

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

ApoA-I nanodiskoien prestakuntza eta karakterizazioa

Egilea

Shifa Jebari

Zuzendaria

César Martín

AURKIBIDEA

1. SARRERA.....	3
2. MATERIAL ETA METODOAK.....	5
2.1. Bakterio kimiokonpetenteen lorpena	
2.2. ApoA-I plasmidoaren anplifikazioa eta produkzioa	
2.3. ApoA-I proteina errekonbinantearen produkzioa eta purifikazioa	
2.4. ApoA-I-en adierazpenaren azterketa Western plaketaren bidez	
2.5. Nanodiskoaren prestakuntza	
2.6. Nanodiskoaren karakterizazioa	
2.6.1. Tamainaren determinazioa <i>Dynamic Light Scattering</i> bidez	
2.6.2. ApoA-I-en egituraren azterketa Dikroismo Zirkularraren bidez	
2.6.3. Nanodiskoaren tamaina eta itxuraren azterketa Transmisiozko Mikroskopia Elektronikoaz	
2.7. Zelulen hazkuntza	
2.7.1. THP-1 zelulen diferentziazioa	
2.7.2. Zelula apartuen eraketa LDL oxidatuen bidez	
2.7.3. <i>Oil Red</i> bidezko zelula apartuen lipido tanten tindaketa	
3. EMAITZAK.....	10
3.1. ApoA-I purifikazioaren purutasunaren azterketa	
3.2. ApoA-I-en adierazpena Western plaketaren bidez	
3.3. Nanodiskoaren tamaina <i>Dynamic Light Scattering</i> bidez	
3.4. ApoA-I-en egitura Dikroismo Zirkularraren bidez	
3.5. Nanodiskoaren tamaina eta itxura Transmisiozko Mikroskopia Elektronikoaz	
3.6. LDLen oxidazioa zelula apartuen eraketarako	
3.7. <i>Oil Red</i> bidezko zelula apartuen lipido tanten tindaketa	
4. ONDORIOAK ETA EZTABAIDA.....	13
5. ERREFERENTZIAK.....	15

1. SARRERA

Hiperkolesterolemia, odoleko kolesterola maila onartua (200 mg/dl), baino altuagoa izatea da, jatorri desberdinak izan ditzakeena. Alde batetik, hiperkolesterolemia familiarrean gertatzen den moduan, kausa, genetikoa izan daiteke; bestalde, arrazoia dieta eta osasun ohitura ezegokiak izan daitezke, hiperlipemia askotan bezala; eta, bestetan, beste gaixotasun baten ondorioa da, diabetes mellitus edo hepatitis paziente askotan ematen den moduan (*Martínez-Gonzalez, 2001*). Nola edo hala, hiperkolesterolemia guztiek ateroesklerosia dute ondorio nagusizat, gaixotasun kardiobaskularren lehen kausa dena (*Frostegård J, 2013*).

Gaur egun, terapien aldetik aurrerakuntza handiak egin diren arren, gaixotasun kardiobaskularrek mundu mailan heriotza gehien eragiten duten gaitz multzoa osatzen dute (*Munduko Osasun Erakundea*). Esan bezala, arrazoi garrantzitsuena arterietako ateroesklerosia da, arterien paretaren barnean kolesterola pilatzeagatik garatzen dena (*Insull W Jr, 2009*). Hori dela eta, gaixotasun kardiobaskularren tratamendu gehienek kolesterol maila hori murrizten saiatzen dira.

Kolesterola baina, oso hidrofobikoa izanda, odolean zehar ez da modu askean garraiatzen, lipoproteina

deritzen konplexu molekularren bidez baizik, organismoan zehar lipidoen garraioaz arduratzen direnak (*Lu M eta Gursky O, 2013*). Hala, nanopartikula natural horien artean, dentsitate baxuko lipoproteinak aurkitzen dira, (LDL, ingelesez, *Low Density Lipoprotein*) kolesterol txarra bezala ezagutzen dena. LDLak kolesterola ehun periferikoetara garraiatzeaz arduratzen dira, ehunak kolesterolaz hornitzeko, prozesu zelular askotarako ezinbestekoa dena (*Daniels TF et al, 2009*). Hiperkolesterolemian kolesterol maila, eta beraz, LDL kontzentrazioa altuegia denez, arazoak sortzen dira, batez ere, tratamendurik jasotzen ez duten pazienteetan.

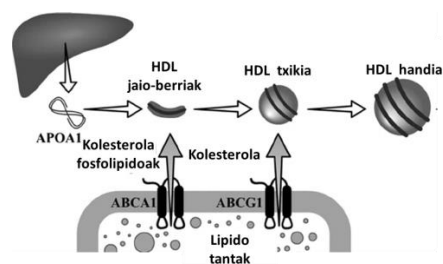
Hala, LDLek arterien endotelioa zeharkatzeko (barneko-tunika moduan ezagutua) eta horren azpian metatzeko gaitasuna aurkezten dute (*Linton MF et al, 2015*); prozesu hau LDL kontzentrazio altuak dituzten paziente hiperkolesterolemikoetan areagotua egongo delarik. LDLak bertan daudela oxidatzen hasiko dira eta gune horretara migratuko diren monizitoak makrofagoetara diferentziatuko dira, LDL oxidatuak barneratzeko hartzailak adieraziko dituztelarik. Ondoren, makrofagoen *Scavenger* hartzailak oxidatutako LDLak errekonozitu eta endozitosi bidez internalizatuko dituzte, jarraian lisosometan degradatuko direlarik (*Peiser L eta Gordon S, 2001*).

Lipoproteinetatik eratorritako gehiegizko kolesterol askea (KA) erretikulu endoplasmatikora garraiatua izango da, bertan esterifikatua izateko. Lortutako kolesterol esterrak (KE), lipido tantetan paketatuko dira zitoplasman, makrofagoei zelula apartsu itxura hori emango diotenak.

