere azaltzen dute, funtzio horretan CDR-H3-ko W100b aminoazidoa bereziki garrantzitsua dela ikusi delarik.



Hori dela eta, esan daiteke Fab 10E8 birkonbinatuak GIB-1 birusaren gp41-eko MPER peptidora bideratuz birusaren infekzioa ekiditeko ezaugarri onak azaltzen dituela. Hortaz, etorkizunean FPL gehiago aztertuko dira 10E8 antigorputz hau ekoizteko sistema immunea aktibatuko duen immunogeno egokia aurkitu arte.

## BIBLIOGRAFIA

1. <http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/globalreport2013/factsheet/>
2. J.van Gils, M., Sanders, R.W. (2013). *Broadly neutralizing antibodies against HIV-1: Templates for a vaccine*. *Virology* 435, 46-56.
3. Cohen, J. (2013). *Bound for Glory*. *Immunology* 341, 1168-1171.
4. Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G., Ruker, F., Katinger, H. (1993). *A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1*. *J Virol* 67, 6642-6647.
5. Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J.P., Katinger, H. (1996). *Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1*. *J Virol* 70, 1100-1108.
6. Chan, D.C., Kim, P.S. (1998). *HIV entry and its inhibition*. *Cell* 93, 681-684.
7. Huang, J., Ofek, G., Laub, L., Louder, M.K., Doria-Rose, N.A., Longo, N.S., Imamichi, H., Bailer, R.T., Chakrabarti, B., Sharma, S.K., Alam, S.M., Wang, T., Yang, Y., Zhang, B., Migueles, S.A., Wyatt, R., Haynes, B.F., Kwong, P.D., Mascola, J.R., Connors, M. (2012). *Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody*. *Nature* 491, 406-412.
8. Nandi, A., Lavine, C.L., Wang, P., Lipchina, I., Goepfert, P.A., Shaw, G.M., Tomaras, G.D., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., Easterbrook, P., Robinson, J.E., Sodroski, J.G., Yang, X. (2010). *Epitopes for broad and potent neutralizing antibody responses during chronic infection with human immunodeficiency virus type 1*. *Virology* 396, 339-348.
9. Stiegler, G., Kunert, R., Purtscher, M., Wolbank, S., Voglauer, R., Steindl, F., Katinger, H. (2001). *A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1*. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17, 1757-1765.
10. Zwick, M.B., Labrijn, A.F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E.O., Binley, J.M., Moore, J.P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D.R. (2001). *Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41*. *J Virol* 75, 10892-10905.
11. Burton, D.R., Pyati, J., Koduri, R., Sharp, S.J., Thornton, G.B., Parren, P.W., Sawyer, L.S., Hendry, R.M., Dunlop, N., Nara, P.L. (1994). *Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody*. *Science* 266, 1024-1027.
12. Chen, J., Frey, G., Peng, H., Rits-Volloch, S., Garrity, J., Seaman, M.S., Chen, B. (2014). *General mechanism of HIV-1 neutralization by antibodies targeting a Membrane- Proximal Region of gp41*. *Journal of Virology* 88, 1249-1258.
13. Montero, M., van Houten, N.E., Wang, X., and Scott, J.K. (2008). *The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design*. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 54-84
14. Suarez, T., Gallaher, W.R., Agirre, A., Goni, F.M., Nieva, J.L. (2000). *Membrane interface-interacting sequences within the ectodomain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: putative role during viral fusion*. *Journal of virology* 74, 8038-8047.
15. Hope, M.J., Bally, M.B., Webb, G., Cullis, P.R. (1985). *Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential*. *Biochim Biophys Acta* 812, 55-65.
16. Böttcher, C.J.F., van Gent, C.M. (1961). *A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination*. *Anal Chim Acta* 24, 203-204.
17. Ladokhin, A.S., Wimley, W.C., Hristova, K., White, S.H. (1997). *Mechanism of leakage of contents of membrane vesicles determined by fluorescence quenching*. *Methods Enzymol* 278, 474-486.
18. Struck, D.K., Hoekstra, D., Pagano, R.E. (1981). *Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion*. *Biochemistry* 20, 4093-4099.