

Gradu Amaierako Lana  
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

Mintz ereduetan toxina proteiko  
batekin egindako ikerketa  
espektroskopikoa

MC540 zunda gai da mintzean dauden proteinen  
aldaketa konformazionalak antzemateko?

Egilea:  
Garazi Guembelzu Iraola  
Zuzendariak:  
Kepa B. Uribe eta Helena Ostolaza

# AURKIBIDEA

SARRERA .....	3
Adenilato ziklasa toxina .....	3
Merozianina 540 zunda .....	4
Mintz biologikoak eta liposomak.....	5
HELBURUAK .....	6
MATERIALAK ETA METODOAK .....	6
Materialak.....	6
Metodoak.....	6
EMAITZAK .....	8
MC540 zundaren ezaugarri espektralak soluzioan .....	8
Lipido konposizio ezberdinek MC540 zundaren ezaugarri espektraletan duten eragina	9
ACTΔN482 toxina.....	12
EZTABAIDA .....	14
BIBLIOGRAFIA .....	16

## SARRERA

### Adenilato ziklasa toxina

Adenilato ziklasa toxina (ACT) jatorri bakterianoa duen toxina proteikoa da. “Kukutxeztula” deritzon arnas bideen gaixotasun kutsakorra eragiten duen *Bordetella pertussis* bakterio patogenoaren oinarrizko birulentzia faktoreetako bat da eta ostalariaren arnas aparatua infektatzen duenean jariatzen du. 1706 aminoazidoz osaturik dagoen eta 200 kDa-eko pisu molekularra duen toxina, RTX (ingelesez *Repeats in ToXin*) toxinen familiako kidea da, zeinak poroak sortzeko gaitasuna duten (Vojtova eta lank., 2006). Hala ere, familia honetako kideekin alderatuz gero ACT-ak desberdintasun bat azaltzen du, proteina bifuntzionala dela. Izan ere, aktibitate entzimatikoa (adenilato ziklasa) eta hemolitikoa aurkezten ditu (Ladant eta Ullmann, 1999).

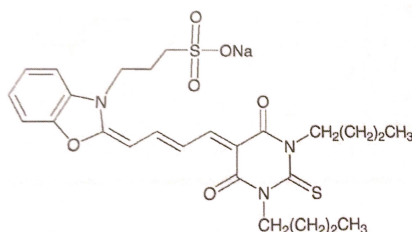
Estrukturaliki, ACT-a bi domeinuetan banatuta dago. Amino muturreko lehenengo  $\approx 400$  aminoazidoek adenilato ziklasa (AC) domeinua osatzen dute. Domeinu honek ATP-aren ziklazioa katalizatzen du, cAMP-a sortuz. Domeinu hemolitikoa ( $\approx 1306$  aa) aitzitik, karboxilo muturrean dago kokatua eta toxina itu zelulei batzea baimentzen du. Guztiz argi ez dagoen mekanismoa jarraituz, domeinu hemolitikoak mintzean zeharreko AC domeinuaren translokazio zuzena baimentzen du, zitosolera barneratuz. Bertan kalmodulinari batu eta aktibatu egingo da cAMP-a ekoitziz. Domeinu hemolitikoa aldi berean, poroak sortzen dituen domeinuaz (500-700 aa), glizina eta aspartikoetan aberatsa den RTX domeinuaz eta bi azilazio gunez (800-1000 aa) osatua dago. Azken gune hauetara gantz-azidoak lotura kobalentez batzen dira, toxinak bere egitura heldua eskuratzen duelarik. Azilo taldeez gain, konformazio guztiz aktiboa eskuratzeko, toxinak kaltzio ioiak batu behar ditu RTX domeinura (Masin eta lank., 2004; Ladant eta Ullmann, 1999).

AC domeinuaren translokazioaren mekanismoa zehaztasun osoz ezagutzen ez den prozesua da. Hala ere, prozesua bi pausutan ematen dela pentsatzen da, non, lehenengo ACT-a mintzera batzen da eta ondoren, AC domeinuak mintza zuzenean translokatzeko du (Ladant eta Ullmann, 1999). Berriki, itu zelulari lotuta dagoen ACT toxinak mozketaren proteolitiko bat jasaten duela jakin da. Hain zuzen ere, AC domeinua traslokatu ondoren kalpainaren izeneko proteasa zelularrek mozketaren bakarra eragiten dute 450-480 aminoazido tartean. Ondorioz, proteina bitan banatzen da, alde batetik, AC domeinu osoa zitosolean askatzen da, eta domeinu hemolitikoa berriz, mintzean txertatuta geratzen da (Uribe eta lank., 2013).

Lan honetan ACTΔN482 toxina mutantea erabili da, zeinari amino muturreko lehenengo 482 aminoazidoak falta zaizkion, beraz, domeinu hemolitikoa soilik aurkezten du. Mutante honek AC domeinua translokatu ostean mintzean geratzen den domeinu hemolitikoa errepresentatuko luke.

### Merozianina 540 zunda

Merozianina 540 (MC540) ezaugarri fluoreszenteak aurkezten dituen eta zianina familiako kidea den zunda bat da. Zundaren egiturari dagokionean, MC540 talde aromatikoa heteroziklokoz osaturik dago eta karga negatiboa du (**1. irudia**). Ezaugarri hauetaz baliatuz, asko erabili da fosfolipidoz osaturik dauden mizela, bigeruzeta eta besikulen egoera fisikoaren inguruko informazioa lortzeko (Kaschny eta Goñi, 1992).



1. Irudia. MC540 zundaren egitura kimikoa.

MC540 zunda fluoreszenteak izaera anfipatikoa du, hori dela eta, polaritate tarte zabaleko soluzioetan disolbatu daiteke, uretatik hasi (polarra) eta kloroformo (apolarra) bitartean (Kaschny eta Goñi, 1992). Zunda honek beste zianinen antzera, monomero-dimero oreka bat jasaten du disoluzioan, mizeletan eta fosfolipidoz osaturiko bigeruzetan. Zundak ezaugarri espektrofotometriko desberdinak aurkeztuko ditu ur disoluzioan edo ingurune apolar batean aurkitzen denaren arabera (**1. taula**) (Kaschny eta Goñi, 1992; Kuo eta Hochstrasser, 2011).