Aldi berean, KE zitoplasmatikoa hidrolisatuko da KA emanez. Hura mintz plasmatikora garraiatuko da eta HDL-tara transferituko da, zelula apartsuen formazioa murrizteko helburuarekin. HDLak (ingelesez, *High Density Lipoprotein*) kolesterola ehun periferikoetatik gibelerako garraioaz arduratzen diren lipoproteinak dira (*Lund-Katz S eta Phillips MC, 2010*) eta kolesterol on moduan ezagutzen dira.

Karen kanporanzko fluxu hori, kolesterolaren alderantzizko garraio moduan ezagutzen dena (RCT, ingelesez, *Reverse Cholesterol Transport*) hainbat mekanismo bidez gertatzen da, eta horien artean lan honetan dagokiguna, ABCA1 garraiatzailearen bidezkoa da (ingelesez, *ATP Binding Casette A1*). Izan ere, HDL-en ApoA-I apolipoproteina (ingelesez, *Apolipoprotein A-I*) ABCA1 garraiatzailearekin interakzionatzen du bai hepatozito zein makrofagoetako lipido garraiatzaile bat dena. (*Yu XH et al, 2013*). Modu horretan, gibelak eta heste meheak sintetizatu eta plasmara jariatutako lipido gabeko ApoA-I

proteinak, KA eta fosfolipidoekin konbinatuko da HDL jaio-berriak deritzonak eratuko direlarik. Hala, hasiera batean disko-itxura duten HDL jaio-berriek, lipido gehiago hartzen doazela, itxura esferikoa izatera pasa eta tamainan emendatuko dira (1. irudia) (*Mo ZC et al, 2016*).



1. irudia: HDL-en sorrera in vivo. Gibelak ekoiztutako ApoA-I proteinak makrofagoen eta zelula apartsuen ABCA1 garraiatzailearekin elkarri eragiten diote, kolesterola eta fosfolipidoak bereganatuz eta disko itxura duten HDL jaio-berriak eratuz. HDL horiek lipidoa hartzen doazen heinean, HDL txikiak, eta gero, handiak eratuko dira, itxura esferikoa dutenak.

Hala, ateroma plaka pixkanaka garatzen joango da, eta lesioa aurrera egiten duen heinean, zelula apartsuak apoptosiz hil egingo dira eta horietatik eratorritako lipido tantak barne-tunikan pilatzen joango dira, plakaren tamaina emendatuz eta odolaren fluxua oztopatuz (*Rafieian-Kopaei M et al, 2014*).

Ateroeskleriari aurre egiteko bide desberdin asko daude. Alde batetik, plasmako LDL kontzentrazioa murrizten duten farmako asko daude. Horien artean ezagunenak estatinak dira, kolesterolaren sintesian ezinbestekoa den HMG-CoA entzimaren (ingelesez, *hydroxymethylglutaryl CoA reductase*)

inhibitzaileak direnak. Horiek ordea, nahiz eta gaixotasun kardiobaskularren ondoriozko heriotza arriskua murrizten duten, albo-efektu oso handiak dituzte, muskulu eta gibel toxikotasuna, besteak beste, askotan tratamendutik kendu behar direlarik (*Luthi AJ et al, 2010*).

Bestalde, HDLarekin erlazionatutako terapiak daude, bi estrategiatan oinarritzen direnak. Bata, HDLaren metabolismoa eta kolesterolaren alderantzizko garraioa itu duten molekula txikiak dira; eta, bestea, ordezkapena, hau da, HDL sintetikoaren administrazioa, nahiz eta azken hau, ikerketa faseetan aurkitu (*Hovingh GK et al, 2015*).

Lan honetan, ApoA-I nanodiskoak eratu eta karakterizatu dira *in vivo* agertzen diren HDL jaio-berriak imitatzeko. Horrez gain, nanodiskoaren aktibitatea aztertzeko lehen esperimentuak burutu dira.

Horrela, etorkizuneko helburua, mikroRNAk, RNA txiki ez-kodetzaile batzuk, edo horien inhibitzaileak (antagomiR edo antimiR) daramatzaten HDL sintetikoak eratzea da. Hala, molekula horiek modu espezifikoan garraiatuak izan daitezke eta zelula apartsuak bezalako itu zeluletan, intereseko efektuak eduki dezakete, ateroma plakaren eraketaren inguruan zenbait aplikazio terapeutiko eskaintzen duena.

2. MATERIAL ETA METODOAK

2.1. Bakterio kimiokonpetenteen lorpena

Escherichia coli DH5 α bakterio-lerroa erabili zen ApoA-I kodifikatzen zuen plasmidoa anplifikatzeko. Bakterio kimiokonpetenteak lortzeko, lehenik dentsitate optimora ($OD_{600} = 0,6$) heldu arte hazi ziren LB medioan (ingelesetik, *Luria Broth*). Jarraian, zelulen suspentsioaren 2 ml zentrifugatu ziren (1 minutuz eta 8000 rpm-tan). Behin zentrifugatuta, jalkina 1 ml $CaCl_2$ -tan (100 mM) berreseki eta 30 minutuz utzi zen berriro zentrifugatu arte (8000 rpm, 4 °C eta 10 minutuz). Ondoren, 900 μ l gainjalkina kendu eta geratzen zenarekin jalkina berreseki zen.

2.2. ApoA-I plasmidoaren anplifikazioa eta produkzioa

Aurretik lortutako *E.coli* DH5 α bakterio kimiokonpetenteak transformatu ziren ApoA-I plasmidoa anplifikatzeko. Plasmidoak anpizilinarekiko erresistentzia eskaintzen zuenez, bakterioak antibiotiko horren presentzian hazi ziren, momentu oro. Hala, 1 min eta 30 segundotan zehar 42 °C-tan berotu ziren eta LB medioa gehitu zitzaien; jarraian, 37 °C-ra 45 minutuz inkubatuz. Ondoren, lagina zentrifugatu (5 min, giro tenperaturan eta 5.000 rpm-tan), gainjalkineko 450 μ l kendu, eta jalkina geratzen zenarekin berreseki zen. Bakterioak 37 °C-ra

berotzen egon ziren anpizilinadun agar-LB plaketan zuzenean erein ziren; eta gau osoan zehar 37 °C-tan inkubatu ziren hazi zitezten.

