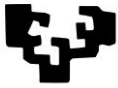
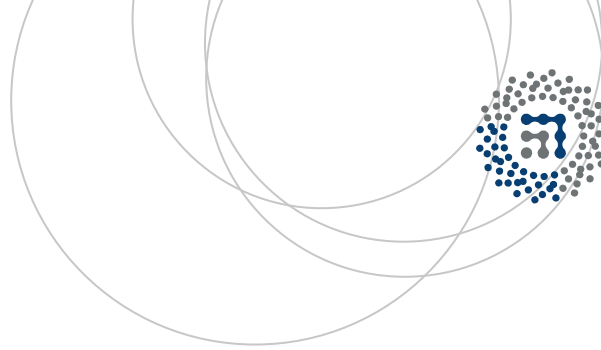


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana  
Biokimikako eta Biologia Mokularreko Gradua

# GIB-1 birusaren env fusio proteinaren ingurune lipidikoaren azterketa

Egilea:  
Irati Odriozola Lerchundi

Zuzendaria:  
Maier Lorizate Nogales

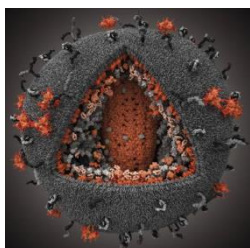
# Aurkibidea

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Sarrera</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>2. Helburuak</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>3. Materialak eta metodoak</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>3.1. Kultibo zelularrak eta birus purifikazioa</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>3.2. Lipido fotoaktibagarri eta proteinen arteko elkarrekintzen behaketa</b> .....              | <b>6</b>  |
| 3.2.1. Lipido fotoaktibagarri erradiaktiboen gaineratzea .....                                     | 6         |
| 3.2.2. Immunoprezipitazioa .....   | 7         |
| 3.2.3. Western blot (WB) erdi-lehorra .....  | 7         |
| <b>4. Emaitzak</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>4.1. Metodoaren funtzionaltasun-frogapena</b> .....   | <b>8</b>  |
| 4.1.1. Lipidoen inkubazio denboraren finkapena .....   | 8         |
| 4.1.2. Cav-1 eta TfR kontrolak .....   | 9         |
| <b>4.2. Env-lipido arteko elkarrekintzen azterketa zelula mailan</b> .....                         | <b>10</b> |
| <b>4.3. Env-lipido arteko elkarrekintzen azterketa birus mailan</b> .....                          | <b>10</b> |
| 4.3.1. Birioien karakterizazioa .....  | 10        |
| 4.3.2. Lipido eta proteinen arteko elkarrekintzak .....  | 11        |
| 4.3.3. Purifikatutako birusaren kuantifikazioa eta lipidoen baneraketa zelula eta birioietan ..... | 11        |
| <b>5. Eztatbaida</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>6. Bibliografia</b> .....   | <b>15</b> |

## 1. Sarrera

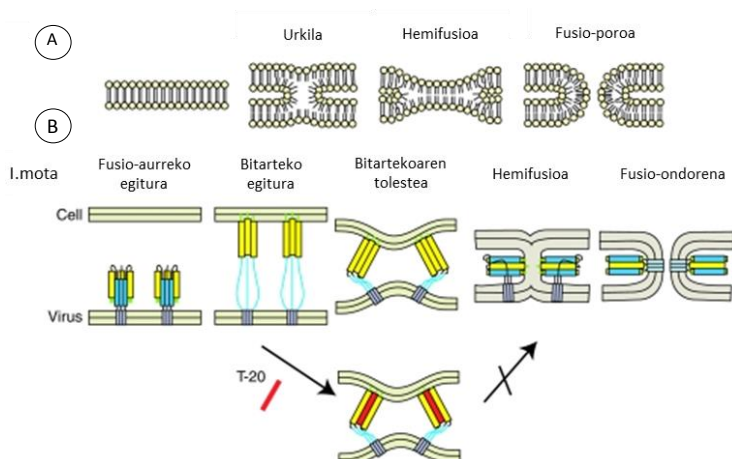
Giza Immunoeskasiaren Birusa (GIB-a) HIES-aren erretrivirus eragilea da, sistema immunearen infekzio kronikoa sortarazten baitu. 1980. urte aldera aditzera eman zenetik oraindino, 30 milioi heriotza baino gehiagoren kausa izan da, eta egun, munduan, 34 milioi pertsona inguru daude GIB-arekin kutsatuta <sup>[1]</sup>. Oraindik, ordea, ez da sendagai edo txerto eraginkorrik aurkitu. Hala ere, birusa identifikatu zenetik, aurrerapen esanguratsuak egin dira arlo biologiko eta patologikoan, eta honek, birusaren propagazioa behintzat kontrolarazten duten terapia berrien aurkikuntza ekarri du, gaixotasuna kronikoa bihurtaraziz. Normalean, farmako antiretrobiralak terapia konbinatu moduan erabiltzen dira (HAART; ingelesez, *highly active antiretroviral therapy*) eta patologia- eta heriotza-tasen jaitsiera ekarri dute. Dena den, atxikipen terapeutikoa, tolerantzia eta luzarorako toxikotasuna, beraien erabilpenaren muga nagusi izaten darraite. Horrez gain, birusaren mutazio-ratioa altua da ( $10^{-4} - 10^{-5}$  mutazio nukleotidoko eta erreplikazio ziklo bakoitzeko) eta errekonbinazio maiztasun altua agertzen du. GIB-ari aurre egitea, beraz, ez da lan erraza, eta ikertalde ugari dira arlo honetan ekarpenak egiteko asmoz dihardutenak.

GIB-1-a estalki lipidiko batez inguratutako dago, eta bertan, zelula ostalaria ezagutu eta infektatzeaz arduratzen diren arantze proteinak (env) aurkitzen dira. Glikoproteina hauek gp160 prekursorre moduan sintetizatzen dira, eta prozesamendu proteolitikoaren ondoren, gp120 azpi-unitate solugarriak eta gp41 transmintz azpi-unitateak, heterodimeroen homotrimerokoak eratzen dituzte (*1. Irudia*).



1. Irudia. GIB birusa. 120 nm inguruko birus esferikoa da. Harizpi bakarreko bi +RNA kopia ditu eta bertan 9 gene daude kodetuta. Horietako hiruk (*gag*, *pol* eta *env*) partikula berrien proteina estrukturalak adierazten dituzte. Gainerakoak (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*) gene erregulatuak dira. Laranja, birusaren beraren proteinak, eta grisez, ostalaritik datozkionak. <sup>[2]</sup>

Birusak ostalaria ezagutzen duenean, gp120-a CD4 hartzailera eta CXCR4 edo CCR5 koerrezeptoreetara lotzen da. Honek, gp41-aren konformazio aldaketa bultzatu eta egoera aktibora darama, birusaren eta zelularen mintzen arteko fusioa eragiten duelarik <sup>[3]</sup>. Gp41-aren funtzio fusogenikoa honako elementuetan oinarritzen da: batetik, birusarentzat izatez energetikoki desfavoragarria den kurbadura aldaketa ahalbidetzen duten fusio peptidoan (FP) eta mintzaren ondoko kanpo sekuentzian (MPER; ingelesez *membrane proximal external region*). Sekuentzia hauek ostalariaren eta birusaren mintza desegonkortzen dute, hurrenez hurren. Bestetik, bi gune helikoidal anfipatikoetan (HR1 eta HR2) oinarritzen da. Sekuentzia hauek, energetikoki egonkorra den eta estruktura kristalino ezaguna duen urkila-egitura



