

ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA FAKULTATEA. LEIOA

---

# GRADU AMAIERAKO LANA BIOTEKNOLOGIA

---

FMDV 2B BIROPORINA  
AKTIBITATEAREN LIPOSOMA-SAIOAK  
ETA ERABILPENA ANTIBIRALEN  
GARAPENEAN

**Egilea:** *Del Rio Lavin, Ane*

**Data:** 2015eko iraila

**Zuzendariak**  
*Jose Luis Nieva Escandon*  
*Eneko Largo Pereda*

**Ikasturtea**  
*2014/15*

# AURKIBIDEA

<b>1. SARRERA ETA HELBURUAK.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. PIKORNABIRUSAK.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. “Foot-and-mouth disease virus” (FMDV birusa).....	1
<b>1.2. BIROPORINAK.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Pikornavirus 2B bioporina.....	4
<b>1.3. MINTZEKO LIPIDOAK.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4. HELBURUAK.....</b>	<b>6</b>
<b>2. GARAPENA.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. MATERIALAK ETA METODOAK.....</b>	<b>6</b>
2.1.1. Materialak.....	6
2.1.2. Ereditopologikoak.....	7
2.1.3. Dikroismo zirkularra.....	7
2.1.4. Monogeruzak.....	8
2.1.5. Solutuen askapena - ANTS/DPX saioa.....	8
2.1.6. Lamela bakarreko besikula erraldoien iragazpena.....	10
<b>2.2. EMAITZAK.....</b>	<b>11</b>
2.2.1. Proteinen topologiaren iragarpena eta peptidoen diseinua.....	11
2.2.2. 2B bioporinatik lortutako peptidoen egitura sekundarioaren azterketa.....	12
2.2.3. Peptidoen txertaketa mintzean.....	14
2.2.4. Solutuen askapena.....	15
2.2.5. Lamela bakarreko besikula erraldoien iragazpena.....	16
2.2.6. 2B bioporina aktibitatearen inhibizioa.....	18
<b>2.3. EZTABAIDA.....</b>	<b>20</b>
<b>3. ONDORIOAK.....</b>	<b>22</b>
<b>4. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>23</b>

## 1. SARRERA ETA HELBURUAK

### 1.1. PIKORNABIRUSAK

*Picornaviridae* familia kate bakuneko RNA genomikoa duten birusek osatzen dute. Egun, hogeita sei birus generotan sailkatzen da; baina, zehazki, gizaki zein animalia askorentzako patogeno larrienak enterovirus, cardiovirus, aphtovirus eta hepatovirus generokoetako espezieak dira (Martinez-Salas, Francisco-Velilla eta lank. 2015).

Enterobirus generoari dagokionez, giza rinobirusa eta poliobirusa dira patogeno ikertuenak. Rinobirusak arnasbideen infekzioa, otitisa eta sinusitisa eragiten ditu. Gainera, munduan ematen diren hotzeri kopuru erdiaren eragilea da eta ondorioz, diru galera izugarriak eragiten ditu osasun arloan (Jacobs, Lamson eta lank. 2013). Poliobirusak iraganean hainbat hildako eragin dituen poliomieltis izeneko gaixotasun paralitikoak eragiten du. Gaur egun, birus honen aurkako txertoa dagoen arren, herrialde batzuetan endemikoa izaten jarraitzen duen gaixotasuna da (Fields, Knipe eta lank. 2001, Viale 2013).

#### 1.1.1. “Foot-and-mouth disease virus” (FMDV birusa)

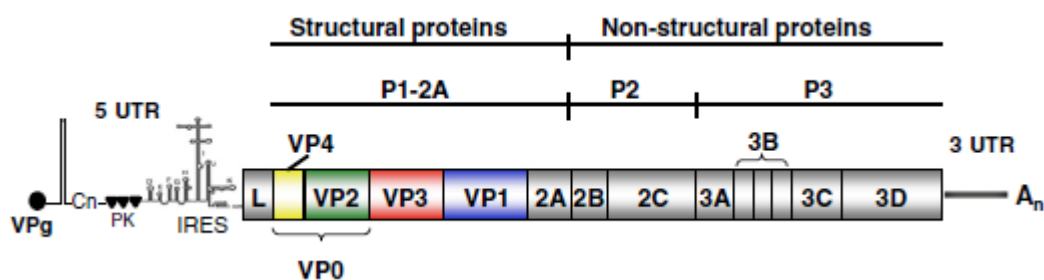
FMDVa aphtobirus generoari dagokion birusa da eta apatx bikoitiak dituzten animaliei erasotzen die. Loeffler eta Frosch-ek 1898an aurkitutako lehenengo animalien patogenoa da (Fields, Knipe eta lank. 2001).

Gaixotasun honek galera ekonomiko izugarriak eragiten ditu hainbat arrazoiengatik. Lehenik eta behin, gaixotasun akutua eta oso kutsagarria da, eta ehun herrialde baino gehiagotan, endemikoa izaten jarraitzen du; batez ere, Asia, Afrika eta Ekialde Ertainean (Jamal eta Belsham 2013). Honetaz gain, birusak duen infekzio eta mutazio tasa altuagatik, aspaldi gaixotasuna pairatu ez duten herrialdeek beste erasoaldi bat jasateko arriskua izan ditzakete. Gainera, gaixotasun hau kontrolatzeko asmotan, abereak ere hiltzen dira. Arrazoi guzti hauen ondorioz, oraindik ere antibiral eta txerto berriak garatzea ezinbestekoa da (Han, Guo eta lank. 2015).

FMD birusak 8500 basetako RNA genomikoa du eta hiru eskualde nagusitan banatu daiteke: 5' eta 3'eskualde ez-kodetzaileak, eta eskualde kodetzailea (ORF). Azken hau, poliproteina aitzindari bakar batera itzultzen da eta prozesamendu

proteolitikoaren bidez, birusaren infekzioa emateko beharrezkoak diren proteina estrukturalak (P1 eskualdea) eta ez estrukturalak (P2 eta P3 eskualdeak) lortzen dira

**1. irudian** ikusi daitekeen moduan (Han, Guo eta lank. 2015).



**1. irudia. FMD birusaren genomaren antolaketa.** FMDV-aren genomaren eskualde kodetzailea (ORF) poliproteina aitzindari bakar batera itzultzen da. Prozesamendu proteolitikoaren ondoren, proteina estrukturalak eta ez estrukturalak lortzen dira (Irudia Jamal and Belsham 2013-tik egokitu da).

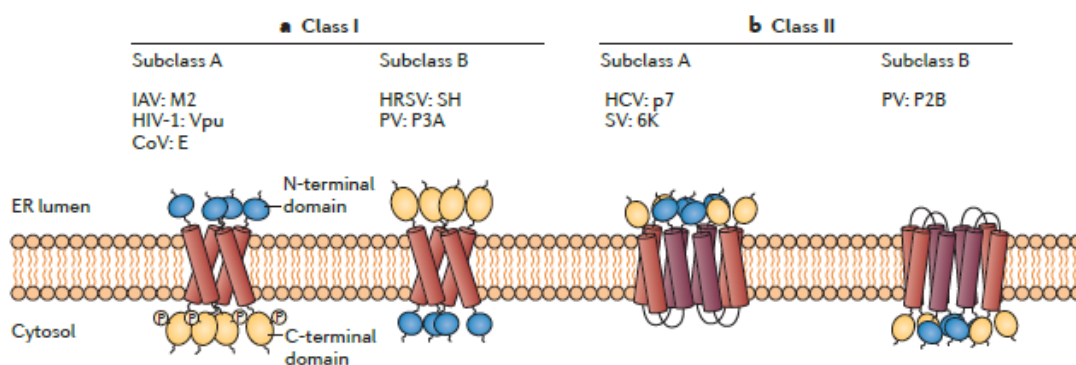
## 1.2. BIROPORINAK

Bioporinak hainbat birusek kodetzen dituzten proteina txiki eta hidrofobikoak dira. Zelula ostalariaren mintzarekin elkar eragiteko gai dira, hauen iragazkortasuna eta propietate fisiologikoak aldatuz. Birusen bizi zikloan duten garrantziagatik, proteina hauek interes handia berpiztu dute azken urte hauetan (Gonzalez eta Carrasco 2003).

Orokorrean, 60-120 aminoazido arteko proteinak dira eta gutxienez mintza zeharkatzen duen  $\alpha$ -helize bat dute. Bioporinek poro hidrofobikoak eratu ditzakete ostalariaren mintzean, bertan txertatu eta oligomeroak eratzeko gaitasuna baitute. Hain zuzen, aminoazido hidrofobikoak bigeruzaren fosfolipidoekin kontaktuan jartzen dira eta aminoazido hidrofobikoak poroaren barnerantz orientatuta (Gonzalez eta Carrasco 2003).

Mintza zeharkatzen duten domeinu kopuruaren arabera, bioporinak bi talde nagusitan sailka daitezke: I taldea eta II taldea. Sailkapen hau **2. irudian** ageri da. I taldekoek mintza zeharkatzen duen domeinu bakarra dute. II taldekoek aldiz, mintza zeharkatzen duen bi domeinu dituzte. Era berean, bi talde hauek azpitaldetan bana daitezke mintzean duten topologiaren arabera. IA taldekoek amino domeinua erretikulu endoplasmaticoaren lumenerantz dute kokatuta eta karboxilo muturra

zitosolera begira. IB taldekoek ordea, kontrako orientazioa dute; hau da, amino muturra zitostol aldera begira eta karboxilo muturra erretikulu endoplasmaticoaren lumenera. IIA taldeari dagokionez, karboxilo zein amino muturra lumenera begira dute, IIB taldekoek aldiz, karboxilo eta amino muturrak zitostol aldeari begira (Nieva, Madan eta lank. 2012).



**2. Irudia. Bioporinen sailkapena mintza zeharkatzen duten domeinuen arabera** (Irudia Nieva, Madan et al. 2012-tik egokituta).

