

Gradu Amaierako Lana

Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

Giza Immunoeskasiaren Birusaren mintz ereduen azterketa irudi tekniken bidez

Egilea:

Peio Rodriguez Muguire

Zuzendariak:

Nerea Huarte Arrayago

José Luis Nieva Escandón

AURKIBIDEA

| | |
|--|----|
| 1. SARRERA ETA HELBURUAK..... | 1 |
| 2. GARAPENA..... | 3 |
| 2.1. MATERIAL ETA METODOAK..... | 3 |
| 2.2. EMAITZAK..... | 5 |
| 2.2.1. Konposaketa lipidiko ezberdinez osatutako mintzen ordena molekularren azterketa | 5 |
| 2.2.2. AFM-ak eragindako artefaktuak | 6 |
| 2.2.3. Konposaketa lipidiko ezberdinen arteko desberdintasun topografikoak..... | 7 |
| 2.2.4. Presioaren eragina fase antolaketan | 9 |
| 3. ONDORIOAK | 11 |
| 4. BIBLIOGRAFIA | 12 |

1. SARRERA ETA HELBURUAK

Giza Immunoeskasiaren Birusa (GIB) Hartutako Immuno Eskasiaren Sindromearen (HIES) eragilea da. Gaur egun 33 milioi pertsona baino gehiago GIB-arekin infektatuta daude, eta 25 milioi pertsona inguru gaixotasun honengatik hil direla estimatzen da (Dieffenbach and Fauci 2011). Patogeno honen kontrako txerto eraginkorrik ez dagoenez, erretrobirusen kontrako terapia GIB-arekin infektatutako pertsonak tratatzeko aukera bakarra da, baina birus honen genomaren eta proteinen aldakortasun altuagatik droga berrien garapen konstanteak beharrezkoa izaten jarraitzen du (Cai et al. 2011).

GIB-aren ziklo infektiboaren hasiera zelula ituaren inbasioarekin hasten da. Inbasio hau hiru urratsetan banatu daiteke: 1/birusaren elkarrekintza CD4 hartzaile espezifikoarekin, 2/elkarrekintza CCR5 edo CXCR4 kohartzaileekin eta 3/birusaren mintzaren fusioa zelularen mintzarekin edo birusaren endozitosia (Dumas et al. 2014). Urrats hauek burutzeko GIB-ak *envelope* proteina (Env) erabiltzen du, I motako fusio proteina. Env proteina gp120 eta gp41 glikoproteinen asoziazio ez kobalenteen bidez sortutako heterodimeroz osatutako trimero bat da. Inbasioa gertatzeko gp120 CD4 hartzailera lotzen da, eta egitura aldaketan ondorioz, CCR5 edo CXCR4 kohartzaileei lotzeko guneak agerian uzten ditu. Gp120-k kohartzailea lotu ondoren, aldaketa konformazional gehiago pairatzen ditu eta gp41 mintz proteina agerian uzten du (Dumas et al. 2014). Fusio prozesuan zehar, gp41-en elementu ezberdinek hartzen dute parte: 1/mintzean txertatuko diren peptidoak, hala nola fusio peptidoa (FP), mintzarekiko kanpo eskualde proximala (MPER) eta transmintz domeinua (TMD) eta 2/NHR eta CHR domeinu helikoidalak, energetikoki egonkorra den 6 helize sortan (6-HB) mihiztaten direnak. 6-HB estrukturaren agerpenaren ondorioz, zelularen mintzean ainguratutako FP-a eta birusaren mintzean ainguratutako TMD-a hurbiltzen dira, eta modu honetan mintzen fusioa baimentzen da. Fusioa birusaren infekzio eta erreplikazio zikloen hasiera da, eta horregatik farmakoen eta txerto prebentiboen iturri garrantzitsua da (Apellaniz et al. 2014).

Aipatutako gertaera hauek mintz mailan ematen dira, eta birusaren mintzaren konposaketa lipidiko ezberdinek zein iturri zelularenak prozesu hauen gertaera erraztu edo galaraziko dute. Konposizio lipidikoaz gain, baltsa lipidikoek berebiziko garrantzia daukate fusio prozesuan (Dumas et al. 2014). Baltsa lipidikoak esfingolipidoen, lipido asean, esterolen eta proteina espezifikoaren asoziazioaren ondorioz sortzen diren mintz domeinu txikiak (10-200 nm) dira, eta likido ordenatu fasean (l_o) antolatzen dira. Haien tamaina txikiagatik, heterogenizitateagatik eta izaera dinamiko eta iragankorragatik domeinu hauek ikertzea zaila da, baina zailtasun hauetako batzuk eredu sistemei esker gainditu daitezke (Yang et al. 2015).

GIB-aren mintza, birusa sortu den zelularen jatorriko mintzarekin konparatuz hainbat lipidotan aberastuta dago. Lipido hauetatik inportanteenak esfingomielina (SM), dihidroesfingomielina

(DHSM), plasmeniletanolamina edo plasmalogeno PE (pl-PE), fosfatidilserina (PS) eta kolesterola (Chol) dira (Brugger et al. 2006). Birusaren mintza fosfoinositidoetan aberastuta dago ere, eta honek aurretik aipatutako aberastasun lipidiko selektiboarekin batera, birusak zelularen mintzaren baltsa lipidiko konkretuetatik ateratzen direla iradokitzen du (Chan et al. 2008).

Birusaren konposaketa berezi honek bere fusio prozesuan eragina dauka, eta GIB-aren kontrako txerto eraginkorrak lortzeko kontuan hartu beharreko zerbait da. Fosfoinositidoen aberastasunak birusaren mintzaren kurbatura positiboa sustatu dezake fusioa erraztuz (Dumas et al. 2014). Bestalde, kolesterolean eta SM-n aberatsak diren guneeak gp-41-en agregazioa ekartzen dute (Saez-Cirion et al. 2002), eta kolesterolak eragindako birusaren mintzaren zurruntasunak MPER-TMD arteko loturaren fusioa sustatzen du (Apellaniz et al. 2014). Gainera MPER domeinuan oinarritutako txertoak garatzeko, MPER eta birusaren mintzeko lipidoen arteko erlazioa ezagutu behar da, immunogeno eraginkorrak lortzea posiblea izateko MPER peptidoak eta lipido konposaketa sinplifikatuak konbinatuz (Huarte et al. 2008). MPER peptidoa ito interesgarria da txertoak garatzeko, birusaren fusio prozesuan parte hartzen duelako mintzaren deformazioa eraginez, eta hau neutralizatuz fusio prozesua ekidin daitekelako. Horretaz gain, MPER sekuentzia gp41 proteinaren oso gune kontserbatua da, eta horregatik puntu zaurgarri bat da antigorputz neutralizatzaileentzat eta txertoentzat (Apellaniz et al. 2014).

