

# GIBaren EGITURA- PROTEINA-KOLESTEROL ELKARREKINTZAREN AZTERKETA

Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

Gradu Amaierako Lana

Egilea:

Ariane Araujo Lombraña

Zuzendaria:

Maier Lorizate Nogales

Leioan, 2016ko ekainaren 28a

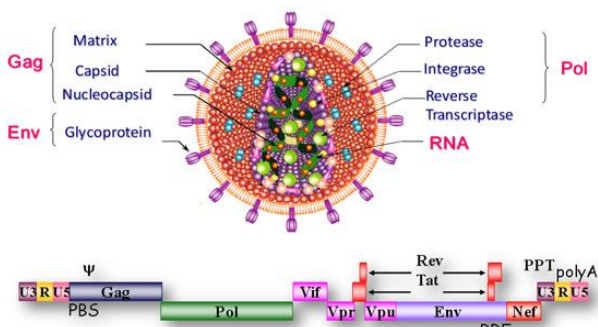
# AURKIBIDEA

1.	<b>SARRERA</b> .....	3
2.	<b>HELBURUAK</b> .....	7
3.	<b>MATERIAL ETA METODOAK</b> .....	7
3.1.	ZELULEN HAZKUNTZA .....	7
3.2.	ZELULEN APURKETA.....	7
3.3.	ZELULA-APURKETA MIKROSKOPIOAN AZTERTU .....	8
3.4.	ZELULEN TRANSFEKZIOA ETA LIPIDO FOTOAKTIBAGARRIA JARTZEA .....	8
3.5.	BIRUSEN PURIFIKAZIOA.....	8
3.6.	IMMUNOPREZIPITAZIOA.....	9
3.7.	LAGINEN AZTERKETA WESTERN BLOT ERDI LEHORRA ETA B-IMAGER BIDEZ .....	9
4.	<b>EMAITZAK</b> .....	10
4.1.	ZELULEN APURKETA.....	10
4.1.1.	Zelulak apurtzeko modurik egokiena aukeratzen.....	10
4.1.2.	Izozketa/desizozketa metodoa aztertzen.....	11
4.2.	TRANSFEKZIOA ETA ELKARREKINTZA .....	12
4.3.	KOLESTEROL ETA EGITURA-PROTEINEN ARTEKO ELKARREKINTZA .....	13
5.	<b>EZTABAIDA</b> .....	14
6.	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	17

# 1. SARRERA

Hartutako immunoeskasiaren sindromea (hiesa) jasaten duten pertsonak ahulduta daukate defentsa sistema. Hiesa giza immunoeskasiaren birusak (GIBak) eragin dezake birusaren aurkako tratamendurik hartzen ez den bitartean, immunitate sistemako zelulak infektatzen eta suntsitzen baititu, nagusiki CD4<sup>+</sup>T-zelulak<sup>[26]</sup>. Normalean birusak infektatutako pertsonak botika hartzen duen bitartean, birusa egoera latentean egongo da eta karga birala detektaezina izango da.

GIBaren genoma, bestelako erretrovirusetan bezala, RNAz osatuta dago, kate bakarreko bi RNA kopiaez hain zuzen ere. Genomaren bi bukaeretan errepikapen luzeko muturrak (LTR) deritzen sekuentziak daude. LTR eskualde horien artean osagai desberdinak daude, besteak beste, hiru poliproteina (Env, Pol eta Gag), lau proteina osagarri (Vpu, Vif, Vpr, Nef) eta bi proteina erregulatuak (Rev, Tat) (**Irudia 1**)<sup>[17]</sup>.

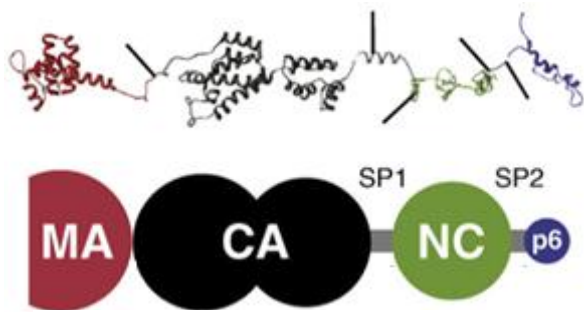


*Irudia 1. GIB-1aren egitura eta osagaiak.* GIB-1 birioi helduak 100 nm-ko diametroa duten partikula esferikoak dira eta lipidomintz batez inguratuta daude. Mintzean gainazal-proteinaren trimerokoak daude eta mintzaren azpian matrix geruza bat. Barnealdean capsid proteinaz osatutako kono-itxurako nukleoa dago. Egitura honen barruan erreplikaziorako behar den makineria (transkriptasa eta integrasa) eta genomaren kopia bikoitza dago<sup>[24]</sup>.

Env geneak zelula ostalariari sartzeko eta infektatzeko ezinbestekoa den gainazaleko proteina kodetzen du. Gp160 poliproteina bezala ekoizten da, eta zelula ostalariaren proteasen bidez gp120 eta gp41 azpiunitateetan prozesatzen da. Honela, bi azpiunitate hauek birusaren mintzean agertzen dira, dimeroen trimerokoak diren gainazaleko proteinak osatuz. Gp41 azpiunitateak mintza zeharkatzen du eta mintzen arteko fusioaz arduratzen da, bestetik, gainazaleko azpiunitatea, gp120, tropismo zelularraz arduratzen da, hots, infektatu beharreko zelula ezagutu eta inespezifiko hartzailletara estekatzen da<sup>[4,17]</sup>.

Pol geneak birusaren entzimak diren proteasa, alderantzizko transkriptasa eta integrasa kodetzen ditu<sup>[10]</sup>.

Gag geneak proteina estrukturalak kodetzen ditu. Birusaren morfogenesian aitzindari moduan sintetizatzen den Gag poliproteina birusak kodeturiko proteasa batek prozesatzen du lau egitura-proteina sortzeko: matrix (MA, p17 moduan ere ezagutzen dena), capsid (CA edo p24 ere izendatu daiteke), nucleocapsid (NC edo p7) eta p6. Gainera, bi peptido bereizle agertzen dira, SP1 eta SP2

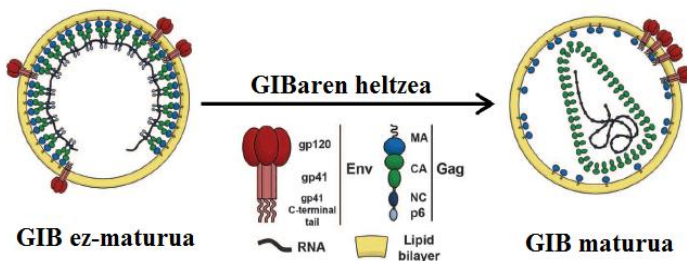


**Irudia 2. GIB birusaren Gag poliproteinaren irudi eskematikoa.** Bertan erresoluzio altuko tekniken bidez lortutako poliproteina osatzen duten domeinu desberdinak agertzen dira<sup>[2]</sup>.

(**Irudia 2**)<sup>[25]</sup>. Gag proteinak ondorengo funtzioak betetzen dituela ikusi da. Morfogenesia mintz plasmatikoa gertatzen denez, poliproteinaren MA domeinua eraginduta, Gag gemazio lekura bideratuko da<sup>[18,20]</sup>. Env glikoproteina birus partikuletara txertatzearen arduraduna da<sup>[17]</sup>. Birusaren genoma (RNA) mintz plasmatikora ituratzen du poliproteinaren NC aldera lotuz, gainera, RNA lotzeko duen gaitasunagatik Gag-en multimerizazioa eragiten

du<sup>[17,18]</sup>. Azkenik, birus-partikulen gemazio eta askapenean dihardu p6 domeinuak eraginduta. Horretarako zelula ostalariaren ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) makineria erakarriko du<sup>[18]</sup>.