1. Taula. MC540 zundak disoluzioan eta liposometan aurkezten dituen ezaugarri espektrofotometrikoak.

	Disoluzioa	Liposoma
<b>Monomeroa</b>	$\lambda_{ex}=540$ nm $\lambda_{em}=575$ nm	$\lambda_{ex}=570$ nm $\lambda_{em}=585-590$ nm
<b>Dimeroa</b>	$\lambda_{ex}=502$ nm $\lambda_{em}=-$	$\lambda_{ex}=529$ nm $\lambda_{em}=625$ nm
<b>Poliagregatua</b>	$\lambda_{ex}=456$ nm	

MC540 zundak, molekula anfipatiko ugariaren antzera, ur disoluzioan dagoenean dimerizatzeko joera izango du (Dixit eta Mackay, 1983). Hala ere, dimeroez ez dute fluoreszentzia igortzeko gaitasunik ez uretan ez eta polaritate desberdineko soluzio organikoetan. Liposomak dituen ur soluzio batean, MC540 zundak bigeruzeta lipidikoan tartekatze joera du eta mintzean monomero zein dimero egoeran aurki daiteke.

Bigeruza lipidikoetan, MC540 monomeroak mintzaren gunen hidrofobikoan kokatzen dira eta MC540 dimerokoak mintzeko lipidoen buru polarren eta kate hidrokarbonatuen artean sartzen dira (Bernik eta lank., 1999). Bigeruza lipidikoko zundaren monomero-dimero oreka mintzaren makurdura, konposizioa, tenperatura, paketamendu maila eta [lipido]/[MC540] ratioaren arabera izango da (Bernik eta lank., 1999; Kuo eta Hochstrasser, 2011). Gainera, MC540 zunda bigeruzen jariakortasunarekiko sentikorra da (Williamson eta lank., 1983) eta ezaugarri honek zunda mintzaren egitura aztertzeko oso erabilgarria bilakatzen du.

### **Mintz biologikoak eta liposomak**

Zelulen mintz plasmatikoa zelulak kanpo inguruetik babesten dituen lipidoz osaturiko egitura lamelar bat da. Mintza bi lipido geruzez osatua dago, non lipidoen buru polarrak kanpo medioari begira eta kate hidrokarbonatuak barnealdera begira kokatzen diren. Mintz biologikoen egitura azaltzen duten eredu artean, 1972. urtean Singer eta Nicolson-ek aurkeztutako *mosaiko fluidoaren* egitura da orain arte onartuena. Eredu honen arabera, bigeruza osatzen duten lipidoak era simetrikoan antolatuta daude eta plano horizontalean baino ezin daitezke mugitu (Singer eta Nicolson, 1972). Gaur egun, nahiz eta eredu baliagarria izan, jakina da bigeruzek zelula inguruetik babestea baino funtzio gehiago dituztela eta euren egitura uste baino konplexuagoa dela (Engelman, 2005).

Jariakortasuna mintzak definitzen dituen ezaugarri fisikoetako bat da eta faktore desberdinek baldintzatzen dute: tenperatura, lipidoen antolamendua mintzean zehar, kolesterolaren presentzia, lipidoen kate hidrokarbonatuen izaera... Faktore hauen arabera mintza gel ( $L_{\beta}$ ), likido desordenatu ( $L_d$ ) edo likido ordenatu ( $L_o$ ) izeneko faseetan aurkitu daiteke. Gel fasean dauden mintzak gantz-azido asetuez osaturik dauden fosfolipidoak izan ohi dituzte, zeinak mintzaren mugikortasuna mugatu egiten duten. Likido desordenatu fasea aurkezten duten mintzen fosfolipidoak aldiz, gantz-azido asegabenez osaturik daude eta hauek kateen trinkotzea ekiditen dute. Kolesterolak mintzak likido ordenatu fasea eskuratzea baimentzen du. Izan ere, bere jatorri hidrofobikoak eta bere zurruntasunak lipidoen kate hidrokarbonatuen artean barneratzea baimentzen dio, mintzaren egitura ordenatzen duelarik (Van der Goot eta Harder, 2001).

Liposomak mintz eredu sinplifikatu bezala erabiltzen diren bigeruza lipidikoz osaturiko besikulak dira. Hauek era erraz batean prestatzeaz gain, faktore desberdinak (lipido konposizioa, tamaina, besikula barneko edukia...) kontrolatzeko aurkera ematen dute. Hori dela eta, mintz eredu artean, *in vitro* lan egiteko sistema erabilienak dira.

## HELBURUAK

Lan honen helburuak ondorengoak dira:

1. MC540 zundaren ezaugarri espektralaren karakterizazioa soluzioan eta konposizio lipidiko ezberdinak dituzten mintz-sistema ereduetan.
2. Adenilato ziklasa toxinarene mutante baten (ACT $\Delta$ N482) eta mintz-sistema ereduaren arteko interakzioak MC540 zundaren ezaugarri espektraletan duen eragina aztertzea.

## MATERIALAK ETA METODOAK

### Materialak

1,2-Dioleil-glizerol-3-fosfatidilkolina (DOPC), 2-Dipalmitoil-glizerol-3-fosfatidilkolina (DPPC), kolesterola (Chol) eta garuneko esfingomielina (bSM) Avanti Polar Lipid (USA) etxe komertzialaren bidez lortu ziren. Merozianina 540 (MC540), 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonikoa (ANTS) eta p-xileno-bispiridinio (DPX) Molecular Probes, Life Technologies (USA) hornitzailetik eskuratu ziren eta Triton X-100 Sigma-Aldrich (USA) hornitzailetik.

MC540 zundaren stock soluzioak (2 mM) etanol absolutuan prestatu ziren eta behin prestatuta, sortzen ziren agregatuak ultrasoinuen bidez desegiten ziren. Zunda fotosentikorra izanik, argitik babestua mantentzen zen. MC540 zundaren stock berriak astean behin prestatzen ziren eta -20°C-tan gordetzen ziren.

### Metodoak

ACT $\Delta$ N482. ACT $\Delta$ N482 (483-1706 aa) toxina mutantearekin lan egiteko Powthongchin eta Angsuthanasombat-ek (2007) deskribatu zuten plasmido berbera erabili zen. Plasmidoaren gainadierazpena eta purifikazioa Basar eta lankideek (1999) ACT toxina basatia purifikatzeko deskribatu zuten protokoloa jarraituz egin zen.

