



Gradu Amaierako Lana
Biologia Gradua

**GIB-1aren Env gainazal proteinaren palmitoilazioak
duen eragina kolesterolaren elkarrekintzan.**

GIB-1aren Env fusio proteinaren ingurune lipidikoaren azterketa.

Egilea:

Sara Otaegi Ugartemendia

Zuzendaria:

Maier Lorizate Nogales

© 2020, Sara Otaegi Ugartemendia

Abstract

The Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection is the cause of the worldwide spread Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). HIV expresses a single viral glycoprotein in the viral membrane: envelope (Env). This glycoprotein is formed by a trimer formed by two subunits, a surface gp120 protein and a transmembrane gp41 protein. In HIV, the cytoplasmic domain (CTD) sequence of the gp41 protein is uncommonly long among other lentiviruses and highly conserved within HIV serotypes, suggesting possible essential function in HIV's life cycle. Preliminary results from the group show that the CTD is responsible for protein-cholesterol interaction and that such interaction is necessary for Env clustering within viral membrane. Moreover, clustering of Env has been proved to be a prerequisite for viral infection. Palmitoylation is thought to be one of the responsible factors for targeting membrane proteins, including Env, to cholesterol rich domains, commonly called, lipid rafts. However, studies were conducted by using DRM (Detergent Resistant Membrane) method which presents limitations in the establishment of a reliable direct association between proteins and lipid rafts. Since DRM extraction conditions can form new lipid-protein assemblies, the objective of this study was to clarify the role of palmitoylation in the interaction of the gp41 CTD-cholesterol *in vivo* by new techniques, such as, Click chemistry and radioactive photoactivable lipids. Experiments were performed with the HIV-1_{NL4-3} C762S mutant, which presents the substitution of the cysteine residue to serine in the 762nd position of the CTD, and therefore, it lacks of palmytoilation. The results of this scientific study demonstrate that the interaction of Env protein to cholesterol through the CTD is not due to palmitoylation, but direct domain-viral membrane interaction.

Keywords: HIV-1, Env, gp41, cytoplasmic domain, palmitoylation, Click chemistry, [³H]photocholesterol.

Laburpena

Giza Immunoeskasiaren Birusaren (GIBaren) infekzioa mundu osoan zehar zabalduko Hartutako Immuno Eskasiaren Sindromearen (HIESaren) kausa da. GIBaren mintzean jatorri birikoko proteina bakarra adierazten da: gainazal glikoproteina (Env). Env bi azpiunitatez osatutako trimero gisa txertatzen da mintzean: mintz kanpoko gp120 proteina eta gp41 transmintz proteina. GIBaren gp41 proteinak, *Lentivirus* generoko gainontzeko birus gehienek ez bezala, domeinu zitoplasmatiko (DZ) luzea du; gainera, GIBaren andui ezberdinetan sekuentzia sendoki kontserbatzen da. Honek, DZak GIBaren bizi-zikloan funtzio gakoa izan dezakeela iradokitzen du. Gure taldean burututako ikerketen emaitzek, Env proteinak kolesterolarekin elkar eragiteko gp41aren DZa nahitaezko eragilea dela frogatu dute, baita elkarrekintza hori Env proteina guztien taldekatzea (*clustering-a*) emateko beharrezkoa dela ere; gainera, Env azaleko glikoproteinen multzokatze hau ezinbestekoa da birusak infekzio gaitasuna eskuratu dezan. Palmitoilazioak proteinak, Env barne, kolesterolean aberatsak diren domeinuetara, baltsa lipidikoetara alegia, bideratzen dituenaren ebidentzia dago. Hala ere, ikerketa horiek detergenteekiko mintz erresistenteen (DRM, *Detergent Resistant Membrane*) metodoetan oinarrituta daude eta teknika honen mugak direla eta, ez dute zuzenki frogatzen baltsa lipidikoetarako asoziazioa. Izan ere, DRM erauzketa baldintzek lipido-proteina asoziazio berriak sortaraz ditzakete. Hala, lan honen helburua, gp41 proteinaren DZko palmitoilazioak Env-kolesterol elkarrekintzan daukan papera *in vivo* aztertzea da, klik kimika metodoaren eta lipido fotoaktibagarrien erabilerarekin. Esperimentuak gauzatzeko GIB-1_{NL4-3} C762S mutantea erabili da, zeinak 762. aminoazido posizioan zisteina serina ordezkapena duen eta beraz, palmitoilazioa galtzen duen. Ikerkuntza lan honek DZaren palmitoilazioa Env-kolesterol elkarrekintzaren erantzule ez dela frogatzen du, interakzioa DZaren eta mintzeko kolesterolaren artean zuzenean ematen delarik.

Hitz gakoak: GIB-1, Env, gp41, domeinu zitoplasmatikoa, palmitoilazioa, klik kimika, [³H]fotokolesterol.

Laburdurak

AIDS. *Acquired Immune Deficiency Syndrome.*

AME. *Amphotericin B methyl ester.*

CA. Kapside proteina (*Capsid*).

CCR5. *C-C chemokine receptor type 5.*

CD4. *Cluster of differentiation 4.*

COasa. Kolesterol oxidasa (*Cholesterol oxidase*).

CXCR4. *C-X-C chemokine receptor type 4.*

DNA. Azido desoxirribonukleikoa (*Deoxyribonucleic acid*).

DPM. *Dymethyl Pimelimidate Dyhydrochloride.*

DRM. Detergenteekiko mintz erresistenteak (*Detergent Resistant Membranes*).

DZ. Gp41aren domeinu zitoplasmatikoa.

EDTA. Azido etilendiaminotetraazetiko (*Ethylenediaminetetraacetic acid*).

Env. Gainazal glikoproteina (*Envelope*).

FBS. Behi-fetuaren seruma (*Fetal Bovine Serum*).

Gag. GIB heldugabearen poliproteina (*Group antigens*).

GIBa. Giza Immunoeskasiaren Birusa.

Gp120. Mintz kanpoko proteina (*Glycoprotein 120*).

Gp160. Env glikoproteinaren aitzindaria (*Glycoprotein 160*).

Gp41. Transmintz proteina (*Glycoprotein 41*).

HAART. Farmako antieretrobiralen konbinazioa (*Highly Active Antiretroviral Therapy*).

HBS. *HEPES Buffered Saline.*

HEPES. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.

HIESa. Hartutako Immuno Eskasiaren Sindromea.

HIV. *Human Immunodeficiency Virus.*

IgG. Immunoglobulina G.

IN. Integrasa proteina.

IP. Immunoprezipitatua.

LB. *Luria broth.*

LLP. *Lentiviral Lytic Peptide.*

LTR. *Long Terminal Repeat.*

MA. Matrize proteina (*Matrix*).

Nef. *Negative factor.*

PBS. *Phosphate-Buffered Saline.*

Pol. GIBaren poliproteina (*Polimerase*).

PR. Proteasa proteina (*Protease*).

RAFI. *Rigid amphipathic fusion inhibitors.*

Rev. *Regulator of Expression of Virion proteins.*

RIPA. *Radioimmunoprecipitation assay buffer.*

RNA. Azido erribonukleikoa (*Ribonucleic acid*).

rpm. *Revolutions Per Minute.*

RT. Alderantzizko transkriptasa (*Reverse Transcriptase*).

SD. Desbiderapen estandarra (*Standar Deviation*).

SN. Gainjalkina (*Supernatant*).

SERINC5. *Serine incorporator protein 5.*

ssRNA. Harizpi bakarreko RNA (*Single-stranded RNA*).

STED. *Stimulated Emission Depletion.*

Tat. *Trans-Activator of Transcription.*

TBST. *Tris-Buffered Saline Tween.*

Vif. *Viral infectivity factor.*

Vpr. *Viral Protein R.*

Vpu. *Viral Protein U.*

WT. Basatia (*Wild type*).

Hitzaurrea

SARS-CoV-2 birusak eragindako pandemiaren aurrean ezarritako larrialdi egoerak ez du Gradu Amaierako Lan (GrAL) honen gauzatzean garrantzizko eraginik izan.

Graduko bigarren mailatik Maier Lorizate Nogales doktorearen ikerketa taldeko partaideak izanik, teknika esperimentalen ezagutza aurretiaz eskuratu eta GrALerako aurkeztutako ikerketa proiektuak barne hartzen duen lan esperimental larrialdi egoera ezarri aurretik amaitu zen.

Aurkibidea

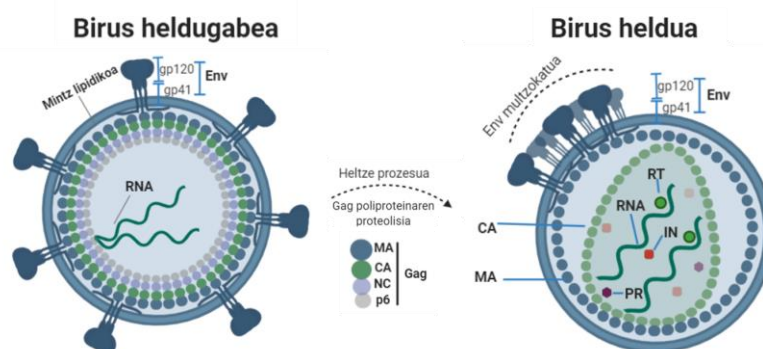
1. SARRERA	1
1.1. GIBaren mintzaren ezaugarriak	2
1.2. Env proteina	2
1.2.1. Gp41aren DZaren inguruko ikerketaren taldeko emaitzak	4
1.2.2. Gp41aren DZaren palmitoilazioa	4
1.3. Helburuak	5
2. MATERIAL ETA METODOAK	6
2.1. Zelula-lerroak eta zelulen hazkuntza	6
2.2. Plasmidoak	6
2.2.1. Plasmidoen ekoizpena eta purifikazioa	6
2.3. Birus partikulen ekoizpena	7
2.3.1. Transfekzioa	7
2.3.2. Birusaren purifikazioa	7
2.4. Western blot	8
2.4.1. Birusaren kuantifikazioa anti-CA Western blot bidez	9
2.5. Immunoprezipitazioa	9
2.5.1. Chessie-8 antigorputzaren akoplamendu kobalentea sefarosazko bolatxoetara	9
2.5.2. Gp41 proteinaren immunoprezipitazioa	10
2.6. Klik kimika bidezko azido palmitikoaren detekzioa	11
2.7. Proteina-lipido interakzioen detekzioa molekula fotoaktibagarrien bidez	12
2.8. Datu estatistikoaren balorazioa	13
3. EMAITZAK	14
3.1. C762S ordezkapenaren eragina gp41aren palmitoilazioan	14
3.2. C762S ordezkapenaren eragina Env glikoproteina birusean txertatzean	15
3.3. C762S ordezkapenaren eragina gp41-kolesterol elkarrekintzan	16
4. EZTABAIDA	17
5. ONDORIOAK	19
6. ESKER ONAK	20
7. BIBLIOGRAFIA	20
8. ERANSKINAK	24
1. Eranskina. Gp41aren DZaren eta kolesterolaren arteko elkarrekintzaren azterketaren emaitzak	24
2. Eranskina. Material eta metodoetako informazio gehigarria	24

1. SARRERA

Giza Immunoeskasiaren Birusaren (GIBaren) infekzioa Hartutako Immuno Eskasiaren Sindromearen (HIESaren) kausa da. GIBak T CD4+ linfozitoak infektatzen ditu nagusiki, eta T CD4+ zelulen ahitze progresiboa eragiten du, erantzun immunearen disfuntzioa ekarriz eta infekzio oportunisten aurreko sentikortasuna emendatuz (Okoye & Picker, 2013). GIBaren infekzioa HAART (ingelesez, *Highly Active Antiretroviral Therapy*) farmako antieretrobiralen konbinazioz tratatzen da (Eggleton & Nagalli, 2020), zenbait birusetan detektatutako farmako espezifikoko erresistentziaren aurrean tratamenduaren eraginkortasuna bermatzeko. Egun, ez dago GIBaren aurkako prebentzio txertorik eta GIBaren infekzioak mundu mailako osasun mehatxu larria izaten jarraitzen du. UNAIDSek plazaratutako datuen arabera, 2018. urtean, 770 mila pertsona hil ziren HIESa pairatuta eta urte horretan, 1,7 milioi infektatu berri diagnostikatu ziren.

GIBa *Retroviridae* familiako eta *Lentivirus* generoko birusa da, estalki lipidikoduna eta ~100-150 nm-ko diametroa duena (Merk & Subramaniam, 2013). Bi GIB talde bereizten dira, GIB-1 eta GIB-2, baina GIB-1 mundu osoko pandemiaren kausa denez, ikerketa gehienak GIB-1 taldeko anduiekin burutzen dira (Hemelaar, 2012).

Erretrobirusa izanik, informazio genetikoa bi harizpi bakarreko RNA (ssRNA) molekuletan du gordeta. Bertan kodetuta dauden proteinen artean, bi proteina estruktural daude: Gag poliproteina, morfogenesiaz arduratzen dena (1. Irudia) eta Env fusio glikoproteina, zelula ostalaria ezagutzeaz eta bertan sartzeaz arduratzen dena. Bestalde, *Pol* geneak biruserako ezinbesteko entzimak kodetzen ditu (proteasa, PR; alderantzizko transkriptasa, RT; eta integrasa, IN). Gainera, ssRNA genomak ondoko elementu erregulatuzaileen sekuentziak daude: Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr eta Vpu (Li, 2015).