Birusaren askapenarekin batera proteasa aktibatu eta poliproteinaren prozesaketa geratzen da (**Irudia 3**), honela birus heldu eta infektagarriak bilakatzen da. Birus helduetan MA mintzaren azpialdean kokatzen da<sup>[14]</sup>. CA-ak kono-itxura duen estalki zurruna eratzen du, besteak beste, birusaren genoma babestuz<sup>[17,18]</sup>. NC-ari dagokionez, birusaren RNAREN kapsulatzean eta babesean funtzio garrantzitsu bat dauka eta infekzioaren hasierako prozesuen eragilea da, alderantzizko transkripzioarena kasu<sup>[17]</sup>.

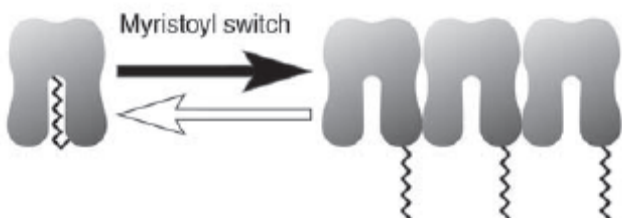


**Irudia 3. GIBaren heltzea.** GIBaren maturazio prozesuan birusaren proteasak Gag poliproteina mozten du proteina desberdinak sortzeko. MA proteina mintzaren azpian kokatzen da birus helduan eta CA-ak kono itxurako estalki bat sortzen du birusaren genoma babesteko<sup>[5]</sup>.

GIB-1en erreplikazio-zikloaren azken urratsa birioien morfogenesia eta askapena da, hauek infektatutako mintz plasmatikotik ateratzen dira<sup>[6]</sup>. Gag proteina gai da bera bakarrik prozesu hauek bideratzeko, hots, heldu gabeko birioien eraketa eta askapena eragiteko, nahiz eta birus infektiboa sortzeko bestelako proteinak eta Gag poliproteinaren proteasa bidezko prozesaketa ere beharrezkoak diren. Birusaren morfogenesia infektatutako zelularen zitoplasman hasten da. Zitoplasman dagoen bitartean Gag poliproteina RNAREkin lotzen da, polisoma deritzen egitua polimerikoak eratuz<sup>[11]</sup>. Orduan, Gag mintzera batzen da MA domeinuak ituratuta<sup>[12]</sup>.

Mintzera lotzeko alde batetik, amino muturrean kobalenteki lotutako miristoil talde bat dauka eta, bestetik, aminoazido basikoen multzo bat (31 aminoazido). Miristatoa 14 karbonotako gantz-azido

asea da. Miristoilazioak proteina eta mintzaren arteko lotura eragin dezake baina bera bakarrik ez da gai elkarrekintza hori egonkortzeko, horregatik bigarren seinale bat behar da: aminoazido basikoen multzoa. Honek mintzerako lotura finkatzen du, lotura elektrostatiakoak sustatzen baititu negatiboki kargatutako mintzeko fosfolipidoekin. Erresonantzia magnetikoko ikerketek baieztatu dute Gag proteinak miristoiloaren aldaketa mekanismo bat duela. Honela, bere miristoilazioaren arabera Gag proteinak bi egoera eduki ditzake: alde batetik, egoera monomerikoa, egoera horretan gantz-azidoa “bahituta” egongo litzateke eta, bestetik, trimero moduan ager daiteke, kasu honetan miristoil taldea esposatuta agertuko da<sup>[23]</sup>. Hala ere, oraindik argitzeke dirau miristoilazioaren esposatze hau Gag monomeroen arteko elkarrekintzaren ondorioz geratzen den<sup>[22]</sup> edo miristoil taldearen esposatzeak Gag proteinaren monomeroen arteko elkarrekintzak sustatzen dituen<sup>[14]</sup> (**Irudia 4**).



**Irudia 4. Gag proteinaren oligomerizazioa eta miristoil taldearen esposaketa.** Gantz azidoak atera egiten da Gag proteinan dagoen poltsiko hidrofobikotik eta honela, miristoil taldea esposatuta daukan Gag proteina sortzen da, mintzerako lotura sustatuko duena<sup>[14]</sup>.

Azkenik, MA-en dagoen aminoazido basikoen multzoen bidez, Gag mintzera lotuko da, bereziki PI(4,5)P2 lipidoarekin<sup>[12]</sup>. Beraz, PI(4,5)P2 lipidoak paper garrantzitsu bat dauka Gag mintzera ituratzeko orduan MA elkarrekintza elektrostatiako bidez PI(4,5)P2-arekin elkarrekin ondoren, miristoiloaren esposaketa eragingo luke eta badirudi lipido horren gantz-azido asegabea MA duen poltsiko hidrofobikoan bahituko lukeela. Modu honetan lipido ingurunearen zurruntasuna eragingo luke, lipido-baltzen eraketa, edo jadanik bertan dauden baltzen koalezentzia bultzatuz<sup>[12,28]</sup>.

Birusen estalkia osatzen duen mintza jaso egiten da zelula ostalariaren zelula-mintzetik gemazio prozesuan. Hala ere, egindako ikerketek aditzera eman dute birusen mintza desberdina dela infektatutako zelula-mintzarekin alderatuz gero<sup>[3]</sup>. Horregatik, proposatu da birusak mintzeko gune berezietatik askatzen direla. Ikusi izan da kolesterola, fosfatidilserina eta esfingomielina bezalako lipidoen kantitatea emendatuta dagoela birusen mintzean<sup>[1]</sup> eta, berriz, fosfatidilkolina eta fosfatidilinositol lipidoen proportzioa murriztuta dagoela. Lipidoen konposaketa hau bat dator lipido-baltsetan (raft-etan) agertzen denarekin, horregatik, ondorioztatu daiteke GIBak mintzeko gune berezi hauetatik askatzen direla<sup>[1,7,12]</sup>.

Oraindik ez dago argi Gag poliproteina zuzenean gune berezi horietara ituratzen den edo Gag-ek eragiten duen ingurune berezi horien eraketa mintzarekin elkarrekintzak eduki ondoren<sup>[1,7,12]</sup>. Gag proteina mintzera ituratzen duen domeinua matrix dela ikusi izan da<sup>[12]</sup>.

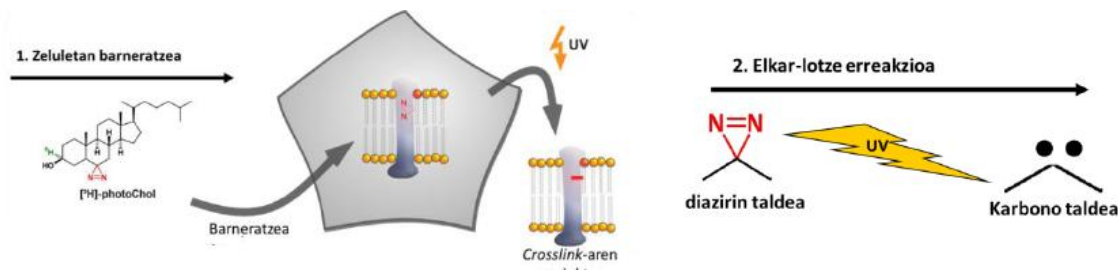
Kolesterolak zelulako bestelako osagaiekin, fosfolipidoekin esaterako, dituen elkarrekintzak ezinbestekoak dira zenbait zelula-prozesuetan. Izan ere, kolesterolatan aberatsak diren gunek, hots, lipido-baltsak, hainbat proteinentzako plataforma moduan aritzen dira, honela, lipido eta proteinen arteko elkarrekintza asko erregulatzen dira bertan, birusen muntaketa esaterako<sup>[19]</sup>.