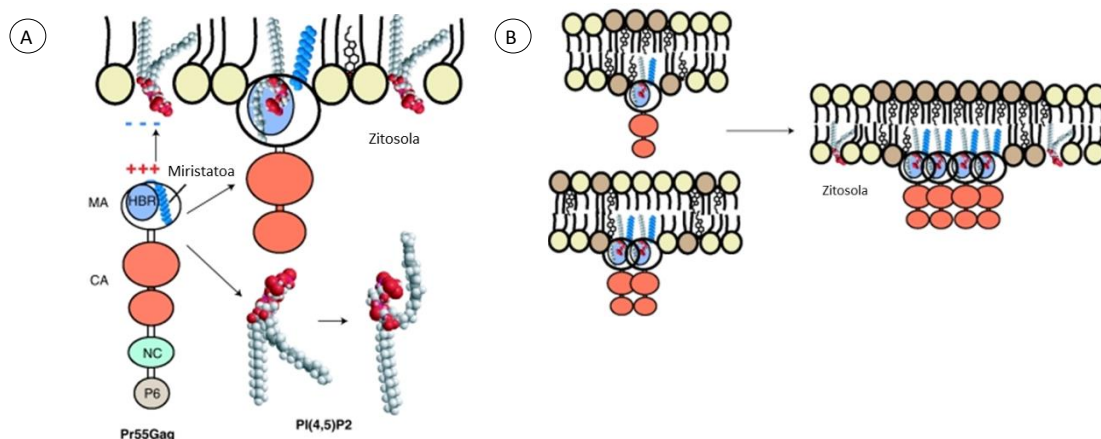
**2.Irudia. Mintzen arteko fusioa.** A) Urkilaren mekanismoa mintz lipidikoaren fusioan. B) I.motako fusio proteinek sustatutako fusio-modeloa. Beheko irudiak, T-20-aren inhibizio mekanismoa adierazten du, molekula hau zuzenean bitarteko egiturara lotu, eta aurre-urkila egituratik urkila egiturarako trantsizioa oztopatzen duelarik. [4]

erazten dute, eta honek, birusaren eta ostalariaren mintzak elkarrengandik getu geratzea dakar (2.Irudia) [4]. Baina horrez gain, bada fusioan inplizituki agertzen den beste parte hartzaile garrantzitsu bat ere: ostalariaren eta birusaren mintz lipidikoa. Ildo honi jarraituz, birusaren mintzaren osagai nagusienetako bat kolesterola da, eta MPER domeinuan dagoen CRAC motiboarekin elkar eragiten duela postulatu da. Sekuentzia kontsentsu honetan mutazioak eraginez gero, birusa hemifusio egoeran blokeatuta gelditzen dela ikusi da [5]. Infektatutako zeluletatik kolesterola kenduz, berriz, GIB-aren infekzio eta erreplikazio tasak gutxitzen dira [6]. Mintz lipidikoaren estrukturak ere eragin zuzena du birusaren eta zelularen arteko fusioan. Kurbadura aldarazten duten lipidoak txertatuz gero, birusaren infekzio-gaitasuna modulatu daiteke. RAFI deritzen fusio inhibitzaile sintetikoek, esaterako, printzipio honetan oinarrituz, birusaren kurbadura positiboa sustatzen dute fusioa gauzatzeko gainditu behar den energia eskakizuna emendatuz [4].

Jakina da, beraz, mintzaren konposaketa lipidikoak eragin zuzena duela fusioan, baina beraien garrantzia haratago doa; lipidoek ziklo birikoaren fase desberdinetan parte hartze guztiz aktiboa dutela esan daiteke.

GIB-1-ak bere estalki lipidikoa infektatutako zelula ostalariaren mintz plasmatikotik eskuratzen du gemazioz, eta birusaren askapena ematen den mintzaren ingurune horrek *raft* motako ezaugarriak dituela dirudi [4]. *Raft* lipidoak mintzeko mikrodomeinu dinamikoak dira, eta kolesterol, esfingolipido eta saturaturiko glizerofosfolipidoetan aberastuta daude,  $l_o$  deritzon likido-fase ordenatu egitura dutelarik [7]. Mintz biralak ere egoera berdina agertzen du. Gainera, *raft*-ekin erlazionatutako proteinak aurkitu izan dira, eta Gag, *raft*-eko markatzaile hauen kokalekuarekin bat etorri izan da [8]. Hortaz, pentsatzen da GIB-1-a mintz plasmatikoko *raft* mikrodomeinuetatik sortzen dela. Dena den, zelularen eta birusaren mintzen konposaketan desberdintasunak aurkitu izan dira kanpo zein barne geruzan, eta honek, birusean nolabaiteko ordenamendua ematen dela adierazten du. Birusaren mintz lipidikoa

masa espektrometria bidez kuantifikatu ondoren, esfingolipidoetan (% 19), kolesterolan (% 45) eta gantz azido aseetan aberatsa dela ikusi zuten [9]. Gag proteinak birusaren morfogenesia zuzentzen duela kontuan harturik, estalkia eratuko duten mikrodomeinuak ere berak hautatzen dituela, edota bere oligomerizazio prozesuan mikrodomeinu horien eraketa induitzen duela uste da [8]. Beraz, neurri batean, GIB-1-ek bere ingurune lipidiko espezifikoa aukeratzen duela pentsa liteke.



**3.Irudia. A) Gag-ren asoziazio eta garraioa mintzera.** GIB-1-en morfogenesia, Gag poliproteina biralak zuzentzen du, zeina infektatutako zelularen mintz plasmaticoan txertatzen den. Garraio hau, Gag poliproteinaren amino muturreko matrix (MA) proteinan aurkitzen den gune oso basiko batek (HBR; ingelesetik *highly basic region*) bideratzen duela dirudi. Positiboki kargatutako domeinu honek, karga negatibodun mintzeko fosfolipidoekin elkar eragiten du, fosfatidil inositol (4,5) bisfosfatoarekin (PI(4,5)P2) bereziki. Elkarrekintza honek, Gag-ek ezkutuan mantendutako azido miristikoaren aurkezpena aktibatzen du proteina bertan ainguratuta gelditzen delarik. Eredu honen arabera, mintzeko gantz ez-saturatu bat, saturaturiko azido miristikoagatik ordezkatu litzateke. Horrela, iradoki izan den bezala, birusaren askapena ematen den mintzaren inguruneak raft motako ezaugarriak hartuko litzuzke. B) Gag-en elkartzea mintzeko raft lipidoetan.<sup>[4]</sup>