Hau guztia kontuan hartuta, GIB-aren mintza ikertzearen garrantzia agerian uzten da. Txertoak garatzeko, eta gp41-en MPER gunearen funtzioa eta birusaren mekanismo infektiboak ikertzeko, mintz eredu aproposak sortzea ezinbestekoa da, eta beharrezkoa da eredu hauetan lipido zehatzen eragina argitzea. Beraz, lan honen helburu nagusia, birusaren mintzaren eredu diren modeloak aztertzea da, eta mintzean lipido ezberdinek daukaten eragina argitzea. Eredu hauen azterketa egiteko indar atomikoko mikroskopia (*Atomic Force Microscopy*, AFM), fluoreszentzia mikroskopia eta bi fotoien bidezko fluoreszentzia mikroskopia erabili dira. AFM-a eta fluoreszentzia mikroskopiarekin lipido monogeruzak (*Langmuir-Bodgett lipid monolayers*) aztertu dira, euskarri solido batean transferituak (*Supported Lipid Monolayers*, SLM), eta bi fotoien bidezko mikroskopiarekin Laurdan zundarekin markatutako besikula erraldoi unilaminarrak (*Giant Unilamellar Vesicles*, GUV).

Teknika hauekin, konposaketa ezberdinetako mintzetan agertutako lipidoen albo-distribuzioa eta mintzaren topografia ikertu dira, baita lipido nahasketa ezberdinek mintzaren zurruntasunean daukaten eragina ere. AFM-a erabiltzearen arrazoia bere erresoluzio subnanometrikoa da, mintzen azalaren aztertze zehatza baimentzen duena. Fluoreszentzia mikroskopiak, mintzen ikuspegi orokorrago bat edukitzea baimentzen du, lortutako irudiek AFM-arekin hartutako irudiek baino gune zabalagoak erakusten dituztelako. Azkenik, bi fotoien bidezko mikroskopiak mintzaren ordenari buruzko informazioa lortzea baimentzen du, beste tekniken bidez lortutako informazioaren osagarria dena.

2. GARAPENA

2.1. MATERIAL ETA METODOAK

Lipidoak. 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glizero-3-fosfokolina (POPC), kolesterola (chol), arraultz esfingomielina (eSM), N-lauroil-D-*eritro*-esfinganilfosforilkolina (DHSM), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glizero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1-O-alk-1'-enil-2-azil-*sn*-glizero-3-fosfoetanolamina (pl-PE), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glizero-3-fosfo-L-serina (POPS) eta N-(lissamina rodamina B sulfonil)-1,2-dioleoil-*sn*-glizero-3-fosfoetanolamina (Rho-DOPE) Avanti Polar Lipids-en (Birmingham, AL) erosi ziren. 6-Dodekanoil-2-dimetilaminonaftalenoa (Laurdan) Molecular Probes-en (Eugene, OR) erosi zen. Fosfolipidoen stock kontzentrazioak fosfato entsegu baten bidez determinatu ziren.

Konposaketa lipidikoak. Nahasketa lipidiko ezberdinak egin ziren hauen ezaugarriak aztertzeko. Nahasketa bakoitzaren lipido portzentajeak **1. Taulan** agertzen dira.

1. Taula: Konposaketa lipidiko ezberdinak, eta haien lipido portzentajeak.

| | POPC | Chol | eSM | DHSM | POPE | pl-PE | POPS |
|-------------------|------|------|-----|------|------|-------|------|
| Virus-Like | 14 | 46 | 12 | 5 | 3 | 13 | 7 |
| %30 chol | 18 | 30 | 16 | 6 | 4 | 17 | 9 |
| %15 chol | 22 | 15 | 18 | 8 | 5 | 20 | 12 |
| -PE | 30 | 46 | 12 | 5 | - | - | 7 |
| -PS | 21 | 46 | 12 | 5 | 3 | 13 | - |

GUV-en prestaketa. GUV-ak aurretik azaldutako moduan prestatu ziren (Carravilla et al. 2015). Besikula unilamelar handiak (*Large unilamellar vesicles*, LUV) H₂O puruan prestatu ziren estrusio metodoa erabiliz. 0.125 mg lipido 100 µL CHCl₃:CH₃OH (9:1)-tan kodisolbatu zen %1 Laurdanarekin. Nahasketa hau ordu batez sikatu zen huts ponpa batean, eta H₂O-rekin saturatutako nitrogeno gaseosoarekin pre-hidratatu ostean, nahasketa ordu batez hidratatu zen 250 µL H₂O-n 55°C-tan. Gero, 30 ziklotako estrusioa egin zen 0.4 µm-tako poroetan zehar Avanti Mini Extruder batean, 65°C-tan. Honen ostean, 5 µL silika bihi (40 µm) LUV-en suspentsioaren 20 µL-rekin nahastu ziren, eta nahasketa 3 µL-tako tantetan banatu zen tefloizko film batean. Hauek 45 minutuz lehortu ziren, eta lipidoz estalitako bihiak 7.5 g/L sakarosa tanpoi batera transferitu ziren, GUV-en sorkuntza espontaneo eragiteko. Azkenik besikulak azterketa plaketara transferitu ziren, 10 mM HEPES, 150 mM KCL (pH 7.4) tanpoian.

Bi fotoien mikroskopia. Irudiak Leica TCS SPS II mikroskopia batean (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) hartu ziren. GUV-ak 63X ur murgiltze objektibo batekin behatu ziren (irekidura numerikoa, NA=1.2), eta 512 x 512 pixeleko irudiak lortu ziren 400 Hz-tan eskaneo larro bakoitzeko. GUV unilamelarrak aukeratu ziren, eta hauen irudia plano ekuatorialean hartu zen fotoselekzioa saihesteko. Titanium-sapphire (Mai-Tai Deepsee, Spectra-Physics) laser pulsatua 780 nm-tan erabili zen Laurdanarekin markatutako GUV-en irudiak lortzeko.

Fluoreszentziaren igorpena nondescanned (NDD) detektagailu hibridoekin detektatu zen. Igorpenaren alde urdina NDD 1-ekin 435 ± 20 nm-tan, eta alde gorria NDD 2-rekin 500 ± 10 nm-tan.

GUV-en datuen analisia. Polarizazio orokortua (*Generalized polarization*, GP) MATLAB-en (MathWorks, Natick, MA) oinarritutako etxeko-softwarea erabiliz kalkulatu zen. GP ekuazioarekin kalkulatu zen GUV-en irudietan oinarrituz:

$$GP = \frac{I_B - G \times I_R}{I_B + G \times I_R} \quad (1)$$

I_B NDD 1-ek detektatutako intentsitatea da, I_R NDD 2-k detektatutakoa, eta G bi kanalen sensibilitate erlatiboa kontuan hartzeko faktorea da, $5 \mu\text{M}$ Laurdan DMSO puruan disolbatuta erabiliz kalibratzen dena. GP balioaren media gutxienez 21 GUV prozesatu ondoren kalkulatu zen.