Gainera ikusi izan da kolesterolak zeregin garrantzitsua duela Gag mintzera lotzeko orduan. Izan ere, kolesterola mintzean zehar barreiatuta dago modu heterogeneo batean eta horrez gain, kate aseak dituzten beste lipidoekin elkartzean lipido-baltsak izeneko mikrodomeinuak sortzen dira mintzean. Ikerketek aditzera eman dute kolesterola kentzean lipido-baltsa hauek ez direla sortzen, gainera, HIV-1 Gag poliproteinaren lotura mintzera murrizten da eta baita ere birioien sorrera<sup>[18]</sup>. Horrez gain, ingurune lipidiko desberdinetan kolesterol kantitatea emendatzean Gag proteinaren lotura emendatzen da<sup>[8]</sup>. Beraz, ikerketa hauek iradoki egiten dute kolesterolak Gag poliproteina eta mintzaren arteko lotura errazten duela lipido-baltsak edo antzeko egiturak sortuz.

Gag poliproteinak bideratzen duen morfogenesia ulertzea garrantzitsua da elkarrekintza hauek farmakoen ituak izan daitezkeelako. Egituran oinarritutako ikerketek frogatu dute zenbait molekula inhibitzaile txikiak PI(4,5)P2 lipidora lotzen direla GIB-1en MA domeinua lotzen den leku berdinean eta honela birusen sorrera nabarmen murrizten dela<sup>[23]</sup>. Hala ere, elkarrekintza horiek ondo zehazteko ikerketa asko egin behar dira oraindik.

Hori dela eta, lan honetan Gag poliproteina eta mintz plasmatikoko kolesterolaren arteko elkarrekintza aztertuko da. Horretarako zelulari fotokolesterola (<sup>[3</sup>H]kolesterola) gaineratuko zaio (**Irudia 5**).

Lipido hauek talde fotoaktibagarri bat daramate, diazirin taldea hain zuzen ere, argi ultramorearekin irradiatu ostean karbono bilakatzen dena<sup>[9]</sup>. Azken hau oso erraktibagarria da, honela behin mintzean txertatuta eta argi ultramorearekin irradiatuta, talde erraktibagarria gai da lotura kobalenteak eratzeke inguruan dauden molekulekin; hau da, 3 Å baino hurbilago dituen proteina eta lipidoekin. Talde fotoaktibagarriaz gain, erradioaktiboki markatuta egongo da lipido eta proteinen arteko elkarrekintza detektatu ahal izateko<sup>[27]</sup>. Modu honetan, transfektatutako zelulak kolesterol fotoaktibagarriarekin hazi ostean, zelulan MA, ez ordea Gag, kolesterolarekin elkarreragiten duela ikusi da. Hau konfirmatuz gero, prozesatutako proteinak kolesterolarekin elkarreragiten duenez, heldze prozesuak ingurune lipidikoan zeresana duela adieraziko luke, eta birus mailan aztertzeke geratu den elkarrekintza hori espero izatekoa liteke. Horrela elkarrekintza hau deuseztatuko lukeen molekulen garapena erretrobirus aurkako beste farmako bat bihur zitekeen.



*Irudia 5.* **Lipido fotoaktibagarrien mekanismoa.** Lipidoak zelula-mintzean txertatu eta argi-ultramorearekin irradiatu ostean, diazirin taldearen elektroiak desparketzen dira eta honela oso molekula erreaktibagarria eratzen da, inguruan dituen molekulekin lotura kobalenteak eratuko dituena.

## 2. HELBURUAK

Gag poliproteina GIB-1 birusaren egitura-proteina bat da. Ikerketek adierazi duten moduan, Gag proteinak mintzeko lipido-baltsekin ditu elkarrekintzak, zehazki bertan dagoen PI(4,5)P2rekin. Aldiz, baltsak osatzen dituzten bestelako lipidoekin dituen elkarrekintzak argitzeke daude oraindik. Horregatik, Gag proteinak zelula-mintzeko kolesterolarekin elkarrekintzak dituen edo ez aztertuko da. Horretarako fotokolesterol erradioaktiboa erabiliko da, izan ere molekula hauek gai dira lotura kobalenteak eratzeko 3 Å-etako distantzia baino hurbilago dauden molekulekin. Honela, Gag proteina eta zelula-mintzeko kolesterolaren artean elkarrekintzarik dagoen zehaztuko da.

## 3. MATERIAL ETA METODOAK

### 3.1.ZELULEN HAZKUNTZA

HEK293T zelulak hazteko erabili den medioa Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, High Glucose, Glutamax, Gibco® Thermo Fisher Scientific) medioa izan da, %10 (v/v) behi-umekiaren serumarekin (FBS, Gibco® Thermo Fisher Scientific) eta %5 (v/v) antibiotikorekin (estreptomizina eta penizilina, Gibco® Thermo Fisher Scientific) aberastu ostean. Zelulak hazi direneko inkubagailuaren baldintzak %5 CO<sub>2</sub> eta 37 °C dira.

### 3.2.ZELULEN APURKETA

HEK293T zelulak sei putzuetako plaketan (Sigma-Aldrich) erein dira. Putzu bakoitzean 5·10<sup>5</sup> zelula jarri dira eta bertan hazi dira 24-48 orduz. Zelulak jasotzeko PBS (Sigma Aldrich) indargetzailea proteasen inhibitzailearekin (PI) (Roche) %2 (v/v) aberastu da eta arraskagailua erabili da.

Zelulak saiodi batean jaso dira eta 1250 r.p.m.-tan 5 minutuz zentrifugatu da. Gainjalkina baztertu ostean, jalkina 200 µL PI-dun PBS indargetzailean berreseki da.

Jalkinekin bi zelula-apurketa metodo frogatu dira. Alde batetik, zelulak orratza meheko xiringa batetik pasaraziz apurtu dira. Honetarako, zelulen disoluzioak diametro desberdinetako (0.5 mm eta 0.8 mm) orrazdun xiringetatik (Microlance) zehar pasarazi dira. Bestetik, zelulak izozte/desizozte 10 zikloen bidez apurtu dira. Honetan, nitrogenuko likidotan minutu batez izoztu ondoren, 30 °C-tan

dagoen uretan desizoztu dira hiru minutuz. Ondoren, laginak 13300 r.p.m.-tan zentrifugatu dira 15 minutuz 4 °C-tan.

Zelulak kontagailu automatikoan (TC20™ Automated Cell Counter, Bio-Rad) zenbatu dira baita zelulak apurtu ostean.

### **3.3.ZELULA-APURKETA MIKROSKOPIOAN AZTERTU**

Zelulak altxatu dira eta 400 µL input moduan gorde dira. Gainerako bolumena (4.8 mL) 1250 r.p.m.-tan zentrifugatu da 5 minutuz eta jalkina PI-dun PBS indargetzailearen 100 µL-tan berreseki da. Zelulak izozketa/desizozketa metodoaren bidez apurtu dira eta ostean jalkina eta gainjalkina lortu dira. Lagin hauek (inputa, jalkina eta gainjalkina) 1000 r.p.m.-tan 15 minutuz zentrifugatu dira Cellspin (Rotor JC370, Tharmac) erabilia, horrela, zuzenean mikroskopiorako porta batera pasa dira. Inputetik eta gainjalkinetik 100 µL bana jarri dira baina jalkina oso likatsua denez, bi erreplika egin dira %10 ea %50ekoa.

Muntaiak zentrifugatu ostean, laginen gainean formaldehido (%40 v/v) tanta batzuk jarri dira eta PBSarekin, eta gero urarekin, garbitu dira portak. Bukatzeko mounting medioa gehitu da.