Horrela, hazitako kolonietako bat anpizilina zeraman LB medio likidora transferitu zen 37 °C-tan, agitazioan eta 20 orduz inkubatzeko utzi zelarik. Horren ostean, plasmidoen erauzketarako Qiagen® Plasmid Midi kita (QIAGEN) erabili zen eta kontzentrazioa NanoDrop bidez neurtu zen.

2.3. ApoA-I proteina errekonbinantearen produkzioa eta purifikazioa

E.coli BL21 (DE3) pLysS bakterio-lerroa giza ApoA-I proteina kodifikatuta zuen plasmidoaz transformatu zen, aurretik erauzitakoa, *E.coli* DH5 α bakterioekin egin zen modu berdinean. LB hazkuntza medioa eta anpizilina (0,1 μ g/ml) zuen medioan hazi ziren dentsitate optimoa lortu arte ($OD_{600} = 0,6$). Gero, proteinaren adierazpena isopropil- β -D-1-tiogalaktopiranosidoaz (IPTG) induzitu eta 3 h-tan zehar inkubatu ziren 37 °C-ra. Ondoren, zelulak 15 minutuz eta 6000 g-tan zentrifugatu ziren, 4 °C-tan; eta lortutako jalkina proteina erauzteko disoluzioan berreseki zen (20 mM Tris, %1 Igepal (v/v) eta *Complete EDTA-free cocktail* eta PMSF 1:1000 (M/M) proteasa inhibitzaileak, pH 8). Zelulak sonikazioaren bidez apurtu ziren eta zelula-hondakinak kentzeko asmoz 30

minutuz eta 10000 g-tan lagina zentrifugatu zen. Gainjalkina nikelzko erretxina batekin nahastu eta zutabeen paketatzen utzi zen. Izan ere, proteina histidina isats bat zuen amino terminalean, purifikazioan nikelzko zutabeari lotzeko. Horrela, zutabea karga soluzioaren bidez (40 mM NaPO₄, 1 M NaCl eta 6 M guanidinio hidrokloruroa, pH 7,4) eta gero, garbitzeko soluzioaren (20 mM NaPO₄, 0,5 M NaCl, pH 7,4) bitartez garbitu zen. Jarraian, ApoA-I eluzio tanpoiaz (20 mM NaPO₄, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazola, pH 7,4) eluitu zen, 0,5 ml-ko frakzioak jasoz. Frakzioetan proteinaren presentzia detektatzeko Bradford metodoa erabili zen (*Bradford MM, 1976*); eta purutasuna % 15eko poliakrilamidazko geletan aztertu zen. Horretarako, 20 μ l lagin, 5 μ l karga-tanpoiaz (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,2 g/ml glizerol, 77,15 mg/ml DTT, 0,2 g/ml SDS, 1 mg/ml bromofenol urdina) nahastu ziren, kargatu baino lehen. Azkenik, gela *Coomassie Brilliant Blue* bidez tindatu zen eta markatzaile moduan SDS-PAGE Standards Broad Range erabili zen (BIO-RAD).

Gelan positibo eman zuten frakzioak aukeratu eta 16 orduz dialisatu ziren 4 °C-tan (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM benzamidina, 1 mM EDTA, pH 8). Horren ostean, eluitutakoa ApoA-I zela guztiz ziurtatzekotan Westen plapaketa burutu zen.

2.4. ApoA-I-en adierazpenaren azterketa Western plaketaren bidez

ApoA-I proteinaren adierazpena Western plaketaren bidez aztertu zen, % 8,5eko poliakrilamidazko geletan.

Horretarako, 5 µl lagin eta 5 µl karga-tanpoi (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,2 g/ml glizerol, 77,15 mg/ml DTT, 0,2 g/ml SDS, 1mg/ml bromofenol urdina) nahastu ziren; gero, 5 minutuz, 100 °C-tan berotzeko. Behin elektroforesia amaituta, poliakrilamidazko gela nitrozelulosazko mintz batera transferitu zen; eta, gero, % 0,1eko TBST tanpoiarekin (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, % 0,1 Tween 20, pH 7,5) hiru garbiketa burutu ziren. Mintza blokeatzeko eta antigorputza ApoA-I proteinari soilik lotu zedin, % 5eko esnea zuen TBST tanpoiaren 15 ml erabili ziren, jarraian, mintza ordubetez inkubatu zelarik.

Horren ostean, TBST bidez berriro ere hiru garbiketa egin ziren eta mintzari ahuntzaren anti-ApoA-I antigorputz primarioa (*abcam*) gehitu zitzaion 1:1000 proportzioan % 2,5eko esnea zuen % 0,1 TBST tanpoian. Prestakuntza hori gau osoan inkubatzen utzi zen; hurrengo egunean, berriro ere garbiketak egin zirelarik. Gero, errefau minaren peroxidasari (HRP, ingelesez *Horse Radish Peroxidase*) lotutako antigorputz sekundarioa (*Santa Cruz Biotechnology*) gehitu zitzaion (ahuntzaren aurkakoa),

1:2000 proportzioan eta % 0,1 TBST tanpoian, ordubetez inkubatzen utzi zelarik. Garbiketak errepikatu ostean, seinaleak detektatu ahal izateko, *Super Signal West Femto Extended Substrate* erabili zen, seinalearen detekzioa ChemiDoc XRS aparatuen bitartez egin zelarik.