Bioporinen funtzioei dagokionez, hainbat dira orain arte aurkitutakoak. Alde batetik, proteina hauek gai dira mintz plasmaticoaren potentzian aldaketak eragiteko, hain zuzen, zelularen gradiente ionikoa desegin dezakete mintza despolarizatuz (Sanz, Madan eta lank. 2005). Bestetik,  $\text{Ca}^{2+}$  intrazelularren emendioa eragiten dute, ioia gune extrazelularretik sartuz, zein barne konpartimentuetatik (mitokondrio, Golgi aparatu edo erretikulu endoplasmatikotik) askatuz.  $\text{Ca}^{2+}$  ioia hainbat entzima eta prozesuren erregulatuzailea izanik, bere emendioak ondorio larriak eragin ditzake zelula ostalariaren (Hajnoczky, Davies eta lank. 2003). Azkenik, bioporinen beste funtzio garrantzitsu batzuk hurrengoak dira: birusen erreplikazioan zein zelula ostalariaren loturan eta birioiaren askapenean parte hartzea (Jones, Murray eta lank. 2007, Steinmann, Penin eta lank. 2007).

Bioporinek birusen infekzioan duten eginkizun garrantzitsuagatik, terapiak garatzeko iturri proteina bihurtu dira. Alde batetik, poro oztopatzen duten molekula erabil daitezke antibiral moduan. Hauen artean, amantadina eta rimantadina konposatuak daude (StGelais, Tuthill eta lank. 2007, Cady, Schmidt-Rohr eta lank. 2010). Bestetik, bioporina akasduna duten birus indargabetuak erabil daitezke txerto gisa (Watanabe, Watanabe eta lank. 2009).

### 1.2.1. Pikornavirus 2B bioporina

*Picornaviridae* familiaren barnean, poliobirus eta coxsackie birus espezieek kodetzen duten 2B bioporina izan da sakon ikertu den bakarra. Proteina hau zenbait organuluren iragazkortasunaren aldaketaren erantzulea da. Hain zuzen, erretikulu endoplasmaticoaren eta Golgi aparatuen mintzean txertatzen da poroak eratuz; ondorioz, organulu hauen  $\text{Ca}^{2+}$  eta  $\text{H}^+$  kontzentrazioa jaisten da. Kaltzio desoreka hauek zelula ostalariaren apoptosia induzitu dezakete (Aldabe, Barco eta lank. 1996, van Kuppeveld, Hoenderop eta lank. 1997). Proporzio txikiago batean, mitokondrioaren mintzean eta mintz plasmaticoan ere txertatu daiteke.

2B bioporina proteina txikia da, espeziearen arabera 100 aminoazido inguru izan ahal dituelarik. Mintza zeharkatzen duten bi gune hidrofobiko ditu eta hauen sekuentziak garrantzi handia dutela ikusi da. Izan ere, bertan ematen diren mutazioek iragazkortasunaren emendioa eta RNAREN erreplikazioa oztopatzen dute (van Kuppeveld, Galama eta lank. 1995, van Kuppeveld, van den Hurk eta lank. 1996, van Kuppeveld, Melchers eta lank. 1997).

IIB motako bioporina izanik, mintza zeharkatzen duten bi domeinu helikoidal ditu eta hauek lotuz, zitosoleko begizta eratzen duten aminoazido polarren sekuentzia ageri da. Modu honetan,  $\alpha$ -begizta- $\alpha$  egitura eratzen da (Agirre, Barco eta lank. 2002).

Poliobirus eta coxsackie birus espezieak oso ikertuak izan diren arren, gutxi dira FMDV 2B proteinaren inguruan egin diren ikerketak. Gainera, lortutako emaitzak nahiko kontrajarriak izan dira. Gainerako pikornavirus espezieekin alderatuz, badirudi FMDV birusaren 2B bioporinak egitura eta funtzio ezberdinak agertu dituela (de Jong, de Mattia eta lank. 2008). Hori dela eta, bioporina honen egitura eta funtzioaren inguruan analisi sakonago bat egitea pentsatu da.

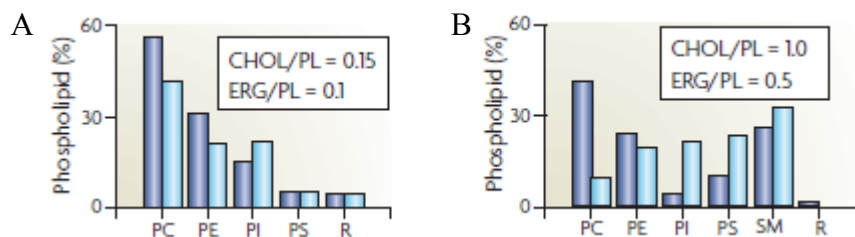
### 1.3. MINTZEKO LIPIDOAK

Mintz biologikoen osagai nagusiak lipidoak eta proteinak dira. Karbohidratoak ere badaude, glikolipido edo glikoproteina moduan ageri direnak, baina proportzio txikian.

Mintzaren egitura izaera anfipatikoa duten lipidoei esker lortzen da, hauek eratzen baitute bigerua lipidikoa. Modu honetan, mintza bi eskualdetan bana daiteke: gune hidrofobikoa eta interfasea. Lehenengoa, fosfolipidoen kate hidrokarbonatuek eta kolesterol molekulek osatzen dute. Bigarrena, buru polarrez osatuta dago. Bigeruzaren egitura eratzeaz gain, lipidoek beste funtzio batzuk dituzte, hala nola, seinaleztapenean, erreakzio biosintetikoetan eta hazkuntza zelularren erregulazioan parte hartzea eta mezulari moduan jokatzea.

Lipidoen ezaugarrien artean, karga eta egitura dira aipagarrienak. Alde batetik, fosfolipido anionikoak molekula askorekin elkar eragiteko ahalmena dute. Era honetan, proteina edo peptido bat aldentzea edo erakartzea eragin dezakete. Fosfatidilinositola (PI), esaterako, karga negatibodun lipidoa da. Bestetik, lipidoen egiturak mintzak izan dezakeen kurbadura baldintzatzen du. Lipidoaren buru polarra kate hidrokarbonatuak baino handiagoa bada, kurbadura eragingo du mintzean. Gauza bera gertatuko da, buru polarra kate hidrokarbonatua baino txikiagoa bada. Esate baterako, fosfatidiletanolaminak (PE-k) bere geometria konikoari esker, kurbadura indusitzen du, buru polarra oso txikia baitu kate hidrokarbonatuekin alderatuz. Aldiz, fosfatidilkolinak (PC), geometria molekular zilindrikoa duenez, ez du kurbadurarik indusitzen (van Meer, Voelker eta lank. 2008).

Organulu batetik bestera mintzeko lipido konposaketa eta erlazio molarra asko aldatzen da. Hau da, esan daiteke organulu bakoitzak konposaketa zehatz eta bakarra izango duela (van Meer 1989). Erretikulu endoplasmatikoa lipido gehienentzako sintesi tokia da (Bell, Ballas eta lank. 1981). **3.A irudian** ikus daitekeen moduan organulu honen mintza glizerofosfolipidoz osatuta dago; batik batik, fosfatidilkolinak (PC), fosfatidiletanolaminak (PE) eta fosfatidilinositolak (PI) osatzen dute (van Meer, Voelker eta lank. 2008). Mintz plasmatikokoari dagokionez, bere funtzio nagusienetako bat zelulari egonkortasuna ematea da. Mintz hau, aurrekoa ez bezala, esfingolipido eta esteroletan aberatsa da (**3.B irudia**). Lipido hauek mintzaren paketamendu maila areagotuko dute zurruntasuna emanez, beraz, estres mekanikoari hobeto egingo diote aurre. Mintz plasmatikoa osatzen duten lipidoak, batez ere, honako hauek dira: kolesterola (Chol), PC, PE, esfingomielina (SM) eta fosfatidilserina (PS) (van Meer, Voelker eta lank. 2008).



**3. Irudia. Mintz biologikoen lipido konposaketa.** Erretikulu endoplasmatikoaren (A) eta mintz plasmaticoaren (B) konposaketa fosfolipidikoa ageri da ehunekotan. Ugaztunen (urdin ilunez) eta legamien (urdin argiz) konposaketak desberdinu daitezke (Irudia van Meer, Voelker et al. 2008-tik egokituta).

Mintz biologikoen konposaketa jakinda, lipido sintetikoak erabiliz, mintzean ematen diren baldintzak islatu daitezke *in vitro*, era sinplifikatu eta kontrolatu batean. Beraz, bigeruz artificial hauek, proteina eta mintzen artean ematen diren elkarrekintzen hurbilketak egiteko aukera ematen dute.

#### 1.4. HELBURUAK

- Orokorki FMDV 2B bioporinaren egitura-funtzioa aztertzea eta antibiralen garapenerako itu proteina posiblea den ikertzea. Horretarako;
  - Teknika bioinformatikoak erabiliz bioporinaren topologia aztertzea.
  - Mintzarekin elkarrekiten duten domeinuen mapaketa egitea.
  - Poro hidrofiliakoak eratzen dituzten domeinuen mapaketa egitea.
  - Bioporina aktibitatea erakusten duten domeinuen inhibizioa aztertzea.

## 2. GARAPENA

### 2.1. MATERIALAK ETA METODOAK

#### 2.1.1. Materialak

Fosfatidilkolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositola (PI), errodamina fosfatidiletanolamina (Rh-PE), fosfatidiletanolamina (PE), kolesterola (Chol) eta esfingomielina (SM) Avanti Polar Lipids (Birmingham, AEB) enpresan erosi ziren. 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfoniko azidoa (ANTS), p-xileno-bis-piridinio bromuroa (DPX) eta Alexa Fluor 488 fluoroforoa Molecular Probes (Junction City, OR, AEB) enpresan erosi ziren.