### **3.4.ZELULEN TRANSFEKZIOA ETA LIPIDO FOTOAKTIBAGARRIA JARTZEA**

Zelulak pCHIV plasmido pro-biralarekin transfektatu dira kaltzio fosfatoaren metodoa erabiliz<sup>[14]</sup>. Transfekzioa gauzatu eta sei ordu beranduago medioa aldatu zaie. Behin medioa aldatuta 30 orduko birusen produkzioa utzi da. 12 ordu beranduago, kolesterol fotoaktibagarria gehitu zaie, FBS delipidatua duen DMEM medioa (12 mL) 60 µCi fotokolesterol erradioaktiborekin (5 µCi/µL) nahastuta. 24 ordutara medioa jaso da. Zelula batzuk izarniadura kontagailuan erabili dira, barneratutako lipido portzentajea neurtzeko eta gainerakoei 500 µL PI-dun PBS jarri eta gero, argi ultramorez irradiatu dira bost minutuz, zelulak izotzetan mantendu direlarik.

### **3.5.BIRUSEN PURIFIKAZIOA**

Jasotako medioa birusen purifikaziorako erabili da. 1500 r.p.m.-tan 5 minutuz zentrifugatu ostean, medio hori 0.45 µm-tako diametroa duen filtro batetik zehar pasarazi da. Filtratutako medioa Petri kutxa batean jaso da eta 5 minutuz irradiatu da argi ultramorearekin, plaka izotzetan mantenduta. Ostean, ultrazentrifugazio hodian %20-ko sakarosa duen HEPES indargetzailearen (HN77.5, Carl Roth) 10 mM, NaCl (MERCK) 150 mM, pH 7.4.) 0.5 mL jarri dira. Disoluzio horren gainean iragazitako eta irradiatutako medioa jarri da eta 44000 r.p.m.-tan 45 minutuz eta 4 °C-tan zentrifugatu da Optima L-100XP ultrazentrifugan (Beckman Coulter) SW60-Ti errotorea (Beckman Coulter) erabilia. Ultrazentrifugatu ostean, gainjalkina kendu da eta saiodi bakoitzeko jalkina 30 µL



HEPES indargetzailean berreseki da.

### 3.6. IMMUNOPREZIPITAZIOA

Laginak 5 minutuz 13000 r.p.m.-tan zentrifugatu ostean, zelulen jalkina, zelulen gainjalkina eta birusen jalkina berreseki dira PI daukan lisi tanpoian (HEPES (Carl Roth) 20 mM, NaCl (MERCK) 100 mM, EDTA (Sigma-Aldrich) 5 mM, Sodium Deoxycholate (DOC) (Sigma-Aldrich) (0.5% w/v), Triton X-100 (Sigma-Aldrich) (1% w/v), pH 7.4). Lagin bakoitzetik 10 µL jaso dira hasiera puntu bezala. Gainerakoa, gau osoan zehar, 4° C-tan eta mugimenduan, utzi da matrix (untxia) aurkako antigorputzekin eta A sefarosa bolatxoekin (GE Healthcare). Laginak 6500 r.p.m.-tan zentrifugatu dira 5 minutuz. Gainjalkina gorde da eta jalkina 500 µL lisi tanpoian berreseki da eta 6500 r.p.m.-tan zentrifugatu dira 5 minutuz. Gainjalkina aurretik jasotako gainjalkinarekin nahastu da. Lagin guztiei β-merkaptotetabolen 30 µL gehitu zaizkie eta 95° C-tan 5 minutuz berotu dira. Ondoren, immunoprezipitatutako laginak 10 minutuz 6500 r.p.m.-tan zentrifugatu dira eta gainjalkina hartu da. Bolatxoez osatutako jalkinari 20 µL β-merkaptotanol gaineratu eta berriz zentrifugatu da, kasu honetan baita ere, gainjalkina gorde da, aurreko zentrifugaziotik lortutako gainjalkinarekin.

### 3.7. LAGINEN AZTERKETA WESTERN BLOT ERDI LEHORRA ETA B-IMAGER BIDEZ

Laginak β-merkaptotetolarekin nahastu ostean, %12-ko poliakrilamida duen SDS-PAGE gelan kargatu eta 80 V-etan 15 minutuz migratu dira, *staining*-ean sartu diren arte. Orduan, 120 V-tan 45 minutuz migratu dira gelan zehar. *Dual Color* markatzailea (Bio-Rad) erabili da. Ostean, gelatik metanolarekin aktibatutako nitrozulodosazko mintzera transferitu dira proteinak, honetarako 15 V-etan ordubetez mantendu dira transferentzia-kasetean (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell – Bio-Rad). Mintza giro tenperaturan eta mugimenduan ordubetez blokeatu da Blocking Buffer (Odyssey, Li-Cor) erabilita. Behin mintza blokeatuta, Blocking Buffer-ean diluitutako antigorputz primarioekin inkubatu da ordu betez giro tenperaturan edo gau osoan zehar 4 °C-tan. 15, 5 eta 5 minututako 3 garbiketa egin dira TBST indargetzailearekin (Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 (%0.2 w/v)). Antigorputz sekundarioa Blocking Buffer-ean diluitu da eta diluzio honi %0.1 Tween 20 (Sigma Aldrich) eta %0.01 SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, Merck) gehitu zaio. Mintza ordubetez eta mugimenduan inkubatu da diluzio horrekin. Mintza berriz ere TBSTarekin garbitu da. Garbiketen ostean, gela Li-Cor-ean edo HPR-an, peroxidasaren metodoa erabilita, hau da, peroxidasak akoplatuta daukan antigorputza erabilita (Santa Cruz), errebelatu da. Laginak immunoprezipitatu direnean mintz berdinen erradioaktibitatea β-imager-ean (Biospace) neurtu da.

*Taula 1. Western Blot erdi lehorrean erabilitako antigorputzak. Capsid (CA), matrix (MA), eskramblasa (Scr).*

ESPERIMENTUA	ANTIGORPUTZA	ANTIGENOA	OSTALARIA	DILUZIOA	ETXE KOMERTZIALA
Gag-kolesterol elkarrekintzak	Primarioa	CA, MA	Ardia Untxia	1:5000, 1:10000	Hans-Georg Krausslich laborategikoa
	Sekundarioa	Ardia (IRDye 800), Untxia (IRDye 680)		1:10000 1:10000	Rockland Li-Cor
Eskramblasaren detekzioa	Primarioa	Scr	Ahuntza	1:500	Santa Cruz
	Sekundarioa	Ahuntza	Astoa	1:10000	Santa Cruz

## 4. EMAITZAK

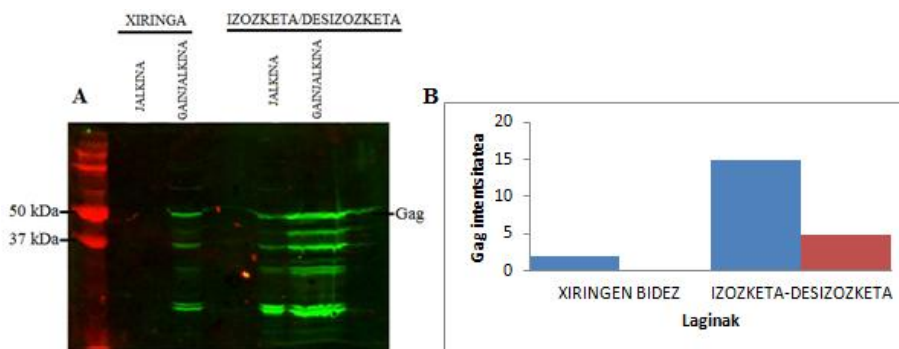
Gag poliproteinak morfogenesisia bultzatzen du. Birioien sintesi prozesuaren pausu goiztiarretan zitosolean barreiaturiko polisometan hazten dela behatu izan da<sup>[6]</sup>. Gag-ek mintz plasmaticoarekin dituen elkarrekintzak zehazki aztertu nahi direnez, polisoma hauek baztertzeko helburuarekin zelulak apurtuko dira. Ondoren, zelula-mintzak eta zitosoleko osagaiak banatuko dira.