Fluoreszentziaren neurketak. Igorpen eta kitzikapen espektroak neurtzeko FluoroLog-3 (Horiba Jobin Yvon, Japonia) fluorimetroa erabili zen. MC540 zundaren ezaugarri espektroskopikoak ikertzeko, kitzikapen eta igorpen espektroak aztertu ziren uhin luzera ezberdinetan. Kitzikapen espektroak 350-565 nm tartean neurtu ziren hiru  $\lambda_{em}$  ezberdinetan: 575 nm, 590 nm eta 625 nm. Igorpen espektroei dagokionean lau izan ziren erabilitako  $\lambda_{ex}$ -ak: 502 nm, 529 nm, 540 nm eta 570 nm. Lehenengo hiru kasuetan 550-700 nm tartean neurtu zen igorpena eta  $\lambda_{ex}$ =570 nm-ren kasuan, 580-700 nm-ko tartean. Espektroak lortzeko 2 nm-ko igorpen nahiz kitzikapen zirrikituak finkatu ziren eta

0,1 segunduko integrazio denbora erabili zen. Neurketa guztiak 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl eta 10 mM CaCl<sub>2</sub> tanpoiean egin ziren, 37°C-tan eta etengabe irabiatuz.

Disoluzioan egindako neurketa fluorimetrikoak, MC540 zunda bi minutuz 37°C-tara girotutako tanpoira gehitu eta 10 minututara burutzen ziren. Liposomak erabiltzean, hauek tanpoiarekin batera gehitzen ziren eta inkubazio protokolo berdina jarraitzen zen. ACTΔN482 toxina mintzean batu ostean MC540 zundarengan eragiten zituen aldaketak aztertzeko, zunda liposomekin inkubatu ondoren, toxina gehitu eta azken hau beste 10 minutuz inkubatzen zen.

Liposomen prestaketa. Bigeruza bakarreko besikula handiak (LUV, ingelesetik *Large Unilamellar Vesicles*) prestatzeko, Martín eta lankideek (2004) deskribaturiko protokoloa jarraitu zen.

MC540 zundarekin entseguak egiteko, lipidoak 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, eta 150 mM NaCl tanpoiarekin hidratatu ziren. Askapen entseguak egiteko ordea, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 12,5 mM ANTS, 45 mM DPX eta 70 mM NaCl tanpoia erabili zen. Azkeneko kasu honetan, aske geratutako zundak kentzeko, LUV-ak Sephadex G-25 (PD-10 Columns, GE Healthcare) zutabe batetik pasarazi ziren, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, eta 150 mM NaCl eluzio tanpoia erabiliz.

Liposomen edukien askapena. Neurketak Fluoromax-3 (Horiba Jobin Yvon, Japonia) fluorimetroan egin ziren, ondorengo baldintzetan: 100 μM lipido (1 mL-ko bolumenean), 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl eta 10 mM CaCl<sub>2</sub> tanpoia, 37°C-tan eta etengabe irabiatuz. Entseguak toxinarekin gehitzearekin hasten ziren. ANTS-ren fluoreszentsia etengabe neurtu zen 10 minutuz ( $\lambda_{\text{ex}}=355$  nm;  $\lambda_{\text{em}}=520$  nm; 5 nm-ko kitzikapen-igorpen zirrikituak). % 100-eko seinalea lortzeko Triton X-100 detergentea gehitu zen (amaierako kontzentrazioa, % 0,01 [p/b]). Askapenaren ehunekoa kalkulatzeko hurrengo ekuazioa erabili zen:

$$\text{Askapena \%} = \frac{F_f - F_0}{F_{100} - F_0} \times 100$$

**F<sub>f</sub>**: toxina gehitu ostean 10 minutura lortzen den fluoreszentsia.

**F<sub>0</sub>**: fluoreszentsiaren hasierako balioa.

**F<sub>100</sub>**: Triton X-100 gehitzean lortzen den fluoreszentsia.

Datu espektrofotometrikoen tratamendua. Zundaren ezaugarri espektrofotometrikoak soilik aztertzeko, datuei barne zuzenketa faktorea ezartzeaz gain, tanpoiaren edo liposoma "hutsen" (liposomak MC540 gabe) eragina kendu zitzaien. MC540 zundaren ezaugarri espektrofotometrikoetan ACTΔN482 mutanteak zuen efektua aztertzeko, toxina eta zunda zuten liposomen fluoreszentsia balioei liposoma eta

zundarekin soilik lortutako fluoreszentzia balioak kendu zitzaizkien. Nahiz eta kenketarik egin gabe efektu bera ikusten zen, kenketa egitearen arrazoia toxinak zundarengan zuen efektua amplifikatzeko izan zen, liposometara atxikitzen den toxina kantitatea txikia baita ( $\approx$  %10-a) eta lorturiko fluoreszentzia balioen proportzio handiena toxina baturik ez duten liposomek ematen baitzuten.

Mintzean txertatutako monomero-dimero oreka ikertzeko, batetik, fluoreszentzia espektro erlatiboak sortu ziren, lortutako espektroetan seinale edo datu altuenari 100-eko balioa eman eta gainontzeko balioak honekiko erlatibizatuz, eta bestetik, I585/I625 ratioa kalkulatu zen,  $\lambda_{ex}=529$  nm zenean,  $\lambda_{em}=585$  nm (monomeroaren igorpena) eta  $\lambda_{em}=625$  nm-etan (dimeroaren igorpena) lortu ziren intentsitateen ratioa kalkulatu.

Analisi estatistikoa. Neurketak gutxienez hiru aldiz errepikatu ziren eta agertzen diren emaitzak datuen batzbestekoa  $\pm$  desbideratze estandarra edo errore tipikoa dira. Adierazgarritasun maila Student *t*-testaren bidez determinatu zen, eta adierazgarritasun estatistikoa definitzeko % 99-a ( $p < 0,001$ ) baino altuagoa den konfidantza maila ezarri zen.

## EMAITZAK

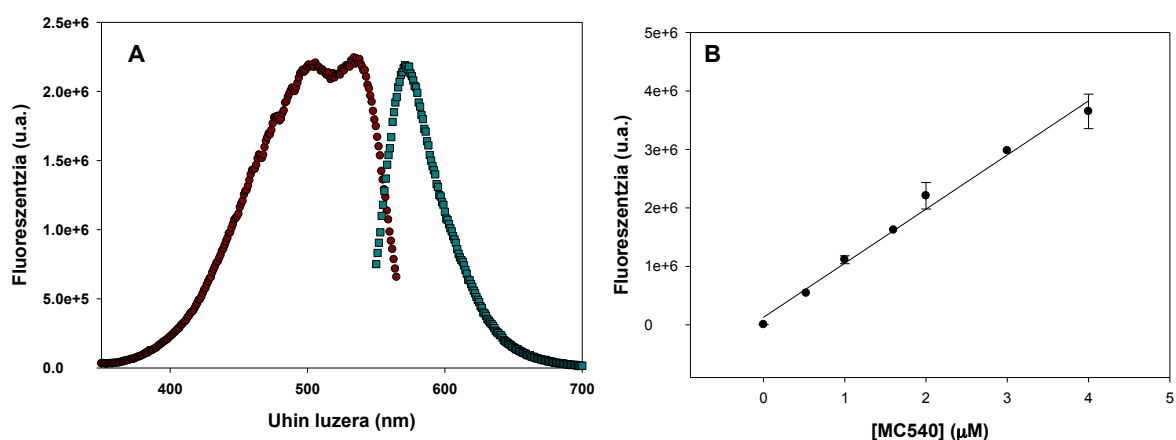
### MC540 zundaren ezaugarri espektralak soluzioan