Dodezilfosfokolina (DPC) Anatraxe (Maumee, OH, AEB) enpresan erosi zen. 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanola (HFIP), sodio dodezil sulfatoa (SDS) eta amantadina eta berapamilo inhibitzaileak Sigma-Aldrich (San Luis, AEB) enpresan erosi ziren. FMDV birusaren 2B bioporinatik eratorritako peptidoak (2B1, 2B2, 2B3 eta 2B4) Thermo Scientific (Waltham, AEB) zerbitzuak sintetizatu zituen.

### **2.1.2. Eredu topologikoak**

Peptidoak sintetizatu aurretik, proteinaren eredu topologiko teorikoa garatu da. Transmintz domeinuak iragartzeko, jarraian agertzen diren egitura eta topologia iragarpen algoritmoak erabili ziren: DAS (Cserzo, Wallin eta lank. 1997), PHDhtm (Rost, Fariselli eta lank. 1996), MEMSAT3 (Jones 2007), TMHMM (Krogh, Larsson eta lank. 2001), Tmpred (Hofmann eta Stoffel 1993), DG prediction (Hessa, Kim eta lank. 2005, Hessa, Meindl-Beinker eta lank. 2007), OCTOPUS & SPOCTOPUS (Viklund, Bernsel eta lank. 2008) eta TOPpred (von Heijne 1992).

### **2.1.3. Dikroismo zirkularra**

Dikroismo zirkularra (CD) absorbantzia oinarritutako teknika espektroskopikoa da, makromolekula biologikoen egitura sekundarioari buruzko informazioa lortzeko eta aldaketa konformazionalak behatzeko erabiltzen dena.  $\alpha$ -helize baten CD espektroak bi minimo aurkezten ditu 222 nm eta 208 nm-tan, eta maximo bat 191 nm inguruan. Banda hauen intentsitateek, aztertzen ari garen peptido edo proteinaren eliptizitate proportzioa adierazten dute.

Lan honetan egindako CD neurketak, Jasco J-810 dikroismo zirkularreko espektropolarimetroan egin ziren. Peptidoen stock-ak zegokien kontzentrazioan DMSOn disolbatu ziren eta gau batez liofilizatu ziren. Neurketak egiten hasteko, 20  $\mu$ M-eko kontzentrazioan zeuden peptidoak hiru tanpoi ezberdinetan disolbatu ziren; %50 HFIP zuen Hepes (5 mM, pH 7.4) tanpoian eta 50 mM DPC zuen Hepes tanpoian. Espektroak 1 mm-eko pasu optikoa zuen kuartzozko kubeta baten neurtu ziren 25°C-tan. Neurketak 200-260 nm tartean jaso ziren eta 20 espektroren batz bestekoa lortu zen. Honetarako 1s-tako erantzun denbora eta 50 nm/minutuko abiadura erabili ziren.

#### 2.1.4. Monogeruzak

Monogeruzak, anfipatikoa den konposatu bat, fosfolipido bat adibidez, azalera urtsu baten sakabanatzean sortzen dira. Fosfolipidoak azalera urtsuaren interfasean kokatzen dira, buru polarrak ingurune urtsura begira eta kate hidrofobikoak airerantz begira dituztelarik.

Lipidoz osotutako monogeruza hauek peptido eta proteinekin mintzarekin eratzen dituzten elkarrekintzak aztertzeko oso baliogarriak dira (Maget-Dana 1999). Gehitzen den proteina edo peptidoa mintzean txertatzen bada edo nolabaiteko elkarrekintza eratzen badu, monogeruzaren interfasearen azalera presio aldaketa bat emango da. Presio aldaketa hau monogeruzarekin kontaktuan dagoen zunda batek detektatuko du. Azalera presioaren aldaketa, monogeruzan txertatzen den proteina kantitatearekin erlazio zuzena du.

Lan honetan, lau peptidoen txertaketa aztertu zen monogeruzetan. Neurketak irabiaketa konstantean (400 rpm) eta 25°C-tan egin ziren. Honetarako azalera zirkular eta finkoa zuten kubetak erabili ziren, hain zuzen ere, 1,25 mL-tako bolumena zutenak.

Fase urtsu modura tanpoi arrunta (Hepes 5 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4) erabili zen. Lipidoei dagokionez, kloroformotan disolbatutako bi konposaketa lipidiko ezberdin erabili ziren. Alde batetik, erretikulu endoplasmaticoaren (ER) konposaketa lipidikoa zuena, PC:PE:PI (5:3:2, erlazio molarrean). Bestetik, mintz plasmaticoaren (PM) konposaketa lipidikoa zuena, Chol:PC:PE:SM:PS (5:2:1.25:1.25:0.5, erlazio molarrean). Behin monogeruza eratua zegoela, 1  $\mu$ M-eko kontzentrazioa zuen peptidoa gehitu zen azpifasean txertatuz.

#### 2.1.5. Solutuen askapena - ANTS/DPX saioa

Liposomen barnean enkapsulatutako solutuen askapen saioekin, proteina edo peptido batek mintza apurtzeko duen gaitasuna neurtu daiteke. Saio honetarako DPX eta ANTS molekulak mintz ereduak diren liposomen barnean enkapsulatzen dira. ANTSa molekula floreszentea da berez, baina DPX molekularekin talka egitean bere fluoreszentzia murrizten da, neurtzen den fluoreszentzia minimoa izanik. Mintzaren iragazkortasuna handitzen duen kanpo eragilerik egotekotan, bi konposatuak

liposometatik aterako dira, eta kanpo medioan diluituko dira, kolisio fenomenoak murriztu egiten direlarik. Modu honetan, ANTSaren fluoreszentsia igorpenaren seinalea handituko da.

Saio honetarako erabilitako liposomak, lamela bakarreko besikula handiak (ingelesez Large Unilamellar Vesicles, LUV) ziren, 100-500 nm-tako tamaina zutenak. Bi konposaketa ezberdineko LUVak prestatu ziren, hain zuzen, aurretik aipatutako mintz plasmatico eta erretikulu endoplasmaticoko konposaketa zutenak.

Liposomen prestaketarako lehenik eta behin, bi lipido nahaskeak disolbatzaile organikoan (kloroformoan) disolbatu ziren, 6 mM-eko kontzentrazioan. Ondoren fase organikoa nitrogeno gas korrante batekin lurrundu zen. Geratzen ziren disolbatzaile organikoaren arrastoak huts ponpa bati konektatuta dagoen lehergailu baten bidez kendu ziren, ordu batez.

Jarraian, lehortutako lipidoak ANTS/DPX tanpoarekin (12.5 mM ANTS, 45 mM DPX, 20 mM NaCl eta 5 mM Hepes) berreseki ziren, eta 10 izozte/desizozte ziklo egin ziren. LUV-ei tamaina eta itxura egokia lortzeko, Hopek deskribaturiko estrusio metodoa erabili zen (Hope, Bally eta lank. 1985). Metodo honetan, besikulak 0.1  $\mu\text{m}$ -eko polikarbonatozko filtroetatik pasatzen dira 10 aldiz.

Kanpoaldean enkapsulatu gabe geratu zen zunda kentzeko, liposomak PD10 iragazpen zutabe batetik pasatu ziren. Iragazpenerako 5 mM Hepes eta 100 mM NaCl (pH 7.4) zuen tanpoia erabili zen. Liposomen prestaketarekin bukatzeko, hauen kanpo eta barneko osmolaritatea orekan zegoela ziurtatu zen, apurtuta ez zeudela berresteko. Honetarako, Osmomat 030 osmometroa (Osmomat 030; Gonotec, Berlin, Germany) erabili zen.

Fluoreszentsia neurketak SLM Aminco 8100 espektrofluorimetroan (Spectronic Instruments, Rochester, NY) egin ziren. Honetarako ANTS molekularen igorpen uhin luzera 520 nm-tan eta kitxikapen uhin luzera 355 nm-tan jarri ziren. Liposomen hasierako fluoreszentsia balioari %0-ko askapena zegokion. Ondoren, liposomei zegokion peptido kantitatea gehitu zitzaien eta igorritako fluoreszentsia neurtu zen. Bukaeran, Triton X-100 (%0.5 [vol/vol]) detergentea gehitu zen. Modu honetan, ANTSaren fluoreszentsia maximoa lortu zen, liposomak erabat apurtzen baitziren.

Peptidoek eragindako solutuen askapena neurtu ondoren, amantadina (5 mM) eta berapamilo (1 mM) inhibitzaileekin egin ziren saioak. Neurketak bi modutara egin ziren: inhibitzaileak zuzenean tanpoian disolbatuz edo inhibitzailea peptidoa gehitu ondoren gaineratuz.

#### **2.1.6. Lamela bakarreko besikula erraldoien iragazpena**

Saio honen bidez, peptidoek, mintzaren osotasuna mantenduz, poroak eratzeko duten gaitasuna aztertu daiteke. Honetarako erabilitako liposomak, lamela bakarreko besikula erraldoiak (ingelesetik, Giant Unilamellar Vesicles, GUV) ziren, 25-100  $\mu\text{m}$ -eko tamaina zutenak.

Liposomak elektroformazio metodoaren bidez prestatu ziren (Landeta, Landajuela eta lank. 2015) . Aurreko metodoetan aipatutako erretikulu endoplasmatikoko konposaketa erabili zen, baina kasu honetan, %0.5-eko Rh-PE gehitu zen. Lipidoak disolbatzaile organikoan (kloroformo:metanol) (9:1) disolbatu ziren, 2 mM-eko kontzentrazioan.

Nahaste honetatik, 2  $\mu\text{l}$  gehitu ziren elektroformazio ganbera baten platinozko hari bakoitzera. Behin disolbatzailea lurrunduta, hariak 300 mM-eko sakarosa tanpoiaz estali ziren, eta 10 Hz-tako pulstu elektrikoekin utzi ziren bi orduz. Denbora hau pasata, 2 Hz-tan utzi ziren 30 minutuz.