### 4.1.ZELULEN APURKETA

#### 4.1.1. Zelulak apurtzeko modurik egokiena aukeratzeko

Lehenik eta behin, zelulak apurtzeko metodo egokiena aukeratzeko bi metodo frogatu dira. Lehena orratz mehea duen xiringen bidezkoa eta bigarrena izozketa/desizozketa zikloen bidezkoa, hau da, zelulak nitrogenu likidotan izoztu eta 30 °C-tan dagoen uretan desizoztu. Prozedurak aurrera eramanean, xiringen bidez apurtutako laginean jalkin kantitate handiagoa dago, nitrogenu likidotan izoztu/desizoztutakoarekin alderatuta. Gainera, gainjalkin hori likatsua da, nukleoak apurtu direnaren adierazle, izan ere, nukleoak apurtzean DNA askatzen da eta honek ura bereganatzen du. Ondorioz, lagina likatsuagoa eta edukiaren aldetik handiagoa bilakatzen da. Honek eraman gaitu pentsatzera xiringen bidezko apurketa bortitzegia izan dela. Gainera likatasunagatik ezin izan da egokiro gelan

kargatu. Hau dela eta, ez da bandarik detektatu xiringen bidez apurtutako zelulen jalkinean (**Irudia 6**).



**Irudia 6.** Zelulak apurtzeko metodo egokiena (xiringen bidez edo izozketa/desizozketa bidez) zehazteko egindako Western Blot semi-lehorra. A) Laginak migratu ostean lortutako gela. Antigorputz primarioa anti-kapside da eta sekundarioa kapsidearen aurkako antigorputza ezagutzen duen ardiaren antigorputza. B) Gag-i<sub>d</sub> dagokion bandaren intentsitatea neurtu da eta lagin desberdinen intentsitatea alderatu da (urdinez gainjalkina eta gorritz jalkina).

Izozketa/desizozketa zikloen bidezko apurketa egokiagoa dela ondorioztatu da. Horretarako bi prozeduren bidez apurtutako zelulen gainjalkinak konparatu dira, izan ere, xiringen bidez apurtutako jalkina oso dentsua zenez ezin izan da kargatu.

Gainjalkinean dagoen Gag kantitatea printzipioz mintzera lotuta geratzen diren edo irteteko prozesuan dauden birioietatik dator. Xiringen bidez apurtutako lagineko gainjalkinean lortutako seinale baxuak adieraz dezake jalkinean apurtu gabeko zelula asko egon daitezkeela. Ondorioz, izozte/desizozte metodoarekin jarraitzea erabaki da.

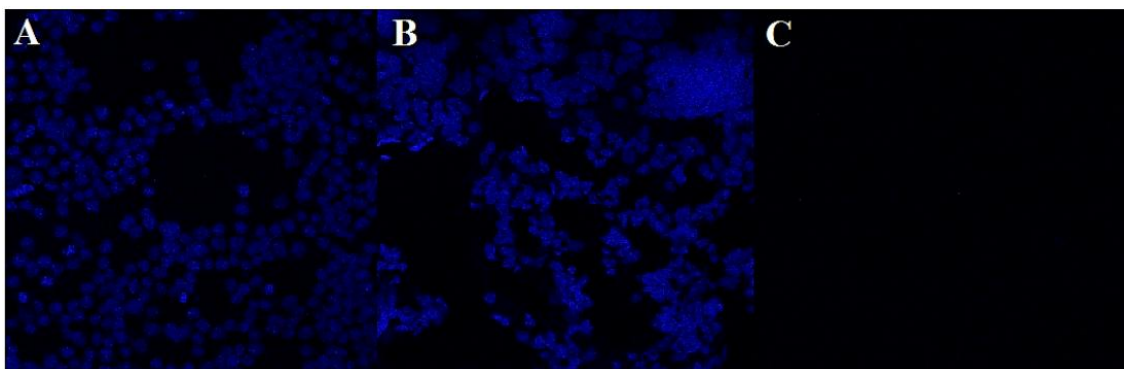
#### 4.1.2. Izozketa/desizozketa metodoa aztertzen

##### 4.2.2.1. Azterketa kuantitatiboa

Aldi berean izozketa/desizozketa bidezko apurketa metodoaren eraginkortasuna kuantitatiboki aztertu da. Honetarako, zelula-kopurua neurtu da zelulak apurtu aurretik eta apurtu ostean, tripan urdina erabilia zein konposatu hau erabili gabe. Hasieran  $3.8 \cdot 10^6$  eta  $3.3 \cdot 10^7$  arteko zelula zenbatu dira eta bukaeran aldiz,  $7.5 \cdot 10^5$  eta  $1.58 \cdot 10^6$  arteko zelula-kopurua zenbatu da tripan urdina erabili gabe, eta aldiz, tripan urdina gehitutakoan  $2.65 \cdot 10^5$  eta  $6 \cdot 10^5$  zelula artean. Beraz, tripan urdina gehitzen ez denean, apurketa metodoaren eraginkortasuna %86.42-koa dela ondorioztatzen da. Berriz, tripan urdina gehitzean ikusten da eraginkortasuna %98.1-koa dela. Desberdintasun honetarako arrazoia izan daiteke zelulan egindako apurketa txikien ondorioz zelulen morfologia mantentzen duten hildako zelulak, izan ere, tripan urdinik gabe hildako zelula hau zelula bizitzat joko litzateke benetan hilda dagoen bitartean.

##### 4.2.2.2. Mikroskopia bidezko azterketa eta eskranblasaren detekzioa

Zelulak apurtu ostean prozeduraren eraginkortasuna aztertzeko bi esperimentu gauzatu dira. Batetik, zelulak apurtu ostean, mikroskopia konfokalean begiratu dira, honela, Nomarsky bidez zelularen itxura iger daiteke eta nukleoak Dapi-rekin detektatu dira.



*Irudia 7.* Mikroskopia konfokalean begiraturako laginak. A) Apurtu gabeko zelulen lagina. B) Zelulak apurtu eta zentrifugatu osteko jalkina. C) Zelulak apurtu eta zentrifugatu osteko gainjalkina.

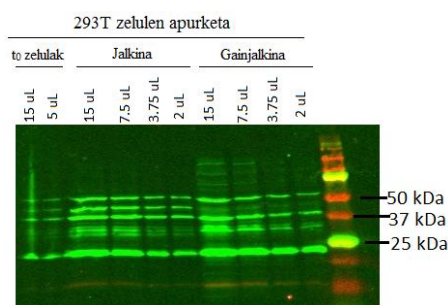
293T zelulak disoluzioan eta bizirik daudenean borobilak dira (**Irudia 7, A**). Apurtu ostean, zelulen nukleoak desegituratuta agertzen dira eta beha daitezkeen orbanak zelulen mintzei dagozkie (**Irudia 7, B**). Beraz, jalkinean desegituratuta dauden nukleo horiek eta mintzak ikusten dira baina gainjalkinean ez da ezer ez ikusten (**Irudia 7, C**). Aipatzekoa da kasu bietan bolumen berdina aztertzen dela, beraz gainjalkina berriro zitosolaren adierazlea da. Izozketa/desizozketa zikloen bidezko apurketaren ostean zentrifugazioa egokia dela esan daiteke. Zelula-mintzak eta zelula barruko osagaiak banatu ditu, mintzak jalkinean geratzen direlarik. Hala ere, esperimentu honen

bidez ez dira banatzen mintz plasmatikoa eta bestelako organuluetatik datozen mintzak. Beraz, jalkinean ikusten diren mintzetan mintz plasmatikoa ondo bereizita dagoela ziurtatzeko eta apurketa ez dela masiboa izan jakiteko, lagin horietan mintz plasmatikoa dagoen eskramblasa mintz-proteina detektatu da. Horretarako eskramblasa aurkako western blot bat egin da (**Irudia 8**).