SLM-en prestaketa. SLM-ak KSV NIMA Langmuir Blodgett balantza batean egin ziren. Balantza Tris 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7 (Milli Q uretan) bufferrarekin estali zen, eta monogeruza transferitzeko euskarria (beirazko euskarri bi eta mikazko euskarri bat) bufferrean murgildu zen. Isotermen bidez bufferraren gainazalaren garbiketa ziurtatu ondoren, gainazalean $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1)-tan disolbatutako 1 mM lipido nahasketaren (% 0.5 Rho-DOPE-rekin markatuta) tantak gehitu ziren, ≈ 0.4 mN-eko presioa lortu arte. Gero 10 minutuz $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ -a lurruntzen utzi ondoren, balantzaren 5 mN-etako albo presioa ezarri, eta beste 10 minutuz egonkortzen utzi zen monogeruza. Honen ostean euskarria partzialki (5 mm) eta astiro desmurgildu zen, bufferraren gainazalean ezarritako monogeruza euskarriara transferitu zedin. Gero 8 mN-etako presioa ezarri zen, eta prozesua errepikatu zen. Hau 5, 8, 10, 20 eta 30 mN-etako presioak transferitu arte errepikatu zen.

Indar Atomikoko Mikroskopia. AFM-arekin SLM-en neurketak egin ziren. NanoWizard II AFM-a (JPK Instruments, Berlin, Germany) erabili zen. Monogeruzak mika euskarrietan transferituta zeuden, eta SiN MLCT Bruker (Camarillo, CA, USA) *cantilever*-ekin eskaneatu ziren, 0.1 N/m-ko konstante elastikoa daukatenak. Irudiak *contact* moduan hartu ziren.

AFM irudien eta datuen prozesamendua. AFM irudiak JPK data processing (JPK Instruments, Berlin, Germany) softwarearekin prozesatu ziren. Software honekin irudien tratamendu matematikoa, altueren erlatibizazioa eta eskalen aukeraketa egin zen, eta topografiaren altueren histogramak sortu ziren. Behin hau eginda, OriginPro 9.0 softwarea erabiliz, histogramen analisia egin zen domeinu ezberdinen altuera medioak lortzeko, eta histogramen dekonboluzioa egin ondoren, altuera jakineko domeinu bakoitzak AFM irudiaren azalera okupatzen zuen

portzentajea kalkulatu zen. Datu hauek lortzeko, gutxienez $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -ko 5 AFM irudi aztertu ziren konposaketa bakoitzeko eta presio ezberdin bakoitzeko.

Fluoreszentzia mikroskopia. Leica DMI4000 B mikroskopia erabili zen. Rho-DOPE kitzikatzeko erabili zen kubo Leica Y5 ET zen, BP 620/60 kitzikapen filtroarekin eta BP 700/75 igorpen filtroarekin. Irudiak hartzeko Hamamatsu ORCA-R² kamera erabili zen.

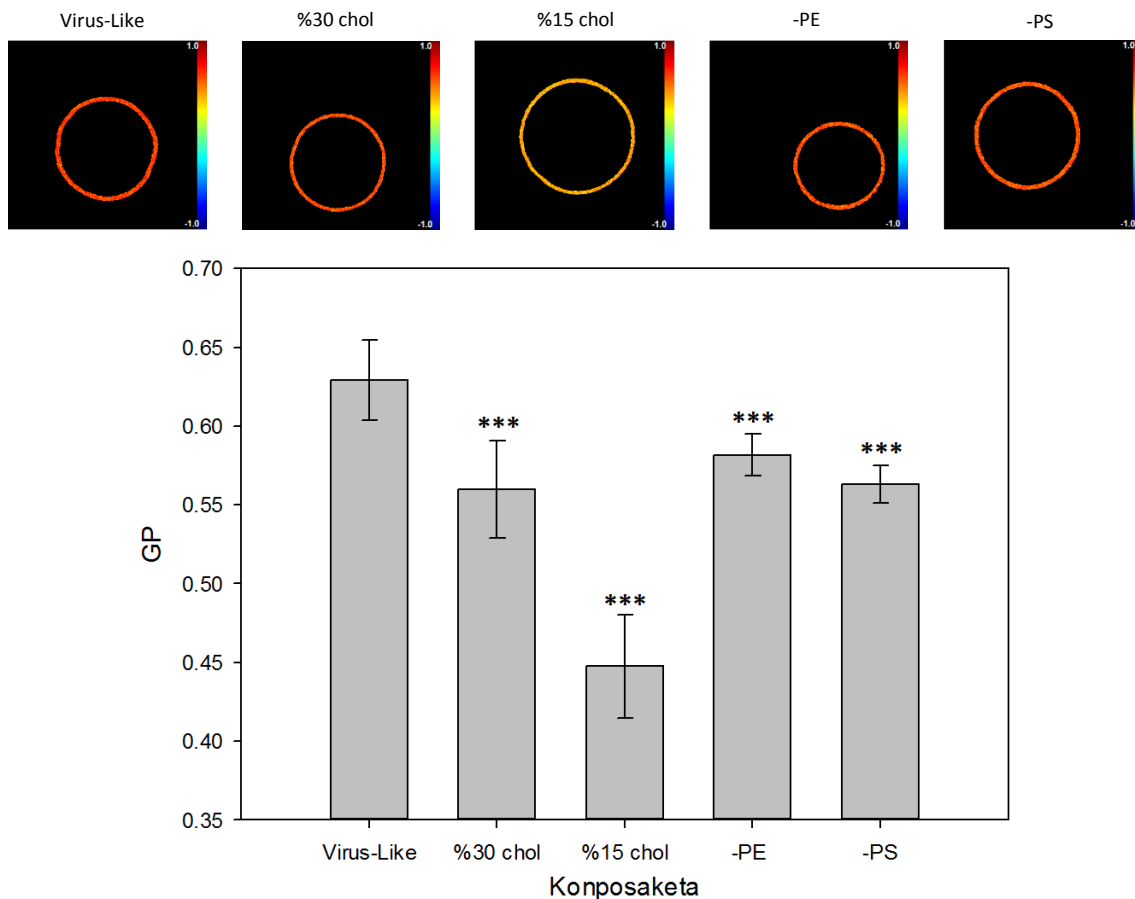
2.2. EMAITZAK

2.2.1. Konposaketa lipidiko ezberdinez osatutako mintzen ordena molekularren azterketa

Konposaketa lipidiko ezberdinez osatutako mintzen ordena aztertzeko, Laurdan zundarekin markatutako GUV-ak bi fotoien bidezko mikroskopiaz behatu ziren aurretik deskribatutako moduan (Bagatolli et al. 2003). Laurdana molekula fluoresentea da, mintzen fase aldaketak detektatu ditzakeena, ingurunearen polaritatearekiko daukan sentsibilitateari esker. Fase fluidoagoetan, Laurdanak disolbatzaile polarrarekin kontaktu handiagoa dauka, eta honek bere fluoresentzia igorpenaren desplazamendua ekartzen du alde gorrirantz. Fase ordenatuagoetan, ez du disolbatzaile polarririk hurbil edukiko, eta bere igorpena alde urdinerantz desplazatzen da. Igorpenaren aldaketa hauek GP balioaren bidez adierazten dira (Sanchez et al. 2012). Beraz, mintzaren ordena konposaketa bakoitzean lortutako GP balioaren bidez adierazi zen, GP balio altuagoak ordena handiago baten adierazle izanik (mintz zurrunagoak). PE, PS, eta kolesterol portzentajearen eragina aztertu zen metodo honekin.