Merozianina 540 zundak, beste zianinen antzera, disoluzioan monomero-dimero oreka bat adierazten du (Kaschny eta Goñi, 1992). **2A irudian** ageri diren maximoak oreka honen adierazleak dira. Kitzikapen espektroan ageri diren bi maximoek,  $\lambda_{ex}=540$  nm eta  $\lambda_{ex}=502$  nm, tanpoian dagoen monomeroari eta dimeroari egiten diote erreferentzia hurrenez hurren. Bi maximo hauez gain,  $\lambda_{ex}=456$  nm-tan beste maximo bat agertu daiteke, zeina agregatuak daudenaren adierazlea den. Gure laginetan maximo hau ez zen nabaria zunda sotock-ak sonikatuak izaten zirelako. Igorpen espektroari dagokionean ordea, maximo bakarra ageri da,  $\lambda_{em}=575$  nm-tan (2A irudia), tanpoian aske dagoen monomeroaren igorpenaren maximoa hain zuzen ere. Igorpen espektroan ez da tanpoian aske dagoen dimeroaren maximoak ageri, dimeroek ur disoluzioan ez baitute igortzen (Bernik eta lank., 1999).

Zundak disoluzioan zituen ezaugarri espektralak ikusita (2A irudia), eta hauek literaturan deskribatuta daudenekin bat zetoze ikusirik, lanean zehar erabiliko zen MC540 kontzentrazioa finkatu zen. Honetarako, zunda kontzentrazioaren eta fluoreszentiaren arteko tarte lineala zein zen aztertu zen. **2B irudian** ikusten den



bezala, MC540 zundaren kontzentrazioa eta fluoreszentzia 4  $\mu\text{M}$  arte zuzenki proportzionalak dira. Horrela, 2  $\mu\text{M}$ -eko zunda kontzentrazioa erabiltzea erabaki zen.



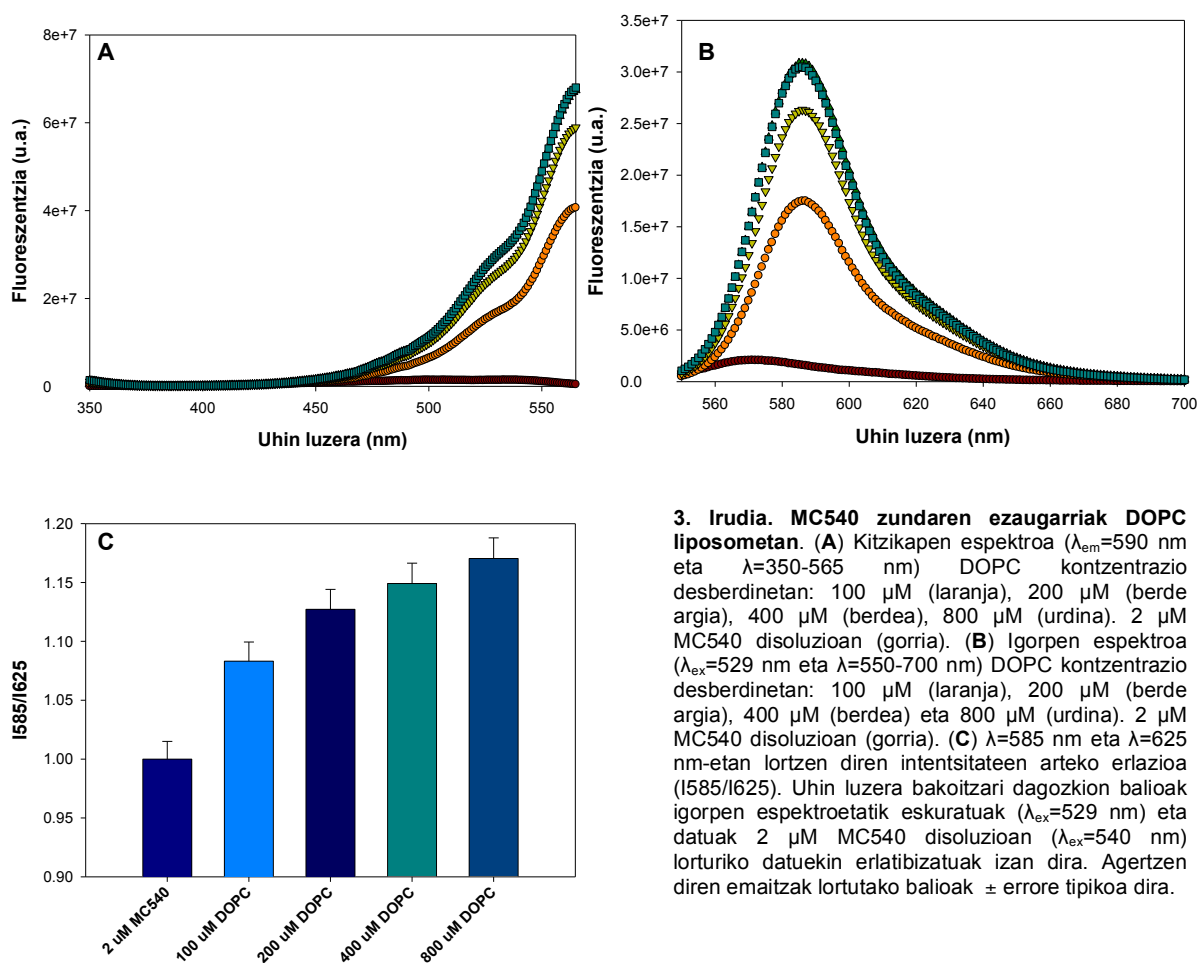
**2. Irudia. MC540 zundaren ezaugarri espektralak soluzioan.** (A) 2  $\mu\text{M}$  MC540 zundaren kitzikapen (gorria) eta igorpen (berdea) espektroak:  $\lambda_{em}=575$  nm eta  $\lambda_{ex}=540$  nm ( $\lambda=350-700$  nm). Kitzikapen/igorpen espektro hau ikerketan zehar egin ziren gainontzeko espektroen erakusgarria da. (B) MC540 (0,525-4  $\mu\text{M}$ ) eta fluoreszentiaren arteko erlazioa. Agertzen diren emaitzak hiru saiakeren batazbestekoa  $\pm$  desbideratze estandarra dira.  $R^2$ : 0,988.