1. Irudia. **GIBaren morfogenesi prozesua.** Birus heldugabeetan, Env gainazal glikoproteinaren (gp120 mintz kanpoko proteinaz eta gp41 transmintz proteinaz osatuta) sakabanaketa uniforme da gainazal osoan. Gemazioarekin batera edo handik gutxira, GIB partikula heldugabeetan, mintz lipidikoaren barnealdeari asoziatuta dagoen Gag poliproteinaren proteolisia ematen da (matrix, MA; kapside, CA; nukleokapside, NC; eta p6 proteina) birusaren proteasari (PR) esker, eta konformazio heldua eta infekzio gaitasuna eskuratzen du. Prozesamendu honek eta, batez ere, MA eta CA proteinen banantzeak birusaren berrantolaketa eragin eta Env-

aren multzokatzea bideratzen du. Birus helduak, mintzari barnealdetik asoziatuta MA proteina du eta nukleokapsida inguratzen, CA proteinaz osatutako kapsida ikosaedrikoa. Nukleokapsidaren barnean, bi ssRNA molekula ditu, bizi-zikloa burutzeko beharrezkoak diren entzima eta proteinak kodetzen dituztenak.

1.1. GIBaren mintzaren ezaugarriak

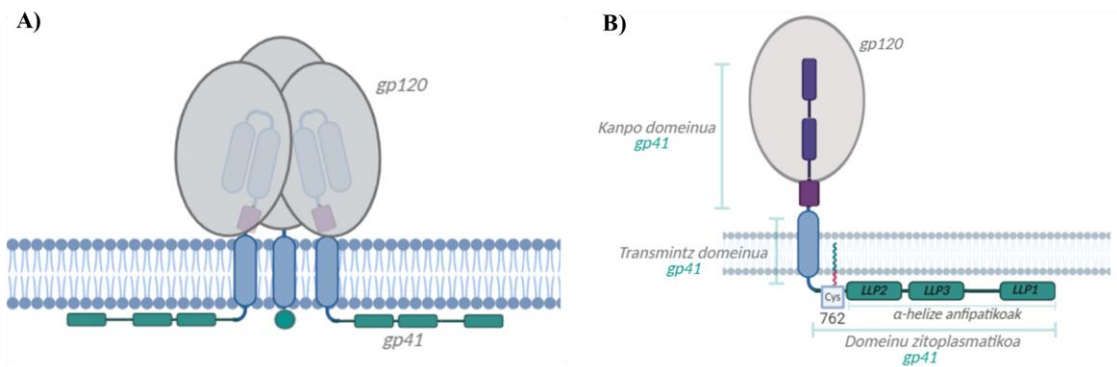
GIBak zelula ostalariaren mintz plasmatikoa erabiltzen du partikula birikoaren estalkia eratzeko. Hala ere, ostalariaren mintz plasmatikoa eta GIB-1aren estalkiaren konposizioan desberdintasun esanguratsuak daude (Lorizate et al., 2009, 2013). GIB-1aren mintza baltsa lipidikoetan ohikoak diren lipidoetan aberastuta dago, besteak beste, esfingomielina, gantz azido asedun fosfolipido, eta fosfatidilserina bezalako lipidoetan. Gainera, baltsa lipidikoen osagai nagusia eta ezinbestekoa den kolesterolak, birusaren lipidoen ia % 50a osatzen du. Aipatutako ezaugarriek, birusaren mintzak eta baltsa lipidikoen edo kolesterolean aberastutako nanodomeinuen egitura antzekoa dutela erakusten dute (Lorizate et al., 2009). Horregatik, birusen gemazioa nanodomeinu hauetatik ematen dela onartzen da.

Baltsa lipidikoak nanodomeinu oso espezializatuak dira eta prozesu fisiologiko anitzetan parte hartzen dute, horien artean, seinale transdukzioan, T linfozitoen aktibazioan eta birusen morfogenesisian (Rouso et al., 2000). GIB-1 partikulek infekzio gaitasuna bereganatzeko, Env proteina zelula ostalariaren mintz plasmatikoko baltsa lipidikoetan txertatzea beharrezkoa da (Pezeshkian et al., 2019).

Campbell et al. ikerketan, GIB-1ak infekzio gaitasuna lor dezan kolesterola ezinbesteko osagaia dela ondorioztatu zen, GIB-1aren kolesterola % 40-60an murrizteak infekzio gaitasunaren % 50eko jaitsiera eragiten baitu (Campbell et al., 2002). Gainazal lipidikoa duten birus gehienek (influenzak, Measles birusak, Semliki Forest birusak, Dendai birusak, Sindbis birusak eta estomatitis besikularraren birusak, besteak beste), mintzean kolesterol kantitate handiak izaten dituzte. GIB-1aren kasuan, kolesterola birus honen bizi-zikloko etapa ezberdinetan beharrezko dela frogatu da, hala nola, erreplikazioan, ostalariaren sarreran, birus partikularen muntaketan eta horien askapenean (Campbell et al., 2002).

1.2. Env proteina

Env geneak gp160 proteina aitzindaria kodetzen du. Zelula ostalariaren proteasen bidez gp120 mintz kanpoko proteina eta gp41 transmintz proteina banatzen dira, eta hauek ez-kobalentekei lotzen dira Env proteina trimerikoaren azpiunitate bat osatzeko (2.A eta 2.B Irudiak). Env gainazal proteinak zelula ostalariaren CD4 hartzailea eta CXCR4 edo CCR5 ko-hartzaileak ezagutu, horietara lotu eta mintzen fusioaren bidez ostalariaren barnera sartzea du funtzio (Li, 2015; Postler & Desrosiers, 2013; Yang et al., 1995).



2. Irudia. **Env glikoproteinen egitura.** **A)** Env proteinaren konformazio tridimentsionalaren eskema, proteina heterotrimeriko gisa mintzean txertatua, gp120 eta gp41 azpiunitateekin. Gp41aren kanpo domeinua gp120aren azpian mantentzen da, gp120 CD4 hartzaileetara eta CXCR4 edo CCR5 ko-hartzaileetara lotu arte. Orduan, gp120 proteinaren konformazioa aldatu eta gp41 agerian geratzen da. **B)** Env proteinaren gp120 eta gp41 azpiunitateak, eta gp41aren eskualde eta domeinuen banaketa: kanpo domeinua, transmintz domeinua eta domeinu zitoplasmatikoa (DZa). DZan hiru α -helize anfipatikoa (LLP) bereizten dira. DZko zisteina palmitoilatua LLP2 α -helize anfipatikotik gertu, 762. aminoazido posizioan kokatzen da.

Beste lentivirus edo estalki lipidikodun birusek ez bezala, GIB-1ak 7-14 Env trimero soilik adierazten ditu mintzean (Chertova et al., 2002; Zhu et al., 2003). Hots, GIBa salbuespena da, gainazal proteinak, orohar, dentsitate handiagotan aurkitzen baitira. Mintzaren fusioa energetikoki garestia den prozesua izanik, GIB-lean Env gainazal proteinak modu berezian antolatzen dira ostalarira sartzeko eraginkortasuna bermatzeko: heltze prozesuan guztiak multzokatu egiten dira (1. Irudia), sarrera foko bakarra lortu eta Env trimero ezberdinek elkarrengaitan dute ostalariaren mintzarekin fusioa erraztuz (Chojnacki et al., 2012).

GIB-lean, *Lentivirus* generoko gainontzeko birus gehienetan ez bezala, Env glikoproteinen gp41 azpiunitateak domeinu zitoplasmatikoa (DZ) luzea du (Vzorov et al., 2007). Hala, DZak GIBaren bizi-zikloan funtzio gakoa izan dezakeela ondorioztatzen da (Murakami & Freed, 2000).

Hain zuzen ere, gp41aren DZak, morfogenesi prozesuko Env proteinaren taldekatzean aktiboki jarduten duela frogatu da. STED (ingelesetik, *Stimulated Emission Depletion*) superreresoluzio fluoreszentsia mikroskopio bidez, Env proteinaren multzokatzeari birusaren heltze prozesuan ematen dela ikusi da (Chojnacki et al., 2012). Hasieran, Env trimeroak ostalariaren mintzeko gemazio guneetan, baltsa lipidikoetan edo kolesterolean aberatsak diren domeinuetan, kontzentratzen dira. Gemazioa ematen den bitartean, birus heldugabearen, Env proteina gainazal lipidiko osoan zehar sakabanatuta kokatzen da, mintzaren barnealdeko Gag poliproteinen sare zurrunera eutsita (1. Irudia) (Chojnacki et al., 2012). Gemazioa ematen denean, proteasak aktibatuta eta Gag poliproteinen ebaketa ematen da. Honela, Env proteinak mugikortasuna lortzen du mintzean (Chojnacki et al., 2017) eta difusio bidez Env-aren taldekatzea ematen da, infekzio gaitasuna lortzen duen birus heldua bilakatzen delarik.

1.2.1. Gp41aren DZaren inguruko ikerketaren taldeko emaitzak

Gure ikerketa taldean aurrez burututako lanetan, kolesterolarekin interakzionatzen duen gp41 proteinaren DZaren eskualdea zehaztea lortu zen (Nieto-Garai, 2019; taldeko argitaratu gabeko lana). Elkarrekintza honen azterketa gp41aren DZko hiru α -helize anfipatikoetan (LLP sekuentzietan, ingelesez, *Lentiviral Lytic Peptides*) oinarritu zen (2.B Irudia). Izan ere, zenbait ikerketek LLP domeinuek gp41aren biruserako txertaketan eta birus eta zelula ostalariaren mintzen fusioan funtzio kritikoa jokatzen dutela iradokitzen zuten (Kalia et al., 2003; Piller et al., 2000; Srinivas et al., 1992; Zhu et al., 2007).

LLP sekuentzietan oinarritutako DZaren eta kolesterolaren arteko interakzioaren ikerketarako bi mutante diseinatu ziren: Δ DZ₈₁₁ mutantea, LLP1 sekuentzia falta duena, eta Δ DZ₇₅₀ mutantea, DZko LLP sekuentzia guztiak falta dituen (1. Eranskina, 1.A Irudia).

Gp41aren DZaren eta kolesterolaren arteko elkarrekintza *in vivo* aztertu zen, kolesterolaren analogoa den erradioaktiboki markatutako [³H]fotokolesterol molekula fotoaktibagarriaren bidez. Emaitzek Δ DZ₈₁₁ mutanteak birus basatiaren pareko interakzioa duela erakutsi zuten. Δ DZ₇₅₀ mutantean, ordea, kolesterolarekiko interakzioa % 30an murrizten zen (1. Eranskina, 1.B eta 1.C Irudiak). STED mikroskopioaren laguntzaz DZ-kolesterol elkarrekintzak Env proteinen taldekatzean eragin zuzena duela ere frogatu zen. Δ DZ₇₅₀ mutantean zein kolesterol oxidasaz (COasaz, ingelesez, *Cholesterol oxidase*) mintzeko kolesterola murriztuta zuten birusetan Env proteinen taldekatzea inhibitzen zela ikusi zen (Nieto-Garai, 2019; taldeko argitaratu gabeko lana). Laburbilduz, gp41aren DZ₇₅₁₋₈₅₄ domeinua kolesterolarekin elkarrekitearen erantzule dela ondorioztatu zen, baita Env-aren sakabanaketa zein taldekatzea bideratzen duela ere.

1.2.2. Gp41aren DZaren palmitoilazioa

Δ CT₇₅₀-ak, kolesterolarekin interakzioa galtzen duen mutanteak, 762. posizioan palmitoilatutako zisteina hondarra ere galdu duela kontuan hartuta eta proteinen palmitoilazioak, orohar, proteinen lokalizazio zein mintzeko albo garraioan duen eragina jakinda, gp41aren DZaren palmitoilazioa gure taldeko ikerketa itu bilakatu zen.

Palmitoilazioa ostalariaren Golgi aparatuan emandako itzulpen osteko eraldaketa da, non azido palmitikoa tioester loturaren bidez zisteinaren sulfhidrilo taldera lotzen den (Bhattacharya et al., 2004; Chan et al., 2005; Klug et al., 2017; Yang et al., 1995). Nahiz eta lentibirusen genomak oso moldakorrak izan, zisteina hondarrak nahiko kontserbatuta agertzen dira. Hain zuzen ere, sekuentzien erkaketari esker 762. posizioko zisteina hondarra ia GIB-1 guztietan kontserbatu dela frogatu da (Yang et al., 1995). Gure ikerketan erabilitako GIB-1_{NL4-3} anduiak 762. hondarrari dagokion zisteina bakarra du DZan (Chan et al., 2005). Zisteina hau DZko α -helize anfipatikoetatik oso gertu kokatzen da (2.B Irudia) eta zenbait argitalpenetan, honek gp41

proteinak mintzarekin dituen elkarrekintzetan parte hartzen duela proposatzen da (Bhattacharya et al., 2004; Rousso et al., 2000; Yang et al., 1995).