Lanean erabili zen Virus-Like konposaketak, GIB-aren mintza osatzen duten lipido adierazgarrienak zituen (Brugger et al. 2006), eta birusaren mintzaren oinarritzko modelo bezala erabili zen. Erabilitako beste konposaketak, Virus-Like konposaketaren bariazioak dira, bai kolesterol portzentajearen (%30 eta %15 chol) edota lipido jakinetan (PE gabeko konposaketa eta PS gabekoa), eta lipido hauen eragina aztertzeko erabili ziren.

1. Irudian Virus-Like mintz ereduan kolesterol ehunekoak eta PE eta PS lipidoek ordena molekularrean duten eragina aztertu zen. Horretarako POPE eta pl-PE (-PE) edo POPS (-PS) lipidorik gabeko Virus-Like GUV-ak prestatu ziren, eta kolesterol portzentaje ezberdina zuten GUV-ak (%30 chol eta %15 chol). GP balioek adierazten duten moduan, lipido hauek kentzearen efektua mintzaren zurruntasunaren jaitsiera bat izan zen, POPS-a kentzearen efektua POPE eta pl-PE-a kentzearena baino handiagoa izanik. Kolesterol ehunekoaren jaitsierak, mintzaren ordenaren txikipen garrantzitsua zekarrela ikusi zen, aurretik egindako esperimentuetan ikusitakoarekin bat datorrena (Lorizate et al. 2009).



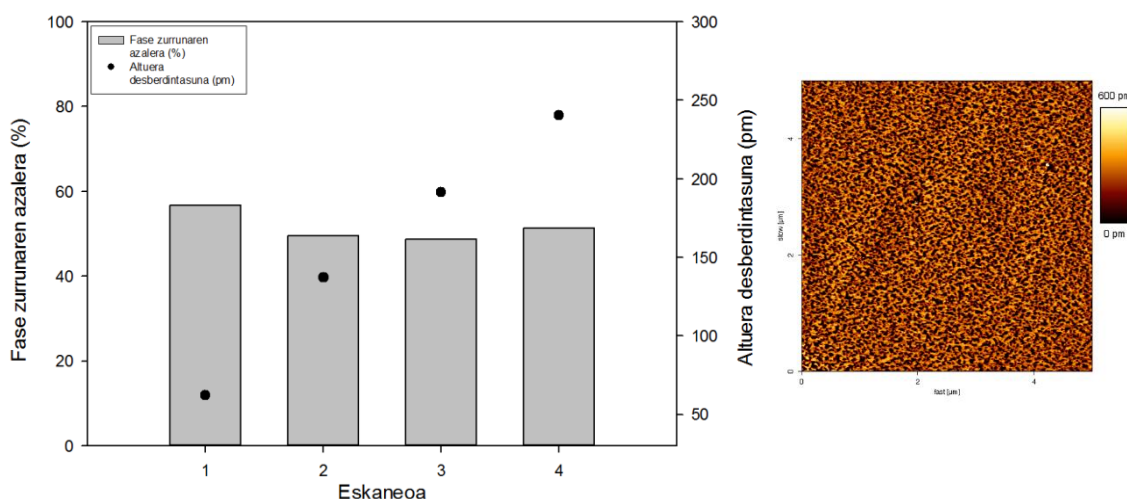
1. Irudia: Kolesterol ehunekoaren eta PE eta PS-aren eragina Virus-Like konposaketaren ordena molekularrean. Bi fotoien bidezko mikroskopia erabiliz, konposaketa lipidiko ezberdinez osaturiko GUV-en GP balioa kalkulatu zen mintzaren zurruntasunaren adierazle bezala. Goiko panelean, konposaketa ezberdinen GUV-en irudiak agertzen dira, eta haien GP balioa kolorearen bidez adierazi da. Beheko panelean, konposaketa ezberdinen GP balioaren adierazpen grafikoa agertzen da. Zutabeek GP balioa adierazten dute. Barrek desbiderapen estandarra. Kolesterolaren murrizketak mintzaren ordenaren jaitziera zekarrela behatu zen. PE zein PS-a Virus-Like nahasketaren ordena molekular handian parte hartzen dutela behatu zen ere. Zurruntasunean gertatutako aldaketen adierazgarritasuna kalkulatzeko T testa erabili zen (*** : $p < 0.00005$).

2.2.2. AFM-ak eragindako artefaktuak

AFM-ak irudiak lortzeko modu ugari ditu: monogeruzen kasuan ebazpen handiena ematen duena azalera eskaneatzean *contact* modua da. Modu honetan AFM-aren punta indar konstante bat mantenduz mintzarekin kontaktuan jartzen da, eta gero plano horizontalean X eta Y ardatzean mugitzen da, lagina eskaneatuz. *Contact* moduan frikzio indarrek eta konstante mantentzen den indarrak garrantzi handia daukate, eskaneoa zehar lagina kaltetu daitekeelako (Morkvenaitte-Vilkonciene et al. 2013). *Contact* moduan egindako eskaneoeak laginean duten efektua ikusteko, $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -ko gune bat 4 aldi kontsekutibotan eskaneatu zen, eta bere ezaugarri topografikoaren eboluzioa aztertu zen (**2. Irudia**).

2. Irudiko eskuineko panelaren AFM-arekin lortutako irudiko gune ilunenak, hau da, altuera baxuagoa daukaten eremuak, gune fluidoak dira, eta likido hedatu fasea (*liquid expanded*, LE) daukate. Gune argienak berriz, altuera handiagoko domeinuak dira, zurrungoak direnak eta

likido kondentsatu fasean (*liquid condensed*, LC) daude (Picas et al. 2012). Monogeruzetan agertutako fase hauek, bigeruzetan agertzen diren likido desordenatu (*liquid disordered*, l_d) eta likido ordenatu (*liquid ordered*, l_o) faseekin erlazionatuta daude hurrenez hurren. LC domeinuak lipido asetuetan aberatsak dira, eta lipido hauen isats hidrofobikoak zuzenak dira. Isatsak zuzenak direnez, lipidoek paketatze handiagoa jasan dezakete, ez dagoelako eragozpen esterikorik alboko lipidoekin. Paketatze maila handiagoa izanda, LC domeinuetako lipido asean isatsak gorantz orientatzen dira, eta hauek zuzenak direnez, domeinu hauen altuera erlatiboa handiagoa da LE domeinuekin konparatuz. LE domeinuak lipido asegabeetan aberatsak dira, eta isats okertuak dituzte. Arrazoi honegatik, LE domeinuetako lipidoek eragozpen esteriko gehiago dituzte inguruko lipidoekin, haien ordena eta paketatzea txikituz. Hori dela eta, LC domeinuak LE domeinuak baino zurrunagoak eta altuagoak dira.