### Lipido konposizio ezberdinek MC540 zundaren ezaugarri espektraletan duten eragina

Deskribaturik dago liposometan zundak duen errendimendu kuantikoa ur disoluzioan duena baino handiagoa dela (Aramendia, 1988). Horregatik, MC540 zundaren xurgapen eta igorpen intentsitateak altuagoak dira zunda liposometan tartekatua dagoenean. Hain zuzen ere, 3. eta 4. irudietan jasotako igorpen/kitzikapen espektroen datuak bat datoz baieztapen honekin. Honez gain, monomeroaren uhin luzera maximoak gorriranzko desplazamendu bat jasaten duela ikus daiteke ingurune apolarrean dagoenean. Desplazamendu hau zunda medio apolarrago batera igarotzearen ondorioa izango da (Kaschny eta Goñi, 1992). Beraz, zunda medio apolarrera igarotzen denean bere errendimendu kuantikoa emendatzeaz gain, gorriranzko desplazamendua jasaten du. Gainera, espektroak aztertuz, ia zunda kontzentrazio guztia liposometara batzen dela ikus daiteke. Izan ere, liposomak dauzkaten espektroak aztertuz gero, besteak beste, monomeroei dagokien maximoa bakarra dela ikus daiteke,  $\lambda_{ex}=570$  nm edo  $\lambda_{em}=585$  nm.

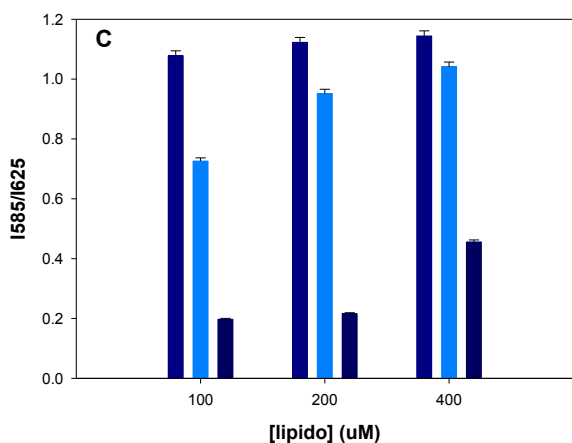
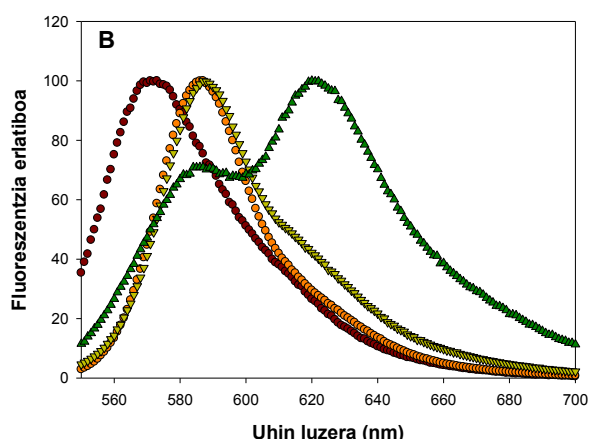
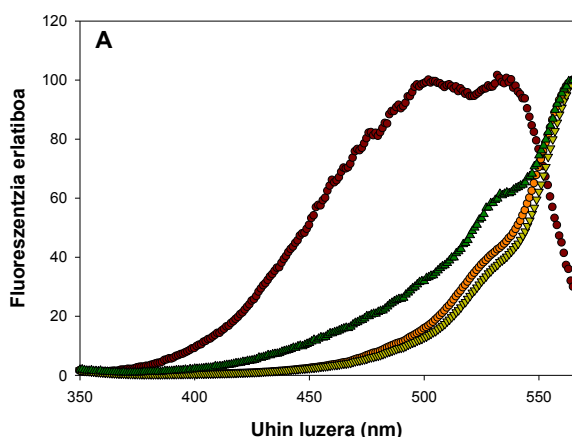
Mintzean tartekatua dagoenean, merozianina 540 zundaren monomero-dimero oreka faktore ezberdinek baldintzatzen dute (Bernik eta lank., 1999; Kuo eta Hochstrasser, 2011). Horien artean, lipido:zunda ratioaren eta mintzaren jariakortasunaren efektuak aztertu ziren lan honetan.

Lipido:zunda ratio ezberdinak erabili zirenean (**3A** eta **3B irudiak**) zundaren monomero-dimero orekan aldaketak nabaritu ziren. Izan ere, ratioa handiagoa zen heinean, hau da, DOPC liposoma gehiago zeudenean, liposomako batuta zegoen zunda kopurua txikiagoa izango zen monomero-dimero oreka monomeroruntz lekualdatzen zelarik. Hori dela eta, lipido:zunda ratioa handitzen zen heinean  $\lambda_{em}=585$  nm-etan ( $\lambda_{em}$  maximoa zunda monomero gisa liposoman) lortzen zen intentsitatea handiagoa zen (**3C irudia**). Hala ere,  $\lambda_{em}=585$  nm eta  $\lambda_{em}=625$  nm-etan ( $\lambda_{em}$  maximoa zunda dimero gisa liposoman) dauden intentsitate aldaketei behatuz gero, uhin luzera hauetan gertatzen diren aldaketak ez direla maila berean ematen ikus daiteke. Izan ere, liposomara atxikitua dagoen monomeroaren errendimendua dimeroarena baino handiagoa da. Hori dela eta, igorpen espektroan  $\lambda_{em}=585$  nm-tan dauden intentsitatea aldaketak  $\lambda_{em}=625$  nm-tan baino handiagoak dira (3B irudia). I585/I625 intentsitateen arteko erlazioaren errepresentazioan (3C irudia) lipido kontzentrazioa handiagoa den heinean, erlazioak gora egiten duela ikus daiteke, orekaren desplazamendua monomeroruntz ematen dela adieraziz.