Yang et al. ikerlariak GIB-1_{HXB2} anduiaren DZko 762. eta 835. zisteina hondarrak palmitoilatuta zeudela frogatu zuten, eta hauek Env proteinaren mintzeko txertaketaren erantzule izan zitezkeela iradoki zuten (Yang et al., 1995). *Rousso et al.*-ek 762. eta 835. zisteinak serinarekin ordezkatzuz gero, gp160 proteina aitzindariaren mintzeko inkorporazioa eta aldi berean, birusaren infekzio gaitasuna 60 aldiz jaisten zela neurtu zuten (Rousso et al., 2000). Gp160 proteina aitzindariaren lokalizazioaren azterketak, ordea, lortutako emaitzen zein ondorioen adierazgarritasuna zalantzan jartzen du. Izan ere, birus helduetan gp160 proteina gp41 eta gp120 azpiunitate moduan prozesatuta aurkitzen da eta beraz, gp160a aztertuz ezin daiteke gp41aren palmitoilazioaren inguruko ondorio garbirik atera.

Bhattacharya et al.-ek ere palmitoilatu gabeko mutanteetan baltsa lipidoetako integrazioa txikitzen zela ikusi zuten (Bhattacharya et al., 2004). Hala ere, azken bi ikerketa hauetan (Bhattacharya et al., 2004; Rousso et al., 2000) erabilitako baltsa lipidikoen erauzketa metodoak ez du zuzenki frogatzen baltsa lipidikoetarako edo kolesterolean aberatsak diren domeinuetarako asoziaziorik. Ikerketa hauetan, hain zuzen ere, Env proteina baltsa lipidikoetan lokalizatzen dela ondorioztatzeko, Env proteina DRMetan erauzten den aztertu zuten. DRMak mintz zelular edo biralak detergente ez-ionikoekin 4 °C-tan tratatuz lortzen diren mintz zatiak dira. Metodo horretako erauzketa baldintzek (hotzak eta detergenteen erabilerak), ordea, jatorrizko mintzeko lipidoak berrantolatu eta naturalki ematen ez diren lipido eta proteinen arteko asoziazioak sortarazi ditzakete. Beraz, DRMek baltsa lipidiko nanodomeinuen lipidoen eta proteinen konposizio antzekoa izan arren, DRM horietan Env proteina detektatzeak ez du zuzenki frogatzen Env proteina kolesteroletan aberatsak diren nanodomeinuetara asoziatuta dagoenik.

1.3. Helburuak

Gp41 proteinaren DZ₇₅₁₋₈₅₄ domeinua kolesterolarekin elkarrekitearen erantzule dela jakinik eta orain arte argitaratutako palmitoilazioaren mintzeko asoziazioaren inguruko ikerketen mugak kontuan hartuta, ikerketa proiektu honen helburua GIB-1aren gp41aren DZko palmitoilazioa kolesterolarekin elkarrekintza ezartzearen erantzule den zehaztea da *in vivo* birusaren mintzean. Helburu zehatzak ondorengoak dira:

1. C762S ordezkapenaren eragina gp41aren palmitoilazioan
2. C762S ordezkapenaren eragina Env glikoproteinaren biruserako txertatzean
3. C762S ordezkapenaren eragina gp41-kolesterol elkarrekintzan

2. MATERIAL ETA METODOAK

2.1. Zelula-lerroak eta zelulen hazkuntza

HEK 293T zelula-lerroa (*NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH*) *DMEM GlutaMAXTM High glucose* medioan mantendu zen (*Thermo Fisher Scientific*), % 10 behi-fetuaren serumarekin edo FBSrekin (*Fetal Bovine Serum, Thermo Fisher Scientific*) eta 100 U/mL penizilina-estreptomizina antibiotikoarekin (*Thermo Fisher Scientific*), 37 °C-tan, % 5 CO₂ eta hezetasunean.

HEK 293T zelulak bi-hiru egunetik behin altxatu eta 1:10 ratioan T75 flaskuetan hazi ziren. Lehendabizi, zelula hondakinak garbitzeko PBS indargetzailea (*Phosphate-Buffered Saline, Sigma-Aldrich*) erabili zen eta ondoren, tripsina-EDTA 1X (*Thermo Fisher Scientific*) bidez zelulak altxatu ziren. Esperimentuetarako *TC20TM Automated Cell Counter (Bio-Rad)* kontagailuan zelulak zenbatu eta zegokien plaketan kantitate zehatzetan ereini ziren.

2.2. Plasmidoak

Erabilitako plasmido probiral guztiak ez-infekziosoak ziren (1. Taula) eta transformatutako klonen hautaketarako anpizilinarekiko erresistentzia genea zuten.

1. Taula. **Esperimentuak burutzeko erabilitako plasmido probiral ez-infekziosoak.** WT=*Wild Type*.

Plasmidoa	gp41 mutazioa	Ezaugarriak
pCHIV WT	WT edo basatia	GIB-1 _{NL4-3} -ren proteina guztiak adierazten ditu, Nef salbu. Ez da bikoizteko gai ez dituelako LTR (<i>Long Terminal Repeat</i>) deituriko sekuentziak (Müller et al., 2004).
pCHIV C762S	C762S mutantea	pCHIV WT plasmidotik eratorria, palmitoilazioa ekiditeko, gp41 proteinaren DZko 762. posizioko zisteina hondarra serinaz ordezkaturia duena.

2.2.1. Plasmidoen ekoizpena eta purifikazioa

Plasmidoak kantitate handian ekoizteko, DH5α *Escherichia coli* bakterio konpetenteak transformatu ziren (Cohen et al., 1972). DH5α *E. coli* konpetenteen 50 µL izotzetan desizoztu, intereseko plasmidoaren (1. Taula) 0,5 µg gehitu eta 15 minutu izotzetan utzi ziren. Jarraian, *shock* termiko bidez plasmidoa bakterian barneratzeko, nahasketa 42 °C-tan 90 segundoz eduki eta izotzetan sartu zen bi minutuz. Jarraian, 100 µg/mL anpizilina zuen LB (*Luria broth*) agar plakan transformatutako bakterioak erein eta gehienez 15 orduz inkubatu ziren 37 °C-tan. Agar plakan isolatutako kolonia bat hautatu eta transformatutako bakterioak 500 mL anpizilina zuen LB medio likidoan (20 g/L LB eta 100 µg/mL anpizilina) hazi ziren 12 orduz 37 °C-tan eta mugimenduan.

Plasmidoaren purifikazioa NucleoBond® PC 500 (*Macherey-Nagel*) kit-a erabiliz burutu zen ekoizleak adierazitako argibideak jarraituz. DNA plasmidikoaren kontzentrazioa *NanoDrop Microwave Spectrophotometer* (*ThermoFisher*) espektrofotometroarekin neurtu zen, eta purifikazio maila egokia zela baieztatu ondoren, bere kontzentrazioa 1 µg/mL-ra egokitu zen H₂O ultrapurua disolbatzaile gisa erabiliz.

Plasmidoaren purifikazio kontrol gisa, purifikatutako DNA konstruktoa karakterizatu zen pCHIV plasmidoa zela egiaztatzeko. Horretarako, purifikatutako plasmidoaren 0,5 µg digeritu zen 1 µL HindIII endonukleasarekin ordubetez 37 °C-tan. Elektroforesia % 1 (p/v) agarosazko gelean burutu zen % 0,01 (v/v) SYBR Safe (*Thermo Fisher Scientific*) koloratzailea zuen TAE indargetzailerekin. Liseritutako DNA bandak *UV transilluminator* (*Scie-Plas*) erabiliz ikusarazi ziren eta esperotako banda patroiarekin bat zetoze frogatu zen (2. Eranskina 1. Irudia).

2.3. Birus partikulen ekoizpena

2.3.1. Transfekzioa

Birus partikulak lortzeko HEK 293T zelulak intereseko plasmido probiralarekin (1. Taula) transfektatu ziren kaltzio fosfatoaren metodoa erabiliz. Horretarako, CellPure® kaltzio kloruroa (CaCl₂, *Carl Roth*), ur ultrapurua (*Sigma-Aldrich*), CellPure® HEPES indargetzaile (*Carl Roth*) eta disodio fosfatoa (Na₂HPO₄, *Sigma-Aldrich*) erabili ziren.

Transfekzioa baino 24 ordu lehenago, 10 cm-ko diametroa zuten plaka bakoitzean 4 · 10⁶ HEK 293T zelula ereini ziren. Transfekzioa % 60ko konfluentzia-maila eskuratu zuten HEK 293T plaketan burutu zen. Transfekziorako plaka bakoitzeko 1 mL 0,25 M CaCl₂ eta 10 µg plasmido probiralekin nahastu, eta disoluzio honi, 1 mL 2X HBS (*HEPES Buffered Saline*, 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O, pH 7,1) tantaka gehitu zitzaion abiadura mantsoan irabiatzen zen bitartean. Disoluzioa giro tenperaturan 15 minutuz utzi zen, DNA kaltzio fosfatoarekin konjugatu zedin. Ondoren, plaka bakoitzari transfekzio nahasketaren 2 mL gehitu zitzaizkion tantaka, espiral baten itxura jarraituz, hazkuntza medioaren gainean. Azkenik, sei orduz transfekzio medioan inkubatu ondoren, medioa kendu eta kultibo medio berria gehitu zen.

2.3.2. Birusaren purifikazioa

Birusa purifikatzeko *Sucrose cushion concentration* edo sakarosa koltxoi bidezko birus partikulen kontzentrazio metodoa erabili zen (Welker et al., 2000). Transfekziotik 48 ordura, zelulen gutxi gorabeherako konfluentzia-maila ≤ % 90 zenean eta ekoiztutako partikula birikoak mediora askatu zirela jakinik, transfektatutako HEK 293T zelulen medioa jaso zen. Ondoren, 500 g-an bost minutuz zentrifugatu eta jarraian, gainjalkina 0,45 µm-ko porodun filtroetan (*Carl-*

Roth) iragazi zen. 6 mL % 20 sakarosa (*Thermo Fisher Scientific*) bolumen SW28.1 ultrazentrifuga tutuen (*Beckman Countier*) hondoan gehitu eta filtratutako 32 mL kultibo medioa kontu handiz gaineratu zen. 25.000 rpm-tan bi orduz zentrifugatu ziren 4 °C-tan Optima I-100 XP ultrazentrifugan, SW28.1 errotore egokiarekin. Zentrifugatu ondoren, kultibo medioa eta sakarosa kendu eta birus-jalkina HeNa indargetzailean (HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) berreseki zen. Birus alikuotak -20 °C-tan jaso ziren entsegu funtzionalak burutu behar zirenerako.

2.4. Western blot

Western blot teknika helburu ezberdinetarako erabili zen. Laginak zama indargetzailearekin (*Sample Buffer*; 312,5 mM Tris pH 6,8, % 10 SDS, % 50 glizerol, % 0,5 (p/v) bromofenol urdina eta 300 mM β-merkaptioetanola) nahastu ziren. Proteinak guztiz desnaturalizatu zitezten bost minutuz 95 °C-tan eduki ostean, % 12,5 poliakrilamidadun SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) bidez bereizi ziren, 120 V-tan ordubetez. Markatzaile gisa *Dual color* (*Bio-Rad*) erabili zen. Ondoren, proteinak Immobilon®-FL (*Merck*) mintzera transferitu ziren *Semi-Dry Western Blotting* teknikaren bitartez, transferentzia-kasetean (*Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*, *Bio-Rad*) ordubetez 15 V-etan. Mintza Odyssey blokeo indargetzailean (*LI-COR*) eduki zen ordubetez giro tenperaturan eta irabiatzen. Ondoren, antigorputz primario egokia Odyssey blokeo indargetzailean diluitu eta inkubatzen utzi zen. Gp41aren detekziorako, antigorputz primario gisa anti-gp41 Chessie-8 erabili zen eta gau osoan zehar 4 °C-tan utzi zen (2. Taula). Birusaren kuantifikaziorako, aldiz, anti-CA eta anti-MA antigorputzak ordu betez giro tenperaturan inkubatu ziren (2. Taula). TBST indargetzailea (*Tris-Buffered Saline Tween*, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, % 0,2 (p/v) Tween 20, pH 8) erabiliz egindako hiru garbiketen ondoren, mintza antigorputz sekundarioarekin inkubatu zen (Odyssey blokeo indargetzailean, % 0,1 Tween 20 eta % 0,01 SDS, *Merck*) 45 minutuz, giro tenperaturan eta irabiatzen (3. Taula). Azkenik, TBST erabiliz hiru garbiketa egin ziren eta mintza TBS indargetzailean gorde zen 4 °C-tan. Proteinaren detekzioa antigorputz sekundarioari konjugatutako kromoforo infragorriaren bidez burutu zen *LI-COR Odyssey imaging system*-an, kanal berdea (800 nm) eta gorria (680 nm) erabili zirelarik.