Peptidoek eragindako GUVen iragazpena aztertzeko, fluoreszentziazko mikroskopio konfokala (Nikon DECLIPSE C1, Nikon Inc., Melville, NY) erabili zen. Behaketak egiteko, zegokion peptido kantitatea, Alexa fluoroforoa, 330  $\mu\text{l}$  tanpoi (40mM Hepes, 150mM KCl) eta 70  $\mu\text{l}$  GUV nahastu ziren ganberatan, 400  $\mu\text{l}$ -tako bolumen finala lortuz.

Fluoreszentziazko mikroskopio konfokaletik lortutako irudiak ImageJ programaren bidez prozesatu ziren. Modu honetan, GUVen barneko eta kanpoko fluoreszentzia neurtu zen eta lortutako datuak alderatu ziren.

Neurketa hauetaz gain, amantadina (5 mM) eta berapamilo (1 mM) inhibitzaileekin egin ziren saioak, iragazpena oztopatzen zutela frogatzeko. Honetarako, inhibitzaileak erabilitako tanpoian disolbatu ziren. Aurreko kasuan moduan, datuak ImageJ programa bidez prozesatu ziren.

## 2.2. EMAITZAK

### 2.2.1. Proteinaren topologiaren iragarpena eta peptidoen diseinua

FMDV 2B biroporinaren aminoazido sekuentzia kontuan harturik, proteinaren topologiaren iragarpen bat egiteko teknika bioinformatikoak erabili dira. Honen helburua, proteinak izan ditzakeen peptidoen diseinu arrazional bat egitea da. Era honetan, biroporina aktibitatea izan ditzaketen peptidoak bilatu nahi dira; ahal den neurrian, peptido sekuentzia laburrak lortuz. Hala ere, kontuan izan behar da, peptidoen luzera minimoa 20 aminoazidoetako izan behar dela poroak eratzeko gaitasuna izan dezaten. Proteina IIB taldekoa dela onartuz, bi transmintz domeinu (TMD) izatea espero da. Honen arabera, jarraian agertzen diren TMDak aurkitu dira (1. taula).

1. Taula. Algoritmoetan oinarritutako teknika bioinformatikoak erabiliz lortutako transmintz domeinuak.

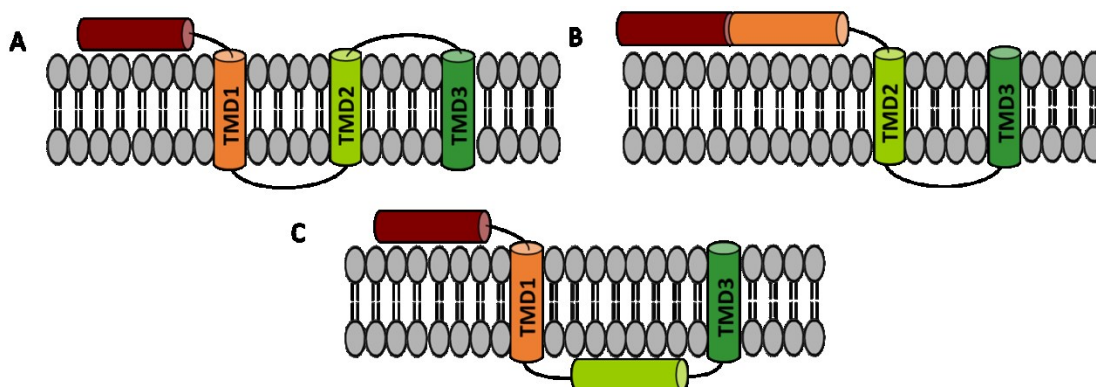
Algoritmoak	TMD1	TMD2	TMD3
DAS	-	84-98	113-139
PHDhtm	-	-	117-134
TMHMM	-	-	-
TMPred	-	83-103	114-134
DG prediction	63-81	-	121-142
SPOCTOPUS	-	-	-
TOPPred	-	-	114 - 134

Lortutako emaitzek, hiru transmintz domeinu proposatzen dituzte: lehenengoa (TMD1), 63-81 aminoazidoen tartean; bigarrena (TMD2), 83-103 tartean, eta hirugarrena (TMD3), 104-142 tartean. Hau ikusirik, 2B biroporinaren azterketa burutzeko, beheko taulan ageri diren lau peptidoak diseinatzea erabaki da. Aipatzekoa da, sintetizatutako hirugarren peptidoa disolbagarri bihurtzeko *lys-tag* bat gehitu dela (Madan, Sanchez-Martinez eta lank. 2007).

## 2. Taula. Peptidoen diseinua eta imitatzen dituzten TMDak.

Peptidoen aminoazido sekuentzia		
<b>2B1</b>	28 KHGPDFNRLVSAFEELAIGVKAIRTGLDE 56	-
<b>2B2</b>	55 DEAKPWYKLIKLLSRLSCMAAVAARSKD 82	TMD1
<b>2B3</b>	79 RSKDPVLVAIMLADTGLEILDSTFVVKK 106	TMD2
<b>2B4</b>	99 DSTFVVKKISDSLSSLFHVPPAPVFSFGAPILLAGLVKVASSFFRSTPED 147	TMD3

Behin peptidoak diseinatu direla eta iragarpenetik lortutako informazioa kontuan hartuz, hiru eredu topologiko posible planteatu dira 2B proteina deskribatzeko (**4.irudia**). Lehenengo ereduak (**A**) mintza zeharkatzen duten hiru domeinu ditu, 2B2, 2B3 eta 2B4 peptidoei dagozkienak. Bigarren (**B**) eta hirugarren (**C**) ereduak, mintza zeharkatzen duten bi domeinu dituzte. 2B4 peptidoa bere baitan hartzen duen domeinua (TMD3) bi eruedetan dago, izan ere, iragarpen gehienetan ageri da. Lehenengo transmintz domeinuari dagokionez, bigarren eredian (**B**) 2B3 peptidoak mintza zeharkatzen duela planteatu da (TMD2); eta aldiz, hirugarren eredian (**C**) 2B2 peptidoa da mintza zeharkatzen duena (TMD1).



**4. Irudia. Planteatutako 2B proteinaren eredu topologiko posibleak.** 2B-k hiru transmintz domeinu (TMD) ditu, 2B2, 2B3 eta 2B4 peptidoei dagozkienak (A). 2B-k bi TMD ditu 2B3 eta 2B4 peptidoei dagozkienak (B), ala soilik 2B2 eta 2B4 peptidoei (C).

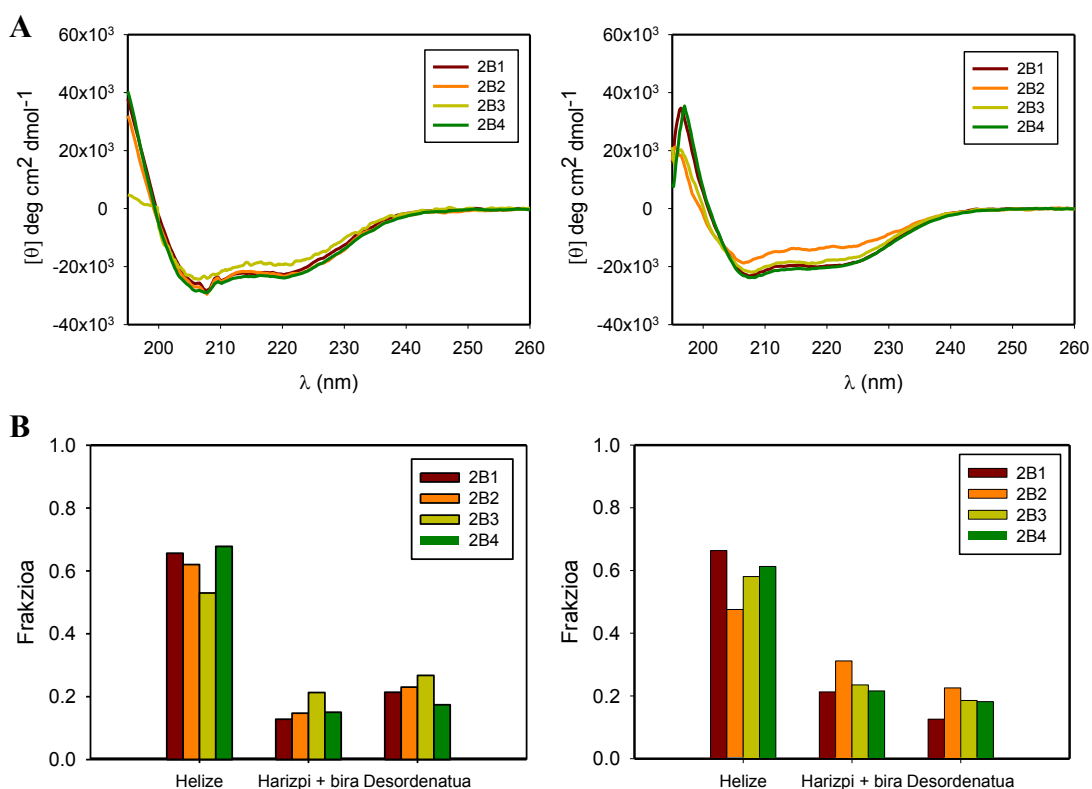
### 2.2.2. 2B bioporinatik lortutako peptidoen egitura sekundarioaren azterketa

2B peptidoen azterketa estrukturala burutzeko CD teknika espektroskopikoa erabili da. Lortutako espektroetan ikusi daitekeen moduan (**5.A irudia**), lau peptidoek

$\alpha$ -helize konformazioa aurkezten dute, HFIP zein DPCren presentzian. Izan ere, bi minimo aurkezten dituzte 222 nm eta 208 nm-tan eta maximo bat 190 nm inguruan.