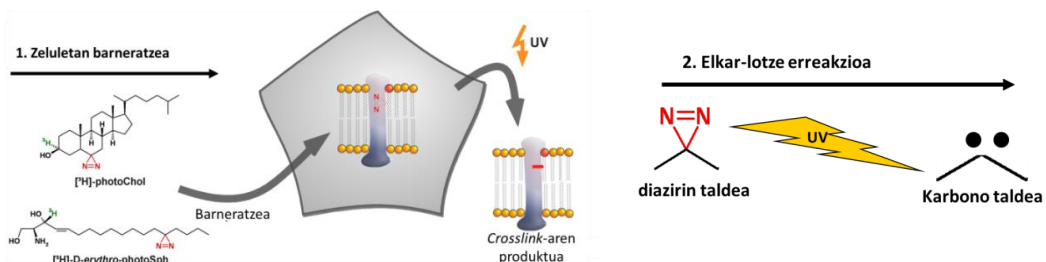
Lipidoek zeresan ugari duten beste arlo bat antigorputzeta da. GIB-1-en kontrako txertoen ikerketan gp41-aren aurka erabiltzen diren antigorputzik ohikoenak (adib. 2F5, 4E10), fusio proteinaren MPER domeinuko epitopoetara zuzentzen dira. Epitopo hauek mintzean baneraturata edo gertutasunean daude, eta espektro zabaleko antigorputz neutralizatzaileen funtzioa, horiek ezagutu eta MPER-ren aktibitatea inhibitzea litzateke, horrela fusioa gertatzea eragotziz [10]. Baina, jakina da proteina baten ingurune lipidikoak bere egitura eta funtzioa erregula ditzakeela. Are gehiago, ikerketa batean, mintzeko esfingolipido konkretu batek proteina baten transmintz domeinuarekin espezifikoki elkar eragiten zuela erakutsi zuten, eta lipido honek proteinaren egoera inaktibotik aktiborako trantsizioa erregulatu zezakeela proposatu zuten. Gainera, transmintz domeinu honek, ugaztunen beste hainbat transmintz proteinetan kontserbatuta dagoen sekuentzia bat agertzen zuen, zeinak esfingolipidoak lotzeko gunea eratzen duen [11]. Hori dela eta, ez da harrizkoa mintzaren konposaketa lipidikoaren baitan gp41 proteinak epitopo desberdinak agerrarazi eta antigorputz

neutralizatzaileen funtzioan aldaketak eman daitezkeela pentsatzea. Baina, azken finean, gp41-arekin elkar eragiten duten lipidoak zein diren determinatuz gero, antigorputz neutralizatzaileak ekoizteko gai den immunogeno bat garatu ahal izango litzateke. Gainera, lipido-proteina elkarrekintza espezifiko honen ondorioz proteinaren funtzioa aldaraziko balitz, elkarrekintza hau inhibitzeko lipidoak edota lipido hauek mimetizatzen dituztenak sintetiza litezke molekula antibiral gisa.

Aipaturiko guztiaz gain, lipidoek GIB-1-aren patogenesisian funtsezko zeregina dutenaren ideia are gehiago sendotu du azken aurkikuntzetariko batek: zelula dendritiko helduek, birioiaren estalkian aurkitzen diren gangliosidoen sialil laktosa molekulak ezagutu eta horien bitartez birusa harrapatzeko gaitasuna dutela azaldu dute <sup>[12]</sup>.

Laburbilduz, bistakoa da, lipidoek zeresan handia dutela GIB-aren infekzioan. Mintzaren konposaketa eta egituraketaren manipulazioak, eragina du birusaren infekzio gaitasun eta ekoizpenean, eta birusaren immunogenizitatea determinatzen du. Hori dela eta, birus eta zelulen ingurune lipidikoaren ikerketa interes bereziko da.

Ildo horri jarraituz, ikerketa proiektu honetan env proteinaren gp41 azpi-unitateak lipidoekin (kolesterol eta esfingolipidoekin) elkarrekintzarik agertzen ote duen aztertu nahi izan da, horretarako, nahiko berria den metodologia bat erabili delarik. Metodologia hau erradiaktiboki markaturiko lipido fotoaktibagarrien erabilpenean oinarritzen da (*4.Irudia*) <sup>[11][13]</sup>. Hauek argi ultramorearekin ( $\lambda = 360$  nm) irradiatu ondoren, *in vivo*, beraiengandik 3 Å baino gutxiagoko distantziara aurkitzen den edozein molekularekin lotura kobalente bat eratzeko gai dira. Gainera, talde fotoaktibagarri hauek txikiak eta oso erreaktiboak izatearen abantaila dute, aldi berean, lipidoen ezaugarri biofisikoen alteraziorik ez dakartelarik. Ezaugarri hauek guztiak direla eta, mintz lipidikoaren ingurunea aztertzeke material arrakastatsutzat har daitezke. Beraz, lipido fotoaktibagarriak erabiliz, gp41-ak hauekin elkarrekintzarik agertuko balu, bien artean lotura kobalentea sortuko litzateke, eta erradiaktibitate bidez seinalea detektatzeko aukera izango genuke. Ikerketaren helburua metodologia honekin aurrera eramanez, gp41 eta bi lipido moten artean elkarrekintzak daudela ikusi da bai birus zein zelula mailan.



**4.Irudia. Lipido fotoaktibagarrien funtzionamendua.** Lipido erradiaktiboak zeluletan barneratu eta argi ultramoreaz irradiatzean, diazirin taldearen elektroiak desperekatu egiten dira, eta molekula, forma oso erreaktiboan gelditzen da, inguruan daukan edozein molekularekin lotura kobalenteak eratzeko gai delarik <sup>[11][13]</sup>.

## **2. Helburuak**

GIB-1-aren estalki lipidikoan gp41 (env) fusio proteina aurkitzen da. Transmintz proteina honen ingurune lipidikoak eginkizun garrantzitsuak burutu ditzake aipaturiko proteina horren erregulazioan; proteinaren egituran, eta hortaz, funtzioan eragin baitezake. Baina, ingurune lipidiko hau ez da ezagutzen, ordea. Hori dela eta, 3 Å-eko distantzia baino laburragora aurkitzen den edozein molekularekin lotura kobalenteak eratzeko gai diren kolesterol eta esfingosina lipido erradiaktiboak erabiliz, helburua, zelula eta birus mailan fusio proteina honen ingurune lipidikoa *in vivo* aztertzea da.

## **3. Materialak eta metodoak**

### **3.1. Kultibo zelularrak eta birus purifikazioa**

HEK293T zelulak glutaminadun, % 10 FCS eta antibiotikodun DMEM medioan hazi ziren hezetasuneko ingurunean, % 5 CO<sub>2</sub>-rekin eta 37 °C-tan inkubatuz.

Ikerkuntza-proiektu honetan erabili ziren plasmidoak honako hauek izan ziren: pCHIV (528) plasmido probirala <sup>[14]</sup> eta kabeolina-1 kodetzen duen Cav-1-GFP plasmidoa <sup>[15]</sup>.

Birus purifikazioan hurrengo erreferentzian egindakoa jarraitu zen <sup>[16]</sup>. Laburki, HEK293T zelulak pCHIV (528) plasmidoaz transfektatuak izan ziren kaltzio fosfatoaren metodoa jarraituz <sup>[8]</sup>. Transfektatu eta 6 ordura medio aldaketa burutu ondoren, birusen produkzioa 24 ordu bitartekoa izan zen. Birusak askatzen ari ziren zelulen gain-jalkina jaso, eta ultrazentrifugazioz % 20 kontzentraziodun sakarosa koltxoiaren bidez purifikatu ziren. Ultrazentrifugazioa honako baldintzetan egin zen: 4 °C-tan, 28000 rpm-tan, 2 orduz eta TST 41.14 kontron errotore kulunkaria erabiliz. Zentrifugazioaren ondoren, jalkinak NaCl 150 mM, Hepes 10 mM pH 7,4 soluzio indargetzailean berresegi eta -80 °C-tan gorde ziren. Birusen karakterizazioa zilar tindaketaren bidez eta western blot kuantitatiboaren bidez egin zen (gero azalduta).

### **3.2. Lipido fotoaktibagarri eta proteinen arteko elkarrekintzen behaketa:**

#### **3.2.1. Lipido fotoaktibagarri erradiaktiboen gaineratzea**

6 putzuetako plaketan ereindako ( $5 \times 10^5$  zelula/putzuko) HEK293T zelulak dagozkien plasmidoaz transfektatu eta medio aldaketa egin eta gero, putzuko 10 µCi lipido fotoaktibagarri gaineratu zitzaizkien lipidorik gabeko FCS-a zeraman DMEM medioarekin batera, 18 edota 23 ordutara (esperimentuaren arabera). Transferrina errezeptorearen kasuan proteina endogenoaren elkarrekintza aztertu zenez, lipidoa zuzenean gaineratu zen.

