

Gradu Amaierako Lana
Biokimika eta Biologia Molekularra Gradua

MPERen ezagumendua GIB birusaren mintzean 4E10 eta 10E8 antigorputzen aldetik

CDR-H3 eta mintzaren garrantziaren azterketa mikroskopia bidez

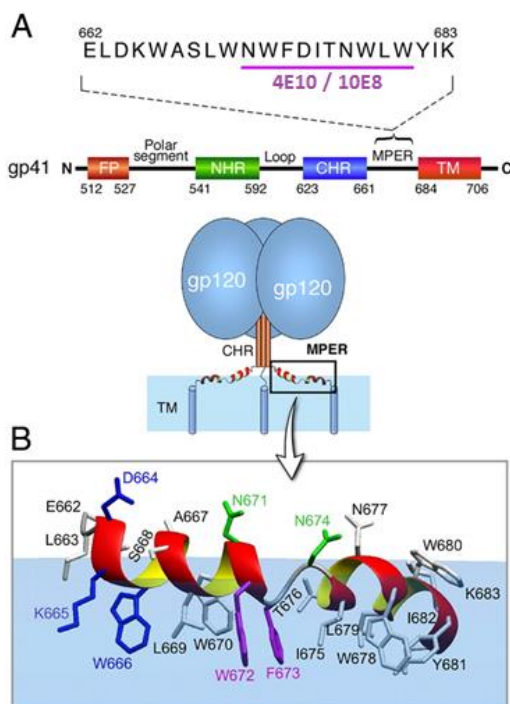
Egilea:
Miren Itziar Ruiz Oar-Arteta
Zuzendariak:
Nerea Huarte Arrayago
Pablo Carravilla Palomares

Aurkibidea

Sarrera	1
FCS teknikaren oinarria	3
FCS mintzean aplikatzea	4
Helburuak	4
Material eta metodoak.....	5
Materiala	5
Besikulen prestaketa	5
Batuketa saioak mikroskopia konfokalaz	5
FCS soluziotan.....	6
FCS mintzean	7
Emaitzak	7
Difusio koefizienteak soluziotan.....	7
Fab-en batuketaren neurketa kualitatiboa	8
Mintzei lotutako Fab-en difusioa	10
Eztabaida	11
Teknikari buruz	12
Mintzarekiko elkarrekintzari buruz	12
MPERen ezagumenduari buruz	13
Begiztaren garrantzia neutralizazioan	14
Erreferentziak	15

Sarrera

Giza Immunoeskasiaren Birusa (GIB) tratatzeko dagoeneko botika eraginkor ugari egon arren, gaixotasunaren zabalkundea ekiditeko beharrezkoa litzatekeen txertoa garatzeak erronka askoz handiagoa suposatzen du, birusaren aldakortasun izugarria dela eta. Bide honetan *Env* glikoproteinaren gp41 azpiunitateko mintz-ondoko kanpoaldeko sekuentziak (MPER, *Membrane Proximal External Region*) aurkezten du etorkizunik oparoena, GIBaren andui ezberdinetan oso kontserbatuta mantentzen baita [1]. MPER sekuentzia (Glu662-Lys683) transmintz domeinuaren jarraian ageri da, mintz birikoaren interfasean eta horrekiko paraleloki kokatuta, α -helize egiturarekin (1 irudia) [2]. MPERen funtzioa birusaren mintzaren antolaketa ezegonkortzean datza, birusaren eta zelularen mintzen fusioa eragiteko [3]. Era berean, mintzaren konposizioak eragina du MPERek horren barnean hartzen dituen sakonera eta orientazioarengan. Birusaren muntaia mintz zelularreko baltsa lipidikoetan ematen da, mintz birikoak konposaketa berezia izatea eraginez, osagai nagusiak kolesterola (Chol), esfingomielina (SM), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilkolina (PC) eta fosfatidilserina (PS) direlarik [4].