Honetaz gain, aipatzekoa da, %50 HFIP duen tanpoiaz berreseki diren peptidoen bandek intentsitate handiagoa dutela, hau da, DPCarekin alderatuz eliptizitate gehiago agertu dutela. Hau esperotakoa da, izan ere, HFIP  $\alpha$ -helizeen indutzitzailea da. DPC-a medio urtsu batean mizela txikiak eratzen dituen detergente bat da. Mizela hauek mintz baten egitura simulatzen dute, era honetan, peptidoek mintzean txertatzean duten egitura azter dezakegu.

CDPro softwarea erabiliz lortutako egitura sekundariozko frakzioetan ageri den moduan (**4.B irudia**),  $\alpha$ -helize egitura da lau peptidoek gehien agertzen dutena (Sreerama eta Woody 2000). Harizpi, bira eta egitura desordenatuak ere badaude, baina proportzio txikiagoetan.



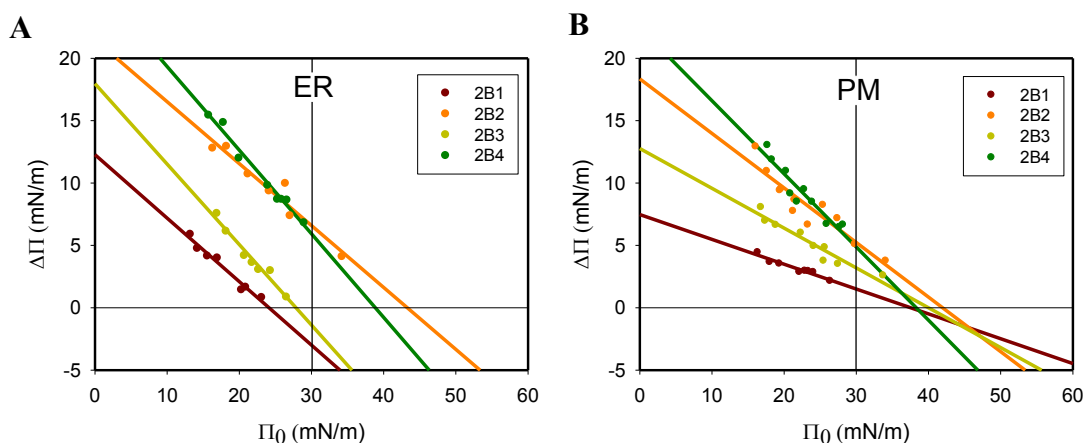
**5. Irudia. 2B peptidoen egitura sekundarioa %50 HFIP (ezkerrean) eta 50mM DPC (eskuman) tanpoiak erabiliz.** Goiko aldean (A), dikroismo zirkularreko espektroak ageri dira. Beheko aldean (B), espektroen datuetan oinarrituta, CDPro software-tik lortutako egitura sekundarioen frakzioak ageri dira.

### 2.2.3. Peptidoen txertaketa mintzean

Peptidoek mintzean txertatzeko duten ahalmena aztertzeko, lipido-monogeruza saioak burutu dira. Azpifasean gehitutako peptidoak mintzean txertatzean, interfasearen presio aldaketa eragin dute. Mintz zelularretan aurkitzen diren presioak 30mM/m ingurukoak direla onar daiteke; beraz, presio hau baino altuagoetan konprimituta dauden monogeruzetan txertatzeko gai badira, zeluletan dauden mintzetan txertatzeko egokiak direla esan daiteke.

**6. irudian** saio honetan lortutako emaitzak ageri dira. **6.A irudian** ikusi daitekeen moduan, 2B2 eta 2B4 peptidoek erretikulu endoplasmatikoko konposaketa duten monogeruzetan txertatzeko gaitasun handia erakutsi dute; aldiz, 2B1 eta 2B3 peptidoek ez dute mintz hauetan txertatzeko gaitasunik agertu.

**6.B irudiari** dagokionez, peptido guztiek mintz plasmatikokoan txertatzeko gaitasuna erakutsi dute. Honen arrazoia, mintz plasmatikoko konposaketaren %50 kolesterola dela izan daiteke. Izan ere, kolesterola fosfolipidoen kate hidrokarbonatuen artean kokatzen da, buru polarrak elkarrengandik banatuz. Era honetan, peptidoek bigeruzaren interfasea heltzeko erraztasun handiagoa dute, txertaketa faboratzen delarik.



**6. Irudia. 2B peptidoen txertaketa monogeruzetan.** Peptidoak erretikulu endoplasmatikoko (A) eta mintz plasmatikoko konposaketa (B) imitatzen duten monogeruzetan txertatzerakoan eragindako presio aldaketaren balioak ageri dira. Datuak, peptidoen txertaketa zinetiketarik lortu dira. Hain zuzen, presioaren aldaketa ( $\Delta\Pi$ ), presio maximoari hasierako presioa ( $\Pi_0$ ) kenduz lortu da.

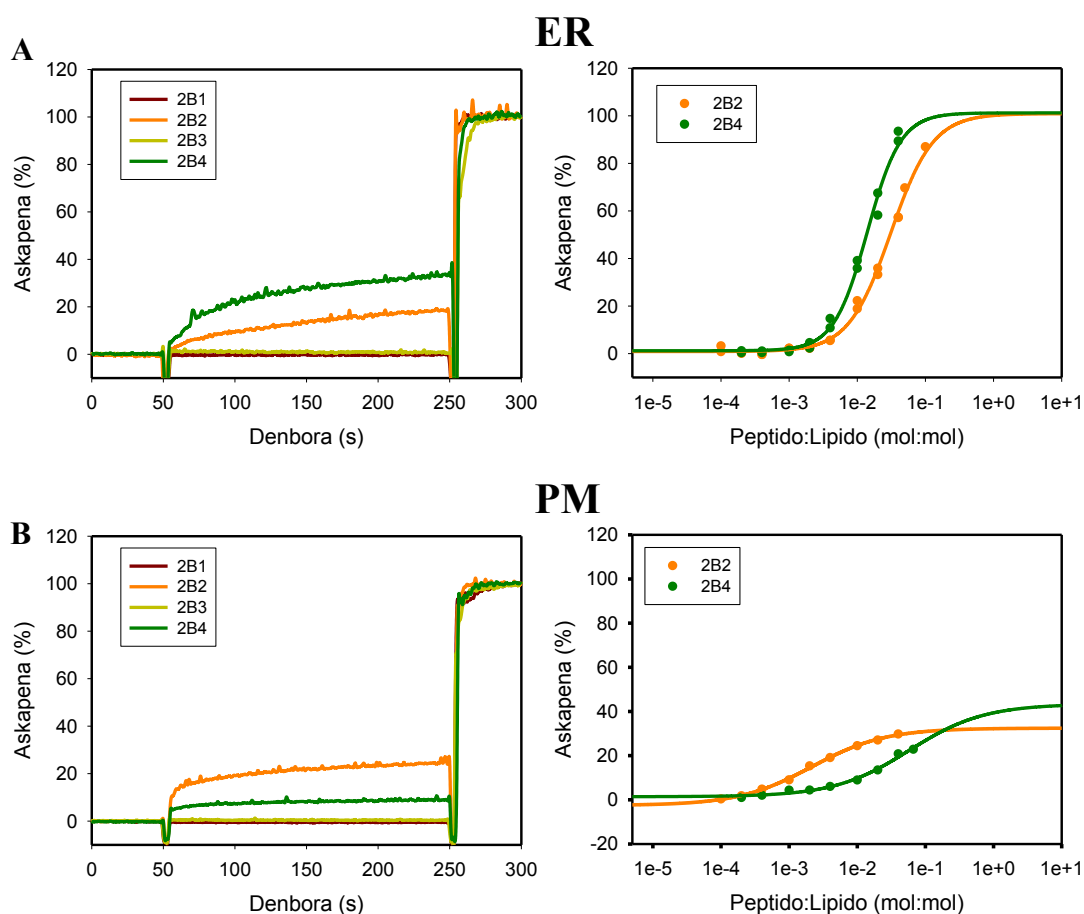


#### 2.2.4. Solutuen askapena

Behin peptidoak mintzean txertatzeko gai direla ikusita, solutuen askapena eragiteko gaitasuna duten ala ez aztertu da (**7. irudia**). Lortutako emaitzen arabera, 2B2 eta 2B4 peptidoak ANTS molekularen askapena eragiteko gai dira, domeinu litikoak direla ondorioztatuz (**7 ezkerreko irudiak**). Gainera, peptido:lipido proportzioa handitu ahala, solutuaren askapenaren emendio bat ematen da bi kasuetan (**7 eskumako irudiak**).

Erretikulu endoplasmatikoko konposaketa duten liposometan, %100eko askapen teorikoa lortzen da 2B2 zein 2B4 peptidoak erabiliz (**7.A irudia eskuman**). Aldiz, mintz plasmatikoko konposaketa duten liposometan, %40 inguruko saturazio teorikora heltzen da soilik (**7.B irudia eskuman**). Honen arrazoa, 2B peptido hauek mintz plasmatikokoan poroak sortzen ez dituztela izan daiteke. Hau da, poroak sortu beharrean, bestelako egitura bat sortzen dute mintz plasmatikokoan txertatzean, eta ondorioz, ez da erabateko askapena lortzen. Honetaz gain, aipatzekoa da 2B4 peptidoak iragazkortasun handiagoa eragiten duela erretikulu endoplasmatikokoan, eta 2B2 peptidoak, aldiz, mintz plasmatikokoan.

2B1 eta 2B3 peptidoak dagokienez, ez dira erretikulu endoplasmatikoko (**7.A irudiak**) ezta mintz plasmatikoko (**7.B irudiak**) konposaketa duten mintzak iragazkor bihurtzeko gai, ez baitute inolako solutuen askapenik eragiten. Beraz, aurretik mintz plasmatikoko konposaketa duten liposometan txertatzeko gai direla ikusi badugu ere, ez dute solutuen askapenik eragiten.