2.5. Nanodiskoien prestakuntza

Dipalmitoilfosfatidilkolina (DPPC) eta ApoA-I nahasketa prestatzeko, lehendabizi, DPPC (27,8 mM) beirazko tutu batera pasa eta sikatzeko N₂ gasa erabili zen; eta, ondoren, hutsezko ponpan utzi zen ordu batez. Ondoren, nanodiskoien prestakuntzarako tanpoia gehitu (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8) eta lipidoak dispartatzeko *vortex*-an nahastu zen, tarteka 40 °C-ra berotuz.

Jarraian, sodio kolatoa gehitu zen. Azken honen kontzentrazioa DPPC eta kolato proportzioa 1:1 (M/M) izateko doitu egin zen nanodiskoien prestakuntzarako tanpoiaz. Horren ostean, aurretik dialisatutako ApoA-I-en soluzioa gehitu zen, proteina eta lipido erlazioa 1:100 (M/M) izan zedin. Lortutako nahasketa gau osoan zehar, 37 °C eta 800 rpm-tan inkubatu zen, *Thermomixer*-ean.

Inkubazioa amaitzean lortutako nanodisko disoluzioa 37 °C-tan eta tanpoi berdineko 2 litrotan, 3 egunez dialisatu zen kolato hondarrak kentzeko; ontziaren tanpoi aldaketa egunero egin

zelarik. Behin dialisia amaituta, nanodiskoak dialisi mintzetik jaso eta 4 °C-tan mantendu ziren hurrengo azterketetarako.

2.6. Nanodiskoek karakterizazioa

Lortutakoa ApoA-I nanodiskoak zirela ziurtatzekotan eta bere ezaugarriak zehazteko ondorengo azterketak burutu ziren.

2.6.1. Tamainaren determinazioa

Dynamic Light Scattering (DLS)

bidez

Metodo hau lagineko partikulek eragiten duten argiaren dispersioan oinarritzen da, soluzioan dauden partikula txikien tamaina neurtzeko. Nanodiskoek tamaina DLS bidez neurtu zen, 10 µm eta 0,3 nm bitarteko diametroko partikulak neur ditzakeen *Nano-S Zetasizer* (Malvern Instruments, UK) aparatuan.

Horretarako, 0,195 µg/µl proteina zuen disoluzioa erabili zen; eta neurketak, 3 ziklo berdinetan egin ziren 37 °C-tan. Ziklo bakoitzean 15 neurketa egin ziren, bakoitza 10 segundokoa. Biskositatea eta errefrakzio indizeak nanodiskoek tanpoira doitu ziren eta datuak *Zetasizer software* bidez aztertu ziren.

2.6.2. ApoA-I-en egituraren azterketa

Dikroismo Zirkularren (DZ)

bidez.

Dikroismo zirkularra absorbantzia oinarritutako teknika espektroskopikoa da, makromolekula biologikoen egitura sekundarioei buruzko informazioa

lortzeko eta aldaketa konformazionalak behatzeko erabiltzen dena. Laginak argi polarizatu destrogiro (eskumatarara) eta lebogioren (ezkerretara) aurrean erakusten duen absorbantzien arteko diferentzia neurtzen da, eliptizitate [θ] moduan ezagutzen dena. Diferentzia horren balio positibo batek, argi destrogioren xurgapen handiago bat esan nahi du; eta balio negatibo batek, argi lebogiorena. α-helize baten DZ espektroak bi minimo aurkezten ditu: 222 nm eta 208 nm-tan, eta maximo bat 190 nm inguruan. Banda hauen intentsitateek, aztertzen ari garen proteinaren eliptizitate proportzioa adierazten dute.

Horrela, purifikatutako ApoA-I proteinaren dikroismo zirkularreko espektroa soluzioan lortu zen *JASCO J-810 Spectropolarimeter* dikrografoan. Horretarako, neurketak 1 mm-ko pasu optikoa zuen kuartzoko kubeta batean egin ziren eta 25 °C, 1 segundoko erantzun denbora eta 100 nm/min-ko abiadurak erabili ziren. Hiru errepliketaz bestekoa adierazten duten espektroa lortu zen.

2.6.3. Nanodiskoek tamaina eta

ituraren azterketa

Transmisiozko Mikroskopia Elektronikoaz (TME)

Nanodiskoek TME irudiak Philips CM200 mikroskopia elektronikoan lortu ziren, 200 mV-ko tentsioan eta tindaketa

negatiboa burututa. Horretarako, laginaren tanta bat ipini zen (10 μ L) kobrezko saretxo baten gainean (Cu-300CN; Pacific Grid-Tech, San Francisco, CA). Minutu baten ostean gehiegizko soluzioa iragaz paper batez kendu zen; eta jarraian, ur deionizatuarekin hiru aldiz garbitu eta saretxoa Parafilm-ean zegoen tanta batean (~30 μ L) murgildu zen. Garbiketa prozesu hori hiru aldiz errepikatu zen, pausu bakoitzean tanta desberdin batean murgilduz eta tarteka iragaz paperean sikatuz. Gero, tindaketa negatiboa burutzeko, saretxoa % 1 (w/v) uranil azetatoaren (pH 4,6) tanta batean (~30 μ L) murgildu zen, ondoren, gehiegizko koloratzailea kendu eta lagina giro tenperaturan sikatzen utzi zelarik (laginen prestaketa *SGIKER* zerbitzuetan egin zen).

2.7. Zelulen hazkuntza

2.7.1. THP-1 zelulen diferentziazioa

THP-1 monozito giza zelula-lerroa da, RPMI 1640 medio osoan (% 10 FBS eta estreptomizina eta penizilina antibiotikoak % 1ean) kultibatu zirenak. Horiek makrofagoetara diferentziazteko PMA (1 mg/ml) induktorea gehitu zitzaizen (ingelestatik, *phorbol myristate acetate*) mediorekiko 1:10000 (v/v) proportzioan. Ondoren, 24 putzutako plaketan erein eta gau osoan diferentziazten utzi ziren 37 °C-ra.