Transfekzioetik 26-48 ordu bitartean medioa kendu, zelulak garbitu eta proteasa inhibitzaileak zeramatzen PBS indargetzailea gaineratu zitzairen. Zelula hauetako batzuk izarniadura kontagailuan erabili ziren, barneratu zuten lipido portzentajea neurtzeko. Gainerakoak, argi ultramoreaz ( $\lambda=360$  nm) irradiatu ziren 20 minutuz 4 °C-tan.

Birioiak, berriz, zelulek askatutako gain-jalkinetik eskuratu ziren. Gain-jalkina petri batera transferitu ondoren, argi ultramoreaz ( $\lambda=360$  nm) 20 minutuz 4 °C-tan irradiatu ondoren, % 20 kontzentraziodun sakarosa koltxoaren bidez purifikatu ziren (aurrez azaldutako moduan).

### 3.2.2. Immunoprezipitazioa

Irradiatutako zelulak plakatik jasotzeko, espatularen laguntzaz altxatu ziren eta 5000 rpm-tan 2 minutuz zentrifugatu ziren 4 °C-tan. Eskuraturiko jalkinak, proteasa inhibitzaileak zeramatzen apurketa indargetzailean (80 mM Hepes, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, % 0,5 DOC (sodio deoxikolatoa), % 1 Tritonia X-100) berresegi eta -80 °C-tan gorde ziren.

Zelulak apurtu ondoren laginak 13000 rpm-tan 5 minutuz eta 4 °C-tan zentrifugatu ziren. Gain-jalkinetik, *input*-a kontsideratzen denaren 10  $\mu$ L gorde ziren -80 °C-tan. Purifikatutako birioiei zegozkien *input* batzuk birus karakterizazioaren zilar tindaketarako, izarniadura kontagailu bidez birioietan barneratutako lipido kopurua neurtzeko eta purifikatutako birioi kopurua kuantifikatzeko erabili ziren. Gainerako gain-jalkina, immunoprezipitazioa egiteko erabili zen. Kabeolina immunoprezipitatzeko, 40  $\mu$ L G proteinadun sefarosaren bolatxoak erabili ziren ahuntza  $\alpha$ - GFP (abcam) 6  $\mu$ L antigorputzekin batera. Transferrina errezeptorearentzat, berriz, 10  $\mu$ L sagua  $\alpha$ -TfR (invitrogen) antigorputzekin akoplatutako 40  $\mu$ L G proteinadun sefarosaren bolatxoak erabili ziren. Env proteina immunoprezipitatzeko, sagua  $\alpha$ -env (chessie8 NIH Aids reagent program) antigorputzaren 5  $\mu$ L-rekin kobalentez akoplatutako 20  $\mu$ L G proteinadun sefarosa bolatxoak erabili ziren. Kasu guztietan inkubazioa gau osoan zehar 4 °C-tan eta mugimenduan egin zen.

### 3.2.3. Western blot (WB) erdi-lehorra

Inkubazioaren ondoren, laginak 6500 rpm-tan 5 minutuz eta 4 °C-tan zentrifugatu ziren, immunoprezipitatu gabeko proteina gain-jalkinean eta immunoprezipitaturikoa jalkinean eskuratu zirelarik. Lagin hauek eta *input*-ak,  $\beta$ -merkaptolanolarekin nahastu eta 95 °C-tan inkubatu ondoren, proteinak %12,5 SDS-PAGE bidez banatu ziren (60 V-tan, laginek gel-kontzentratzailea zeharkatu arte eta 180 V-tan, frontea gelaren bukaeraraino heldu arte. Erabilitako markatzailea *Precision Plus Protein All Blue Standards* izan zen). Proteinak geletik metanolarekin aktibatutako nitrozululosazko mintzera transferitu ziren transferentzia-



kasetearen bidez, 15 V-ko korrontearekin 45 minututan. Ordu betez, mintzak blokeatu ziren Odyssey Blocking Buffer-arekin (OBB) giro tenperaturan eta mugimenduan. Gero, OBB-an diluitutako antigorputz primarioarekin inkubatu ziren mintzak (4 °C-tan gau osoan zehar mugimenduan), eta TBST-arekin hiru garbiketa egin ostean, %1 Tween20 eta OBB-an diluitutako antigorputz sekundarioarekin inkubatu ziren (ordu betez giro tenperaturan eta mugimenduan). Garbiketen ostean Li-Cor edo peroxidasaren metodoaren (Pierce-n kit-a erabiliz) bidez errebelatu ziren mintzak, eta mintz berbereko <sup>3</sup>H-ren erradiaktibitatea β-imager (Biospace) bidez neurtu zen.

**1.Taula. Western blot erdi lehorrean erabilitako antigorputzak.** Cav-1: kabeolina-1; TfR: transferrina hartzailea; Env: envelope; CA: kapsida

| Esperimentua              | Antigorputzak    | Antigenoa         | Ostalaria | Diluzioa        | Etxe komertziala         |
|---------------------------|------------------|-------------------|-----------|-----------------|--------------------------|
| Cav-1 kontrola            | Ag1 <sup>o</sup> | Cav-1             | Untxia    | 1:1000          | Santa Cruz               |
|                           | Ag2 <sup>o</sup> | Untxia: IRDye 680 | Astoa     | 1:10000         | Li-Cor                   |
| TfR kontrola              | Ag1 <sup>o</sup> | TfR               | Sagua     | 1:500           | Invitrogen               |
|                           | Ag2 <sup>o</sup> | Sagua: IRDye 800  | Astoa     | 1:10000         | Li-Cor                   |
| Env-lipido elkarrekintzak | Ag1 <sup>o</sup> | Env (ch8)         | Sagua     | 1:1000          | NIH AIDS reagent program |
|                           | Ag2 <sup>o</sup> | Sagua: IRDye 800  | Astoa     | 1:10000         | Li-Cor                   |
|                           |                  | Sagua: HRP        | Zaldia    | 1:4000 / 1:5000 | Cell signaling           |
| CA estandarra             | Ag1 <sup>o</sup> | CA                | Ardia     | 1:3000          | NIH AIDS reagent program |
|                           | Ag2 <sup>o</sup> | Ardia: IRDye 800  | Astoa     | 1:10000         | Rockland                 |