**7. Irudia. 2B peptidoek eragindako solutuen askapena.** Erretikulu endoplasmatico (A) eta mintz plasmaticoko (B) konposaketa imitatzen duten liposomekin egindako neurketak ageri dira. Ezkerrean, solutuaren askapena neurtu da denboran zehar, peptido: lipido erlazioa 1:100 (mol:mol) izanik. 50 segunduan peptidoa gehitu da, eta 250 segunduan Triton X-100 detergentea askatasun maximoa eraginez. Eskuman, peptido:lipido erlazio desberdinek eragindako solutu askapena ageri da.

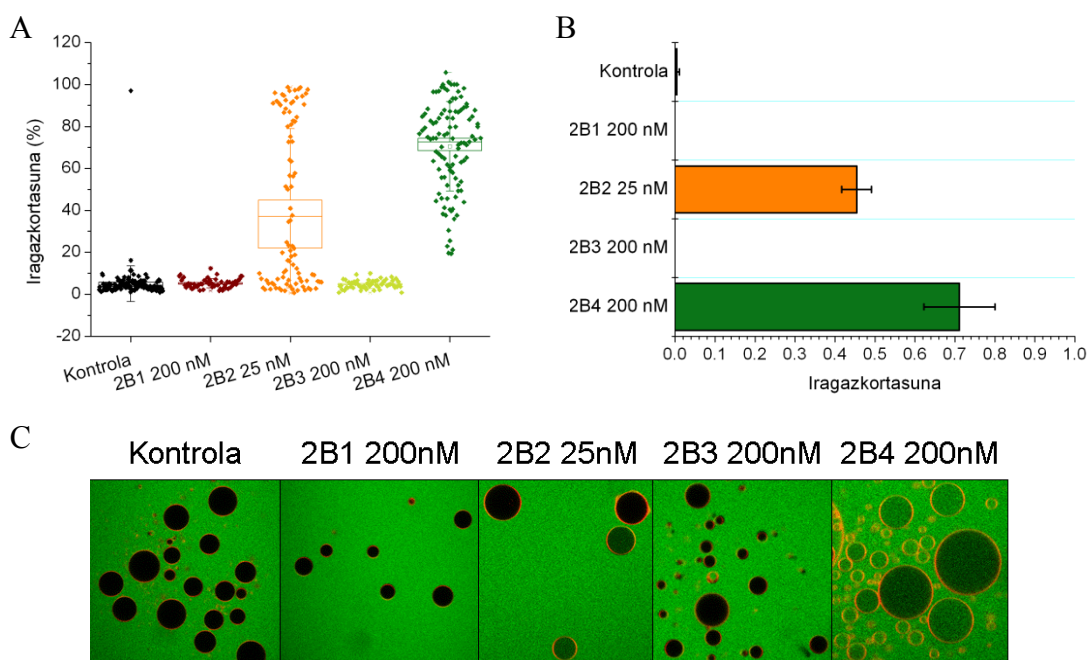
### 2.2.5. Lamela bakarreko besikula erraldoien iragazpena

Behin peptidoek mintzean txertatzeko eta solutuen askapena eragiteko duten ahalmena aztertuta, lamela bakarreko besikula erraldoietan poroak eratzeko duten gaitasuna neurtu da. Honetarako erretikulu endoplasmaticoaren konposaketa lipidikoa duten GUVak erabili dira.

Lortutako emaitzen arabera (**8.irudia**), 2B2 eta 2B4 peptidoak mintzaren iragazkortasuna emendatzeko gai dira. Hau argi ikusten da mikroskopia konfokaletik lortutako irudietan (**8.C irudia**), zeinetan 2B2 eta 2B4 peptidoek, Alexa fluoroforoa, liposomen barnealdera sartzea eragiten duten, gainerakoetan ez bezala.

2B2 eta 2B4 peptido litikoak erabiliz lortutako emaitzetan sakontzeko, imageJ programa erabili da, lortutako irudiak prozesatu direlarik. Era honetan, GUVen barne eta kanpoko fluoreszentzia alderatu da, iragazkortasun portzentajea lortuz. Saio honetarako, GUVen iragazpena eman dela onartzeko, gutxienez %50eko iragazkortasuna izan behar dutela erabaki da. Honetan oinarrituz, 2B2 peptidoak poroak eratzeko gaitasun altuagoa erakutsi du. **8.B irudian** ikusi daitekeen moduan, 2B4 peptidoaren 200 nM erabiliz, GUVen %70eko iragazkortasuna lortu da. 2B2 peptidoaren 200 nM erabiliz, iragazkortasuna erabatekoa zen, eta 25nM erabiliz liposomen %45a iragazita ageri dira.

2B1 eta 2B3 peptidoak aldiz, ez dira erretikulu endoplasmatikoko mintzean poroak eratzeko gai (**8.A eta 8.B irudiak**). Mikroskopia konfokaletik lortutako irudietan ikusten den moduan (**8.C irudia**), fluoroforoa ez da GUVen barnealdean ageri, kontrol negatiboan lortzen diren pareko irudiak lortuz. Iragazkortasun portzentajea zero izanda, orain arte, bai monogeruzetan zein solutuen askapen saioan, lortutako emaitzak berresten dira.



**8. Irudia. 2B peptidoek eragindako lamela bakarrekoko besikula erraldoien iragazpena.** (A) Puntu bakoitza ER moduko GUV bati dagokio. Kutzak errore estandarra adierazten du, erdiko marra horizontalak bataz bestekoa, eta lerro bertikala desbiderapen estandarra. Beltzez, kontrola ageri da, GUVak egoera egokian daudela ziurtatzeko. (B) Gutxienez GUVek %50eko permeabilitatea izan behar dutela onartuz, 2B peptidoek eragindako liposomen iragazkortasun maila ageri da. (C) Mikroskopia konfokaletik lortutako argazkiak. Berdez, Alexa fluoroforoa ageri da, eta gorriaz mintzari lotuta dagoan rodamina (Rh-PE).

### 2.2.6. 2B bioporina aktibitatearen inhibizioa

2B bioporinaren aktibitatearen inhibizioa aztertzeko, amantadina eta berapamilo inhibitzaileak aukeratu dira. Izan ere, amantadina bioporinen inhibitzaile klasikoa da, eta berapamiloa ioi kanalak inhibitzen dituen konposatua da. 2B2 eta 2B4 izan dira mintzean txertatu eta poroak eratzeko gaitasuna agertu duten peptido bakarrak, beraz, inhibitzaileen saioa hauekin burutu da.

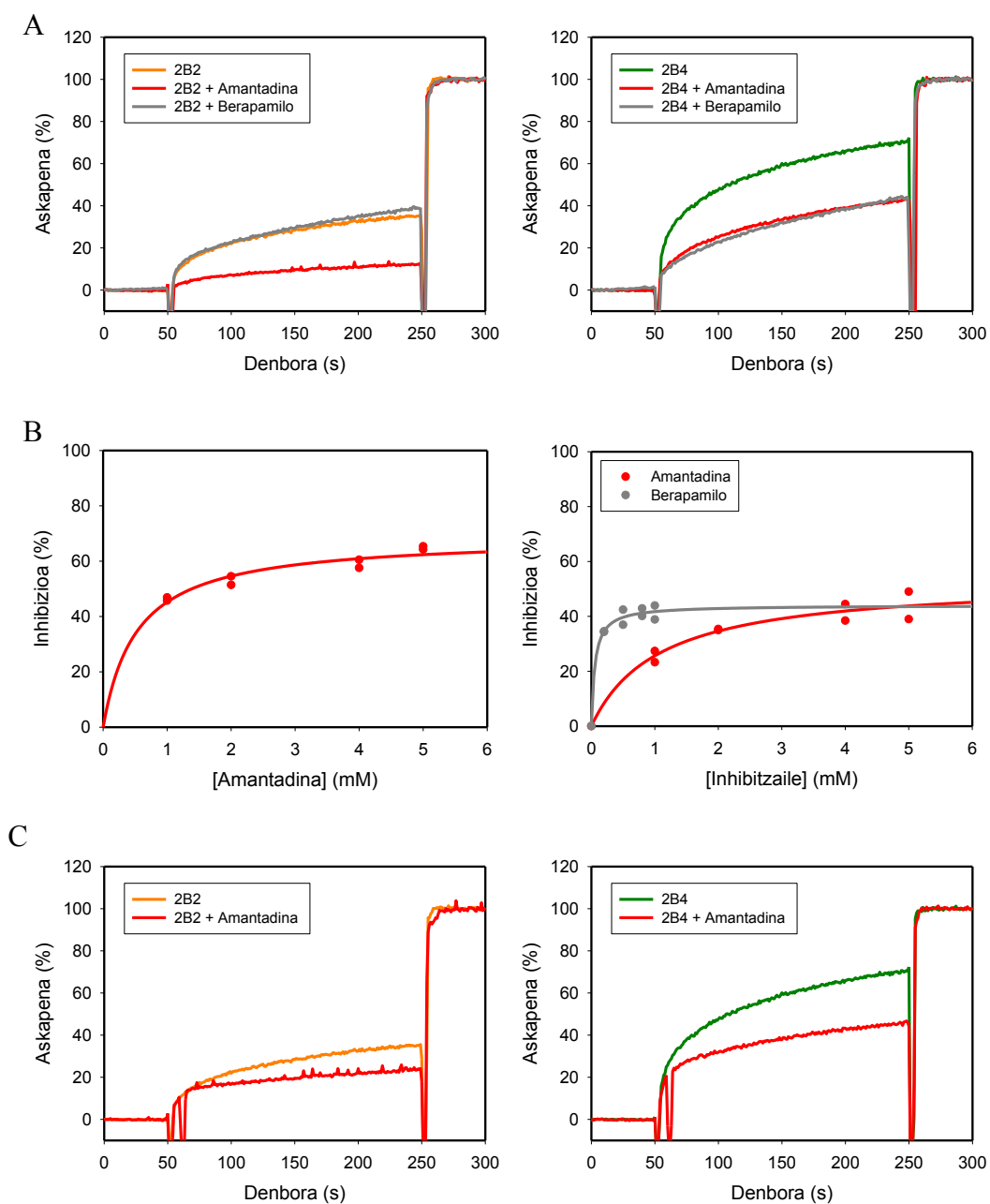
Lehenik eta behin, inhibitzaileek solutuaren askapenean duten eragina aztertu da. 2B2 peptidoari dagokionez, 5 mM-eko kontzentrazioa duen amantadinak, %60ko inhibizioa eragiten du. 1 mM-eko kontzentrazioa duen berapamiloak aldiz, ez du bere aktibitatea inhibitzen, izan ere, inhibitzailearik gabeko 2B2 peptidoaren askapen berdina eragiten du (**9.A ezkerreko irudia**).