Eskramblasa mintz markatzaile moduan erabiltzen da<sup>[21]</sup>. Proteina honen pisu molekularra 37 kDa-takoa da, hori dela eta, jalkinean ikusten den 37 kDa-tako banda eskramblasari dagokio. Honek adierazten du jalkinean agertzen diren mintzen artean mintz plasmatikoa aurkitzen dela, ezin baita baztertu bertako mintz batzuk zelula barruko organuluak izatea. Gainera, banda hau ez denez agertzen gainjalkinean, mikroskopio konfokalean lortutako emaitzak indartzen ditu, gainjalkinean ez da zelula-mintzarik geratzen. Apurketa masiboaren aukera baita ere baztertzen du.

#### 4.2. TRANSFEKZIOA ETA ELKARREKINTZA

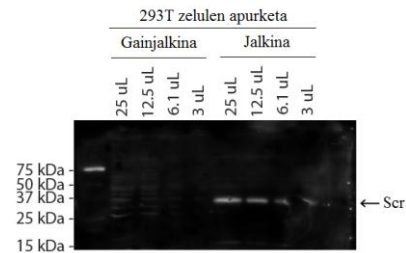
Izozketa/desizozketa metodoak zelulak apurtzeko duen eraginkortasuna transfektatutako zelulekin ere frogatu da. Kasu honetan ere apurketa metodo egokia dela esan daiteke aurretik ikusitako patroia bera errepikatzen delako. Hortaz, capsid proteinari dagozkion banda sorta detektatu denez (**Irudia 9**), alde batetik, onar daiteke transfekzioa egokia izan era eta, bestetik, frogatuta geratzen da zelulak apurtzeko metodoa egokia dela transfektatutako zeluletan baita ere.



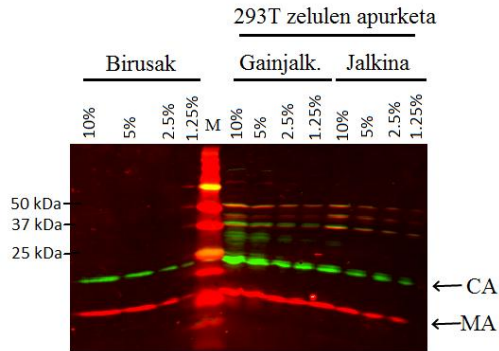
**Irudia 9. Zelulak apurtzeko metodoa transfektatutako zeluletan ere egokia dela frogatzeko Western-Blot erdi-lehorra.** Laginen diluzio desberdinak gelan kargatu ostean, capsid proteinaren aurkako antigorputzek ezagutzen duten banda-sorta ikusi da.

bitartean sortzen diren bestelako bitartekariei dagozkien bandak ere agertzen dira.

1: Anti-PSCR1 Sta. Cruz 1:500 Gau osoa 4 °C  
2: Anti-ahuntza HRP Sta. Cruz 1:10.000 45' GT  
Espasaketa-denbora: 13 s



**Irudia 8. Jalkineko mintzetan mintz plasmatikoko markatzailea den eskramblasa proteinaren detekzioa.** Gainjalkin eta jalkinaren bolumen berdinetatik abiatuta, bolumen desberdinak kargatu dira poliakrilamidazko gel batean. Eskramblasa bakarrik jalkineko laginean ikusi denez, onartu daiteke mintz plasmatikoa jalkinean geratzen dela zentrifugazioaren ostean.

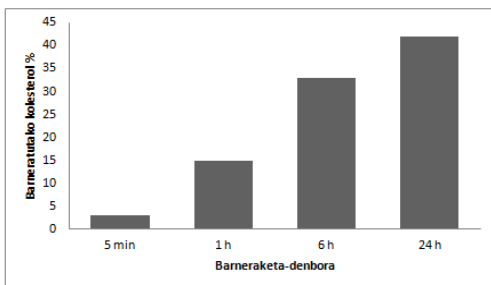


**Irudia 10. Birusen sorrera egokia dela frogatzeko Western-Blot erdi-lehorra.** Bolumen osotik kargaturiko portzentaia desberdinak adierazten dira. Proteinen patroia egokia da bai birus bai zelula mailan, matrix (17 kDa eta gorriz) eta capsid (24 kDa eta berdez) proteinak ikus daitezkeelako.

Bestalde, bai zeluletan bai birusetan matrix eta capsid proteinen patroia agertzen denez, transfekzioa eta birus produkzioa egokiak izan direla ondorioztatzen da.

### 4.3.KOLESTEROL ETA EGITURA-PROTEINEN ARTEKO ELKARREKINTZA

Ikerketaren helburu nagusia GIB-1en egitura-proteina eta mintz plasmatikoko kolesterolaren arteko elkarrekintza aztertzea denez, zelulei gehitutako [<sup>3</sup>H]-fotokolesterolaren edukitze maximoa zein denbora tartean gertatzen den neurtzeko denbora-tarte desberdinetan gaineratutako kolesterol kantitate neurtu da.



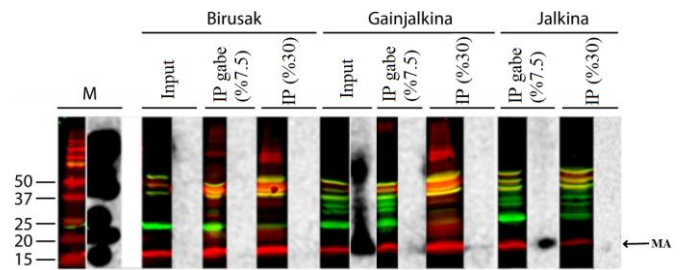
**Irudia 11. Zelulek barneratutako kolesterol kantitatea denbora tarte desberdinetan.** Aztertutako denbora-tarteen arabera kolesterolaren barneratze maximoa 24 h inguru gertatzen da.

Kolesterolaren barneratze maximoa lortzen da zelulak lipidoarekin 24 ordutan zehar inkubatuta (**Irudia 11**). Horregatik, kolesterol fotoaktibagarria 24 orduz inkubatuko da transfektatutako zelulekin. Zelulak transfektatu eta kolesterol fotoaktibagarriarekin inkubatu ostean, zelulak eta birusak argi ultramorearekin irradiatu dira. Zelula hauek sortutako birusak purifikatu dira eta zelulak apurtu dira. Orduan, purifikatutako birusak eta apurtutako zelulak immunoprezipitatu dira matrix proteinaren aurkako antigorputzak erabilia. Ondoren

immunoprezipitatutako laginak gel batean kargatu eta Western Blot erdi-lehorra egin da matrix eta capsid proteinak ikusteko. Era berean, gel hori β-imagerarekin aztertu da lipido fotoaktibagarriaren seinalea jasotzeko.

Bai birusen bai zelulen gainjalkin zein jalkinean matrix (17 Da inguru) eta capsid (24 kDa inguru) proteinei dagozkien bandak ikusten dira. Bestetik, β-imagerarekin [<sup>3</sup>H]-fotokolesterolaren seinalea neurtzean ez da seinalerik jasotzen birusen kasuan (**Irudia 12**). Egia da normalean birusetan proteina-kantitate baxuagoa lortzen dela baina behintzat inputean ikusi beharko litzateke seinalaren bat. Honek adierazten du birusengan egindako argi-ultramorearearen bidezko irradiazioan arazoren bat egon dela eta ez duela funtzionatu, honela, fotokolesterola ez da aktibatu eta hau dela eta ez da bandarik ikusten.