2.7.2. Zelula apartsuen eraketa LDL oxidatuen bidez

LDL lipoproteinak oxidatu ziren *in vivo* gertatzen dena simulatu nahian. Horretarako LDL horiek (1,69 g/ml) giza serumetik isolatu ziren dentsitatezko gradiente ultrazentrifugazioaren bidez; eta proteina kantitatea Bradford metodo kolorimetrokoaz determinatu zen (*Bradford MM, 1976*). CuSO_4 (1 mM) erabili zen agente oxidatzaile moduan, eta prozesua monitorizatzeko absorbantzia 234 nm-tan neurtu zen (CARY 300 BIO UV-Visible Spechtrophotometer). Izan ere, lipidoa oxidatzen doan heinean (Cu^{2+} -ak eraginda), dieno konjokatuak eratzen dira; eta horiek uhin luzera horretan dute xurgapena. Horrela, 1000 minutuko zinetika bat burutu zen, 37 °C-tan eta 10 segundoro 234 nm-tan absorbantzia neurtuz. Modu horretan, kanpoan tenperatura berdinean oxidatzen ari ziren LDLen oxidazioaren jarraipena egin zitekeen eta ondo zihoala ziurtatu. Aipatu beharra dago, dieno konjokatuak behin eratuta, beste motako espezieak eratzen direla, 7-zetokolesterola, besteak beste. Hala ere, oxidazio prozesua 500 minutuetara gelditu zen, LDLek oxidazio puntu optimoa eduki zezaten (*Fernández-Higuero JA, 2008*). Izan ere, THP-1etik eratorritako makrofagoekin inkubatuko ziren, horiek zelula apartsu bilakatzeko. Eta horretarako garrantzitsua da LDLak

oxidatuta egotea baina ez guztiz, makrofagoak horiek mediotik barneratu ahal izateko.

Hala, LDL oxidatuak (100 µg/ml) aurretik diferentziatzen utzitako makrofagoetako putzuei gehitu zitzairen, eta beste 24 orduz 37 °C-ra inkubatzen utzi ziren, zelula apartsuak lortu nahian. Kontrol moduan, LDL oxidatuekin inkubatu gabeko makrofagoak erabili ziren.

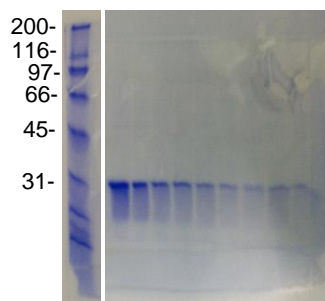
2.7.3. Oil Red bidezko zelula apartsuen lipido tanten tindaketa

Zelula apartsuak eratu zirela jakiteko barneratu zuten lipidoa tindatu zen; eta horiek LDL oxidatuekin inkubatu gabeko makrofagoekin konparatu ziren. Horretarako, *Oil Red* tindaketa protokoloa jarraitu zen. *Oil Red* oso lipofilikoa den koloratzaile gorri bat da, kasu honetan makrofagoetako lipido tantak koloratuko dituena. Horrela, putzuak PBSaz (ingeleseko sigletatik, *Phosphated-buffered saline*) bi aldiz garbitu ziren. Jarraian, *Oil Red* soluzioa (3 mg/ml) gehitu zen putzu bakoitzari eta 15 minutuz giro tenperaturan inkubatzen utzi ziren. Horren ostean, zelulak urarekin bi aldiz garbitu ziren; eta, azkenik, zelulen argazkiak atera ziren fluoreszentsiazko mikroskopia baten bidez.

3. EMAITZAK

3.1. ApoA-I purifikazioaren purutasunaren azterketa

A-I apolipoproteina *E.coli* bakteriotan adierazi ostean purifikazioa burutu zen nikelezko erretxina baten bidez, proteinak histidina isatsa baitzuen. Purifikazioaren purutasuna % 15eko poliakrilamidazko geletan aztertu zen gelak *Coomassie Brilliant Blue* bidez tindatu zirelarik. Markatzaile moduan SDS-PAGE Standards Broad Range (BIO-RAD) erabili zen. 2. irudian ikus daitekeenez 9 frakzio jaso ziren, kontzentrazio altuena zuena lehena izanik. Markatzailearekin konparatuta, gelan agertzen den banda 31 kDa-eko tamainako proteina bati dagokio, ApoA-I-enarekin bat egiten duena (28,3 kDa).

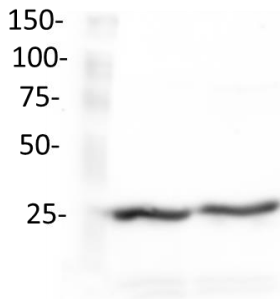


2. irudia: ApoA-I purifikazioaren gela. Purifikazioaren purutasuna poliakrilamidazko geletan aztertu zen. ApoA-I proteinaren bandak 31 kDa-eko markatzaile bandarekin bat egiten du.

3.2. ApoA-I-en adierazpena Western plapaketaren bidez

Proteinaren purifikazioa behin amaituta, frakzio positiboak batu, dialisatu, eta ApoA-I zela ziurtatzekotan Western plapaketa egin zen, ahuntzaren anti-ApoA-I antigorputz primarioa (*abcam*) eta HRP lotutako ahuntzaren aurkako antigorputz sekundarioak (*Santa Cruz Biotechnology*) erabilita. Markatzaile moduan Precision Plus Protein™ Dual

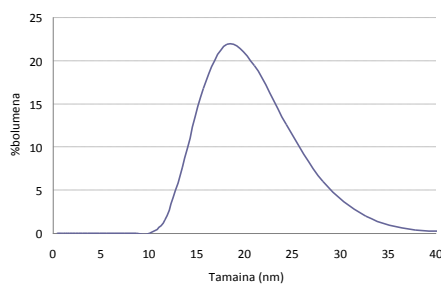
Color Standards (BIO-RAD) erabili zen eta 3. irudian ikusten denez ApoA-I-aren bandak 25 kDa-eko tamainako bandarekin bat egiten du, bere benetako tamainaren antzekoa dena (28,3 kDa).