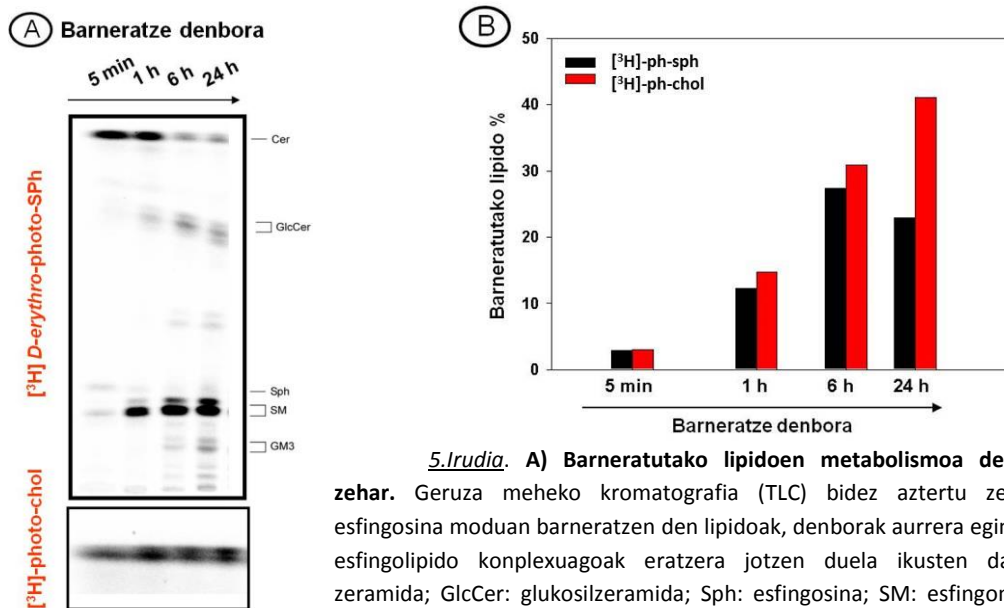
## 4. Emaitzak

*Emaitzak azaltzeko erabilitako laburdurak.* M: markatzailea; IP: immunoprezipitatu; [<sup>3</sup>H]-ph-chol: tritio bidez markatutako foto-kolesterola; [<sup>3</sup>H]-ph-sph: tritio bidez markatutako foto-esfingosina; Cav-1: kabeolina-1; Cav-1 GFP: proteina fluoreszente berdea akoplatua duen kabeolina-1; TfR: transferrina hartzailea. SPV: sakarosa bidez purifikatutako birusak (ingelesezik *Sucrose Pelleted Virus*); CA: kapsida; MA: matrix; I.I: intentsitate integratua; DE: desbideratze estandarra; G1: immunoprezipitazioko lehen garbiketarik eskuratutako gain-jalkina.

### 4.1. Metodoaren funtzionaltasun-frogapena

#### 4.1.1. Lipidoen inkubazio denboraren finkapena

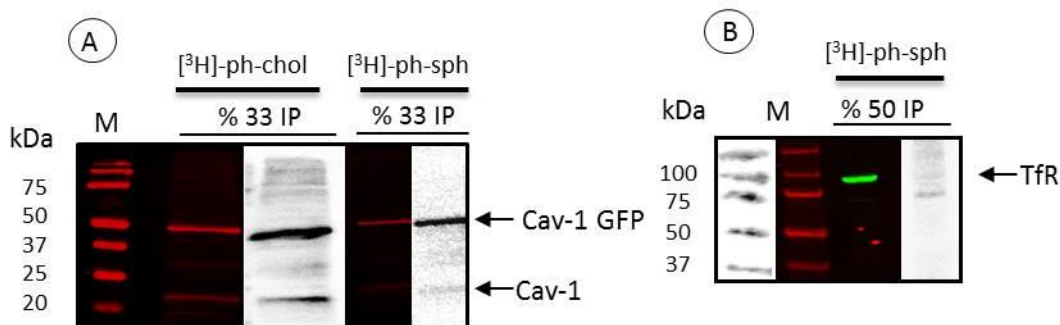
Ikerketaren helburu nagusia gp41 proteinak kolesterolarekin eta esfingolipidoekin dituen elkarrekintzak aztertzea izanik eta lortutako emaitzak konparagarriak izan daitezen, komenigarria zen esperimendu biak aldi berean burutzea. Lipidoek zeluletan duten barneratze maximoaren denbora-tarteak desberdinak dira, ordea. Are gehiago, kolesterola behin barneratuta ez da metabolizatzen, baina esfingosinak lipido konplexuagoak eratzeraz jotzen du (*5A.Irudia*). Hori dela eta, bi lipido hauen arteko oreka lortu eta esperimenduko orduak zehazterakoan, bibliografiako eta aurretik taldeak egindako esperimendutik lortutako datuez baliatu zen (*5B.Irudia*). Zelulak lipidoekin 8 orduz inkubatzea erabaki zen.



**5. Irudia.** A) Barneratutako lipidoen metabolismoaren denboran zehar. Geruza meheko kromatografia (TLC) bidez aztertu zen, eta esfingosina moduan barneratzen den lipidoak, denborak aurrera egin ahala, esfingolipido konplexuagoak eratzen jotzen duela ikusten da. Cer: zeramida; GlcCer: glukosilzeramida; Sph: esfingosina; SM: esfingomielina; GM3: monosialodihexosilgangliosida B) Zelulek barneratutako lipido portzentajea berauekin denbora desberdinetan inkubatu ondoren. Aztertutako denbora-tartearen arabera, esfingosinak barneratze maximoa 6 h-ren inguruan agertzen du; kolesterolak, berriz, 24 h-ren inguruan.

#### 4.1.2. Cav-1 eta TfR kontrolak

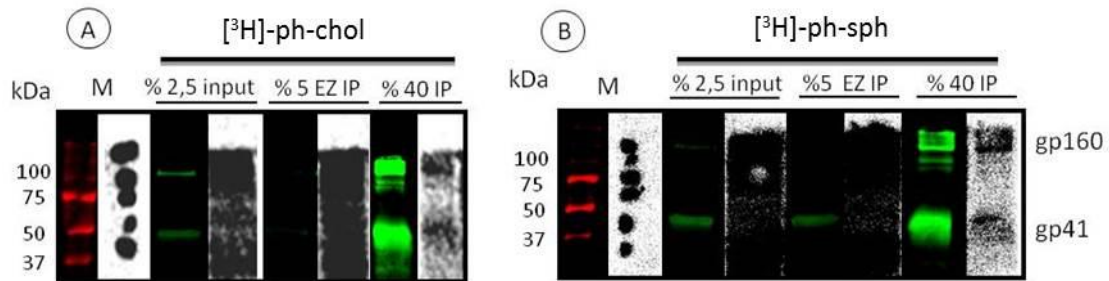
Ikerketa honetan erabilitako metodoaren funtzionaltasuna ziurtatzeko kabeolina-1 eta transferrina hartzaileen ingurune lipidikoa aztertu zen (6. Irudia). Gaur egun erabiltzen den raft motako ingurune lipidikoetan aurkitzen den proteina modeloa kabeolina da, eta kontrako egoerarena transferrinaren hartzailea. Hortaz, Cav-1-GFP proteinak kolesterol zein esfingolipidoekin elkar eragiten duela aztertu zen, 50 kDa inguruko masa molekularra agertzen duelarik. Adierazgarria da zelulen Cav-1 proteina endogenoak ere elkarrekintzak adierazten dituela, 22 kDa-eko masa molekularra duelarik. Kabeolak eratzekoan bi proteinen (transfektatutako Cav-1 GFP-ren eta Cav-1 endogenoaren) oligomerizazio egonkorra ematen dela da honen arrazoia. Transferrinaren kasuan, aldiz, WB bidez proteina dagoela detektatzen da (90 kDa inguruan), baina, ez da ikusten elkarrekintzarik esfingolipidoekin. Hori dela eta, emaitza hauek kontrol positibo eta negatibotzat hartzen dira, bibliografiako datuekin bat datozelarik<sup>[17]</sup>.



**6. Irudia.** Transfektatutako Cav-1 proteinaren (A irudia) eta TfR proteina endogenoaren (B irudia) elkarrekintzak kolesterol eta esfingolipidoekin. Li-Cor bidez errebelatua eta erradiaktibitatea  $\beta$ -imager bidez neurtua.