2B4 peptidoari dagokionez, bai amantadinak (5 mM) zein berapamiloak (1 mM) bere funtzio litikoa inhibitzen dute. Hau argi ikusi daiteke **9.A eskumako irudian**, non solutuaren askapena nabarmenki murriztu den denboran zehar. Aipatzekoa da, kontzentrazio baxuetan, berapamiloak duela inhibitzeko gaitasun altuagoa, baina biek %40 inguruko inhibizioa baino ez dute eragiten (**9.B eskumako irudia**).

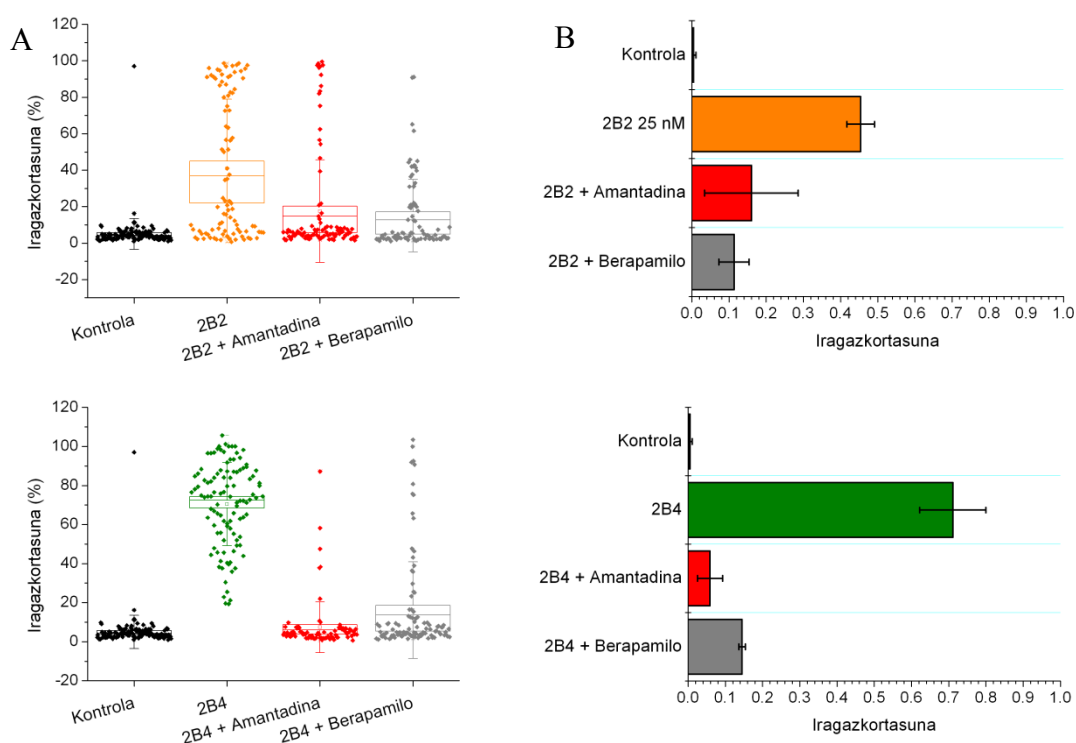
Honetaz gain, amantadinak poroa bera edo poroaren eraketa oztopatzen duen jakiteko saio bat egin zen (**9.C irudia**). Lortutako emaitzen arabera, behin poroa eratuta inhibitzailea gehituz gero solutuaren askapena inhibitzen zen. Beraz, inhibitzaileak poroa bera oztopatzen duela ondoriozta daiteke, eta ez bere eraketa.

Ondoren, amantadina eta berapamilo inhibitzaileek lamela bakarreko besikula erraldioen iragazpena inhibitzen duten aztertu da. **10.A irudietan** ikusten den moduan, inhibitzaileen presentzian iragazkortasun portzentaia nabarmenki jaitsi da, 2B4 eta 2B2 peptidoek sortutako poroen iragazpena oztopatu delakoaren seinale.

Kasu honetan ere, GUVen iragazpena eman dela onartzeko, gutxienez %50eko iragazkortasuna izan behar dutela erabaki da (**10.B irudia**). Honetan oinarrituz, 2B2 peptidoak eragindako GUVen %50eko iragazkortasuna izatetik, erdira baino gutxiagoa izatera jaitsi da inhibitzaileen presentzian. 2B4 peptidoa erabiliz, liposomen %70a iragazita izatetik, %15era pasatu da.



**9. Irudia. Amantadina eta berapamiloak eragindako 2B2 (ezkerreko zutabea) eta 2B4 (eskumako zutabea) peptidoen aktibitatearen inhibizioa.** (A) Solutuaren askapena neurtu da denboran zehar, peptido: lipido erlazioa 1:50 (mol:mol) izanik. Honetarako 5 mM amantadina eta 1 mM berapamilo tanpoian disolbatu dira. (B) Inhibizio kurbak. (C) Behin poroa eratuta, 5 mM amantadina inhibitzailearen adizioa.



**10. Irudia. 2B2 (goian) eta 2B4 (behean) peptidoek eragindako GUVen iragazpenaren inhibizioa.** Saiorako 25 nM 2B2, 200 nM 2B4, 5 mM amantadina eta 1 mM berapamilo erabili dira. (A) Puntu bakoitza GUV bati dagokio. Kutxak errore estandarra adierazten du, erdiko marra horizontalak bataz bestekoa, eta lerro bertikala desbiderapen estandarra. Beltzez, kontrola ageri da, GUVak egoera honean daudela ziurtatzeko. (B) Gutxienez GUVek %50eko permeabilitatea izan behar dutela onartuz, 2B peptidoek eragindako liposomen iragazkortasun maila ageri da, inhibitzailearik gabe eta inhibitzaileen aurrean.

### 2.3. EZTABAIDA

Lan honetan, FMDV birusaren 2B proteina ez-estrukturalaren azterketa topologiko eta funtzionala egin da. Modu honetan, hain gutxi ikertua izan den eta birusaren infekzio eta bizi zikloan hainbesteko garrantzia duen proteinari buruzko informazio gehiago biltzea lortu da. Honetarako, peptidoetan oinarritutako analisiak egin dira, bi konposaketa lipidiko ezberdin erabiliz.

Erretikulu endoplasmatikoko konposaketa duten mintzetan oinarritutako saioetan, 2B proteinaren bi domeinuk poroak eratzen dituztelakoaren ebidentzia lortu da. Aldi berean, artikuluan baten FMDVaren 2B proteinak bi transmintz domeinu zituela proposatu zen (Ao, Guo eta lank. 2015). Egile hauen predikzio eta analisisien arabera, TMDak 83-104 eta 119-137 aminoazidoen artean kokatzen diren aminoazidoek

osotuko lituzkete, 2B proteinak proposaturiko bigarren eredu topologikoa jarraitzen zuelarik (**4.B irudia**). Aldiz, gure analisiak bukatu ostean eta lortutako emaitzak kontuan hartuz, 2B proteinarentzat proposatutako hirugarren eredu topologikoa (**4.C irudia**) ontzat eman liteke. Honen arabera, 2B2 eta 2B4 peptidoak dira mintza zeharkatzen duten domeinuak. Lortutako emaitzen arabera, bi peptido hauek mintzean txertatzeko eta aldi berean, solutuaren askapena eragiteko gaitasuna dute. Gainera, GUVekin egindako saioretan, bi peptidoek independenteki poroak eratzen dituztelaren ebidentzia lortu da. Azken hau bioporinek duten funtzioen aniztasunaren arrazoia izan daiteke. Hau da, poroak eratzeko gai diren domeinu bat baino gehiago izateak, proteina txiki hauei funtzio gehiago betetzeko aukera eman diezaieke. 2B1 eta 2B3 peptidoek, ez dute inolako aktibitate litikorik agertu mintz mota hauetan.

Mintz plasmatikoko konposaketa duten mintzekin aldiz, lortutako emaitzak oso bestelakoak izan dira. Izan ere, peptido guztiek mintzean txertatzeko gaitasuna agertu dute, baina 2B2 eta 2B4 izan dira solutuaren askapena eragin duten bakarrak. Hala ere, askapen hau ez da erretikulu endoplasmatikokoan eman den bestekoa izan. Kasu honetan, %40ko askapen teorikora baino ez dira heldu, ez totalera. Honen azalpena, mintz plasmatikokoan 2B proteinak poroa ez den bestelako egitura bat hartzen duela izan liteke. Gainera, egitura ezberdin bat hartzeak, funtzio ezberdin bat izatea suposatzen du.