3. irudia: ApoA-I-en adierazpenaren azterketa. Antigorputz espezifikoak erabilia, purifikatutako proteina ApoA-I zela guztiz ziurtatu zen. ApoA-I proteinaren bandek 25 kDa-eko markatzaile bandarekin bat egiten du.

3.3. Nanodiskoaren tamaina *Dynamic Light Scattering* bidez

DLS erabilia, eratu ziren nanodiskoaren tamaina kalkulatu zen, partikulak dispersatzen zuten argian oinarrituta. *Zetasizer software* erabilia eta 4. irudian ikus daitezkeen moduan 18 nm-ko diametroa zuten partikulak detektatu ziren.



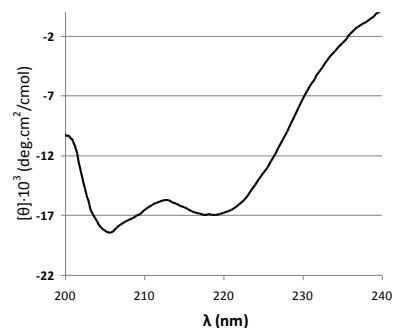
4. irudia: ApoA-I nanodiskoaren tamainaren determinazioa. DLSak detektatutako partikulen tamaina, eta bakoitzaren bolumen ehunekoa. 10 eta 40 nm arteko partikulak detektatu ziren, laginaren bolumen gehiena 18 nm-tako partikulak zirelarik. Neurketak 3 ziklotan egin ziren; eta bakoitzean 10 segundoko 15 neurketa egin ziren.

3.4. ApoA-I-en egitura Dikroismo Zirkularren bidez

HDL partikulak eratzeko ezinbesteko proteina da ApoA-I. Giza ApoA-I molekula 243 aminoazidotako kate polipeptidiko bakarra da eta 22 hondarretako α -helizeetako errepikapen askoz osatua dago (*Frank PG eta Marcel YL, 2000*).

Beraz, proteina horren estruktura sekundarioa, hein handi batean, α -helizeez osatuta dagoenez, nanodiskoak dikroismo zirkularra bidez aztertu ziren; eta horri esker, nanodiskoak paketatzean proteina egitura mantentzen zuela ziurta zitekeen.

Hala, 5. irudian ikusten denez nanodiskoetako ApoA-I alfa helizeez osatua zegoen, estruktura sekundario horren hain bereizgarriak diren bandak behatu baitaitezke (222 nm eta 208 nm inguruetan).



5. irudia: ApoA-I egitura sekundarioaren determinazioa. Dikroismo zirkularra bidezko azterketen arabera, nanodiskoetako ApoA-I-aren estruktura sekundarioa α -helizeez eratuta zegoen gehienbat. Izan ere, α -helizeen bereizgarriak diren eliptizitatearen bi minimo behatu daitezke, 222 nm eta 208 nm inguruetan agertzen diren bandak, hain zuzen ere. Lortutako espektroa hiru errepliketan batez bestekoa adierazten du.

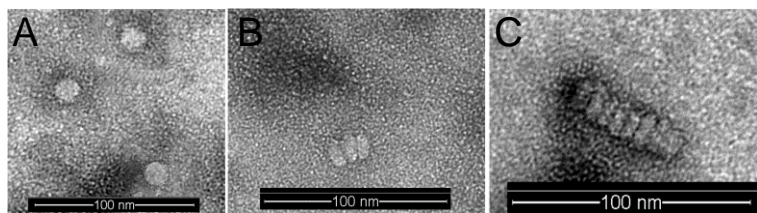
3.5. Nanodiskoekoen tamaina eta itxura

Transmisiozko Mikroskopia

Elektronikoaz

HDL nanopartikulen egitura zuzenean behatu ahal izateko uranil azetatoaren bidezko tindaketa negatiboa burutu eta TMEaren bidez aztertu ziren 6. irudian ikus daitezkeen moduan.

TME irudiek HDL jaio-berrien disko morfologia tipikoa erakuste dute. Forma borobila (6A irudia) nanopartikulen aurrealdeko aurpegia da; eta txanponen ilarak diruditen egiturak nanodiskoekoen alboko aurpegiari dagokie (B eta 5C irudiak). Izan ere, HDL partikulak soluzioan daudenean agregatzeko joera dute, ApoA-I proteinen arteko elkarrekintza elektrostatikoa dela eta (Wlodawer A et al, 1979).



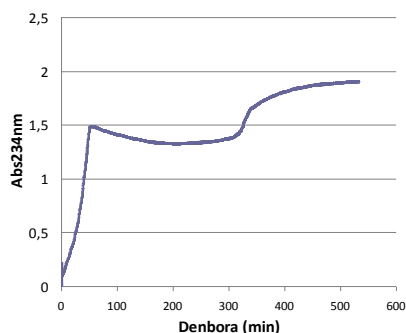
6. irudia: ApoA-I nanodiskoekoen tamaina eta itxuraren azterketa Transmisiozko Mikroskopia Elektronikoaren bidez. Uranil azetato bidezko tindaketa negatiboa burutu zen metodoetan adierazten den bezala.

Itxura aztertzeaz gain, mikroskopia honen bidez partikulen tamaina ere kalkulatu zen, DLSaren bidez lortutako balioak konfirmatuz (~10 nm-tako diametroan partikulak).