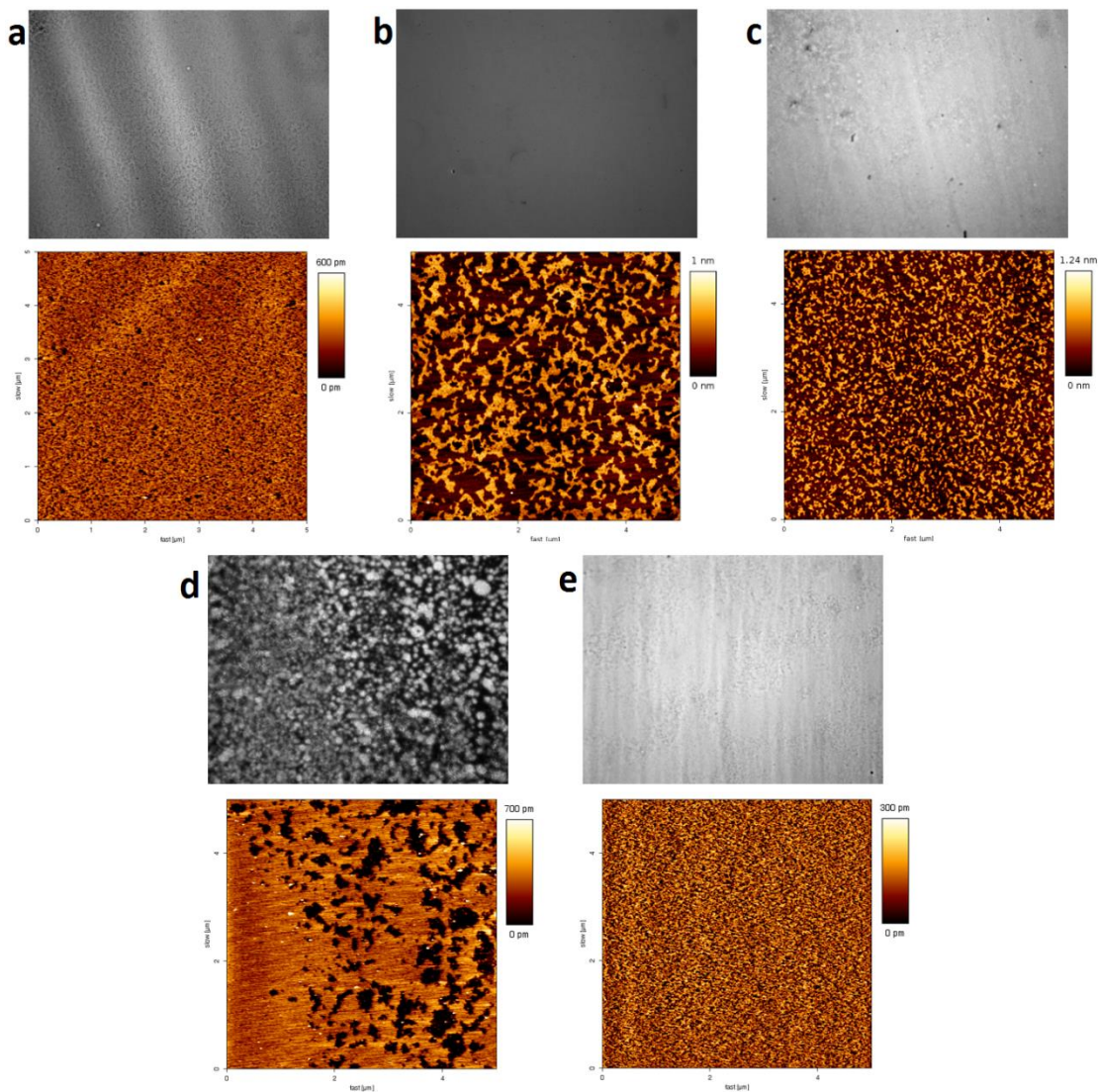
2. Irudia: AFM *contact* eskaneo kontsekutiboek domeinu zurrunen portzentajea eta altueran daukaten efektua. Ezkerreko panela: AFM *contact* moduan egindako eskaneo kontsekutiboak ezkerretik eskuinera (1 lehenengoa izanik, eta 4 azkenengoa). Zutabeek domeinu zurrunen portzentajea adierazten dute. Puntu beltzek faseen arteko altuera desberdintasuna. Eskaneoa 5 x 5 μm^2 -ko gunean hartu ziren, era kontsekutiboan eta baldintza konstanteetan. Eskuineko panela: eskaneatutako gunearen AFM irudia.

2. Irudiko ezkerreko panelean ikusten den moduan, eskaneo bakoitzarekin fase zurrunaren azaleraren aldaketa ez zen oso nabaria izan, nahiz eta hau murriztu. Hala ere 2. eskaneotik aurrera nahiko orekatuta mantendu zen. Faseen arteko altuera desberdintasunak aldiz aldaketa garrantzitsuak pairatzen ditu. Eskaneo bakoitzarekin era linealean igotzen zen, area berdina behin baino gehiagotan eskaneatzeak duen efektu handiaren adierazle. Hau kontuan hartuta, lan honetan lortutako AFM irudiak, behin bakarrik eskaneatutako guneenak dira, eskaneo kontsekutiboek dakarten laginaren deformazioa ekiditeko.

2.2.3. Konposaketa lipidiko ezberdinen arteko desberdintasun topografikoak

AFM-a eta fluoreszentsia mikroskopia erabiliz konposaketa lipidiko ezberdinen arteko desberdintasunak aztertu ziren. Nahiz eta monogeruzak albo-presio desberdinetan transferitu ziren, atal honetan aurkeztutako emaitzak 8 mN/m-tako presioari dagokie. Izan ere, aztertutako

nahasketa lipidiko guztietan, 8mN/m-ko presioan soilik bat egiten dute GUV-etan eta monogeruzetan ematen diren albo antolaketek.