## 4.2. Env-lipido arteko elkarrekintzen azterketa zelula mailan

Gp41-ak kolesterol eta esfingolipidoekin zelula mailan elkar eragiten ote duen aztertzeko HEK293T zelulak plasmido probiralaz (pCHIV 528) transfektatu ziren. Eginiko esperimenteruek, elkarrekintza hauen presentzia dagoela erakusten dute, alabaina, ondoko irudietan (7.Irudia), gp41 proteinak, aztergai diren lipidoekin elkar eragiten duela ikusten da. Izan ere, kolesterol zein esfingosina lipidoekin inkubatutako zeluletan gp41-ari dagokion banda detektatzen da WB bidez, eta aldi berean, erradiaktibitate bidez ere tamaina horiei dagokien seinalea behatzen da. Horretaz gain, gelaren goialdean ere seinale nabarmena bereizten da, eta markatzaileaz baliatuz, gp160 proteina prekurtsoreari dagokiola ondorioztatzen da, proteina honek chesi 8 antigorputzaren epitopoa baitauka. Hortaz, western blot zein  $\beta$ -imager-ean ikusten da.

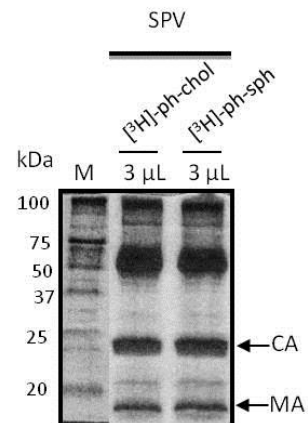


**7.Irudia.** Gp41-aren elkarrekintzak zelula mailan kolesterol (A irudia) eta esfingolipidoekin (B irudia). Zelulak tritio bidez markatutako lipido erradiaktiboekin inkubatu eta handik 8h-ra aldatu zen medioa. Li-Cor bidez errebelatua eta erradiaktibitatea  $\beta$ -imager bidez neurtua.

## 4.3. Env-lipido arteko elkarrekintzen azterketa birus mailan

### 4.3.1. Birioien karakterizazioa

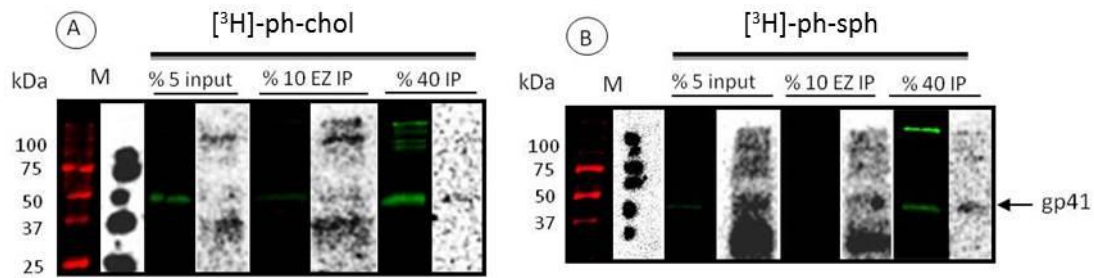
Esan bezala, HEK293T zelulen transfekzioa pCHIV 528 plasmidoarekin burutu eta gero birus produkzioa ondo joan zela ziurtatzeko, birioi purifikatuen *input*-ak aztertu ziren zilar tindaketaren bitartez (8.Irudia). Irudian, patroi biralaren presentzia adierazten duten bi banda nabarmen agertzen dira. Seinale hauek birusaren kapsida (24 kDa-etan) eta matrix (17 kDa-etan) proteina estrukturaleri dagozkie. Transfekzioa, eta beraz, birus produkzioa, arrakastatsua izan zela baieztatzen da.



**8.Irudia.** Purifikatutako birusen zilar tindaketak patroi biralaren presentzia detektatzeko. Lipidoak gehitu eta 8h-ra egin zen medio aldaketa.

#### 4.3.2. Lipido eta proteinaren arteko elkarrekintzak

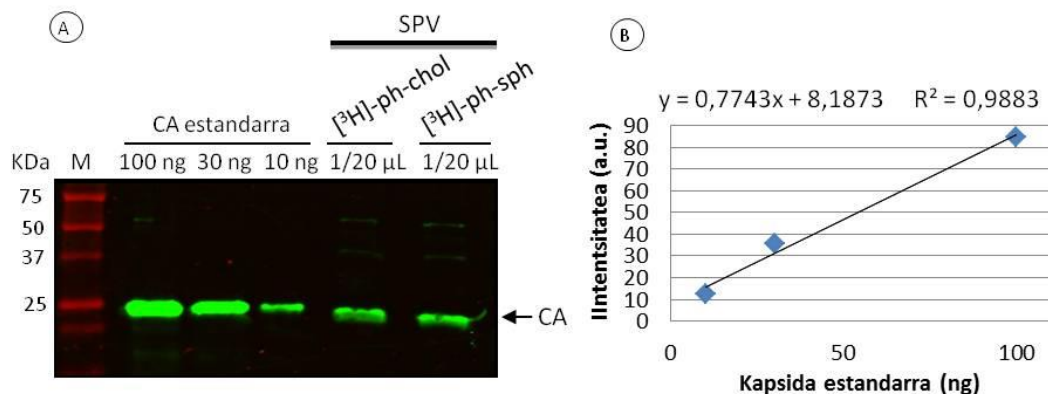
Gp41-ak kolesterol eta esfingolipidoekin birioi mailan elkar eragiten ote duen aztertzeko eginiko esperimentuetatik lortutako emaitzetan (*9.Irudia*), gp41 proteinaren presentzia detektatzen da WB bidez 41 kDa-en inguruan; eta erradiaktibitatean ere seinalea dagoela ikus daiteke. Hemen aurkezten diren irudietan oso banda adierazgarriak ikusten ez badira ere,  $\beta$ -imager-a zuzenean begiratuta, proteina honen eta aztergai izan diren lipidoen artean elkarrekintzak daudela ondorioztatzeko adina seinale agertzen zen.



*9.Irudia.* Gp41-aren elkarrekintzak birioi mailan kolesterol (A irudia) eta esfingolipidoekin (B irudia). Zelulak tritio bidez markatutako lipido erradiaktiboekin inkubatu eta handik 8h-ra aldatu zen medioa. Li-Cor bidez errebelatua eta erradiaktibitatea  $\beta$ -imager bidez neurtua.

#### 4.3.3. Purifikatutako birusaren kuantifikazioa eta lipidoen barneraketa zelula eta birioietan

Aurrez aipatu diren emaitzen esanguratsutasuna neurtzeko, purifikatutako birioi kantitatea neurtu zen alde batetik (*10.Irudia*). Horretarako, kontzentrazio ezaguneko kapsida estandarrak erabili ziren, eta Li-Cor bidez neurtutako intentsitate integratuarekin zuzen patroia eraiki zen. WB-an ikus daitekeen moduan, estandarraren seinaleak kapsidari dagokion 24 kDa-etan agertzen dira. Purifikatutako birioiek ere kapsida proteina hau daramatela ikusten da, transfekzio prozesua ondo joan zela berriz ere ziurtarazten dutelarik.



*10.Irudia.* A) Kontzentrazio ezaguneko CA proteina estandarrak eta kuantifikatu nahi diren birioi purifikatuak. Li-Cor bidez errebelatua. B) Kapsida estandarrekin eraikitako zuzen patroia eta erregresio lineala.