3.6. LDLen oxidazioa zelula apartuen eraketarako

THP-1 monozito giza zelula-lerroa makrofagoetara diferentziatu ostean, zelula apartu bilakatzeko LDL oxidatuak gehitu behar zitzairen; eta horretarako, lehendabizi LDLak oxidatzen jarri behar ziren. Hala, giza serumetik lortutako LDL horiek CuSO_4 agente oxidatzaileaz inkubatu ziren, eta prozesua jarraitzeko 1000 minutuko zinetika bat burutu zen, absorbantzia 234 nm-ra neurtu zelarik. 7. irudian ikusten ez baden ere, hasiera batean fase latente bat behatu beharko litzateke, LDLek berezko agente antioxidatzaileak dituztelako, prozesua atzeratzen dutenak. Ondoren, 50. minuturaino, propagazio fase bat behatu daiteke lipidoetan dieno konjokatuak eratzen hasten direlako, oxidazioa dela eta. Hortik aurrera, absorbantziaren murrizpena behatu daiteke, dieno konjokatuak deskonposatzen hasten direlako. Amaitzeko, aipatu beharra dago, 300. minututik aurrerako absorbantziaren handipenaren arrazoiak: LDLen oxidazioaren prozesuan, hasiera batean dieno konjokatuak espezie nagusienak badiren ere, euren deskonposizioaren fasearekin batera, 7-zetokolesterola eratzen hasten da, uhin luzera berdinean xurgapen oso handia duena (Fernández-Higuero JA, 2008). Horrela, zinetikari esker, LDLen oxidazio prozesua jarraitu

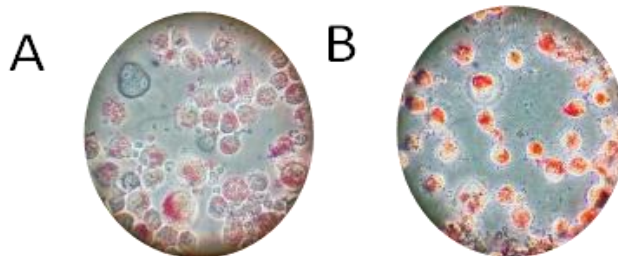
zitekeen eta oxidazio puntu egokiena identifikatu. Hala ere, puntu hori bibliografian adierazitakoa erabili zen oinarritzat (500 min), oxidazioa momentu horretan geldiarazi zelarik.



7. irudia: LDLen kobre bidezko oxidazioaren jarraipena. 234 nm-tan absorbatzia neurtuz, hau da, LDLen oxidazioaren aierazleak diren dieno konjokatuen xurgapena neurtuz, 1000 minutuko zinetika burtu zen. 1. Fasea (0-50 min), esponentzialki ematen den LDLen oxidazioa adierazten da. 2. Fasea (50-300 min): dieno konjokatuen deskonposizioa. 3. Fasea (>300): 7-zetokolesterolaren eraketa.

3.7. Oil Red bidezko zelula apartsuen lipido tanten tindaketa

Zelula apartsuen eraketa zehazteko, barneratu zuten lipidoa *Oil Red*-az tindatu zen, kontrol moduan LDL oxidatuekin inkubatu gabeko makrofagoak erabili zirelarik. 8. irudian lipido tantak begi bistaz behatu daitezke. Gainera, zelula apartsuetan (8B irudia) gorriaren intentsitatea askoz handiagoa da, zelula apartsuen eraketaren adierazlea dena (*Xu S et al, 2010*).



8. irudia: Zelula apartsuen eraketaren azterketa kualitatiboa. LDL oxidatuekin inkubatutako makrofagoak *Oil Red*-az tindatu ziren, barneratu zuten lipidoa behatzeko eta zelula apartsuen eraketa zehazteko. Kontrol moduan, LDL oxidatuekin inkubatu gabeko makrofagoak erabili ziren (8A irudia). Kolore gorriaren handipenak lipido kopuru gehiago adierazten du. Irudien handipena: 40X.

4. ONDORIOAK ETA EZTABAIDA

Lan honetan, A-I apoliporoteinen nanodiskoak eratu eta karakterizatu ziren. Modu horretan, *in vivo* eratzten diren HDL jaio-berrien antzeko partikulak sortu ziren laborategian; eta egindako azterketek erakusten dutenez, ezaugarri berdinak mantentzen dituzte. Hala, DLS eta mikroskopia elektronikoa aztertu zen moduan ~ 18 nm-tako nanopartikulak eratu ziren, HDL jaio-berrien tamaina antzekoa dutenak (*Duivenvoorden R et al, 2014*). Gainera, mikroskopia elektronikoko irudiak erakusten zuten itxura eta forma berdina aurkezten zuten; honekin nanopartikulen eraketa guztiz baieztatu zelarik. Halere, behin nanodiskoetan paketatuta proteinek egitura mantentzen zutela zehaztu zen, dikroismo zirkularra bidez.

Horrez gain, nanodisko horien aktibitatea HDL jaio-berrien modukoa

zela zehaztu nahi bazen ere, lehen esperimentuak baino ez ziren burutu. Hau da, zelula apartsuen eraketa aztertu zen. Beraz, behin hori lortuta, zenbait azterketa faltako lirateke nanodiskoek aktibitatea dutela baieztatzeko, ondoren eztabaidatuko direnak.

Alde batetik, zelula apartsuak kualitatiboki aztertzeaz gain (mikroskopioko irudiak aztertuta), analisi kuantitatibo bat falta da. Horretarako, fluxu zitometria erabili daiteke, zelula apartsuen tanten lipido kantitate maila neurtu dezakeena.

Gero, sortutako nanodiskoek zelula apartsu horiekin interakzionatzeko gaitasuna duten aztertu beharko litzateke, hau da, kolesterola bereganatzeko gai diren ikustea. Hori behatzekotan, nanodiskoek ApoA-I, zelula apartsuen ABCA1ekiko elkarrekintza baieztatuko litzateke.

Esan bezala, azken helburua RNA molekula txikiak daramatzaten HDL sintetikoak eratzea da, molekula horiek, zelula konkretu batzuetan efektu espezifikoa izan dezaten. Kasu honetan, makrofagoek eta zelula apartsuek adierazten duten mikroRNA-33a inhibitu nahi da (miR-33), antagomir-33a daramatzaten HDL nanodiskoek bidez, ateroma plakaren eraketa ekiditeko asmoz.