Bestetalde, aurretik aipatu den bezala, merozianina zundaren ezaugarri espektralek aldaketak jasango dituzte liposomaren fosfolipidoek aurkezten duten jariakortasunaren arabera. Liposoma bakoitzaren jariakortasuna definitzerako unean, garrantzitsua da lipido bakoitzaren trantsizio temperatura ( $T_m$ ) ezagutzea, zeina liposomen ezaugarri fisiko-kimikoek zehaztuko duten. Trantsizio temperaturatik gora dauden liposomak likido desordenatu fasean egongo dira, paketamendu maila baxuagoa izango delarik. Trantsizio temperaturatik behera dauden liposomak aldiz, gel fasean egongo dira, paketamendu maila altuagoa adieraziz.

Honen erakusle dira konposizio desberdinetako liposometatik abiatuz lortu diren espektraok (**4A** eta **4B irudiak**). DOPC ( $T_m=-17^\circ\text{C}$ ) eta DPPC ( $T_m=41^\circ\text{C}$ ) liposomak fase desberdinean aurkitzen dira lan temperaturan ( $37^\circ\text{C}$ ), likido desordenatu eta gel fasean hurrenez hurren. DOPC:bSM:Chol (2:1:1 erlazio molarra) konposizio lipidikoaren kasuan ordea, lan temperaturan bi fase bereiztu daitezke. Alde batetik, likido desordenatu fasea, zeina DOPC lipidoan aberatsa izango den, eta bestetik, likido ordenatu izeneko fasea, zeina esfingomielina eta kolesteroletan aberatsa izango den.

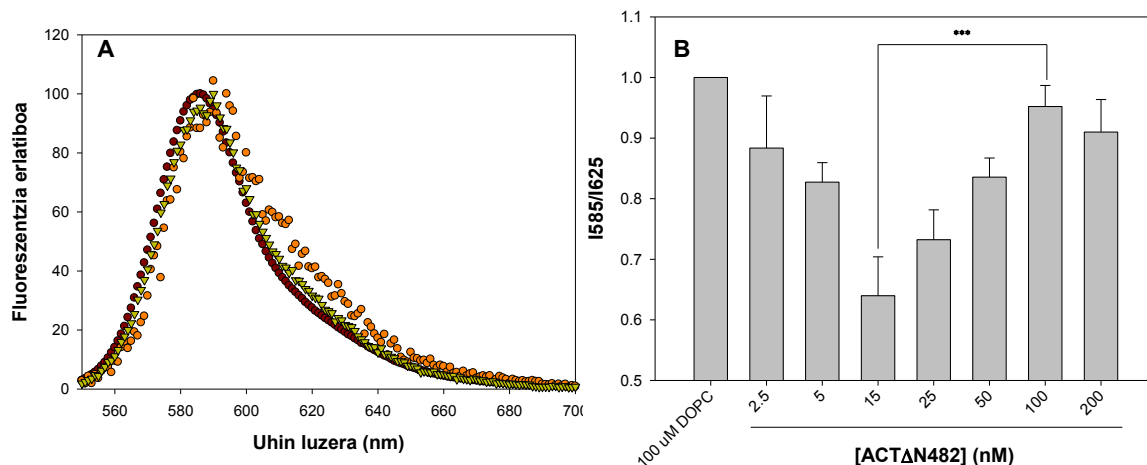


**4. Irudia. Liposomen konposizio lipidikoak MC540 zundaren ezaugarri espektroskopikoetan duen eragina.** (A)  $2\mu\text{M}$  MC540-ren kitzikapen espektra ( $\lambda_{em}=590\text{ nm}$  eta  $\lambda=350\text{-}550\text{ nm}$ )  $100\mu\text{M}$  DPPC (berdea),  $100\mu\text{M}$  DOPC (laranja) eta  $100\mu\text{M}$  DOPC:bSM:Chol (2:1:1) (berde argia) denean.  $2\mu\text{M}$  MC540 disoluzioan (gorria). (B)  $2\mu\text{M}$  MC540-ren igorpen espektra ( $\lambda_{ex}=529\text{ nm}$  eta  $\lambda_{em}=550\text{-}700\text{ nm}$ )  $100\mu\text{M}$  DPPC (berdea),  $100\mu\text{M}$  DOPC (laranja) eta  $100\mu\text{M}$  DOPC:bSM:Chol (2:1:1) (berde argia) direnean.  $2\mu\text{M}$  MC540 disoluzioan (gorria). (C) I585/I625 ratioa,  $2\mu\text{M}$  MC540 disoluzioan ( $\lambda_{ex}=540\text{ nm}$ ) lorturiko datuekin erlatibizatuak. DOPC (morea), DOPC:bSM:Chol (2:1:1) (urdin argia) eta DPPC (urdin iluna). Agertzen diren emaitzak lortutako balioa  $\pm$  errore tipikoa dira.

DPPC liposomekin lortzen da seinale altuena  $\lambda_{em}=625$  nm-tan eta ezaugarri hau dimero kopurua handiena aurkezten duenaren adierazlea da. DOPC liposomen kasuan, monomero-dimero oreka monomeroruntz dago desplazatuta, lehen ikusi bezala, eta igorpen maximoa 585-590 nm-tan ageri da. DOPC:bSM:Chol (2:1:1) liposometan, tarteko egoera bat ikusi daiteke, izan ere, liposomaren gehiengoa DOPC izango da, nahiz eta zurrunago dauden gune batzuk egongo diren (4A eta 4B irudiak). Konposizio desberdinetan lorturiko I585/I625 ratioak (**4C irudia**), liposomen konposizioak zundaren ezaugarrietan eragina dutenaren ideia indartzen du. Izan ere, DOPC, DOPC:bSM:Chol (2:1:1) eta DPPC konposizio lipidikoetan ageri den erlazioa desberdina da. Ikus daiteke, liposoma osatzen duten lipidoen jariakortasuna txikitzen den heinean, monomero-dimero oreka dimeroruntz lekualdatua ageri dela.