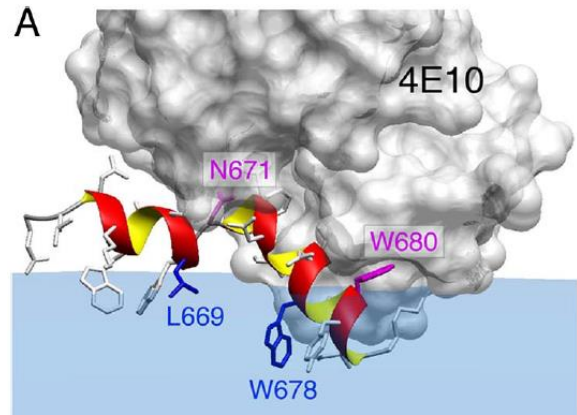
1 irudia. *Env* glikoproteinaren eta MPER sekuentziaren egitura. A) MPERen kokapena *Env* glikoproteinaren baitan. B) MPERek mintzean txertatuta dituen egitura eta orientazioa.

GIBari aurre egiteko *Env* ezagutzen duten antigorputzen sorrera ohikoa bada ere, neutralizazio espektro zabaleko antigorputzak pertsona gutxirengan aurkitu dira. Horien artean interesgarrienak 4E10 eta 10E8 dira, MPER ezagutu eta GIBaren anduien % 98aren aurkako neutralizazioa lortzen baitute. 4E10aren MPEReko epitopoa ⁶⁷¹NWFDITNWLW⁶⁸⁰ kontsentsu-sekuentzia da, peptidoaren C-terminalean kokatutakoa [2]. Peptidoa espezifikoki batzeaz gain 4E10ak mintza lotzeko joera ere badu, elkarrekintza inespezifikoaren bitartez. Alde batetik, antigorputzak badu karga positibodun gune bat GIBaren mintzarekiko afinitateduna, PSak sortutako azaleko elektronegativotasunarengatik [5]. Gainera, bere paratopoa badago begizta bat (CDR-H3 begizta) bereziki luzea eta hidrofobikoa dena, mintzarekin elkarrekintza hidrofobikoa ezartzen dituen [1]. 4E10-MPER soluzioko kokristalean (PDB: 1TZG) ikusten da begiztaren erpin malgua peptidoaz haratago kokatzen dela, testuinguru lipidikoan erpin hori mintzean txertatuta legokeela iradokiz (2 irudia).

4E10ek mintzak inespezifikoki lotze hori oztopo handizat hartzen da, autoerreaktibotasuna baitakar; dagokion epitopoa aurkeztu arren gorputzean mota honetako antigorputzak eratzea ia ezinezko bihurtzen duelarik [6]. Ezaugarri hau aztertzeke helburuz 4E10en aldaerak sortu ziren, CDR-H3 begiztan mutazioak dituztenak. Horietako batean begiztako erpineko ¹⁰⁰WGWL^{100c} sekuentzia Ser-Gly dipeptido batengatik ordezkatu da (4E10 Δ loop); soluzioan MPER lotu arren, neutralizatzeko gaitasunik ez duen antigorputza sortuz [1]. 4E10 Δ loop-ek soluzioan MPER lotzean 4E10 basatiaren (4E10 WT) egitura berdina aurkezten du, baina ez da birusak lotzeko gai, ezta neutralizazioa eragiteko ere. Hau bat dator 4E10ak birusa ezagutzeko bi urratsetako mekanismoarekin, zeinen arabera elkarrekintza hidrofobikoen bidez antigorputza mintzean kontzentratzen den, kokapen egokia lortuz bigarren urrats batean interfaseko epitopoa lotzeko [7]. Era berean, agerian geratzen da erpin hidrofobiko horrek neutralizazioa lortzeko duen garrantzia lipidoarekin eratutako elkarrekintzan oinarritzen dela.

10E8 antigorputzari dagokionez, bere epitopoa 4E10enarekin teilakatuta dago; baina hori lotzeko paratopo oso ezberdina darabil, soluzioan MPERengatik afinitate baxuagoduna [8]. Hala ere, antigorputz honek jakin-min handia piztu du neutralizazio-ahalmen handiena izateagatik, eta ez duelako lipidorik lotzen, autoerreaktibotasuna ekidituz. 10E8an, paratopoaz gain, CDR-H3 begiztak du garrantzirik handiena epitopoa lotzeko; begiztako erpineko triptofanoa (W100b) izanik ezagumendu eta neutralizaziorako ezinbestekoena [8]. Hondar honen garrantzia aztertzeke W100bD mutaziodun aldaera sortu da, neutralizazio gaitasunik gabekoa; 4E10ek bezala 10E8k ere neutralizaziorako begizta beharrezkoa baitu.