MikroRNAk RNA txiki ez-kodetzaileak dira, geneen adierazpena

erregulatzen dutenak, izan ere, RNA mezularien egonkortasuna eta itzulpena kontrolatzen dute; eta prozesu biologiko askotan parte hartzen dute: zelulen hazkuntzan, metabolismoan eta estresaren aurreko erantzunean, adibidez (*Wahid F et al, 2010*).

Makrofagoek miR-33-a SREBF2 genearen 16. introitik ekoizten dute. SREBF2 genea (ingelesez, *Sterol regulatory element-binding transcription factor*) gantz azido eta kolesterolaren sintesia eta harrera erregulatzen duten transkripzio faktoreak kodetzen ditu. Hala, miR-33ak, aktibitate erregulatuazalea duena, ABCA1aren adierazpena inhibitzen du eta horrekin batera, kolesterolaren alderantzizko garraioa (RCT) (*Ouimet M et al, 2015*). Esan beharra dago gainera, estatinak hartzen dituzten paziente hiperkolesterolemikoek miR-33 gehiago aurkezten dutela eta beraz, RCTa murriztuagoa dutela (*Niesor EJ et al, 2015*), ateroma plakaren eraketa azkarrago emango delarik.

Hortaz, miR-33ak makrofagoek eragindako hantura sustatzen duenez, miR-33aren antagonistak atero-babesleak direla esan daiteke. Hala, saguetan eta primateetan egindako azterketek erakutsi dutenez, miR-33-aren inhibitzaileak ABCA1 garraiatzailearen adierazpena emendatzen dute, eta beraz, makrofagoetatik HDLra gertatzen den transferentzia ere. Horrela, saguak

antagomiR-33 oligonukleotidoarekin tratatu ziren eta horietan ateroma plakaren murrizpena behatu zen (Rayner KJ et al, 2011). Beraz, antagomiR horiek aterosklerosia tratatzeko erabili daitezke.

Jakina da ere, mikroRNAk HDL bezalako lipoproteinen bidez plasman zehar garraiatuak izan daitezkeela (Michell DL eta Vickers KC, 2016); eta baita ere, HDLek makrofagoetara mikroRNAk transferitzeko gaitasuna dutela, zelula horietan hainbat geneen adierazpena erregulatzen dutelarik (Vickers KC et al, 2011).

Horrela, makrofagoek adierazten duten miR-33aren eragina eragozteko, antagomiR-33 barnean duten HDL sintetikoak eratu nahi dira, ApoA-I eta ABCA1 bidezko interakzioaz antagomiR-33a makrofagoetara transferitzeko, eta miR-33 endogenoa isilarazteko. Modu horretan, miR-33-aren efektuak eragotziko liratekeenez, ABCA1ren adierazpena emendatzea espero da, eta horrekin batera, kolesterolaren alderantzizko garraioa; kasu horretan, zelula apartsuen kolesterol murrizpen handiago bat espero delarik. Hau da, neurri batean, kolesterolaren alderantzizko garraioa indartzea espero da.

Azkenik, HDL-tara kolesterol gehiago transferituko litzatekeenez, zelula apartsuen lipido kantitatea eta beraz,

ateroma plakaren tamainaren murrizpena behatzea espero da.

Hortaz, lan honetan prestatutako nanodiskoak mikroRNAren inhibitzaileak diren antagomir molekulak garraiatzeko erabili nahi dira, neurri batean ateroma plakaren eraketa ekiditeko.

5. ERREFERENTZIAK

- Bradford MM. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ et al. *Int J Biol Sci.* 2009;5(5):474-88.
- Duivenvoorden R, Tang J, Cormode DP et al. *Nat Commun.* 2014;5:3065.
- Fernández-Higuero JA, (2007) Tesis Doctoral. Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa.
- Fiske CH, Subbarow Y. *J. Biol. Chem.* 1925;66:375-400.
- Frank PG, Marcel YL.. *J Lipid Res.* 2000;41(6):853-72.
- Frostegård J. *BMC Med.* 2013;11:117.
- Hovingh GK, Smits LP, Stefanutti C et al. *Am Heart J.* 2015;169(5):736-742.
- Insull W Jr. *Am J Med.* 2009;122.
- Lu M, Gursky O. *Biomol Concepts.* 2013;4(5):501-18.
- Lund-Katz S, Phillips MC. *Subcell Biochem.* 2010;51:183-227.
- Luthi AJ, Patel PC, Ko CH et al. *Trends Mol Med.* 2010;16(12):553-60.
- Martínez-González J, Llorente-Cortés V, Badimon L. *Rev Esp Cardiol.* 2001;54(2):218-31.
- Michell DL, Vickers KC. *Biochim Biophys Acta.* 2016. pii: S1388-1981(16)30010-5.

- Mo ZC, Ren K, Liu X et al. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016i: S0169-409X(16)30140-5.
- Niesor EJ, Schwartz GG, Perez A et al. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2015;29(1):7-14.
- Ouimet M, Ediriweera HN, Gundra UM et al. *J Clin Invest.* 2015;125(12):4334-48.
- Peiser L, Gordon S. *Microbes Infect.* 2001;3(2):149-59.
- Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M et al. *Int J Prev Med.* 2014;5(8):927-46.
- Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC et al. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2921-31.
- Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Jerome WGJ, Linton EF, Vickers KC. Ed. Endotext [Internet]. South Dartmouth.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM et al.. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(4): 423-33.
- Wahid F, Shehzad A, Khan T et al. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(11):1231-43.
- Wlodawer A, Segrest JP, Chung BH et al. *FEBS Lett.* 1979;104(2):231-5.
- Xu S, Huang Y, Xie Y et al. *Cytotechnology.* 2010;62(5):473-81.
- Yu XH, Fu YC, Zhang DW et al. *Clin Chim Acta.* 2013;424:245-52.