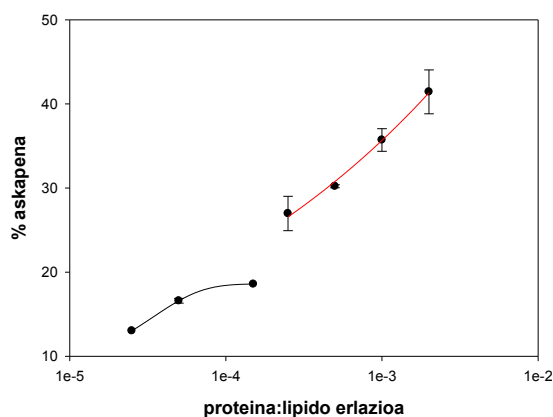
### **ACTΔN482 toxina**

MC540 zundaren ezaugarri espektralek mintzaren jariakortasunaren arabera aldaketak jasaten zituztela ziurtatu ostean, ACTΔN482 toxinak MC540 zundaren gain, eta ondorioz mintzaren beraren gain zuen efektua aztertu zen. Horretarako, MC540 zunda zuten liposomak (100  $\mu$ M lipido, 2  $\mu$ M MC540; 50:1 erlazio molarra) toxina kantitate ezberdinekin inkubatu ziren (2,5-200 nM), honek zundaren monomero-dimero orekan efekturik zuen aztertzeko. **5A irudian** ikus daiteke MC540-ren igorpen espektroetan bi toxina kontzentrazio desberdinek (15 eta 200 nM) duten eragina desberdina dela, bereziki 625 nm inguruan. Toxina kontzentrazio tarte zabalago batekin egindako saiakeretan, I585/I625 ratioan toxinak kontzentrazioarekiko portaera bifasikoa duela nabari da (**5B irudia**). Toxina kontzentrazioa baxua denean (2,5-15 nM) I585/I625 erlazioa gutxituz doa, hau da, MC540 zundaren monomero-dimero oreka dimeroruntz desplazatzen da. Toxina kontzentrazio altuagoentzat (25-200 nM) aldiz, aurkako fenomeno ematen da, hau da, kontzentrazioa igo ahala I585/I625 erlazioak gora egiten du eta hau oreka monomeroruntz desplazatzen denaren adierazlea da.



**5. Irudia. ACTΔN482 toxinak 2 μM MC540 duten DOPC liposometan duen eragina.** (A) ACTΔN482 toxinaren kontzentrazio desberdinak erabiliz lortzen diren igorpen espektroak, ( $\lambda_{ex}$ =529 nm eta  $\lambda=550-700$  nm): 15 nM ACTΔ482 (laranja) eta 200 nM ACTΔN482 (berde argia). 100 μM DOPC (gorria). (B) ACTΔN482 toxina kontzentrazio desberdinekin lortzen diren I585/I625 erlazioak ( $\lambda_{ex}$ =529 nm). I585/I625 ratioak 100 μM DOPC liposomekin lortu diren datuekiko normalizatu dira. Agertzen diren emaitzak hiru saiakeren batzabestekoa  $\pm$  desbideratze estandarra dira. \*\*\* $p < 0,001$ .

Beraz, lorturiko emaitzak aztertuz, kontzentrazioaren arabera toxinak mintzean eragiten zuen asaldura desberdina izan zitekeela ikusi zen. Emaitza hauek hobeto ulertzeko ANTS/DPX askapen entseguak burutu ziren (**6. irudia**). Lortutako emaitzen arabera, ACTΔN482 toxina kontzentrazioaren arabera, askapen prozesua desberdina izan zitekeenaren datu adierazgarriak lortu ziren.



**6. Irudia. Proteina:lipido erlazioaren arabera ACTΔN482 toxinak DOPC liposometan eragiten duen askapena.** Proteina:lipido erlazio ezberdinak lipido kontzentrazioa 100 μM-tan finkatuz eta ACTΔN482 toxinarena aldatuz (2,5-200 nM) lortu dira.  $2,5 \cdot 10^{-5}$ - $1,5 \cdot 10^{-4}$  proteina:lipido erlazioa erabiliz lortutako emaitzak erregresio sigmoide batera doitu dira (marra beltzarekin lotuak) eta  $2,5 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-3}$  proteina:lipido erlazioa erabiliz lortutako emaitzak erregresio potentzial batera doitu dira (marra gorriarekin lotuak). Agertzen diren emaitzak hiru saiakeren batzabestekoa  $\pm$  desbideratze estandarra dira.

Zehazki, proteina kontzentrazioaren arabera edukien askapena bi mekanismo desberdinen bidez gerta daitekeela pentsa daiteke, kontzentrazio desberdinetan lortzen diren puntuak ekuazio desberdinetara doitzen baitira. Liposomak proteina kontzentrazioa baxuekin inkubatzen direnean (2,5-15 nM;  $2,5 \cdot 10^{-5}$ - $1,5 \cdot 10^{-4}$  proteina:lipido erlazioa) lortutako askapen portzentaien balioak kurba sigmoide batera doitzen dira, liposomak proteina kontzentrazio altuekin inkubatzen direnean (25-200 nM;  $2,5 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-3}$  proteina:lipido erlazioa) eskuratutako askapen portzentaien balioak ekuazio potentzial batera doitzen diren bitartean.

## EZTABAIDA

Adenilato ziklasa toxinak zelula eukariotoetan eragiten duen zitotoxizitatea AC domeinuak zitosolean ekoizitako cAMP-aren eta domeinu hemolitikoak zelularen mintzean sortzen dituen poroen ondorioa da (Basler eta lank., 2006). Proiektu honetan, ACT toxinaren domeinu hemolitikoa soilik aurkezten duen mutantea (ACT $\Delta$ N482) erabili da mintzetan duen efektua aztertu asmoz.

Domeinu hemolitikoak mintzetako lipidoengan izan dezakeen eragina, edo lipidoek proteinaren konformazio edo oligomerizazio egoeran izan dezaketen eragina aztertzeko asmoz, MC540 zunda erabili da jakina delako zunda honen ezaugarri espektroskopikoak mintzen fosfolipidoen egoera fisikoarekiko sentikorrek direla.

Lanaren lehen zatian, zundak ur disoluzioan aurkezten dituen ezaugarri espektroskopiakoak aztertu dira metodo fluorimetrikoak erabiliz. Lorturiko emaitzak aztertu ostean, literaturan azaltzen direnekin alderatu dira eta bat datozela ikusi da. Horrela, lan honetarako zehaztu ziren baldintza esperimentalak egokiak zirela ondorizatu daiteke.

Ondoren, MC540 zundak konposizio desberdineko liposomekin interakzionatzean zein ezaugarri aurkezten dituen aztertzeko, ondo definituriko sistema ereduak erabili dira: DOPC, DPPC eta DOPC:bSM:Chol (2:1:1) konposizio lipidikoa duten mintz bakarrekiko besikulak hain zuzen ere. Liposoma kontzentrazio eta konposizio lipidiko desberdinetako liposomen bidez zunda liposomen jariatortasunarekiko (Williamson eta lank., 1983) eta lipido:zunda ratioarekiko sentikorra dela ikusi da. Izan ere, liposomaren ezaugarrien arabera, zundaren monomero-dimero orekaren desplazamendua desberdina dela ikusi da. **4C irudian** ikus daiteke zenbat eta lipidoa "jariakorra" izan (DOPC, 37°C) zundaren gehiena monomero gisa egongo dela, aldiz, lipidoaren egoera zurruna denean (DPPC, 37°C) dimeroaren proportzioa handiagoa da.