2. Taula. Western blot teknikan erabilitako antigorputz primarioak. CA=kapside, MA=Matrix.

Esperimentua	Antigorputza	Non ekoitzia	Erabilitako diluzioa	Etxe komertziala
Gp41aren detekzioa	Anti-gp41 Chessie-8	Xagua	1:2000	NIH AIDS reagent program
Birusaren kuantifikazioa	Anti-CA	Ardia	1:2000	Hans-Georg Kräusslich-ren lagapena
	Anti-MA	Untxia	1:5000	Hans-Georg Kräusslich-ren lagapena

3. Taula. **Western blot teknikan erabilitako antigorputz sekundarioak.** IgG= Immunoglobulina G.

Esperimentua	Antigorputza	Non ekoitzia	Erabilitako diluzioa	Etxe komertziala	Detekzioa (Fluoreszentzia infragorria)
Gp41aren detekzioa	Xaguaren IgG	Astoa	1:15000	LI-COR (#926-32212)	IRDye800 (berdea)
Gp41 palmitoilatuaren + gp41aren detekzioa	Xaguaren IgG	Astoa	1:15000	LI-COR (#926-68072)	IRDye680 (gorria)
Biruaren kuantifikazioa	Ardiaren IgG	Astoa	1:15000	Rockland (613-732-168)	IRDye800 (berdea)
	Untxiaren IgG	Astoa	1:15000	LI-COR (#926-68073)	IRDye680 (gorria)

2.4.1. Birusaren kuantifikazioa anti-CA Western blot bidez

Purifikazio prozesu bakoitzean lortutako birus kantitatea aldatzen denez, birus partikulak purifikatzen ziren aldiro, lortutako birus kantitatea kuantifikatzen zen anti-CA Western blot bidez (2. Eranskina, 2.A Irudia). Partikula biriko bakoitzeko 2.500 CA molekula daudela estimatzen denez (Briggs et al., 2004), CA kopurua jakiteak birusen kontzentrazioaren inguruko informazio fidagarria eta egonkorra ematen du.

Estandar gisa kontzentrazio jakineko CAren diluzio seriatuak erabili ziren (Hans-Georg Kräusslich doktorearen lagapena, *University Hospital of Heidelberg, Germany*). CA estandarrak eta lortutako birus laginen diluzio seriatuak gelean kargatzen ziren. Antigorputz primario gisa anti-CA (ardia) eta anti-MA (untxia) antigorputzak erabili ziren (2. Taula). MA proteinaren detekzioa kontrol gisa erabili zen. Antigorputz sekundario bezala, ardiaren IgG IRDye800 eta untxiaren IgG IRDye680 erabili ziren (3. Taula). *LI-COR Odyssey imaging* sisteman detektatutako estandarren CA seinalearen intentsitatearekin zuzen patroia lortu eta lortutako birus partikulen CA kantitatea, zuzen patroian banden seinale intentsitatea ordezkatzuz kalkulatu zen (2. Eranskina, 2.B Irudia).

2.5. *Immunoprezipitazioa*

Immunoprezipitaziorako G proteinadun sefarosazko bolatxoak (*Protein G Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare*) anti-gp41 Chessie-8 antigorputzarekin lotu ziren. Gp41 proteinaren detekziorako antigorputzaren kate astunaren seinaleak (~50 kDa) immunoprezipitatutako gp41aren seinalearekin (~41 kDa) interferitu ez zezan, antigorputz eta bolatxoen arteko lotura kobalentea bermatu zen.

2.5.1. Chessie-8 antigorputzaren akoplamendu kobalentea sefarosazko bolatxoetara

Sefarosazko bolatxoen 50 µL-ko alikuotak prestatu ziren. Hiru aldiz garbitu ziren 500 µL RIPA lisi indargetzailearekin (*Radioimmunoprecipitation assay buffer, 20 mM HEPES, 100 mM*

NaCl, 5 mM EDTA (Azido etilendiaminotetraacetiko, ingelesez, *Ethylenediaminetetraacetic acid*), % 0,5 (p/v) sodio deoxikolato, % 1 (p/v) tritoi X-100, pH 7,4) 13.000 rpm-ra zentrifugatuta bost minutuz. Ondoren, anti-gp41 Chessie-8 antigorputzaren 10 µg gehitu zitzairen eta gau osoan inkubatzen utzi ziren 4 °C-tan irabiatuz, antigorputzak sefarosazko bolatxoetako G proteinetara lotu zitezten. 13.000 rpm-tan minutu batez zentrifugatu ziren eta bi aldiz borato indargetzailean (0,2 M Na₂B₄O₇ eta 0,2 M H₃BO₃, *Carl Roth*) garbitu ziren. Ondoren, 1 mL DPM borato indargetzailean (5,184 mg/mL DPM, *Dymethyl Pimelimidate Dyhydrochloride*, 0,2 M Na₂B₄O₇ eta 0,2 M H₃BO₃, *Fluka Biochemika*) berreseki ziren, 30 minutuz giro tenperaturan irabiatuz utzi aurretik. Jarraian, momentuan prestatutako etanolamina indargetzailean (0,2 M etanolamina pH 8, *Fluka Biochemika*) bi aldiz garbitu eta 1 mL etanolamina indargetzailean inkubatu ziren bi orduz giro tenperaturan eta irabiatuz. Azkenik, 500 µL RIPA lisi indargetzailearekin hiru aldiz garbitu eta indargetzaile honetan 4 °C-tan gorde ziren.

Immunoprezipitazio esperimentuak burutu aurretik (2.5.2 atala), sefarosazko bolatxoan eta antigorputzaren arteko lotura kobalentea frogatzeko, alikuota bat lisatutako birus laginarekin immunoprezipitatu (2.5.2 ataleko protokoloa jarraituz) eta beste alikuota bat kontrol negatibo gisa erabiliz, Western blot-a burutu zen (2. Eranskina, 3. Irudia). Lotura kobalentea behar bezala eman bazen, Western blot-aren kontrol negatiboaren kalean, ~50 kDa inguruan, ez zen bandarik agertuko eta ~25 kDa inguruan, anti-gp41 Chessie-8 antigorputzaren kate arinena soilik detektatuko zen. Lotura kobalentea eman ezean, bi banda behatuko ziren: bata, anti-gp41 Chessie-8aren kate astunari zegokiona (~50 kDa) eta bestea, haren kate arinari zegokiona (~50 kDa) (2. Eranskina, 3. Irudia).

2.5.2. Gp41 proteinaren immunoprezipitazioa

Gp41 proteina immunoprezipitatzeko, 1 µg CAri zegokion birus bolumenari 200 µL RIPA lisi indargetzaile gehitu zitzaion eta proteinen degradazioa ekiditeko, RIPA lisi indargetzaileari proteasen inhibitzaileak (*Sigma-Aldrich*) gehitu zitzaizkion. Birusen lisirako, laginak 4 °C-tan ordubetez irabiatzen eduki ziren eta bost minutuz zentrifugatu ziren 13.000 rpm-tan. Birus laginaren gainjalkinaren 10 µL input gisa gorde ziren. Gainjalkinaren gainontzekoa, aurretik zentrifugatutako (13.000 rpm-tan, bost minutuz) eta 2.5.1. atalean ekoizitako sefarosazko bolatxoan jalkinaren gainean (50 µL alikuota bakoitzeko) gehitu eta gau osoan zehar inkubatu ziren 4 °C-tan mugimendu konstante batean, antigorputzaren eta gp41aren arteko ezagutza bermatzeko. Hurrengo egunean, sefarosazko bolatxoak eta haiei loturiko gp41 proteina zuten laginak hiru aldiz garbitu ziren 500 µL RIPA lisi indargetzailearekin 6.500 rpm-tan bost minutu zentrifugatuz.

Input laginei 30 μL eta immunoprezipitatutako laginei 40 μL zama indargetzaile gehitu eta 95 $^{\circ}\text{C}$ -tan bost minutuz inkubatu ziren. Honela, input-eko proteinak desnaturalizatzea eta sefarosazko bolatxoetara lotutako gp41 proteina askatzea lortu zen. Ondoren, immunoprezipitatutako lagina soilik, 6.500 rpm-tan 10 minutuz zentrifugatu zen, gp41 proteina gainjalkinean aske geratu zedin eta jalkinean bolatxoei lotutako antigorputzak geratu zitezten. Input eta immunoprezipitatutako laginekin Western blot-a burutu zen (2.4. atala). Antigorputz primario gisa anti-gp41 Chessie-8 erabili zen (2. Taula) eta sekundario gisa, xaguaren IgG IRDye800 edo xaguaren IgG IRDye680 erabili ziren, kasuan kasu (3. Taula).

2.6. Klik kimika bidezko azido palmitikoaren detekzioa

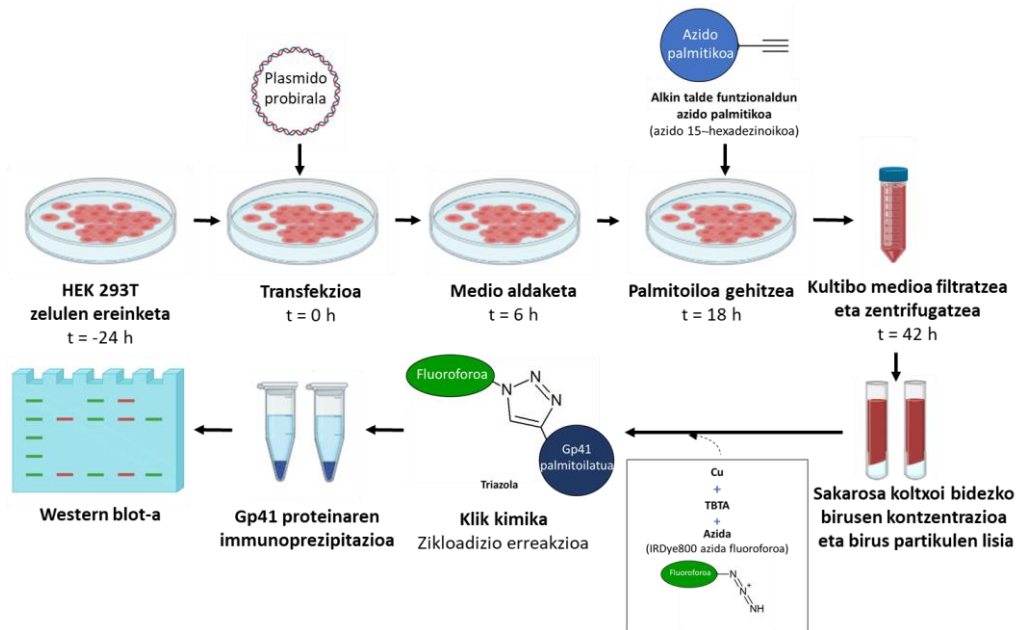
Palmitoiloaren detekzioa klik kimika (ingelesez, *Click chemistry*) izeneko teknikaren bidez burutu zen, kuprez katalizatutako alkin-azida zikloadizio erreakzioaren bidez, alegia. Azida talde funtzionaldun fluoroforoa erabili zen ω karbonoan alkin talde funtzionaldun azido palmitikoa (azido 15-hexadezinoikoa) *in vivo* detektatu, lokalizatu eta karakterizatzeko (3. Irudia).

Azido palmitiko funtzionalizatua Xabier Contreras doktoreak sintetizatu zuen (Biofisika Institutua, CSIC-EHU). Transfekzioa eman eta 18 ordura 500 μM azido palmitiko funtzionalizatu gehitu ziren kultibo medioan; hau da, *DMEM GlutaMAXTM High glucose* kultibo medioa, % 10 behi-fetuaren serum edo FBS delipidatua (*Thermo Fisher Scientific*) eta 100 U/mL penizilina-estreptomizina (*Thermo Fisher Scientific*) zuen kultibo medioan. Alkin talde kimikoa duen palmitoilo analogoa palmitoilo biosintetikoaren moduan proteina zein lipidoetan txertatzen da.

2.3.2 atalean azaldutako pausuak jarraituz birusak purifikatu ziren. Klik erreakzioan indargetzaileen ioiek interferitu ez zezaten, birusak lisatzeko RIPA lisi indargetzailea EDTA gabe prestatu zen (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, % 0,5 (p/v) sodio deoxikolato, % 1 (p/v) tritoi X-100, pH 7,4). Laginak 200 μL RIPA lisi indargetzaile modifikatuan 4 $^{\circ}\text{C}$ -tan ordubetez lisatu eta klik erreakziorako erreaktiboak gehitu zitzaizkien ondorengo ordena jarraituz: 1 mM IRDye800 azida (*LI-COR Biosciences*), 0,1 mM TBTA (*Tris((1-benzyl-4-triazolyl)methyl)amine*, *Sigma-Aldrich*), 1 mM CuSO_4 (*Sigma-Aldrich*) eta 10 mM azido askorbiko (*VWR*). Laginak ordubetez, ilunpean, giro tenperaturan eta irabiatzen utzi ziren. Ondoren, 6.500 rpm-tan bost minutuz zentrifugatu eta PBSarekin bi garbiketa burutu ziren klik erreakzioko erreaktiboak kentzeko. Garbiketetarako Mg^{+2} eta Ca^{+2} gabeko PBS indargetzailea prestatu zen.