Egoera fisiologikoan antigorputz hauek birusarekin duten elkarrekintzaren ulermenerako, beharrezkoa da mintz birikoan txertatutako MPER aztertzea. Mintz birikoaren konposizioa imitatzen duten besikulak modelo egokiak dira elkarrekintza hauen karakterizaziorako. Modelo horiekin zenbait neurketa kualitatibo egin izan dira, batura ematen den hala ez jakitea baimendu dutenak. Hortik aurrera, antigorputz edota mintz-konposaketa bakoitzak ezagumendu eta neutralizazioan duen eragina ulertzeko, beharrezkoa da baldintza ezberdinetan emandako elkarrekintzen karakterizazio kuantitatibo eta zehatza. Molekula-bakarreko teknikak (*single-molecule techniques*) elkarrekintza horien karakterizazio xeheagoa egitea baimentzen dute.



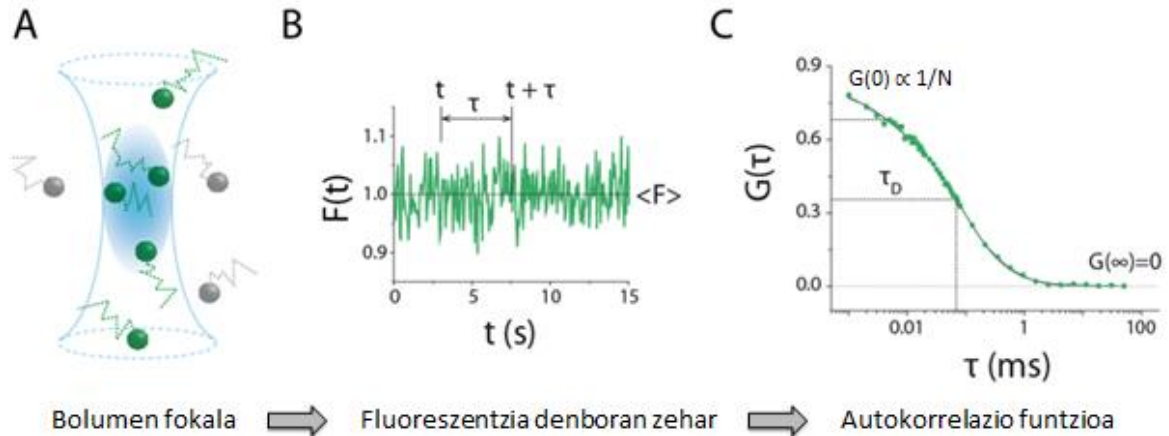
2 irudia. 4E10-MPER kokristalaren egitura. 4E10ek MPER ezagutzean konplexuaren egitura ikus daiteke CDR-H3 begizta mintzari dagokion eremuan (urdina) barneratzen dela.

FCS teknikaren oinarria

Fluoreszentiaren korrelaziozko espektroskopia (FCS, *Fluorescence Correlation Spectroscopy*) denboran zehar fluoreszentiaren intentsitatearen fluktuazioak neurtzen dituen teknika bat da, erresoluzio espazial eta tenporal handiduna. Teknika honen bidez posible da soluzioan edota mintzean molekulen difusio-abiadura edota kontzentrazio zehatzak determinatzea, elkarrekintzen afinitate eta izaerari buruzko informazioa eskuratzeko. Molekula bakarrari dagokion informazioa ezberdintzeko, beharrezkoa da aldi berean aztertutako molekula kopurua (N) oso baxua izatea, bakoitzari dagokion fluktuazioa ezberdindu ahal izateko. Hau lortzeko bolumen fokala asko murriztu behar da (~1 fL) eta kontzentrazio oso diluituak erabili (nM tartean), fokuko N-a 1-100 molekula artean egon dadin [9]. Bolumen fokala (**3A irudia**) r_0 (altuera) eta ω_0 (erradioa) parametroek definitzen dute ($V_{\text{eff}} = \pi^{3/2} \cdot r_0^3 \cdot \omega_0$). Teknikak beharrezko ditu etekin kuantiko eta fotoegonkortasun handiko zunda fluoreszenteak, potentzia handiko laserrak eta fotoi bakarra detektatzeko gai diren detektagailuak (adib. APDak, *Avalanche Photodiodes*).