Zelulei dagokienez, gainjalkinean seinale nabarmena inportean ikusten da, hala ere, gure proteinaz gain, kolesterolarekin elkarrekiten duten proteina ugari adierazten du honek. Aldiz, immunoprezipitatu gabeko eta immunoprezipitatutako gainjalkineko laginetan oso banda ahul bat ikus daiteke 17 kDa inguru, matrix proteinari dagokion banda izango dena. Mintzera lotuta geratu diren birusak edota gemazio prozesuan dauden birusak izango dira banda honen erantzuleak.



**Irudia 12. Laginen immunoprezipitazioa zelula-mintzeko kolesterola eta Gag egitura-proteinen arteko elkarrekintza frogatzeko.** Immunoprezipitatutako laginen portzentaia desberdinak poliakrilamidazko gelan kargatu dira. Jalkin eta gainjalkinean 15 kDa inguru matrix proteinari dagokion banda ikus daiteke. Erradioaktibitatea neurtzerakoan mintzean MA dirudien banda erradioaktiboa ikusten da IP laginean, oso gutxi ikusten den arren. IP: immunoprezipitatu.

Zelulen jalkinaren kasuan, inputa ezin izan zen kargatu oso likatsua zelako, horregatik ez da gelan agertzen. Immunoprezipitatu gabeko laginean, argi eta garbi banda bat ikusten da 17 kDa inguru eta, berriz, immunoprezipitatutako laginean banda ahulago bat agertzen da leku berdinean. Honek eraman gaitu pentsatzera immunoprezipitazioaren ostean, oraindik ere immunoprezipitatu gabeko proteina asko dagoela, horregatik, immunoprezipitazioa hobetu beharko litzateke. Horretarako, lehenik bolatxoak eta antigorputzak kobalentezki akoplatu daitezke, gero garbiketa bat egin lotu ez diren antigorputzak kentzeko eta orduan gaineratu gure lagina. Honela ziurtatuko dugu proteina lotzen duten antigorputzek bolatxoak lotuta edukiko dituztela eta, beraz, immunoprezipitatutako dela. Beste aukera bat proteinari etiketa bat jartzea izango litzateke. Honetarako fusio proteina bat eraiki beharko litzateke, Mic alegia, honen aurkako antigorputzak oso onak dira eta baita, inklusio zutabeak erabili daitezke immunoprezipitazioaren etekina hobetzeko.

Bestalde, seinale hori matrix proteinaren leku berdinean agertzeak adierazten du kolesterola eta matrix proteinaren artean nolabaiteko elkarrekintza egon daitekeela edo behintzat oso hurbil kokatzen direla kolesterola eta matrix proteina, azken hau mintzera ituratzen denean.

## 5. EZTABAIDA

Ikusi izan da Gag poliproteina, morfogenesia bultzatzen duena, zitosolean barreiatuta dauden polisometan agertzen dela birioien sintesi prozesuaren hasieran<sup>[7]</sup>. Gag poliproteinak mintz plasmatikorekin duen elkarrekintza aztertzeko polisomak baztertu dira, horretarako zelulak apurtu eta zentrifugatu dira, honela mintz plasmatikoa zelula-osagai desberdinetatik banatu dira. Xiringen bidez apurtutako zeluletan apurketa metodoa bortitzegia da oso likatsua delako, horregatik, aurreragoko pausuetan apurketa-metodo hau erabiltzea baztertu da. Aldiz, nitrogeno likidotan izoztu eta 30° C-tan dagoen uretan desizoztea aukeratu da apurketa metodo egokientzat. Metodo honen

egokitasuna onartu da apurketa-eraginkortasuna %98.1-ekoa dela ikusitakoan. Emaitza hauek tripan urdinarekin lortu dira eta konposatu hau erabili gabe lortutako emaitzetatik zerbait desberdintzen dira. Hala ere, tripan urdinarekin egindako neurketak erabilgarriagozat hartu dira. Izan ere, zelula-kontagailuak zelula bizitzat jo ditzake itxura mantendu duten baina benetan hilda dauden zelulak. Berriz, tripan urdina, soilik hilda dauden zeluletan barneratzen den molekula denez, ahalbidetzen du zelula bizi eta hilak modu finago batean desberdintzea.

Bestetik, apurketa osteko zelula-mintzen eta barne materialen arteko banaketa egokia dela frogatu da baita ere. Izan ere, mikroskopio konfokalean begiratu ostean, gainjalkinean mintz edo nukleorik ikusten ez diren bitartean, jalkinean desegituratutako nukleoak eta mintzak antzeman daitezke. Gainera, zelula bizien irudiarekin (**Irudia 7, A**) alderatuta zelulen apurketa aproposa izan dela bermatzen da, apurketa ostean zelulak desegituratuta agertzen baitira. Hala ere, ezin da ziurtatu jalkinean ikusten diren mintz horiek zelula-mintzari dagozkiola, baina jalkina eta gainjalkinaren laginen bolumen konparagarriak aztertu ostean, eskramblasa, mintz plasmatikoko markatzailea, bakarrik jalkinean detektatzen da. Honek aditzera ematen du zentrifugazioaren ondorioz mintz plasmatikoa jalkinean hauspeatzen direla. Gainera, eskramblasaren seinalea batez ere lisatutako zelulen mintz plasmatikoa eta ez osorik egon daitezkeen zelulei dagozkiola esan daiteke, arestian aipatu den moduan, apurketaren eraginkortasuna %98.1-ekoa delako, eta hortaz zelula oso bat egoteko probabilitatea oso baxua delako. Dena den, ezin da baztertu mintz plasmatikoa gain zelula-barruko organuluaren mintzak egotea, izan ere, estimatzen da apurtutako zelula guztiak ez dituztela guztiz kanporatzen organulu guztiak. Beraz, **Irudia 6n** jalkinean jasotzen den Gag eta bestelako bitartekarien seinalea nagusiki mintz plasmatikoaekin elkarreagin duten poliproteina eta proteina-bitartekariena izango da. Berriz, gainjalkinean jasotzen den Gag eta bestelako bitartekarien seinalea polisomena eta irtetear dauden partikulen prozesamenduena izango da.

Gag poliproteinaren prozesamenduan eratzen diren bitartekarien artean, mintz plasmatikoa loturik mantendu daitezkeenak daude, horiek prozesatu gabeko Gag, matrix-capsid eta matrix dira. Hauek mintzeko kolesterolarekin duten elkarrekintza aztertu denean, zelula-mintzetan (jalkina) ikusi da nolabaiteko elkarrekintza (**Irudia 12**). Beraz, jalkinean behatutako erradioaktibitate seinalea MA proteinarekin elkarreagin duen mintz plasmatikoko fotokolesterolari dagokio. Hala ere, immunoprezipitatu gabeko laginean seinalea nabariagoa izateak adierazten du immunoprezipitazioa egin ostean ere, oraindik immunoprezipitatzeko proteina geratzen dela laginean. Horregatik, emaitzak hobetzeko asmoz, immunoprezipitazioa hobetu beharko litzateke. Gainjalkinean jasotako erradioaktibitate seinalea ateratzeko bidean dauden edo mintzera itsatsita geratu diren birusei dagokie. Izan ere, mintz plasmatikoa eta zelula barruko osagaiak ez direnez ultrazentrifugazioaren

bidez banatu, askatze-prozesuan dauden birus horiek gainjalkinean agertuko dira. Gainera, euren tamaina txikia dela eta, gainjalkinean egon arren, mikroskopio konfokalaren erresoluzioa ez da nahikoa birus-partikula hauek ikusteko.