Jarraian, 2.5.2. ataleko pausuak jarraituz gp41a immunoprezipitatu zen. Laginei gainjalkina kendu eta 150 mM β -merkaptotanol zuen zama indargetzailearen 40 μL gehitu zitzaizkien. Bost minutuz berotu ziren 60 $^{\circ}\text{C}$ -tan, zama indargetzaile arrunta erabiliz, 95 $^{\circ}\text{C}$ -tan berotuz gero, gp41aren zisteinaren eta azido palmitikoaren arteko tioester lotura apurtuko bailitzake (Martin, 2013). Western blot-a burutzeko gainontzeko pausuak 2.4. atalean jarraitutakoak izan ziren. Gp41

palmitoilatuaren 800 nm-ko kanaleko seinalea (berdea) eta gp41 proteinarena gainjarri ez zitezen, anti-gp41 Chessie-8aren antigorputz sekundario gisa, xaguaren IRDye680 erabili zen (kanal gorria).



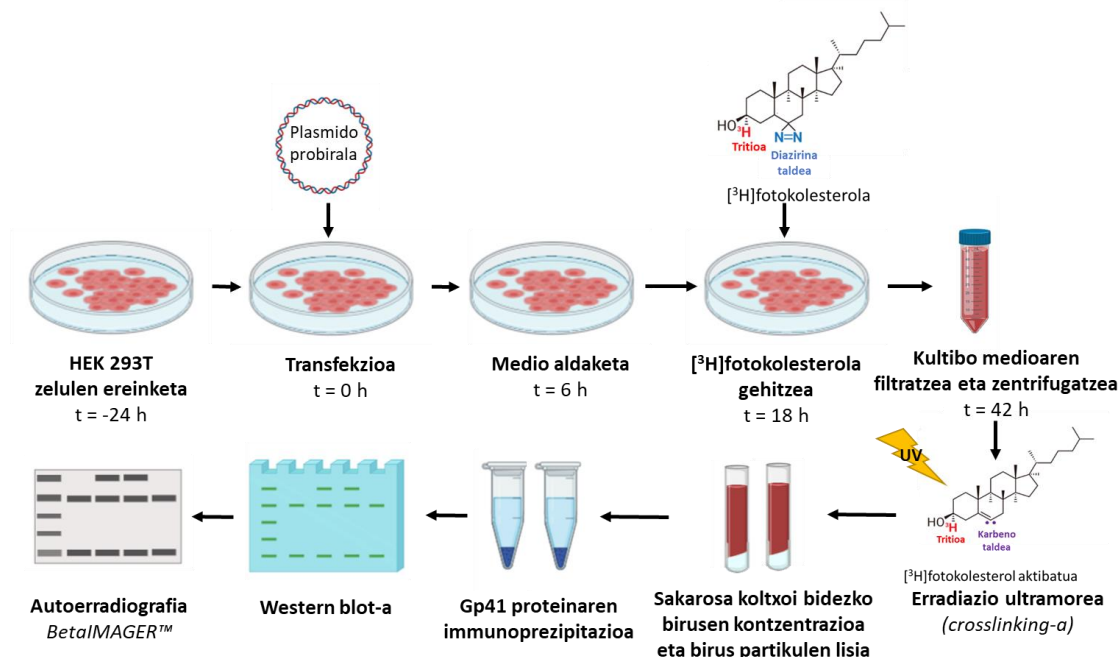
3. Irudia. **Klik kimikaren bidezko gp41 palmitoilatuaren detekzio teknikaren irudikapena.** Transfektatutako zelulei alkin talde funtzionaldun azido palmitikoa gehitu zitzaion. Birusak purifikatu, lisatu eta klik erreakzioa emateko erreaktiboak gehitu ziren: azida taldedun fluoroforoa, TBTA eta kuprea. Jarraian, gp41 proteina immunoprezipitatu eta klik erreakzioan emandako zikloadizio erreakzioari esker, gp41 palmitoilatuaren seinalea detektatu zen Western blot mintza errebelatzean.

2.7. Proteina-lipido interakzioen detekzioa molekula fotoaktibagarrien bidez

Gp41 proteinaren eta kolesterolaren arteko elkarrekintza *in vivo* molekula fotoaktibagarrien bidez burutu zen, Xabier Contreras doktoreak (Biofisika Institutua, CSIC-EHU) ekoiztutako diazirina talde funtzionaldun eta tritioz erradioaktiboki markatutako [³H]fotokolesterolaren bidez, hain zuzen ere (4. Irudia). Argi ultramorearen erradiaziopean (360 nm) diazirin taldeko elektroiak desparekatu eta karbeno talde erreaktiboak sortzen da, 3 Å baino gertuagoko molekuletara kobalentez lotzeko gai dena (Contreras et al., 2012; Haberkant et al., 2008; Thiele et al., 2000).

Transfekzioa eman eta 18 ordura 100 µCi [³H]fotokolesterol gehitu zen kultibo medio delipidatuan. Transfektatu eta 42 ordura, birusak mediora askatzen direla jakinik, kultibo medioa 500 g-an bost minutu zentrifugatu eta 0,45 µm-ko porodun filtroetan (*Carl-Roth*) iragazitako kultibo medioa 4 °C-tan bost minutuz erradiatu zen (360 nm uhin luzeran), lipido eta ondoko molekulen arteko elkargurutzamendua (*crosslinking*-a) eman zedin. Jarraian 2.3.2 atalean azaldu bezala birusak purifikatu eta anti-CA Western blot bidez birus partikulak kuantifikatu ziren (2.4.1. atala).

Ondoren, 2.5.2. ataleko pausuak jarraituta gp41aren immunoprezipitazioa burutu zen. Birus partikulen lisirako, RIPA lisi indargetzaile modifikatua erabili zen (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, % 0,5 (p/v) sodio deoxikolato, % 1 (p/v) tritoi X-100, pH 7,4). Anti-gp41 Chessie-8aren antigorputz sekundario gisa, xaguaren IRDye800 erabili zen. Gp41 proteinari loturiko kolesterol erradiaktiboaren detekziorako, Western blot-eko mintz bera lehortu eta autoerradiografiatu zen *BetaIMAGER*TM sisteman (*Biospace Lab*) 18 orduz esposizioan edukiz.



4. Irudia. Lipido fotoaktibagarrien bidezko gp41 proteinaren eta kolesterolaren arteko elkarrekintza detektatzeko teknikaren irudikapena. Transfektatutako zelulei [³H]fotokolesterola gehitu zitzairen. Birus partikulak askatu ziren medioa argi ultramoreaz erradiatu eta kolesterolaren analogo aktibatua inguruko edozein molekularekin lotura kobalenteak eratuko zituen. Ondoren, gp41 proteina immunoprezipitatu, Western blot-a burutu eta mintza *BetaIMAGER*TM-n autoerradiografiatu zen.

2.8. Datu estatistikoaren balorazioa

Analisi estatistiko guztiak SigmaPlot programaren bidez burutu ziren. Bi talde esperimental baino gehiago konparatzeko Tukey testa burutu zen. Bi laginen artean konparatzeko, berriz, Student's t-testa erabili zen. Analisi guztietan adierazgarritasun-estatistikoa p-balioaren bidez kalkulatu zen.

Datuak batez besteko balore eta ± desbiderapen estandar (±SD) moduan aurkezten dira. Esperimentu kopurua (n) parentesi artean adierazten da. Izartxoek (*, ** eta ***) adierazgarritasun estatistikoaren gradu desberdinak adierazten dituzte ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ eta $p \leq 0,001$, hurrenez hurren).

3. EMAITZAK

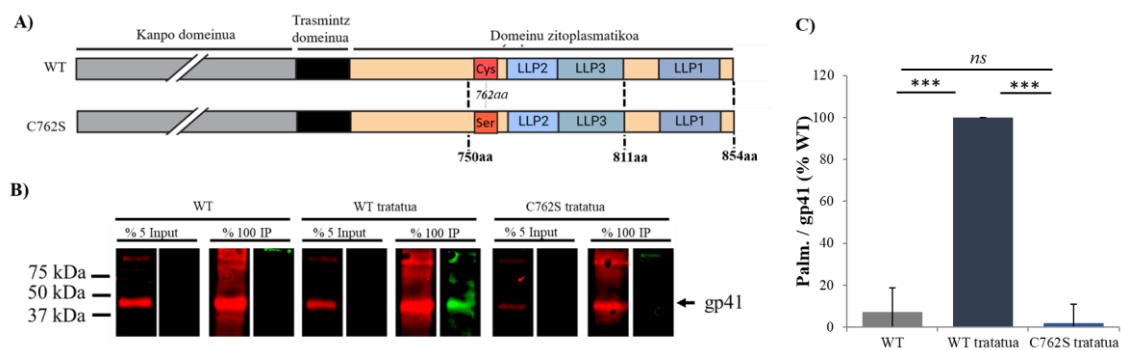
Ikerketa taldeko emaitzen arabera, Env gainazal proteinaren gp41 mintzeko azpiunitateak kolesterolarekin elkarrekiten du eta interakzio hori, gp41eko DZaren 751-854 aminoazido hondarren bitartez gertatzen da. Argitarapen batzuen arabera, DZko 762. posizioko zisteina palmitoilatuak gp41 proteina kolesteroletan aberatsa den eskualdeetara, baltsa lipidikoetara alegia, bideratzeaz arduratzen da. Hau jakinik, ikerketa honetan, DZko palmitoilazioa mintzeko DZ-kolesterol elkarrekintzaren erantzule den aztertu da *in vivo*, Env palmitoilatu gabe duen GIB-1_{NL4-3} C762S mutantearen bidez. Aldi berean, palmitoilazioaren galerak gp41 proteinaren mintzeko txertaketan eraginik duen ikertu da.

3.1. C762S ordezkapenaren eragina gp41aren palmitoilazioan

GIB-1_{NL4-3} C762S mutanteak 762. posizioko zisteina hondarra serinaz ordezkatu du (5.A Irudia). Mutante honetan tioester loturaren bidezko palmitoilazioa galtzen dela frogatzeko, klik kimika teknika erabili zen (3. Irudia): alkin talde funtzionala duen azido palmitiko analogoak edozein proteina palmitoilatu edota lipido ordezkatzeko ditu eta IRDye800 azida taldea duen fluoroforoaren bidez detektatzen da, alkin taldea kupredun medioan inkubatuz gero.

Western blot-ean lortutako emaitzetan, kontrol negatiboan (WT), seinale gorritz lortutako gp41aren bandan ez zen palmitoilaren seinale berderik behatu (5.B Irudia); andui basatiak (GIB-1_{NL4-3} WT) 762. zisteina hondarra palmitoilatu izan arren, palmitoilo funtzionalizaturik gehitu ez zenez, ezin baitzen seinale berderik igorri. Kontrol positiboan (WT tratatua), ordea, ~41 kDa inguruan banda berde bat detektatu zen andui basatiari (GIB-1_{NL4-3} WT) azido palmitiko funtzionalizatua gehitzean, 762. posizioko zisteina palmitoilatuak seinalea ematen baitzuen (5.B Irudia). C762S birus mutanteetan (GIB-1_{NL4-3} C762S), palmitoilo funtzionalizatua gehitu arren (C762S tratatua), ez zen bandarik behatu kanal berdean (5.B Irudia). Honela, GIB-1 andui basatiaren gp41 proteina ez bezala, C762S mutantean DZ palmitoilaturik ez zegoela ondorioztatu zen.

Western blot-ean palmitoilo funtzionalizatuak eta gp41 proteinak emandako seinalea kuantifikatu eta estatistikoki analizatu zen. Palmitoilaren seinalea gp41aren seinalearekiko erlatibizatu zen eta kontrol positiboari (WT tratatua) % 100 balioa emanaz normalizatu ziren emaitzak (5.C Irudia). Kontrol positiboan (WT tratatua) kuantifikatutako gp41 palmitoilatuaren banda seinalea estatistikoki esanguratsua zela frogatu zen. C762S mutantean, ordea, palmitoilaren seinalea baztergarria zen, izan ere, tratatu gabeko birus basatiaren (WT) eta C762S mutantearen (C762S tratatua) artean, ez zen desberdintasun esanguratsurik detektatu. Honela, C762S ordezkapenak gp41aren palmitoilazioa eragozten duela frogatu zen.