Hurrengo pausua ACT $\Delta$ N482 toxinak mintzean duen efektua aztertzea izan da, MC540 zunda duten DOPC liposomak erabiliz. **5. irudiko** emaitzei erreparatuz toxina mutanteak MC540 zundaren igorpen espektroan eragina duela esan daiteke, I585/I625 erlazioa aldatu eta beraz, zundaren monomero-dimero orekan eragina duelako. Toxina kontzentrazio baxuetan (2,5-15 nM) I585/I625 erlazioa txikituz doa oreka dimeroruntz desplazatzen dela adieraziz. Toxina kontzentrazioa handitzen den heinean (25-200 nM) aldiz, kontrako eragina ikusten da, I585/I625 erlazioa handitzen doa, zundaren monomero proportzioaren emendioa azalduz.

Aldaketa hauek toxinak kontzentrazioarekiko duen portaera bifasikoaren erakusle dira. Honela, toxinak eragiten duen zundaren orekaren lekualdaketa mintzaren zurruntasunean duen efektuaren ondorioa izan daiteke.

Toxina kontzentrazioaren menpeko eragin desberdin hauek, toxinak kontzentrazioaren arabera konformazio desberdinak har ditzakeela adierazi dezakete. Hau honela balitz, toxina mintzetara batzean bi egoera ezberdin aurkeztuko liratezke. Batetik, toxina mintzean kontzentrazio baxuetan txertatzean, monomero "laxo" modura lotuko litzateke, hurbileko lipidoen mugikortasuna murriztuz eta ondorioz zundaren dimerizazioa bultzatuz. Bestetik, toxina kontzentrazio altuetan txertatzean, toxinak konformazio aldaketa jasongo luke, egitura konpaktuagoa (edo oligomeroa?) eskuratuz, eta honek okupatzen duen gunea txikiagoa izanik, zundaren oreka monomeroruntz desplazatuko luke.

Literaturan deskribatuta dago ACT-ak oligomeroak sortzen dituela mintzetan (Vojtova-Vodolanova eta lank, 2009). Honek gure egoera esperimentalean toxina kontzentrazio altuekin lortutako emaitzak balidatuko lituzke, nahiz eta entsegu gehiagoren beharra dagoen egoera hau guztiz ziurtatzeko. Ostera, toxina kontzentrazio baxuekin lortutako konformazioaren inguruko emaitzek ez dute, guk dakigun arte, literaturan aipamenik toxina honentzako, nahiz eta familia bereko beste toxina batek mintzean egitura laxoa bereganatzen duen hipotesia planteatu den (Soloaga eta lank., 1999).

Bukatzeko, ANTS/DPX askapen entseguek azaldu dugun ideia hau indartzen dutela esan daiteke, izan ere, prozezu litikoa mekanismo desberdinez gerta daitekeela pentsarazten dute toxina kontzentrazio desberdinekin lortutako emaitzek (**6. irudia**): toxina kontzentrazio baxuetan lortutako askapen datuak kurba sigmoide batera doitzen dira, kontzentrazio altuetan berriz ekuazio potentzial batera.

Laburbilduz, lan honetan ACTN482 mutanteak DOPC mintzetan konformazio desberdinak har ditzakenaren ideia proposatzen da, konformazio "laxo"-agoa kontzentrazio baxuetan eta konformazio trinkoagoa (oligomeroa?) kontzentrazio altuagoetan (**7. irudia**).



7. irudia. ACTΔN482 toxina mutanteak kontzentrazioaren arabera mintzean eskuratzen dituen konformazio ezberdinen hipotesia.

## BIBLIOGRAFIA

- Aramendia P.F., Krieg M., Nitsch C., Bittersmann E. and Braslavsky S.E. (1988). *Photochem. and Photobiol.* **48** (2): 187-194.
- Basler M., Masin J., Osicka R. and Sebo P. (2006). *Infect Immun.* **74** (4): 2207-2214.
- Basar T., Havlíček V., Bezousková S., Halada P., Hackett M. and Sebo P. (1999). *J. Biol. Chem.* **274** (16): 10777–10783.
- Bernik D., Tymczyszyn E., Edit Dario M. and Martín Negri R. (1999). *Photochem. and Photobiol.* **70** (1): 40-48.
- Dixit N.S. and Mackay R.A. (1983). *J. Am. Chem. Soc.* **105**: 2928-2929.
- Engelman D.M. (2005). *Nature.* **438**: 578-580.
- Kaschny P. and Goñi F.M. (1992). *Eur. J. Biochem.* **207**:1085-1091.
- Kuo C. and Hochstrasser R.M. (2001). *J. Am. Chem. Soc.* **133**: 4664-4667.
- Ladant D. and Ullmann A. (1999). *Trends Microbiol.* **7** (4):172-176.
- Martín C., Requero M.A., Masin J., Konopasek I., Goñi F.M., Sebo P. and Ostolaza H. (2004). *J. Bacteriol.* **186** (12): 3760-3765.
- Masín J., Konopásek I., Svobodová J. and Sebo P. (2004). *Biochim. Biophys. Acta.* **1660**: 144-154.
- Powthongchin B. and Angsuthanasombat C. (2007). *Arch. Microbiol.* **189**: 169-174.
- Singer S.J. and Nicolson G.L. (1972). *Science.* **175** (4023): 720-731.
- Soloaga A., Veiga M.P., García-Segura L.M., Ostolaza H., Brasseur R. And Goñi F.M. (1999). *Mol. Microbiol.* **31** (4): 1013-1024.
- Uribe K.B., Etxebarria A., Martín C. and Ostolaza H. (2013). *PLoS One.* **8** (6).
- Van der Goot F.G. and Harder T. (2001). *Semin. Immunol.* **13**: 89-97.
- Vojtova J., Kamanova J. and Sebo P. (2006). *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 69-75.
- Vojtova-Vodolanova J., Basler M., Osicka R., Knapp O., Maier E., Cerny J., Benada O., Benz R. and Sebo P. (2009). *FASEB J.* **23**: 2831-2843.
- Williamson P., Mattocks K. and Schlegel R.A. (1983). *Biochim. Biophys. Acta.* **732**: 387-393.