Birusen infekzioan duten garrantziagatik, bioporinak terapiak garatzeko iturri proteina bihurtu dira azkenengo urteotan (OuYang eta Chou 2014, Scott eta Griffin 2015). Hain zuzen ere, poroa oztopatzen duten molekulak bilatzen ari dira, antibiral moduan erabiltzeko asmotan. Hori dela eta, lan honetan ere, amantadina eta berapamilo inhibitzaileen efektua neurtu da, poroak oztopatzeko duten gaitasuna kontuan hartuz. Lortutako emaitzen arabera, bai amantadinak zein berapamiloak inhibitzeko gaitasuna dute. Ez dute poroaren eraketa oztopatzen, baizik eta behin poroa eratuta dagoela, zelula ostalariaren iragazkortasuna ez aldatzea ahalbidetzen dute. Lortutako emaitzen arabera, 2B2 zein 2B4 peptidoek bioporina aktibitatea erakusten dute, amantadina efektuaren ondorioz inhibitzen baitira. Berapamiloak 2B2 peptidoak eragindako solutuaren askapena inhibitzen ez duen arren, GUV-ekin egindako saioretan lortutako emaitzek inhibizioa ematen dela erakusten dute.

### 3. ONDORIOAK

FMDV 2B bioporinak duen egitura eta funtzio aztertzeke helburuarekin, peptidoetan oinarritutako analisiak egin dira. Modu honetan, 2B proteina ez-estrukturalak bi transmintz domeinu agertu ditu, II motako bioporina dela bermatuz. Izan ere, 2B2 eta 2B4 peptidoek erretikulu endoplasmatikoko konposaketa imitatzen duen mintzean txertatzeko gaitasuna agertu dute. Gainera, bi peptido hauek poroak eratzeke ahalmena dute, amantadina eta berapamiloak aktibitate hau inhibitzen dutelarik.

FMDV 2B bioporinaren aminoazido sekuentziak pikornabirusen 2B aminoazido sekuentziekin homologia erakusten du, 2B4 peptidoari dagokion sekuentzia gehigarria kontuan hartu gabe. Sekuentzia gehigarri hau bigarren domeinu litiko bat da, birus familia honetan deigarria dena. Jakinik birusek haien bizi zikloa aurrera eramateke behar-beharrezkoa den material genetiko bano ez dutela, bi domeinu litiko izateak ebolutiboki zein funtzionalki garrantzia handia duela onar daiteke. Hau guztia kontuan hartuz, lortutako emaitzek, bioporinen funtzioak ulertzeke ikerketarako bide berriak zabaltzen dituzte.



#### 4. BIBLIOGRAFIA

- Agirre, A., A. Barco, L. Carrasco eta J. L. Nieva (2002). "Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein." J Biol Chem **277**(43): 40434-40441.
- Aldabe, R., A. Barco eta L. Carrasco (1996). "Membrane permeabilization by poliovirus proteins 2B and 2BC." J Biol Chem **271**(38): 23134-23137.
- Ao, D., H. C. Guo, S. Q. Sun, D. H. Sun, T. S. Fung, Y. Q. Wei, S. C. Han, X. P. Yao, S. Z. Cao, D. X. Liu eta X. T. Liu (2015). "Viroporin Activity of the Foot-and-Mouth Disease Virus Non-Structural 2B Protein." PLoS One **10**(5): e0125828.
- Bell, R. M., L. M. Ballas eta R. A. Coleman (1981). "Lipid topogenesis." J Lipid Res **22**(3): 391-403.
- Cady, S. D., K. Schmidt-Rohr, J. Wang, C. S. Soto, W. F. Degrado eta M. Hong (2010). "Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers." Nature **463**(7281): 689-692.
- Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne eta A. Elofsson (1997). "Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method." Protein Eng **10**(6): 673-676.
- de Jong, A. S., F. de Mattia, M. M. Van Dommelen, K. Lanke, W. J. Melchers, P. H. Willems eta F. J. van Kuppeveld (2008). "Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking." J Virol **82**(7): 3782-3790.
- Fields, B. N., D. M. Knipe eta P. M. Howley (2001). Fields virology. Philadelphia ; London, Lippincott Williams & Wilkins.
- Gonzalez, M. E. eta L. Carrasco (2003). "Viroporins." FEBS Lett **552**(1): 28-34.
- Hajnoczky, G., E. Davies eta M. Madesh (2003). "Calcium signaling and apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **304**(3): 445-454.
- Han, S. C., H. C. Guo eta S. Q. Sun (2015). "Three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus and its biological functions." Arch Virol **160**(1): 1-16.
- Hessa, T., H. Kim, K. Bihlmaier, C. Lundin, J. Boekel, H. Andersson, I. Nilsson, S. H. White eta G. von Heijne (2005). "Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon." Nature **433**(7024): 377-381.
- Hessa, T., N. M. Meindl-Beinker, A. Bernsel, H. Kim, Y. Sato, M. Lerch-Bader, I. Nilsson, S. H. White eta G. von Heijne (2007). "Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon." Nature **450**(7172): 1026-1030.
- Hofmann, K. eta W. Stoffel (1993). "TMbase—a database of membrane spanning proteins segments." Biological Chemistry Hoppe-Seyler **374**(116).
- Hope, M. J., M. B. Bally, G. Webb eta P. R. Cullis (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**(1): 55-65.
- Jacobs, S. E., D. M. Lamson, K. St George eta T. J. Walsh (2013). "Human rhinoviruses." Clin Microbiol Rev **26**(1): 135-162.

- Jamal, S. M. et al. G. J. Belsham (2013). "Foot-and-mouth disease: past, present and future." Vet Res **44**: 116.
- Jones, C. T., C. L. Murray, D. K. Eastman, J. Tassello et al. C. M. Rice (2007). "Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus." J Virol **81**(16): 8374-8383.
- Jones, D. T. (2007). "Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information." Bioinformatics **23**(5): 538-544.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne et al. E. L. Sonnhammer (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." J Mol Biol **305**(3): 567-580.
- Landeta, O., A. Landajuena, A. Garcia-Saez et al. G. Basanez (2015). "Minimalist Model Systems Reveal Similarities and Differences between Membrane Interaction Modes of MCL1 and BAK." J Biol Chem **290**(27): 17004-17019.
- Madan, V., S. Sanchez-Martinez, N. Vedovato, G. Rispoli, L. Carrasco et al. J. L. Nieva (2007). "Plasma membrane-porating domain in poliovirus 2B protein. A short peptide mimics viroporin activity." J Mol Biol **374**(4): 951-964.
- 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." Biochim Biophys Acta **1462**(1-2): 109-140.
- Martinez-Salas, E., R. Francisco-Velilla, J. Fernandez-Chamorro, G. Lozano et al. R. Diaz-Toledano (2015). "Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions." Virus Res **206**: 62-73.
- Nieva, J. L., V. Madan et al. L. Carrasco (2012). "Viroporins: structure and biological functions." Nat Rev Microbiol **10**(8): 563-574.
- OuYang, B. et al. J. J. Chou (2014). "The minimalist architectures of viroporins and their therapeutic implications." Biochim Biophys Acta **1838**(4): 1058-1067.
- Rost, B., P. Fariselli et al. R. Casadio (1996). "Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy." Protein Sci **5**(8): 1704-1718.
- Sanz, M. A., V. Madan, J. L. Nieva et al. L. Carrasco (2005). The Alphavirus 6K Protein. Viral Membrane Proteins: Structure, Function, and Drug Design. W. Fischer, Springer US. **1**: 233-244.
- Scott, C. et al. S. D. Griffin (2015). "Viroporins: structure, function and potential as antiviral targets." J Gen Virol.
- Sreerama, N. et al. R. W. Woody (2000). "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set." Anal Biochem **287**(2): 252-260.
- Steinmann, E., F. Penin, S. Kallis, A. H. Patel, R. Bartenschlager et al. T. Pietschmann (2007). "Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions." PLoS Pathog **3**(7): e103.
- StGelais, C., T. J. Tuthill, D. S. Clarke, D. J. Rowlands, M. Harris et al. S. Griffin (2007). "Inhibition of hepatitis C virus p7 membrane channels in a liposome-based assay system." Antiviral Res **76**(1): 48-58.

- van Kuppeveld, F. J., J. M. Galama, J. Zoll eta W. J. Melchers (1995). "Genetic analysis of a hydrophobic domain of coxsackie B3 virus protein 2B: a moderate degree of hydrophobicity is required for a cis-acting function in viral RNA synthesis." J Virol **69**(12): 7782-7790.
- van Kuppeveld, F. J., J. G. Hoenderop, R. L. Smeets, P. H. Willems, H. B. Dijkman, J. M. Galama eta W. J. Melchers (1997). "Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release." EMBO J **16**(12): 3519-3532.
- van Kuppeveld, F. J., W. J. Melchers, K. Kirkegaard eta J. R. Doedens (1997). "Structure-function analysis of coxsackie B3 virus protein 2B." Virology **227**(1): 111-118.
- van Kuppeveld, F. J., P. J. van den Hurk, J. Zoll, J. M. Galama eta W. J. Melchers (1996). "Mutagenesis of the coxsackie B3 virus 2B/2C cleavage site: determinants of processing efficiency and effects on viral replication." J Virol **70**(11): 7632-7640.
- van Meer, G. (1989). "Lipid traffic in animal cells." Annu Rev Cell Biol **5**: 247-275.
- van Meer, G., D. R. Voelker eta G. W. Feigenson (2008). "Membrane lipids: where they are and how they behave." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 112-124.
- Viale, P. H. (2013). "Deadly viruses with beneficial uses: the poliovirus as therapy." J Adv Pract Oncol **4**(5): 284-285.
- Viklund, H., A. Bernsel, M. Skwark eta A. Elofsson (2008). "SPOCTOPUS: a combined predictor of signal peptides and membrane protein topology." Bioinformatics **24**(24): 2928-2929.
- von Heijne, G. (1992). "Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule." J Mol Biol **225**(2): 487-494.
- Watanabe, S., T. Watanabe eta Y. Kawaoka (2009). "Influenza A virus lacking M2 protein as a live attenuated vaccine." J Virol **83**(11): 5947-5950.