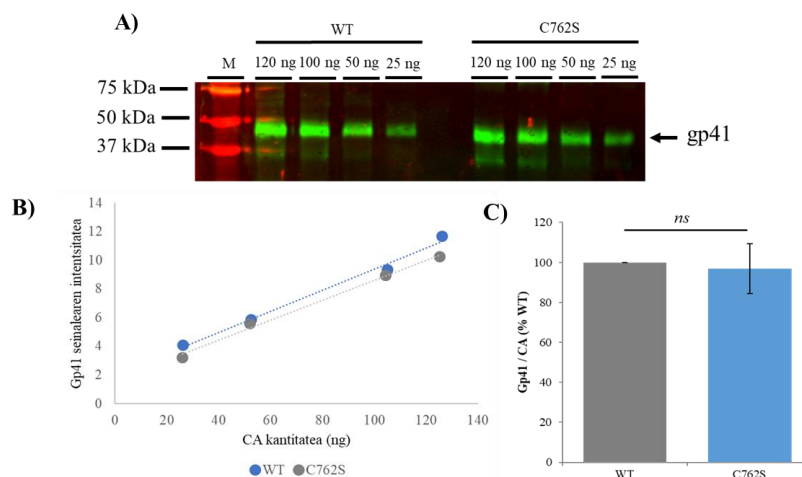


5. Irudia. **C762S ordezkapenaren eragina gp41aren palmitoilazioan.** IP=immunoprezipitatutako lagina; WT=birus basatia; ns=*non-significant*, ez-esanguratsua. **A)** Andui basatiaren eta C762S mutantearen gp41 proteinaren ilustrazio eskematikoa. **B)** C762S ordezkapenaren eragina aztertzeko gp41 proteinaren eta gp41 proteina palmitoilatuaren detektziorako Western blot analisia. Tratatu gabeko GIB-1 andui basatia (WT); eta palmitoilo funtzionalizatuaz tratatutako GIB-1 andui basatia (WT tratatua) eta GIB-1_{NLA-3} C762S andui mutantea (C762S tratatua). 1 µg CA birusen laginetik abiatuta. Ezkerreko kalean, gp41 proteinaren seinalea (gorria) anti-gp41 Chessie-8 antigorputz primarioarekin eta xaguaren IRDye680 antigorputz sekundarioarekin inkubatu ondoren. Eskuin kanalean, palmitoilo funtzionalizatuaren detekzioa IRDye800 azida fluoroforoaren seinalearen bidez (berdea) (n=3). **C)** Palmitoilo funtzionalizatuaren Western blot seinalearen kuantifikazioa. Palmitoiloaren seinalea gp41 proteina seinalearekiko erlatibizatua eta WT tratatuarekiko normalizatua. Lagin taldeak haien artean konparatzeko, Tukey testa burutu zen SigmaPlot programa estatistikoa; $p < 0,001$ adierazgarritasun estatistikoa *** izarrez adierazita. Zutabe bakoitzeko barrek batez bestekoaren desbiderapen estandarra (\pm SD) adierazten dute (n=3).

3.2. C762S ordezkapenaren eragina Env glikoproteina birusean txertatzean

Behin proteina mutanteak palmitoilorik ez duela frogatuta eta zenbait mutantek mintzeko Env kantitatean andui basatiarekiko aldakortasuna erakusten dutela jakinda, 762. posizioko zisteina-serina ordezkapenak izan dezakeen eragina aztertu zen. C762S mutantearen gp41 proteina kantitatea birus basatiaren gp41 kantitatearekiko normalizatu zen. Analisi honen aldakortasun intrintsekoa murrizteko, birus basatiaren eta C762S mutantearen CA kantitate ezberdinei zegozkien diluzioak kargatu ziren: 120, 100, 50 eta 25 ng CA, hurrenez hurren (6.A Irudia).

Gp41aren seinalea kuantifikatu eta gp41 proteinari zegokion banda bakoitzaren intentsitatea eta kargatutako CA kantitatea lotzen zituen erregresio lineal bat burutu zen (6.B Irudia). Gp41/CA ratioa, hots, zuzenaren malda erabili zen emaitza gisa, eta C762S mutantearen maldaren balioa andui basatiarekiko normalizatu zen. Birus basatiaren eta C762S mutantearen gp41 proteina kantitatearen artean ez zen desberdintasunik detektatu (6.C Irudia). Honela, hurrengo entsegu funtzionalean, detektatutako gp41aren seinalea diferentziala palmitoilazioaren eraginari egotzi ziezaiokeen zuzenean. Hortaz, 762 zisteina-serina ordezkapenak gp41 proteina kantitatean, eta beraz, gp41 proteina birusean txertatzean eraginik ez zuela frogatu zen.



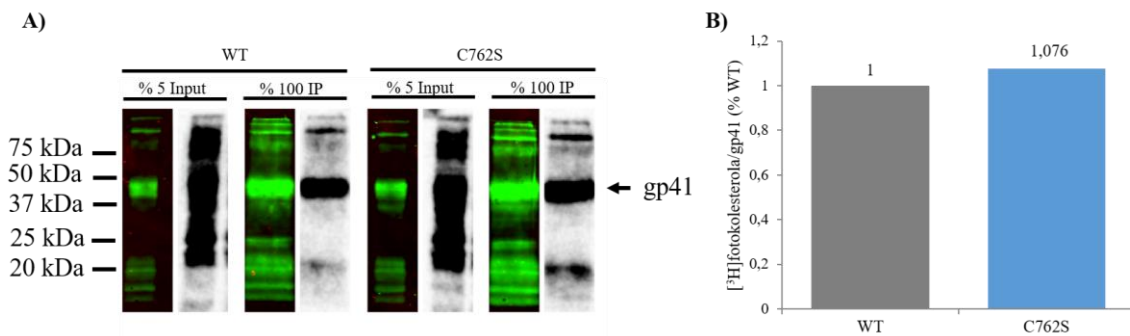
6. Irudia. **C762S ordezkapenaren eragina gp41 proteina birusean txertatzean.** WT=birus basatia, ns=*non-significant*, ez-esanguratsua. **A)** GIB-1_{NL4-3} WT birusaren eta GIB-1_{NL4-3} C762S mutantearen gp41 kuantifikaziorako Western blot analisia. Anti-gp41 Chessie-8 antigorputz primarioarekin eta xaguaren IRDye800 antigorputz sekundarioarekin inkubatu zen (n=3). **B)** Gp41 seinalearen eta CA kantitatearen arteko erregresio linealaren grafikoa. Birus basatiak (WT) eta mutanteak (C762S) emandako zuzenaren ekuazio maldak kalkulatu ziren. **C)** Birus basatiaren eta C762S mutantearen gp41/CA ratioa (erregresio linealaren malda) birus basatiarekiko normalizatua. Bi laginak konparatzeko Student's t-testa burutu zen SigmaPlot programa estatistikoa. Zutabe bakoitzeko barrek batez bestekoaren desbiderapen estandarra (\pm SD) adierazten dute (n=3).

3.3. C762S ordezkapenaren eragina gp41-kolesterol elkarrekintzan

Behin C762S mutanteak 762. posizioko zisteina serinaz ordezkatzean palmitoilazioa galtzen zuela frogatuta eta mutazioak mintzeko gp41 kantitatean eraginik ez zuela bermatuta, gp41-kolesterol elkarrekintzaren azterketa burutu zen. Elkarrekintza [³H]fotokolesterol erradiaktiboaren bidez aztertu zen (4. Irudia). C762S mutantean gp41aren eta kolesterolaren artean interakziorik egongo balitz, [³H]fotokolesterol g41 proteinari kobalentez lotuko zitzaion.

Western blot mintzean *LI-COR Odyssey*-aren bidez gp41aren seinalea detektatu zen (berdez) eta ondoren, gp41 proteinarekin lotutako kolesterol erradioaktiboaren detekziorako, mintz bera autoerradiografiatu zen *BetaIMAGER*TM sisteman (beltzez) (7.A Irudia). Birus basatiak (WT) eta C762S mutanteak (C762S) kolesterolarekiko neurri bereko interakzioa erakutsi zuten (7.B Irudia).

Beraz, C762S mutanteak kolesterolarekin interakziorik galtzen ez duenez, C762S mutantearen gp41 proteina baltsa lipidikoetara behar bezala txertatzen dela ondorioztatzen da, eta bertan alelo basatiak hainako interakzioa duela kolesterolarekin, DZ₇₅₀₋₈₁₁ domeinua osotasunean interakzio honen erantzule izanik.



7. Irudia. **C762S ordezkapenaren eragina gp41 proteina-kolesterol interakzioan.** IP=immunoprezipitatutako lagina; WT=birus basatia; ns=*non-significant*, ez-esanguratsua. **A)** Immunoprezipitatutako gp41aren Western blot analisia. Ezker kanalean, gp41aren seinalea (berdea), anti-gp41 Chesse-8 antigorputz primarioarekin eta xaguaren IRDye800 antigorputz sekundarioarekin. Eskuin kanalean, $[^3\text{H}]$ fotokolesterolaren autoerradiografia seinalea (beltza), mintz berean neurtua (n=3). **B)** Birus basatiaren eta C762S mutantearen $[^3\text{H}]$ fotokolesterol/gp41 ratioa birus basatiarekiko normalizatua (n=1, erreplika gehiagi burutu behar dira balore kuantitatibo esanguratsuak lortzeko).

4. EZTABAIDA

GIB-1ak, gainontzeko estalki lipidikoa duten birusekin alderatuta, gainazal proteina gutxi adierazten ditu, 7-14 Env trimero baino ez (Chertova et al., 2002; Zhu et al., 2003). Gainazal proteinen murrizketa hau ebolutiboki immunitate sistema saihesteko duen estrategia gisa har daiteke. Honen aurrean, birusak ostalariaren mintzarekin fusio eraginkorra bermatzeko Env glikoproteinen antolaketa berezia garatu du. STED mikroskopia bidez buruturiko GIB-1aren ikerketek aditzera eman dutenaren arabera, heltze prozesuan Env-en multzokatzea ematen da eta Env trimeroek elkar eraginez ostalariaren mintzaren fusioa errazten da (Chojnacki et al., 2012). Gainera, Env proteinen multzokatzea inhibitzerakoan birusak infekzio gaitasuna galtzen du (Chen et al., 2020; taldeko publikatu gabeko lana). Hala ere, egun, Env multzokatzearen oinarrian dauden mekanismo molekularrak argitu gabe jarraitzen dute.

STED mikroskopiaoren bidez ikusi da COasa entzima bidez birusaren mintzeko kolesterol kantitate murriztean Env multzokatzea inhibitzen dela (taldeko argitaratu gabeko emaitzak). Berriki argitaratutako ikerketa batean, SERINC5 (ingelesez, *Serine incorporator protein 5*) deritzon proteina zelular batek kolesterol eta fosfatidilserina molekulak bahitu eta Env-aren fusio gaitasunerako beharrezko lipido interakzioa inhibitzen duela ikusi da (Chen et al., 2020). Proteina honek mintzen arteko fusioa eragozten du eta inhibizio honen oinarrian dagoen mekanismoa Env proteinen multzokatzea eragozteko dela frogatu da (Chen et al., 2020).

Beste zenbait ikerketetan ere, kolesterolaren murrizketak edo inhibizioa eragiten duten zenbait konposatuek emaitza adierazgarriak eman dituzte konposatu antierretrobiral gisa (Harada, 2005; Nabatov et al., 2007; Nieto-Garai et al., 2018; St. Vincent et al., 2010). Horietako batzuk kolesterol molekuletara zuzenean batzen dira, besteak beste, AME (ingelesez, *amphotericin B*

methyl ester) konposatua (Waheed et al., 2007). Beste batzuk, ordea, zelulako kolesterol biosintesia inhibituz jarduten dute, hala nola, estatina molekulak (Nabatov et al., 2007). Aipatutako konposatuek, kolesterolaren funtzioa inhibituz, birusaren mintzeko konposaketa eta ezaugarri fisikokimikoak apurtzea lortzen dute. Birusen mintzaren egitura zurruna, orokorrean eta kolesterola itu izan gabe, desegonkortzea lortzen duten RAFI konposatuek (ingelesez, *Rigid amphipathic fusion inhibitors*) ere emaitza positiboak izan dituzte antierretrobiral gisa (St. Vincent et al., 2010).

Beraz, GIB-1aren mintz lipidikoaren osagai nagusia den kolesterola zein baltsa lipidikoetatik eratorritako lipidoak (Lorizate et al., 2009, 2013) mantentzea beharrezkoa da GIB-1aren infekzio gaitasuna bermatzeko. Hau guztia kontuan hartuta, taldearen helburua Env-kolesterol elkarrekintza eta Env proteinaren taldekatzea ikertzea izan da.

GIB-1ak beste erretrobirusekin alderatuz DZ luzea du eta andui desberdinen sekuentzia oso kontserbatua dago (Rousso et al., 2000; Vzorov et al., 2007; Yang et al., 1995; Yang et al., 2010). Ezaugarri honek DZ luze mantentzeko presio positiboa egon dela iradokitzen du. Zenbait ikerketek Env-aren gp41 azpiunitatearen DZak morfogenesi prozesuko Env-aren multzokatzean funtzio garrantzitsua izan dezakeela adierazten dute.

Chojnacki et al. ikerketan, morfogenesi prozesuan, gp41aren DZa trunkatua zuten mutanteek Env multzokatzeko gaitasuna galtzen zutela ikusi da (Chojnacki et al., 2012). Beraz, gp41aren DZak Env-aren taldekatzean aktiboki jarduten du eta mekanismo horren oinarrian gp41aren DZa eta Gag poliproteinaren N-muturreko MAren arteko elkarrekintza dagoela proposatzen da (Chojnacki et al., 2012). Izan ere, DZ-MA arteko elkarrekintzak Env proteinaren mintzeko txertaketa bideratzen du (Muranyi et al., 2013; Sundquist & Krausslich, 2012), gp41aren DZko mutazioek zein MA domeinuko mutazioek (Bhattacharya et al., 2006) Env glikoproteinaren txertatzea eragozten dutelarik.