FCS teknikan bolumen fokaleko fluoreszentiaren intentsitatea neurtzen da denboran zehar ($F(t)$); eta ondoren, horren autokorrelazio funtzioa kalkulatu, seinaleak denboran zehar bere buruarekiko duen antzekotasuna adierazten duena (**3 irudia**). Autokorrelazio-kurbaren tarte bakoitzetik fenomeno ezberdinei buruzko informazio lortzen da: errotazioaren fluktuazioak, tripletea, difusioa eta kontzentrazioa. Gure kasuan, azkeneko bi hauek neurtzeko, kurbaren 0,01-100 ms tarteaz aztertu dugu; molekulak fokua zeharkatzeko batez beste 1 ms behar izaten baitute [9]. Autokorrelazioaren anplitudea ($G(0)$) intentsitatearen fluktuazio normalizatuaren neurria da; eta bolumen fokaleko fluoroforo kontzentrazioarekiko (C) menpekotasun handia du, molekula kopurua handitzeak seinalearen fluktuazio erlatiboa murriztea baitakar. Beraz, autokorrelazioak C-ren neurketa zuzen eta zehatza baimentzen du: $C = 1/(V_{\text{eff}} \cdot G(0))$. Bolumen fokaleko igorpenarengan eragina duten fenomeno periodikoak autokorrelazio funtzioan ($G(\tau)$) islatzen dira, antzekotasuna denboran zehar murriztea eraginez. Autokorrelazioaren jauziaren erdiaren denborak (τ_D) molekulak fokuan emandako batez besteko denbora adierazten digu. Horretarako, espezie bakarraren 3 dimentsiotako difusio askearen autokorrelazio funtzioa erabiltzen da:
$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}} \cdot C} \cdot \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + (r_0/\omega_0)^2 \cdot \tau/\tau_D}}$$

Ondoren, bolumen eta difusio-denbora lotuz, molekularen difusio koefizientea (D) kalkula daiteke: $D = r_0^2/(4 \cdot \tau_D)$. Aztertutako molekularen elkarrekintzek bere difusio-abiadurarengan eragina badute (adib. mintza edota molekula handiak lotzean abiadura murriztea), FCSak hori detekta eta zehaztasun handiz kuantifika dezake; elkarrekintza motari, afinitateari edota indarrari buruzko informazio kuantitatiboa emanez.



3 irudia. FCS esperimentuaren laburpena. Bolumen fokalean zehar barreiatzen diren molekulek igorritako fluoreszentzia (A) neurtu egiten da denboran zehar (B), erresoluzio espazial eta tenporal handiz. Seinalea bere buruarekiko konparatuz autokorrelazio funtzioa sortzen da (C), seinalearen fluktuazio periodikoei buruzko informazioa adierazten duena.

FCS mintzean aplikatzea

Aztertzen diren molekula mintzari atxikiak dauden kasuan ere FCSak informazio ugari eskuratzeko balio dezake, baina teknika moldatu beharra dago. Soluzioan barreiatzen diren molekula aztertzeko puntu bakarreko FCSa (pFCS) erabiltzen da; mintzetarako, ordea, ekorketazkoa (scanning FCS, sFCS); zeinetan puntu bakarra denboran zehar neurtu beharrean mintza zeharkatzen duen lerro bat eskaneatzen den. Honela mintzetan sor litezkeen bi arazori aurre egiten zaie [10]. Batetik, mintzaren berezko mugimenduak hau fokutik ateratzea ekar dezake, baina eskaneoari esker mugimendu hau zuzen daiteke. Gainera, mintzari lotutako molekula difusioa geldoagoa denez, fokua horien gainean mantenduz gero fluoroforoek fotoitxaltzea jasateko aukera handitzen da.

GIBa ezagutzen duten antigorputzen kasuan, sFCS bidez antigorputzek mintzarekin zuzenean edota mintzeko proteinekin duten elkarrekintza karakteriza daiteke. Izan ere, mintzari atxikitako antigorputzen difusio-abiaduraren aldaketak hori lotuta mantentzen duen elkarrekintzari buruzko informazioa ematen du. Gainera, difusio-abiadura hori mintzeko lipido edota proteinenekin alderatuz gero, antigorputzaren difusioa zehazten duen osagaia zein den jakin daiteke.