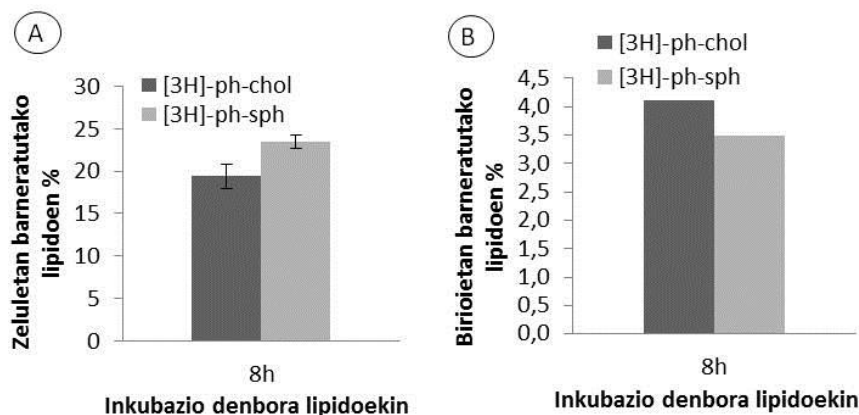
Irudiko zuzen patroia horretan oinarrituz eta purifikatutako birioien kapsida proteinari dagokion intentsitatea jakinik, lipido bakoitzarekin egindako esperimentuetan zenbat birioi purifikatzea lortu zen kuantifikatu zen. 2. taulan adierazten den moduan, kolesterolarekin inkubaturiko zelulekin eta esfingosinarekin inkubatutakoekin, antzeko birus kantitatea lortu zen.

*2.Taula. Purifikatutako birioien kuantifikazioa.*

| SPV 1:20 diluzioa (μL) | Gehitutako lipidoa        | Neurtutako l.l | ng CA/erreian | ng/μL SPV CA |
|------------------------|---------------------------|----------------|---------------|--------------|
| 2,5                    | [ <sup>3</sup> H]-ph-chol | 16,44          | 10,6676999    | 85,3415989   |
| 2,5                    | [ <sup>3</sup> H]-ph-sph  | 15,97          | 10,0607       | 80,5855999   |

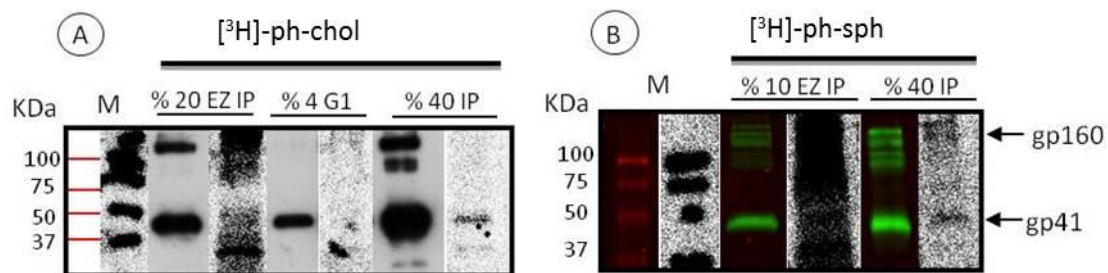
Beste aldetik, zeluletan barneratutako eta birioiek beren mintzean eskuratutako lipido erradiaktibo portzentajeak neurtu ziren izarniadura kontagailuan. Zelulak lipidoekin 8 orduz inkubatu ondoren eskuratutako laginak aztertuz, barneratutako kolesterol portzentajea, batez beste, % 19,39koa izan zela ikusten da. Esfingosinaren datuek, antzeko barneraketa adierazten dute, medioan ezarritako lipido totalaren % 23,46a barneratu zelarik (*11A.Irudia*).

Lipidoekin zelulak 8 orduz inkubatu eta 24 orduz medio arruntean birioien ekoizpena eman ondoren, ikusten da, kolesterolaren kasuan, birioiek zelulek barneratutako lipido guztiaren % 4,10a zeramatela. Esfingosinaren kasuan, zelulek barneratutakoaren % 3,49a zeramatela neurtu da (*11B.Irudia*).



*11.Irudia. A) Zeluletan barneratutako lipido portzentajea berauekin inkubatu ondorengo 8 ordutara. B) Birioetan barneratutako lipido portzentajea medio aldaketatik 24h-ra.*

Lortutako gp41-aren eta lipidoen arteko elkarrekintzen emaitzak birioi mailan hobetzeko asmoz, esperimentuak errepikatu ziren, baina oraingoan, lipido erradiaktiboak gehitu ondoren ez zen medio aldaketarik burutu. Zilar tindaketaren bidez esperotako birioi patroia lortzen zela ziurtatu ondoren (ez dira irudiak erakusten), proteinaren eta lipidoen artean elkarrekintzak ematen direla ikusten da, WB-ean gp41-aren presentzia detektatzen baita, eta erradiaktibitateak ere seinalea ematen baitu kolesterol zein esfingolipidoen kasurako. Aipatzekoa da, prozedura honekin seinalea hobetzea lortzen dela (*12.Irudia*).



**12. Irudia.** Gp41-aren elkarrekintzak birioi mailan kolesterol (A irudia) eta esfingolipidoekin (B irudia). Zelulak tritio bidez markatutako lipido erradiaktiboekin inkubatu ziren baina ez zen medio aldaketarik burutu. A irudia, auto-erradiografia bidez errebelatua eta erradiaktibitatea  $\beta$ -imager bidez neurtua. B irudia, Li-Cor bidez errebelatua eta erradiaktibitatea  $\beta$ -imager bidez neurtua.

## 5. Eztabaida

Metodologia honen funtzionaltasuna ziurtatzearren garrantzia azpimarratu nahi da, tritio bidez markatutako lipido fotoaktibagarri hauen erabilera nahiko berria baita ildo honetakoak diren esperimenduetan. Kabeolina-1 zelulen mintz plasmaticoan agertzen diren kabeolen osagai nagusienetakoa dela eta kolesterol eta esfingolipidoetan aberastutako *raft* lipidikoetan aurkitzen dela jakinda, eta transferrina hartzailea, aldiz, *raft*-etan ez dagoen proteina markatzailea dela jakinik, elkarrekintzen kontrol positibo eta negatiboak dira, ondoz ondo. Modu berean, zilar tindaketa bidezko birioi purifikatuen karakterizazioaren bidez, pCHIV 528 plasmidoaren transfekzio prozedura eta birus produkzioa ondo joan zela ziurtaturik, env fusio proteinaren eta lipidoen arteko elkarrekintzen analisira jo daiteke.

Zelula mailan, emaitza positiboak jasotzen dira gp41 eta lipidoen arteko elkarrekintzetatik, kolesterol zein esfingolipidoen kasurako seinale nabarmena ikusiz. Gp160 proteina prekurtsorearen presentzia ere detektatzen da. Izan ere, proteina honek gp41-ari dagokion azpi-unitatea bere baitan darama; oraindik proteolizatu gabe egongo litzatekeelarik. Env Golgi aparatuen *trans* gunean proteolizatzen dela jakinda <sup>[3]</sup>, ikusten den gp160-aren eta lipidoen arteko elkarrekintza ez dela zelularen mintz plasmaticoan gertatzen ari ondorioztatzen da; zelulako besikularen mintz batean baizik. Honek, era beran, gp41-arekin ikusten diren elkarrekintza guztiak ez direla bakarrik zelularen mintz plasmaticoan emango pentsatzera garamatza.