Env-aren DZak, ordea, morfogenesi prozesuan MArekin elkarrekiteaz gain, gainazaleko lipidoekin interakzionatzen du. *Yang et al.* ikerketan, gp41aren DZak baltsa lipidikoekin izan zezakeen interakzioa auresan zen DRM metodo bidez (Yang et al., 2010). Detekziorako teknika honen mugek, ordea, ez dute frogatzen baltsa lipidikoetarako asoziazio zuzena. Baltsa lipidikoen ezinbesteko lipidoa kolesterola izanik, gure taldearen ikerketa, gp41aren DZaren eta kolesterolaren elkarrekintzak *in vivo* aztertzean oinarritu da, eta DZak kolesterolarekin interakzionatzen duela frogatu da (taldeko argitaratu gabeko emaitzak). Hain zuzen ere, gp41aren DZaren zein eskualdek duen kolesterolarekin interakzioa definitzea lortu da, hots, DZ₇₅₁₋₈₅₄ domeinua, LLP2 eta LLP3 sekuentziak barne dituen (taldeko argitaratu gabeko emaitzak).

DZ₇₅₁₋₈₅₄ sekuentziaren barnean 762. zisteina hondar palmitoilatua dagoela kontuan hartuta eta palmitoilazioa kolesterolean aberatsak diren domeinuetara proteinak bideratzeaz arduratzen dela jakinik, lan honen helburu nagusia gp41aren DZaren palmitoilazioa DZ-kolesterol elkarrekintzaren erantzulea den aztertzea izan da.

Esperimentuetan, lehenik eta behin, C762S mutantean, zisteina-serina aminoazido ordezkapenak gp41 proteinak palmitoilazioa galtzea eragiten duela baieztatu da (5. Irudia). Ondoren, C762S mutazioak GIB-1aren mintzeko gp41aren kantitatean, hau da, Env glikoproteinaren biruserako txertaketan eraginik ez duela frogatu da (6. Irudia). Honela, gp41 proteina-kolesterol interakzioak aztertzen direnean, detektatutako gp41aren fluoreszentziaren seinale diferentziala palmitoilazioaren eraginari dagokiola onartzen da. Azkenik, DZaren palmitoilazioak gp41 proteina birusean txertatzeko eta kolesterolarekin elkarrekiteko ezinbestekoa ez dela frogatu da (6. eta 7. Irudiak). Ondorioz, gp41aren DZaren palmitoilazioak kolesterolaren elkarrekintzan funtziorik ez duela onartzen da.

GIB andui ezberdinetan egindako genomika konparatiboaren azterketak emaitza hauek sendotzen ditu. Izan ere, palmitoilatutako zisteina hondarrak GIB-1_{HXB2} zein GIB-1_{NL4-3}-en posizio berean ez direla kontserbatu ikusi da eta zenbait anduik ez dute zisteinarik kontserbatu DZan (Myers et al., 1997). Birus guzti hauen bideragarritasuna bermatuta dagoenez, DZko palmitoilazioa infekzio gaitasunerako ez dela beharrezkoa ondorioztatzen da.

Laburbilduz, taldeko emaitzek zein ikerketa lan honek gp41aren DZ₇₅₁₋₈₅₄ sekuentziaren barne dauden aminoazidoek osotasunean kolesterolarekin interakzionatzen dutela adierazten dute, hauek heltze prozesuan birusaren Env glikoproteinaren multzokatzearen eta infekzio gaitasuna eskuratzearan erantzuleak izanik. Ondorioz, kolesterolak GIB-1aren bideragarritasunean duen garrantzia ezagututa, gp41-kolesterol elkarrekintza espezifikoak inhibitzeak terapia antierretrobiral eraginkor gisa jardun dezake.

5. ONDORIOAK

GIB-1aren proteina birikoak itu dituzten farmako antierretrobiralen aurrean garatutako erresistentziek terapia berrien diseinurako beharra agerian uzten dute.

Env proteina multzokatzeak GIB-1aren infekzio gaitasunean duen funtzioa jakinik, taldekatze mekanismo hau ikertzea garrantzi handikoa da. Env glikoproteinaren inguruko orain arteko ikerketak, GIB-1aren bideragarritasunean ezinbestekoak diren domeinuak eta mintzeko konposatu gakoak detektatzeko baliagarriak izan dira. Lan honetan, gp41aren DZaren eta kolesterolaren arteko interakzioak aztertu dira eta hala, birusaren infekzio gaitasunean beharrezkoak diren ezaugarriak zehaztu dira. Infekzio gaitasunean kolesterolak duen garrantzia

ezagututa, kolesterola bahitu, haren sintesia murriztu edota hura mimetizatzen duten farmakoen bilaketa ikerketa-itu bilakatu da tratamendu antierretrobiral berrien diseinuan. Are gehiago, ikerketa honen emaitzek, Env-kolesterol elkarrekintza inhibitzen edota Env multzokatzea ekiditen duten farmakoak terapia antierretrobiral berrien bilaketan gakoak izan daitezkeela adierazten dute. Hala ere, konposatu hauek gaixoengan eragin ditzaketen albo-ondorioak aztertzea beharrezkoa da, izan ere, lipidoak itu dituzten zenbait farmako antierretrobiralek (estatinek, kasu) asaldura metabolikoak eragin ditzaketela behatu baita.

6. ESKER ONAK

Maier Lorizate Nogales zuzendariari, Jon Ander Nieto-Garai doktoreari eta Aroa Arboleya Agudo ikerlariari nire esker onak lan esperimentalaren burutzeko beharrezkoa izan dudana laguntza emateagatik, baita Gradu Amaierako Lana burutzeko haiek eskainitako prestutasunagatik ere.

Xabier Contreras doktoreari (Biofisika Institutua, CSIC-EHU) eskerrak ere, berak sintetizatutako alkin talde funtzionaldun azido palmitikoa (azido 15-hexadexinoikoa) eta [³H]fotokolesterol erradiaktiboa lagatzeagatik.

7. BIBLIOGRAFIA

Bhattacharya, J., Peters, P. J., & Clapham, P. R. (2004). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins That Lack Cytoplasmic Domain Cysteines: Impact on Association with Membrane Lipid Rafts and Incorporation onto Budding Virus Particles. *Journal of Virology*, 78(10), 5500–5506. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.10.5500-5506.2004>

Bhattacharya, J., Repik, A., & Clapham, P. R. (2006). Gag Regulates Association of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope with Detergent-Resistant Membranes. *Journal of Virology*, 80(11), 5292–5300. <https://doi.org/10.1128/jvi.01469-05>

Briggs, J. A. G., Simon, M. N., Gross, I., Kräusslich, H. G., Fuller, S. D., Vogt, V. M., & Johnson, M. C. (2004). The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(7), 672–675. <https://doi.org/10.1038/nsmb785>

Campbell, S. M., Crowe, S. M., & Mak, J. (2002). Virion-associated cholesterol is critical for the maintenance of HIV-1 structure and infectivity. *Aids*, 16(17), 2253–2261. <https://doi.org/10.1097/00002030-200211220-00004>

Chan, W. -E., Lin, H. -H., & Chen, S. S. -L. (2005). Wild-Type-Like Viral Replication Potential of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Mutants Lacking Palmitoylation Signals. *Journal of Virology*, 79(13), 8374–8387. <https://doi.org/JVI.79.13.8374-8387.2005>

Chen, Y. C., Sood, C., Marin, M., Aaron, J., Gratton, E., Salaita, K., & Melikyan, G. B. (2020). Super-Resolution Fluorescence Imaging Reveals That Serine Incorporator Protein 5 Inhibits Human Immunodeficiency Virus Fusion by Disrupting Envelope Glycoprotein Clusters. *ACS Nano (Web-ean argitaratua soilik)*. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02699>

Chertova, E., Bess, J. W., Crise, B. J., Sowder, R. C., Schaden, T. M., Hilburn, J. M., ... Arthur, L. O. (2002). Envelope Glycoprotein Incorporation, Not Shedding of Surface Envelope

Glycoprotein (gp120/SU), Is the Primary Determinant of SU Content of Purified Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology*, 76(11), 5315–5325. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.11.5315-5325.2002>

Chojnacki, J., Staudt, T., Glass, B., Bingen, P., Engelhardt, J., Anders, M., ... Krausslich, H.-G. (2012). Maturation-Dependent HIV-1 Surface Protein Redistribution Revealed by Fluorescence Nanoscopy. *Science*, 338(6106), 524–528. <https://doi.org/10.1126/science.1226359>

Chojnacki, J., Waithe, D., Carravilla, P., Huarte, N., Galiani, S., Enderlein, J., & Eggeling, C. (2017). Envelope glycoprotein mobility on HIV-1 particles depends on the virus maturation state. *Nature Communications*, 8(1), 545. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00515-6>

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(8), 2110–2114. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.8.2110>

Contreras, F.-X., Ernst, A. M., Haberkant, P., Björkholm, P., Lindahl, E., Gönen, B., ... Brügger, B. (2012). Molecular recognition of a single sphingolipid species by a protein's transmembrane domain. *Nature*, 481(7382), 525–529. <https://doi.org/10.1038/nature10742>

Eggleton, J. S., & Nagalli, S. (2020). Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). *StatPearls (Web-ean argitaratua soilik)*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32119420>

Haberkant, P., Schmitt, O., Contreras, F.-X., Thiele, C., Hanada, K., Sprong, H., ... Brügger, B. (2008). Protein-sphingolipid interactions within cellular membranes. *Journal of Lipid Research*, 49(1), 251–262. <https://doi.org/10.1194/jlr.D700023-JLR200>

Harada, S. (2005). The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. *Biochemical Journal*, 392(1), 191–199. <https://doi.org/10.1042/BJ20051069>

Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine*, 18(3), 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.12.001>

Kalia, V., Sarkar, S., Gupta, P., & Montelaro, R. C. (2003). Rational Site-Directed Mutations of the LLP-1 and LLP-2 Lentivirus Lytic Peptide Domains in the Intracytoplasmic Tail of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Indicate Common Functions in Cell-Cell Fusion but Distinct Roles in Virion Envelope Incorporation. *Journal of Virology*, 77(6), 3634–3646. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.6.3634-3646.2003>

Klug, Y. A., Rotem, E., Schwarzer, R., & Shai, Y. (2017). Mapping out the intricate relationship of the HIV envelope protein and the membrane environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1859(4), 550–560. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.10.012>

Li, M. (2015). Proteomics in the investigation of HIV-1 interactions with host proteins. *Proteomics- Clinical Applications*, 9(1–2), 221–234. <https://doi.org/10.1002/prca.201400101>

Lorizate, M., Brügger, B., Akiyama, H., Glass, B., Müller, B., Anderlüh, G., ... Kräusslich, H.-G. (2009). Probing HIV-1 Membrane Liquid Order by Laurdan Staining Reveals Producer Cell-dependent Differences. *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 22238–22247. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.029256>

Lorizate, M., Sachsenheimer, T., Glass, B., Habermann, A., Gerl, M. J., Kräusslich, H., & Brügger, B. (2013). Comparative lipidomics analysis of HIV-1 particles and their producer cell membrane in different cell lines. *Cellular Microbiology*, 15(2), 292–304.

<https://doi.org/10.1111/cmi.12101>

Martin, B. R. (2013). Nonradioactive Analysis of Dynamic Protein Palmitoylation. *Current Protocols in Protein Science*, 73(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1415s73>

Merk, A., & Subramaniam, S. (2013). HIV-1 envelope glycoprotein structure. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(2), 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.03.007>

Müller, B., Daecke, J., Fackler, O. T., Dittmar, M. T., Zentgraf, H., & Kräusslich, H.-G. (2004). Construction and Characterization of a Fluorescently Labeled Infectious Human Immunodeficiency Virus Type 1 Derivative. *Journal of Virology*, 78(19), 10803–10813. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10803-10813.2004>

Murakami, T., & Freed, E. O. (2000). The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(1), 343–348. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.343>

Muranyi, W., Malkusch, S., Müller, B., Heilemann, M., & Kräusslich, H.-G. (2013). Super-Resolution Microscopy Reveals Specific Recruitment of HIV-1 Envelope Proteins to Viral Assembly Sites Dependent on the Envelope C-Terminal Tail. *PLoS Pathogens*, 9(2), e1003198. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003198>

Myers, G., Foley, B., Korber, B., Mellors, J. W., Jeang, K. T., & Wain-Hobson, S. (1997). *Human retroviruses and AIDS 1996. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. Los Alamos National Lab., NM (United States). <https://doi.org/10.2172/463607>

Nabatov, A. A., Pollakis, G., Linnemann, T., Paxton, W. A., & de Baar, M. P. (2007). Statins Disrupt CCR5 and RANTES Expression Levels in CD4+ T Lymphocytes In Vitro and Preferentially Decrease Infection of R5 Versus X4 HIV-1. *PLoS ONE*, 2(5), e470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000470>

Nieto-Garai, J. A. (2019). *Role of lipids in HIV-1 pathogenesis. Implications in viral infectivity and development of antiretroviral drugs*. Universidad del País Vasco - Euskal Herriko Unibertsitatea.