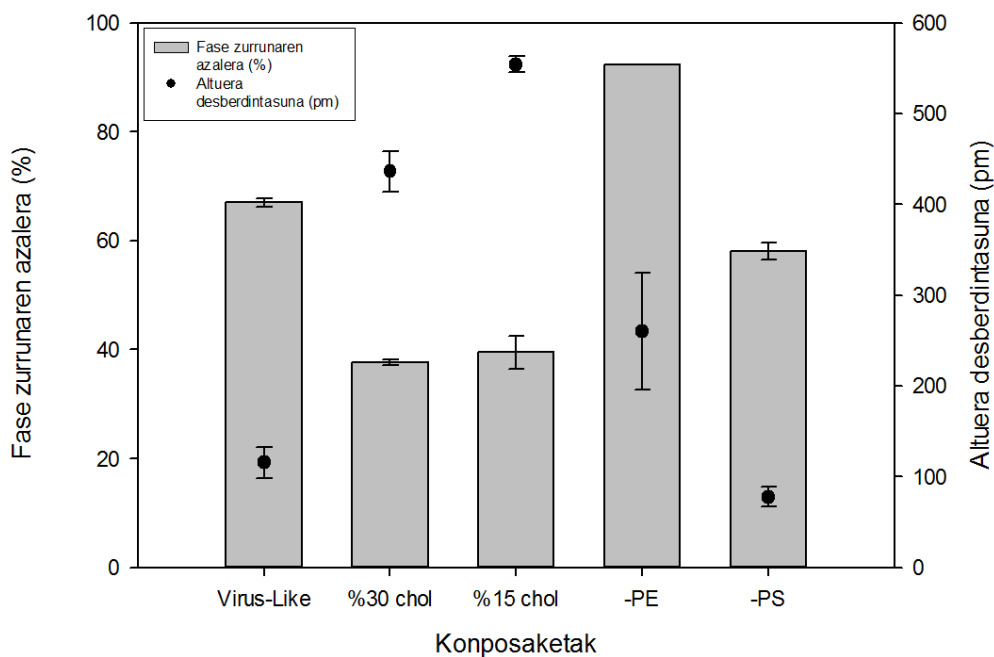


3. Irudia: Birusaren mintzaren eredu den nahasketa lipidikoaren azterketa eta lipido bakoitzaren eragina. Konposaketa lipidiko bakoitzerako fluoreszentzia irudia (goian) eta AFM irudia (behean) adierazten dira. **a)** Virus-Like (%46 chol). **b)** %30 chol. **c)** %15 chol. **d)** PE-rik gabe. **e)** PS-rik gabe. AFM-ko irudiek 5 x 5 μm^2 -ko azalera daukate.

3. Irudian ikusten den moduan fluoreszentzia mikroskopiaren bidez lortutako irudietan fase segregazioa erakusten zuen konposaketa bakarra PE-rik gabeko konposaketa zen (**3. Irudia: goiko panelak**), eta gainontzeko konposaketa guztietan fase homogeen bakarreko antolaketa behatu zen maila mikroskopikoan. Lagin hauek AFM-aren bidez aztertzean berriz, ezberdintasun nabariak antzeman ziren (**3. Irudia: beheko panelak**). AFM-arekin lortutako 5 x 5 μm^2 -tako irudietan fase banaketa ikusi zen, azalera LC domeinu zurrunetan eta LE domeinu fluidoetan banatuta zegoelako. **3. Irudian** ikusi daiteke kolesterol % molar ezberdinetan (%46, %30 eta %15), zenbat eta kolesterol gutxiago eduki, LC domeinuen zatikatzea handiagoa zela (**3. Irudia**

a, b, c behean). PE-rik eta PS-rik gabeko konposaketak aztertzean aldiz (**3. Irudia d, e behean**), zaila da begi bistaz ondorioz ateratzea.

Konposaketa guzti hauen analisi sakonagoa egiteko, AFM eskaneoetan lortutako faseen azalera eta haien arteko altuera desberdintasunak kuantitatiboki aztertu ziren. **4. Irudian** konposaketa ezberdinetan ikusitako domeinu zurrunen ehunekoa eta hauen domeinu fluidoekiko altuera desberdintasuna konparatzen da. Hiru kolesterol % molar ezberdinak aztertzean ikusi zen kolesterol kopuru txikiagoarekin domeinuen arteko altuera desberdintasuna nabarmenki handitzen zela. Azalera aztertzean berriz, %46 mol chol-etik %30 mol chol-era pasatzean txikiagotze bat ikusi zen domeinu zurrunek hartzen zuten azalaren portzentajea, baina %30 mol chol-etik %15 mol chol-era jaistean berriz, ez zen aldaketa nabaririk ikusi. Virus-Like konposaketari (%46 mol chol) PE-a kentzean, handipen esanguratsua behatu zen domeinu zurrunen ehunekoa eta hauen altuera erlatiboan. Azkenik, PS gabeko %46 mol chol Virus-Like konposaketa aztertzean, txikipen bat ikusi zen domeinuen azalera eta altuera desberdintasunean.

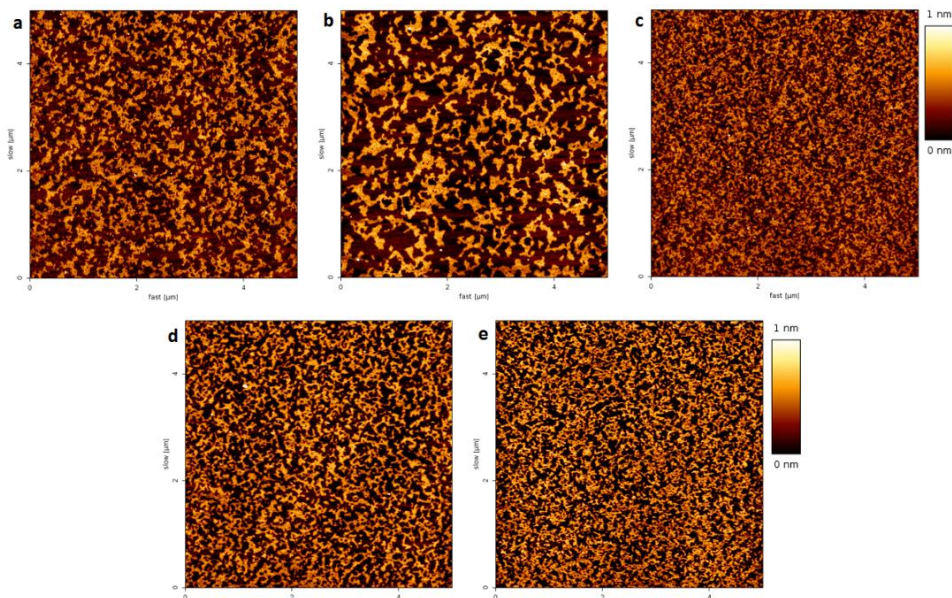


4. Irudia: Domeinu zurrunen portzentajea eta hauen altuera desberdintasuna konposaketa lipidiko ezberdinetan. Konposaketa lipidiko ezberdinetan $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -ko AFM eskaneoetan lortutako domeinuen azalera ehunekoen (zutabeak) eta haien altuera desberdintasunaren (puntu beltzak) adierazpena. Barrek balio bakoitzaren desbiderapen estandarra adierazten dute.

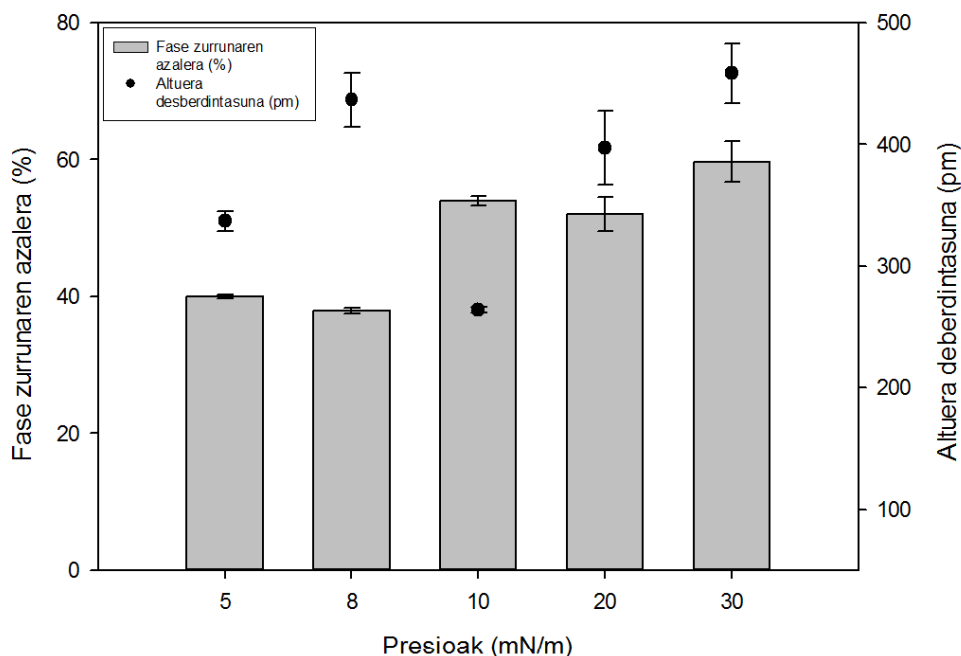
2.2.4. Presioaren eragina fase antolaketan