Birusak aztertuz, gp41-aren eta aztergai izan diren bi lipidoen artean elkarrekintzak daudela ikusten da. Alabaina, detektatzen den seinalea zeluletan ikusitakoa baino ahulagoa da. Arrazoiak, bien arteko gp41 proteinaren kantitate desberdintasunean datza. Zelulek beren mintzean birusek baino proteina gehiago agertzen dituzte; birusaren kasuan 8-15 trimero daudela bakarrik dakigu <sup>[18]</sup>. Hori dela eta, lipido gehiagorekin elkar eragiteko aukera dute, seinale biziagoaren agerpena justifikatuz.

Konparaketa hauek, ordea, non oinarritu bat izan behar dute. Horregatik, emaitzen esanguratsutasuna neurtzeko, alde batetik, purifikatutako birioi kantitatea neurtu zen (kolesterol zein esfingosinarekin inkubatutako zelulek birioi ekoizpen oso antzekoa izan zutelarik), eta beste aldetik, zeluletan barneratutako eta birioiek beren mintzean eskuratutako lipido erradiaktibo portzentajeak neurtu ziren (zeluletan sartutako kolesterolaren % 4,1a aurkitzen zen birioietan, eta esfingosinaren kasuan, % 3,49a). Kontuan izan behar da molekulariki eskala txikiez hitz egiten ari garela, birusak gp41 gutxi batzuk soilik baititu <sup>[18]</sup>. Horregatik, elkarrekintzarik egotekotan oso seinale gutxi ikusiko litzateke. Arazo hau konpontze aldera, esperimentuak errepikatu ziren, baina oraingoan, lipido erradiaktiboak gehitu ondoren medio aldaketarik burutu gabe. Modu honetan, zelulek lipido gehiago barnera zezatela bultzatu zen, eta inkubazioak iraundako 24 orduetan zehar birioiei ere beren mintzean lipido erradiaktibo gehiago txertatzeko aukera eman zitzaien. Kontuan izan behar da esfingosinaren kasuan, birusak hauek metabolizatzeke entzimarik ez duenez, zuzenean txertatutako litzatekeen lipidoa esfingosina dela.

Laburbilduz, ikerketa proiektu honetan gp41-ak kolesterol eta esfingolipidoekin *in vivo* elkar eragiten duela bai zelula zein birus mailan ondorioztatzen da. Oraindainoko antzeko ildoko esperimentuak, aldiz, ez dira *in vivo* frogatuak izan, beraz, ez dute gp41-a ingurune lipidiko horretan bertan dagoenik ziurtatzen. Aitzitik, gure aurkikuntzak zeresan handia izango luke esparru horretan. Baina, galdera asko dira oraindik erantzuteke daudenak; env glikoproteina zein mekanismoren bitartez iristen den mintzera, zelula ostalariak prozesu honetan duen eragina, mintzeko mikrodomeinuen funtzio espezifikoa, etab. Aurrera begira, elkarrekintzen seinalea hobetzen saiatzea, env-en mintzerako garraioan gag-env arteko menpekotasunik dagoen ezagutzeko hau soilik adierazten duen plasmidoarekin esperimentuak errepikatzea edota CRAC eta CT (env-en mutur zitoplasmakoa) domeinuen mutagenesi esperimentuak burutzea geratuko lirateke.

Hitz batean, mintzeko lipidoen antolaketak birusaren infekzio gaitasun eta ekoizpenean eragina izan dezakeela uste da, baina birusaren mintzaren konposaketa modu kuantitatibo eta kualitatiboan ezagutzen bada ere, env fusio proteinen ingurune lipidikoa ezezaguna da oraindik. Proteina honek birusaren patogenesian duen garrantzia ezagututa, lorturiko emaitzek eta aurrerantzean egingo diren ikerketek antigorputz neutralizatzaileak ekoizteko gai den immunogeno bat garatzeko edota ingurune lipidiko hori apurtuko/eraldatuko luketen konposatu lipido mimetizatzaileak sintetizatzeke aukera emango lukete.

## 6. Bibliografia

1. UNAIDS 2012. <http://www.unaids.org/es/dataanalysis/>
2. Konstantinov, I., Stefanov, Y., Kovalevsky, A. eta Voronin Y. (2011) Human Immunodeficiency Virus model. *Science* **331**: 848-849.
3. Checkley, M. A., Luttge, B. G. eta Freed E. O. (2011) HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol* **410**: 582-608.
4. Lorizate, M. eta Kräusslich, H. G. (2011) Role of lipids in virus replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(10):a004820. doi: 10.1101/cshperspect.a004820. (liburu kapitulua)
5. Schroeder, C. (2010) Cholesterol-binding viral proteins in virus entry and morphogenesis. *Subcell Biochemn* **51**: 77-108.
6. Liao, Z., Graham, D. R. eta Hildreth, J. E. (2003) Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**: 675-687.
7. Simons, K., eta Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.
8. 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.
9. Brügger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F. T. eta Kräusslich, H. G. (2006) The HIV lipidome: A raft with an unusual composition. *Cell Biology* **103**: 2641-2646.
10. Nieva, J. L., Apellaniz, B., Huarte, N. eta Lorizate, M. (2011) A new paradigm in molecular recognition? Specific antibody binding to membrane-inserted HIV-1 epitopes. *Journal of Molecular Recognition* **24**: 642-646.
11. Contreras, F. X., Ernst, A. M., Haberkant, P., Björkholm, P., Lindahl, E., Gönen, B., Tischer, C., Elofsson, A., von Heijne, G., Thiele, C., Pepperkok, R., Wieland, F. eta Brügger, B. (2012) Molecular recognition of a single sphingolipid species by a protein's transmembrane domain. *Nature* **481**: 525-529.
12. Izquierdo-Useros, N., Lorizate, M., Contreras, F. X., Rodriguez-Plata, M. T., Glass, B., Erkizia, I., Prado, J. G., Casas, J., Fabriàs, G., Kräusslich, H. G. eta Martinez-Picado, J. (2012) Sialyllactose in viral membrane gangliosides is a novel molecular recognition pattern for mature dendritic cell capture of HIV-1. *PLoS Biol* **10**(4):e1001315. doi: 10.1371/journal.pbio.1001315.
13. Thiele, C., Hannah, M. J., Fahrenholz, F. eta Huttner, W. B. (2000) Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* **2**: 42-49.
14. Lampe, M., Briggs, J. A., Endress, T., Glass, B., Riegelsberger, S., Kräusslich, H. G., Lamb, D. C., Bräuchle, C. eta Müller, B. (2007) Double-labelled HIV-1 particles for study of virus-cell interaction. *Virology* **360**: 92-104.
15. Pelkmans, L., Kartenbeck, J. eta Helenius, A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* **3**: 473-483.
16. Welker R., Hohenberg H., Tessmer U., Huckhagel C. eta Kräusslich H. G. (2000) *J. Virol* **74**: 1168–1177
17. Boesze-Battaglia, K. (2006) Lipid Raft and Caveolae in Transmembrane Signaling. Ali, H. eta Haribabu, B. (Ed.), *Transmembrane signaling protocols* (169-194). Totowa, New Jersey: USA. Humana Press.
18. Chojnacki, J., Staudt, T., Glass, B., Bingen, P., Engelhardt, J., Anders, M., Schneider, J., Müller, B., Hell, S. W. eta Kräusslich, H. G. (2012) Maturation-dependent HIV-1 surface protein redistribution revealed by fluorescence nanoscopy. *Science* **338**: 524-528.

\*Lanaren luzera mugatua dela eta, ez dira erabilitako bibliografia guztiak adierazi.

\*\*Euskararako itzulketa eta terminologia ugari "euskalbar"-etik (asko elhuyar hiztegitik) hartu dira.