Nieto-Garai, J. A., Glass, B., Bunn, C., Giese, M., Jennings, G., Brankatschk, ... Kräusslich, H.-G. (2018). Lipidomimetic Compounds Act as HIV-1 Entry Inhibitors by Altering Viral Membrane Structure. *Frontiers in Immunology*, 9(1983), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01983>

Okoye, A. A., & Picker, L. J. (2013). CD4 + T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunological Reviews*, 254(1), 54–64. <https://doi.org/10.1111/imr.12066>

Pezeshkian, N., Groves, N. S., & van Engelenburg, S. B. (2019). Single-molecule imaging of HIV-1 envelope glycoprotein dynamics and Gag lattice association exposes determinants responsible for virus incorporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(50), 25269–25277. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910008116>

Piller, S. C., Dubay, J. W., Derdeyn, C. A., & Hunter, E. (2000). Mutational Analysis of Conserved Domains within the Cytoplasmic Tail of gp41 from Human Immunodeficiency Virus Type 1: Effects on Glycoprotein Incorporation and Infectivity. *Journal of Virology*, 74(24), 11717–11723. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.24.11717-11723.2000>

Postler, T. S., & Desrosiers, R. C. (2013). The Tale of the Long Tail: the Cytoplasmic Domain of HIV-1 gp41. *Journal of Virology*, 87(1), 2–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.02053-12>

Rouso, I., Mixon, M. B., Chen, B. K., & Kim, P. S. (2000). Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(25), 13523–13525. <https://doi.org/10.1073/pnas.240459697> PNAS

Srinivas, S. K., Srinivas, R. V., Anantharamaiah, G. M., Segrest, J. P., & Compans, R. W. (1992). Membrane interactions of synthetic peptides corresponding to amphipathic helical segments of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(10), 7121–7127.

St. Vincent, M. R., Colpitts, C. C., Ustinov, A. V., Muqadas, M., Joyce, M. A., Barsby, N. L., ... Schang, L. M. (2010). Rigid amphipathic fusion inhibitors, small molecule antiviral compounds against enveloped viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(40), 17339–17344. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010026107>

Sundquist, W. I., & Krausslich, H.-G. (2012). HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(7), a006924. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924>

Thiele, C., Hannah, M. J., Fahrenholz, F., & Huttner, W. B. (2000). Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nature Cell Biology*, *2*(1), 42–49. <https://doi.org/10.1038/71366>

Vzorov, A. N., Weidmann, A., Kozyr, N. L., Khaoustov, V., Yoffe, B., & Compans, R. W. (2007). Role of the long cytoplasmic domain of the SIV Env glycoprotein in early and late stages of infection. *Retrovirology*, *4*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-94>

Waheed, A. A., Ablan, S. D., Roser, J. D., Sowder, R. C., Schaffner, C. P., Chertova, E., & Freed, E. O. (2007). HIV-1 escape from the entry-inhibiting effects of a cholesterol-binding compound via cleavage of gp41 by the viral protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(20), 8467–8471. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701443104>

Welker, R., Hohenberg, H., Tessmer, U., Huckhagel, C., & Kräusslich, H.-G. (2000). Biochemical and Structural Analysis of Isolated Mature Cores of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*, *74*(3), 1168–1177. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.3.1168-1177.2000>

Yang, C., Spies, C. P., & Compans, R. W. (1995). The human and simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein transmembrane subunits are palmitoylated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(21), 9871–9875. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9871>

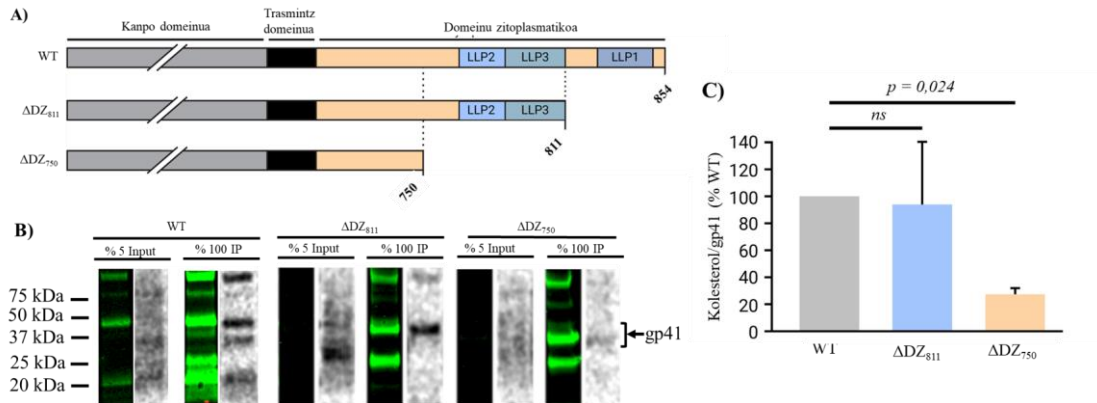
Yang, P., Ai, L.-S., Huang, S.-C., Li, H.-F., Chan, W.-E., Chang, C.-W., ... Chen, S. S.-L. (2010). The Cytoplasmic Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmembrane Protein gp41 Harbors Lipid Raft Association Determinants. *Journal of Virology*, *84*(1), 59–75. <https://doi.org/10.1128/JVI.00899-09>

Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Lifson, J. D., Arthur, L. O., Liu, J., ... Roux, K. H. (2003). Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(26), 15812–15817. <https://doi.org/10.1073/pnas.2634931100>

Zhu, Y., Lu, L., Chao, L., & Chen, Y. H. (2007). Important changes in biochemical properties and function of mutated LLP12 domain of HIV-1 gp41. *Chemical Biology and Drug Design*, *70*(4), 311–318. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2007.00564.x>

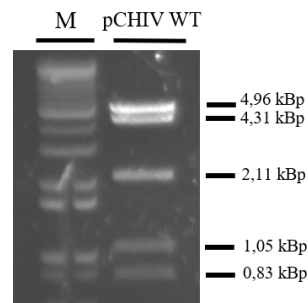
8. ERANSKINAK

1. *Eranskina*. Gp41aren DZaren eta kolesterolaren arteko elkarrekintzaren azterketaren emaitzak.

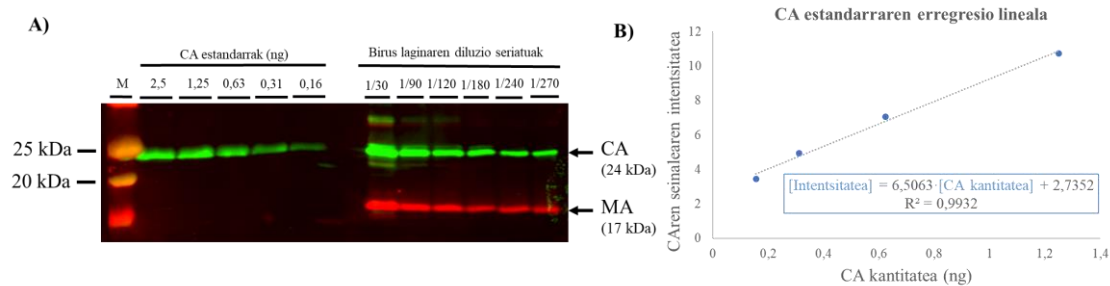


1. Irudia. **DZaren trunkazioak gp41-kolesterol interakzioan duen eragina birus partikuletan**. IP= immunoprezipitatutako lagina; WT=birus basatia; ns=*non-significant*, ez-esanguratsua. **A)** DZaren trunkazio ezberdinak dituzten mutanteen gp41 proteinaren ilustrazio eskematikoa. ΔZ_{811} mutanteak, 812. aminoazidoan stop kodoia duenez, LLP1 sekuentzia falta du. ΔZ_{750} mutanteak, 751. aminoazido honarrean du stop kodoia eta DZko LLP sekuentzia guztiak falta ditu. **B)** Immunoprezipitaturiko WT eta ΔZ aldaeren Western blot seinalea (berdea) eta $[^3H]$ fotokolesterolaren detekzioa autoerradiografia bidez (seinale grisa) burutu zen purifikaturiko partikula birikoetan. Western blot-a Chessie-8 anti-gp41 antigorputz primarioak eta xaguaren IRDye800 antigorputz sekundarioa erabiliz burutu zen. $[^3H]$ fotokolesterolaren erradioaktibitate seinalea autoerradiografia bidez detektatu zen *BetaIMAGERTM* (*Biospace Lab*) gailua erabiliz. **C)** Gp41 proteinaren eta $[^3H]$ fotokolesterolaren Western blot seinalearen kuantifikazioa. ΔZ_{811} eta ΔZ_{750} mutanteetan $[^3H]$ fotokolesterolaren seinalea gp41 proteina seinalearekiko erlatibizatua eta andui basatiarekiko normalizatua. Lagin taldeak haien artean konparatzeko, Tukey testa burutu zen SigmaPlot programa estatistikoan. Zutabe bakoitzeko barrek batez bestekoaren desbiderapen estandarra (\pm SD) adierazten dute ($n=3$) (Iturria: Nieto-Garai, 2019– Euskaratua eta moldatua).

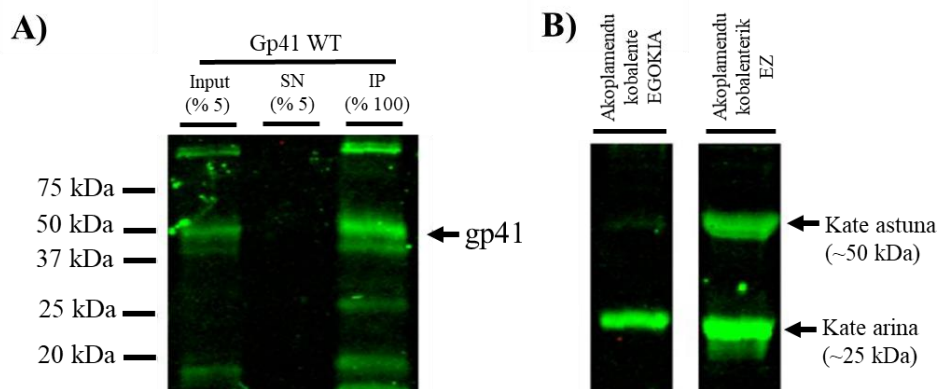
2. *Eranskina*. Material eta metodoetako informazio gehigarria.



1. Irudia. **HindIII errestrikzio entzimaz digeritutako pCHIV WT plasmidoaren elektroforesiaren emaitzak agarosazko gelean**. M=markatzailea, WT=birus basatia. Ezker kalean, 1 kb DNA markatzailea eta eskuin kalean, HindIII errestrikzio entzimaz digeritutako pCHIV WT plasmidoa. pCHIV plasmidoaren HindIII endonukleasaren errestrikzio gunek jakinik, plasmidoaren maparen bidez, agarosazko gelean bost banda espero dira: handienetik txikienera 4,96 kBp, 4,31 kBp, 2,11 kBp, 1,05 kBp eta 0,83 kBp tainakoak, hain zuzen ere.



2. Irudia. **Anti-CA Western blot bidezko birusaren kuantifikazio adibidea.** CA=kapside, MA=matrix. **A)** Birus partikulen kuantifikaziorako Western blot analisia. Anti-CA eta anti-MA antigorputz primarioarekin eta sekundario gisa, ardiaren IgG IRDye800 eta untxiaren IgG IRDye680 antigorputzekin. **B)** CA estandarrak emandako seinale intentsitateki abiatuta eraikitako erregresio lineala. Ekuazio honekin lortutako birus partikulen CA kantitatea kalkulatzen zen. CA estandarrak emandako mugako intentsitate balioetatik kanpo geratzen diren intentsitate balioak baztertuak izaten ziren.



3. Irudia. **Anti-gp41 Chessie-8 antigorputzaren eta sefarosazko bolatxoaren arteko lotura kobalentearen konprobaketarako Western blot-a.** IP=immunoprezipitatu, SN=gainjalkina. Antigorputz primario gisa anti-gp41 Chessie-8 erabili zen eta sekundario gisa, kasu honetan, xaguaren IgG IRDye800. **A)** Sefarosazko bolatxoetara kobalentekei lotutako anti-gp41 Chessie-8 bidez immunoprezipitatutako gp41aren Western blot adibidea. Lotura kobalentearekin esker, sefarosazko bolatxoetako kate astunak gp41aren seinalearekin ez zuen interferitzen. **B)** Akoplamendu kobalentearen konprobaketa Western blot-a. Kontrol negatibo gisa, sefarosazko bolatxo akoplatuak inolako laginekin nahastu gabe immuoprezipitatu ziren (ezker zutabea) eta kate arinari zegokion banda bakarra behatu zen. Lotura kobalenterik ez duten sefarosazko bolatxoaren banda patroia ezagutzeko, sefarosazko bolatxoak anti-gp41 Chessie-8 antigorputzarekin nahastu ziren gelean kargatzerako orduan (eskuin zutabea). Akoplamendu kobalenterik ez ematekotan, eskuin zutabearen ikusten diren bi banda behatuko ziren: bata, kate astunari zegokiona, eta bestea, kate arinari zegokiona.