Presio ezberdinek topografian daukaten eragina aztertzeko, %30 molar kolesterol konposaketa lipidikoko monogerruzaz aztertu zen, presio ezberdinetan transferitua. Izan ere, nahasketa guztien artean presio ezberdinen eragina argiago erakusten duen konposaketa da hau. **5. Irudiak** AFM-arekin lortutako presio ezberdinen eskaneoak erakusten ditu. Eskaneoa hauek bi joera ezberdin ikus zitezkeen: lehenengo joera, 5 mN/m eta 8 mN/m presioek erakusten zutena (**5. Irudia a eta**

b), domeinu fluidoen gune zabalek, eta domeinu fluido eta zurrunen presentzia orekatuak karakterizatzen zuen. Bigarren joerak berriz, 10, 20 eta 30 mN/m presioen kasuetan agertzen zena (5. Irudia c, d eta e), domeinu zurrunen sare dentso bat erakusten zuen, eremu fluido minoritarioekin batera.



5. Irudia: Presio ezberdinetan transferitutako Virus-Like (30% chol) konposaketaren AFM irudiak. a) 5 mN/m, b) 8 mN/m, c) 10 mN/m, d) 20 mN/m eta e) 30 mN/m. Irudiek $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -ko azalera daukate.



6. Irudia: Presio ezberdinetan transferitutako Virus-Like (%30 chol) konposaketaren domeinu zurrunen altuera eta portzentajea. Presio bakoitzean transferitutako monogeruzen domeinu zurrunen portzentajea barrekin adierazita dago, eta domeinu hauen altuera puntu beltzekin. Datu hauek $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ -ko AFM eskaneoen lortu dira. Puntuetan eta barretan dauden marrek desbiderapen estandarra adierazten dute.

Presio ezberdinen ezaugarri topografikoak aztertu ziren ere, **6. Irudian** erakusten den moduan. Azterketa hau egitean, lehen aipatutako bi joera ezberdinak argiago ikusi ziren. Domeinu zurrunen azalera begiratzean, bi talde bereizten ziren, 5 eta 8 mN-etan transferitutako monogeruzak (fase fluido nagusia zelarik) eta 10, 20 eta 30 mN/m-etan transferitutakoak (fase zurruna nagusia). Faseen arteko altuera desberdintasunak aztertzean, 5 mN/m-tik 8 mN/m-ra pasatzean altueraren handipen bat ikusi zen. 8 mN-etako presiotik 10 mN-etako presiora pasatzean berriz, domeinu zurrunen azaleraren handipenarekin batera, domeinuen arteko altuera desberdintasuna murriztu zen. 10, 20 eta 30 mN/m-etako taldea begiratzean, domeinuen altueraren handipen lineal eta proportzionala ikusi zen presioaren handipenarekin.

3. ONDORIOAK

Monogeruzak mintz modelo bezala erabili dira beste ereduaren aurrean (liposomak kasu) abantaila ezberdinak aurkezten dituztelako. Monogeruza hauen lipido konposaketa, albo presioa eta paketatze maila era zehatzean kontrolatu daiteke, eta honek lipidoen albo segregazioa eta lipido-proteina interakzio lekuak eta ezaugarriak aztertzea baimentzen du (Cruz and Perez-Gil 2007).

GIB-aren mintza imitatzen duten mintz modeloetan, interesgarria da ahal den neurrian konposizio lipidikoa sinplifikatzea, esperimenteren errepikakortasuna bermatzeko eta lortutako emaitzen interpretazioa errazteko. Hala ere, sinplifikazio honen ondorioak kontuan hartu behar dira, modeloaren eta birusaren arteko ezberdintasunak gehiegizkoak ez izateko. Modu honetan PE lipidoek berebiziko eragina dutela behatu dugu, PE-rik gabeko konposaketa aztertzerako orduan, Virus-Like nahasketatik POPE eta pl-PE lipidoak kentzeak mintzeko lipidoen albo distribuzioaren birkonfigurazio handia zekarrela behatu zen eta (**3. Irudia d goian, 4. Irudia**). Gainera mintzaren zurruntasunean zeukan efektua aztertzean, zurruntasunaren jaitsiera inportantea ikusi zen (**1. Irudia**). POPS lipidoa kentzean berriz (PS gabeko konposaketa) ez zen aldaketa handirik ikusten lipidoen albo distribuzioan (**3. Irudia e, 4. Irudia**), baina mintzaren zurruntasunaren galera handia sortu zen (**1. Irudia**). Datu hauek hiru lipido hauen garrantzia erakusten dute, eta GIB-aren mintz modeloak lipido hauen ausentzian egin nahi badira, horren ondorioak kontuan hartu behar dira.

Ezaguna da kolesterolak GIB-aren mintzaren zurruntasunarekin daukan erlazio estua. Metil- β -ziklodextrinarekin egindako esperimenteretan ikusi da, birusaren mintzetik kolesterola kentzeak, mintzaren ordenaren jaitsiera ekartzen duela (Lorizate et al. 2009), eta lan honetan egindako esperimenteretan, kolesterol ehunekoaren jaitsiera mintzaren ordenaren txikipenarekin erlazionatuta dagoela ikusi da ere (**1. Irudia**). Kolesterolak eragindako zurruntasunak, birusaren fusio prozesuan eman behar den mintzaren deformazioa zailtzen du (Kozlov et al. 2010). Hala ere, argi utzi da hainbat ikerketetan kolesterolaren garrantzia GIB-arentzat, gp-41-en agregazioa ekarriz SM eta kolesterolean aberatsak diren guneetan (Saez-Cirion et al. 2002) edo MPER-TMD

arteko loturaren fusioa sustatuz birusaren mintzean (Apellaniz et al. 2014) adibidez. AFM-arekin lortutako datuekin gainera, kolesterolak domeinu zurrun zabalaren agerpena sustatzen zuela ikusi zen, eta kolesterol portzentajea jaitsi ahala, domeinu zurrunen zatikatzea sortzen zela (**3. Irudia a, b eta c behean**), hauen altuera erlatiboa handitzen zen bitartean (**4. Irudia**). Nahiz eta zaila izan gertakari hauen efektua ondorioztatzea birusaren prozesu infektiboan, probablea da aldaketaren bat eragitea, eta efektu zehatzak ikertzea interesgarria izan daiteke.