Ezin da baztertu Gag proteinak mintzeko kolesterolarekin elkarrekintza edukitzea, izan ere, Gag poliproteina zailagoa da immunoprezipitate oligomerizatzeko duen gaitasuna dela eta. Baliteke ere elkarrekintzarik ez izatea, Gag mintzera doa modu espezifiko batean, izan ere, elkarrekintza elektrostatikoen bidez PI(4,5)P2 lipidoa dagoen gunetan lotzen da, mintzean txertatzeko ere bere baitan daraman miristoiloaz baliatzen da. Behin mintzera lotu dela, PI(4,5)P2-ren gantz azido asegabea bahitu egiten du, honela ingurune lipidiko zurrunagoa eratzen da eta, dirudenez, lipidobaltsen eraketa bultzatzen da. Germazioa aurrera doanean, poliproteinaren prozesaketa ematen da eta MA da mintzean txeratuta geratzen den proteina bakarra. Ez litzateke arraroa izango proteina txikiago eta aske batek ingurune lipidiko desberdina izatea proteina handiago eta mugimendu mugatua duenarekin alderatuta.

Birus mailako elkarrekintza aztertzeke geratu da, izan ere, arazoak egon dira irradiatzeko orduan, “input” deritzon laginean ez baita ohiko seinale erradioaktiborik antzematen.

*In vitro* egindako ikerketek aditzera eman dute mintz plasmatikoko kolesterola eta Gag poliproteinaren artean ez dela elkarrekintzarik sortzen. Ikerketek erakutsi dute Gag poliproteinak ez duela kolesterola lotzeko domeinurik<sup>[15]</sup>. Hori jakinik, espero daitekeen elkarrekintza gag/matrix-en mirisoiloa eta kolesterolaren artekoa liteke. Horrela, ikusi izan da MA mintzarekin dituen elkarrekintzak kolesterolaren menpekoak direla<sup>[1,18]</sup>.

Ikerketa honetan MA daramaten proteinak eta kolesterolaren arteko elkarrekintzak *in vivo* ikuspuntutik aztertu izan dira. Gure ikerketan lortutako emaitzetan ez dago kolesterolak Gag proteinarekin elkarrekintzak dituenaren seinalerik baina antzeman daiteke lipidoak MA domeinuarekin daukan elkarrekintza. Komenigarria izango litzateke esperimendu gehiago gauzatzea Gag poliproteina eta mintzeko kolesterolaren arteko elkarrekintza zehazteko, baita birioien testuinguruan elkarrekintza hau aztertzeke. Elkarrekintza hau ezagutzea lagungarri suerta baitaiteke birioien sorrera ekiditen duen farmakoen garapenean.



## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Barros, M., Heinrich, F., Datta, S., Rein, A. and Lösche, M. (2016). Membrane Binding of HIV-1 Matrix Protein: Dependence on Bilayer Composition and Protein Lipidation. *Biophysical Journal*, 110(3), p.577a.
2. Briggs, J. and Kräusslich, H. (2011). The Molecular Architecture of HIV. *Journal of Molecular Biology*, 410(4), pp.491-500.
3. Brugger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F. and Krausslich, H. (2006). The HIV lipidome: A raft with an unusual composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), pp.2641-2646.
4. Burton, D. (2006). Structural biology: Images from the surface of HIV. *Nature*, 441(7095), pp.817-818.
5. Chojnacki, J., Staudt, T., Glass, B., Bingen, P., Engelhardt, J., Anders, M., Schneider, J., Müller, B., Hell, S. and Krausslich, H. (2012). Maturation-Dependent HIV-1 Surface Protein Redistribution Revealed by Fluorescence Nanoscopy. *Science*, 338(6106), pp.524-528.
6. Cullen, B. (2014). HIV-1 Packing to Leave. *Cell*, 159(5), pp.975-976.
7. Dick, R. and Vogt, V. (2014). Membrane interaction of retroviral Gag proteins. *Front. Microbiol.*, 5.
8. Dick, R., Goh, S., Feigenson, G. and Vogt, V. (2012). HIV-1 Gag protein can sense the cholesterol and acyl chain environment in model membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46), pp.18761-18766.
9. Haberkant, P., Schmitt, O., Contreras, F., Thiele, C., Hanada, K., Sprong, H., Reinhard, C., Wieland, F. and Brugger, B. (2007). Protein-sphingolipid interactions within cellular membranes. *The Journal of Lipid Research*, 49(1), pp.251-262.
10. Hill, M., Tachedjian, G. and Mak, J. (2005). The Packaging and Maturation of the HIV-1 Pol Proteins. *Current HIV Research*, 3(1), pp.73-85.
11. Lingappa, J., Reed, J., Tanaka, M., Chutiraka, K. and Robinson, B. (2014). How HIV-1 Gag assembles in cells: Putting together pieces of the puzzle. *Virus Research*, 193, pp.89-107.
12. Lorizate, M. and Krausslich, H. (2011). Role of Lipids in Virus Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), pp.a004820-a004820.
13. Lorizate, M., Sachsenheimer, T., Glass, B., Habermann, A., Gerl, M. J., Kräusslich, H. G. eta Brügger, B. (2013) Comparative lipidomics analysis of HIV-1 particles and their producer cell membrane in different cell lines. *Cell Microbiol* 15: 292-304.
14. Maldonado, J., Martin, J., Mueller, J., Zhang, W. and Mansky, L. (2014). New insights into retroviral Gag-Gag and Gag-membrane interactions. *Front. Microbiol.*, 5.
15. Mariani, C., Desdouts, M., Favard, C., Benaroch, P. and Muriaux, D. (2014). Role of Gag and lipids during HIV-1 assembly in CD4+ T cells and macrophages. *Front. Microbiol.*, 5.
16. Mintzer, E., Waarts, B., Wilschut, J. and Bittman, R. (2001). Behavior of a photoactivatable analog of cholesterol, 6-photocholesterol, in model membranes. *FEBS Letters*, 510(3), pp.181-184.
17. Nkeze, J., Li, L., Benko, Z., Li, G. and Zhao, R. (2015). Molecular characterization of HIV-1 genome in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Biosci*, 5(1).
18. Olety, B. and Ono, A. (2014). Roles played by acidic lipids in HIV-1 Gag membrane binding. *Virus Research*, 193, pp.108-115.
19. Ono, A. (2010). Relationships between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly. *Biology of the Cell*, 102(6), pp.335-350.
20. Ono, A. and Freed, E. (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), pp.13925-13930.
21. Ono, A., Waheed, A. and Freed, E. (2007). Depletion of cellular cholesterol inhibits membrane binding and higher-order multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag. *Virology*, 360(1), pp.27-35.
22. Py, B., Basmaciogullari, S., Bouchet, J., Zarka, M., Moura, I., Benhamou, M., Monteiro, R., Hocini, H., Madrid, R. and Benichou, S. (2009). The Phospholipid Scramblases 1 and 4 Are Cellular Receptors for the Secretory Leukocyte Protease Inhibitor and Interact with CD4 at the Plasma Membrane. *PLoS ONE*, 4(3), p.e5006.
23. Resh, MD. (2005). Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles. *AIDS Reviews*, 7(2), pp. 84-91.
24. Tcf.epfl.ch. (2016). *HIV / TCF*. [online] Available at: <http://tcf.epfl.ch/page-20833-en.html> [Accessed 27 Jun. 2016].
25. Tedbury, P. and Freed, E. (2015). HIV-1 Gag: An Emerging Target for Antiretroviral Therapy. *The Future of HIV-1 Therapeutics*, pp.171-201.
26. World Health Organization. (2016). *HIV/AIDS*. [online] Available at: <http://www.who.int/features/qa/71/en/> [Accessed 27 Jun. 2016].
27. Xia, Y. and Peng, L. (2013). Photoactivatable Lipid Probes for Studying Biomembranes by Photoaffinity Labeling. *Chemical Reviews*, 113(10), pp.7880-7929.
28. Yandrapalli, N., Muriaux, D. and Favard, C. (2014). Lipid domains in HIV-1 assembly. *Front. Microbiol.*, 5.

\*Lanaren luzera murriztua dela eta, ezin izan dira erabilitako erreferentzia bibliografiko guztiak bertan jaso.