Mintz modeloaren lipido konposaketa zehatza kontrolatzea ezinbestekoa izan arren, SLM-en kasuan oso inportantea da ere monogeruza euskarri batera transferitzean, hau albo presio espezifiko batekin konprimatuta egotea. **5. Irudian** eta **6. Irudian** ikusten zen moduan, konposaketa lipidiko bera izanda, ezarritako albo presioa ezberdina bada, topografian sortzen diren ezberdintasunak esangarriak dira. Full %30 mol chol konposaketaren kasuan, gauza interesgarri bat ikusi zen. Presio ezberdinetan transferitutako monogeruzetan, bi jokoera ezberdin ikusi ziren lipidoen albo antolaketan, eta hauek, presioaren atalase balio batekin (8 eta 10 mN/m-en artean) banatuta zeudela zirudien (**5. Irudia** eta **6. Irudia**). 5 eta 8 mN/m-etan transferitutako monogeruzetan, antzeko albo distribuzioa ikusi zitekeen, bi faseek antzeko azalera hartzen zutelarik. Horretaz gain, domeinu hauen altuera presioaren handipenarekin batera (5 mN/m-tik 8 mN/m-ra) handitzen zen. 10 mN/m-etara pasatzean, aurretik ikusitako lipidoen albo antolakuntzaren kolapso bat ikusi zen, zeinetan domeinu zurrunen portzentajea handitu zen, baina haien altuera asko txikitu zen. 10 mN/m-etatik aurrera berriz, presioaren handipenarekin batera, domeinu zurrunen altueraren handipen proportzional eta lineala ikusi zen (**6. Irudia**). Datu hauek bi joera ezberdinen presentzia iradokitzen dute albo distribuzioan, 8 mN/m eta 10 mN/m artean dagoen atalase presio bategatik banatuak. Konposaketa lipidiko ezberdinetan halako albo distribuzioaren aldaketarik egotekotan, konposaketa bakoitzean atalase balioa aurkitzea interesgarria izango litzateke, mintz modeloaren funtzioa lipido antolakuntza jakin bati lotuta dagoelako, eta antolakuntza hori lortzeko presio zehatza ezagutzea beharrezkoa delako.

Aurretik aipatutako guztiak, lipido indibidualek konposaketa lipidiko konplexu batean izan dezaketen garrantzia erakusten dute, hala nola mintzeko lipidoen albo antolakuntzan edo mintzaren zurruntasunean, eta monogeruza eta bigeruzetan oinarritutako ereduak modu osagarrian erabiltzeak bien abantailaz baliatzea ahalbidetu digu. Behatutakoa kontuan hartuta, gure emaitzek konposaketa eta albo presio egokiaren aukeraketa ezinbesteko prozesua dela erakusten dute, eta parametro hauek, bilatutako helburuarekin batera aldatu behar diren faktoreak dira.

4. BIBLIOGRAFIA

Apellaniz, B., E. Rujas, P. Carravilla, J. Requejo-Isidro, N. Huarte, C. Domene and J. L. Nieva (2014). "Cholesterol-dependent membrane fusion induced by the gp41 membrane-proximal

external region-transmembrane domain connection suggests a mechanism for broad HIV-1 neutralization." J Virol **88**(22): 13367-13377.

Bagatolli, L. A., S. A. Sanchez, T. Hazlett and E. Gratton (2003). "Giant vesicles, Laurdan, and two-photon fluorescence microscopy: evidence of lipid lateral separation in bilayers." Methods Enzymol **360**: 481-500.

Brugger, B., B. Glass, P. Haberkant, I. Leibrecht, F. T. Wieland and H. G. Krausslich (2006). "The HIV lipidome: a raft with an unusual composition." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2641-2646.

Cai, L., M. Gochin and K. Liu (2011). "Biochemistry and biophysics of HIV-1 gp41 - membrane interactions and implications for HIV-1 envelope protein mediated viral-cell fusion and fusion inhibitor design." Curr Top Med Chem **11**(24): 2959-2984.

Carravilla, P., J. L. Nieva, F. M. Goni, J. Requejo-Isidro and N. Huarte (2015). "Two-photon Laurdan studies of the ternary lipid mixture DOPC:SM:cholesterol reveal a single liquid phase at sphingomyelin:cholesterol ratios lower than 1." Langmuir **31**(9): 2808-2817.

Cruz, A. and J. Perez-Gil (2007). "Langmuir films to determine lateral surface pressure on lipid segregation." Methods Mol Biol **400**: 439-457.

Chan, R., P. D. Uchil, J. Jin, G. Shui, D. E. Ott, W. Mothes and M. R. Wenk (2008). "Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides." J Virol **82**(22): 11228-11238.

Dieffenbach, C. W. and A. S. Fauci (2011). "Thirty years of HIV and AIDS: future challenges and opportunities." Ann Intern Med **154**(11): 766-771.

Dumas, F., P. Preira and L. Salome (2014). "Membrane organization of virus and target cell plays a role in HIV entry." Biochimie **107 Pt A**: 22-27.

Huarte, N., M. Lorizate, R. Kunert and J. L. Nieva (2008). "Lipid modulation of membrane-bound epitope recognition and blocking by HIV-1 neutralizing antibodies." FEBS Lett **582**(27): 3798-3804.

Kozlov, M. M., H. T. McMahon and L. V. Chernomordik (2010). "Protein-driven membrane stresses in fusion and fission." Trends Biochem Sci **35**(12): 699-706.

Lorizate, M., B. Brugger, H. Akiyama, B. Glass, B. Muller, G. Anderluh, F. T. Wieland and H. G. Krausslich (2009). "Probing HIV-1 membrane liquid order by Laurdan staining reveals producer cell-dependent differences." J Biol Chem **284**(33): 22238-22247.

Morkvenaite-Vilkonciene, I., A. Ramanaviciene and A. Ramanavicius (2013). "Atomic force microscopy as a tool for the investigation of living cells." Medicina (Kaunas) **49**(4): 155-164.

Picas, L., P. E. Milhiet and J. Hernandez-Borrell (2012). "Atomic force microscopy: a versatile tool to probe the physical and chemical properties of supported membranes at the nanoscale." Chem Phys Lipids **165**(8): 845-860.

Saez-Cirion, A., S. Nir, M. Lorizate, A. Agirre, A. Cruz, J. Perez-Gil and J. L. Nieva (2002). "Sphingomyelin and cholesterol promote HIV-1 gp41 pretransmembrane sequence surface aggregation and membrane restructuring." J Biol Chem **277**(24): 21776-21785.

Sanchez, S. A., M. A. Tricerri and E. Gratton (2012). "Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(19): 7314-7319.

Yang, S. T., V. Kiessling, J. A. Simmons, J. M. White and L. K. Tamm (2015). "HIV gp41-mediated membrane fusion occurs at edges of cholesterol-rich lipid domains." Nat Chem Biol **11**(6): 424-431.