Helburuak

Lan honetan, $4E10$ eta $10E8$ antigorputzek GIB birusaren mintza lotzeko darabilten mekanismoa karakterizatzen da, lipidoarekiko elkarrekintza inespezifikoa zein MPERen ezagumendua aztertuz. Horretarako batuketa ze baldintzatan ematen den azertu dugu, eta difusio-abiadura nola baldintzatzen duen neurtu. Arreta berezia jarri dugu CDR-H3 begiztaren funtzioaren ulermenean, $4E10$ WT eta Δ loop-aren konparaketaren bidez neutralizazioa eragiteko darabilen mekanismoa ulertzeko helburuz.

Material eta metodoak

Materiala

1,2-dioleil-*sn*-glizero-3-fosfokolina (DOPC), 1,2-dioleil-*sn*-glizero-3-fosfoetanolina (DOPE), 1,2-dioleil-*sn*-glizero-3-fosfo-L-serina (DOPS), 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glizero-3-fosfokolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glizero-3-fosfo-L-serina (POPS), 1,2-dimiristoil-*sn*-glizero-3-fosfokolina (DMPC), kolesterola (Chol) eta arrautz-esfingomielina (eSM) Avanti Polar Lipids-i erositakoak dira. Fab guztiak (4E10 WT, 4E10 Δ loop, 10E8 WT eta 10E8 W100bD) laborategian *E. coli* bakteriotan ekoiztuak dira eta Alexa-rekin markatuak. MPER peptidoa (KKDKWASLWNWFIKLFIMIVGKKK) fase solidoko sintesi bidez sintetizatu da Fmoc kimika bidez eta HPLC-z purifikatu (Barcelonako Pompeu Fabra Unibertsitatea, Proteomika saila).

Besikulen prestaketa

Mintz bakarreko besikula erraldoiak (GUV, *Giant Unilamellar Vesicle*) sortzeko aurretik erabilitako prozedura jarraitu zen [11]. Lipido nahastearen 0,125 mg elkarrekin disolbatzen dira 100 μ L CHCl_3 : CH_3OH (9:1) disoluzioan. Lipidoa huts-ponpan lehortzen da (1 h), N_2 fluxupean aurrehidratatu mili-Q urarekin (30 min) eta 250 μ L uretan hidratatu ur-bainuan (30 min, 55 $^\circ\text{C}$). Besikulak eratzeko 30 zikloko estrusioa aplikatzen zaio 0,4 μm -ko porodun filtroetan zehar 55 $^\circ\text{C}$ -tan (Avanti Mini Extruder). Besikula suspentsioaren 20 μ L nahasten dira 40 μm -ko silizezko bihien 5 μ L-rekin, tefloizko xafla baten gainean kokatu, 3 μ L-ko tantak eratu eta huts-ponpan sikatzen dira (1 h). Lipidoz estalita geratu diren bihiak berreskuratu eta 7,5 g/L sakarosa tanpoiaren 8 μ L-tan berreskitzen dira eta 55 $^\circ\text{C}$ -tan berotu 5 minutuz, lipidoa bihietatik aska dadin GUVak eratuz. Azkenik, GUVak BSAz blokeatutako mikroskopiorako erretiluan (MatTek) kokatzen dira, 125 μ L tanpoi isoosmotikoan (10 mM Hepes, 150 mM KCl, pH 7,4).

Peptidodun besikulen kasuan, bihiekin nahastu aurretik besikula suspentsioaren 20 μ L, 20 μ L ur eta peptidoa nahastu eta agitazioarekin inkubatu (25 $^\circ\text{C}$, 15 min). Peptido:lipido 1:1000 mol erlazioa erabili zen.

GUVei Fab-ak kanpotik gehitzen zaizkie 30-60 nM tarteko kontzentrazioetan.

Batuketa saioak mikroskopia konfokalaz

Irudiak Leica TCS SP5 II mikroskopia (Leica Microsystems GmbH) eta x63 ur-inmertsio-objektiboa (NA=1,2) erabiliz lortu ziren. GUVak ekuatorean enfokatu eta

512x512 pixeleko irudiak lortu ziren 400 Hz-tan. *Pinhole*-a 111,41 μm -koa zehazten da (*Airy*). Mintzean tartekatutako Laurdan-a kitzikatzeko bi-fotoi argiztapena erabili zen 780 nm-koa, pulsu arineko titanio-zafiro laserrarekin (Mai-Tai Deepsee, Spectra-Physics). Quasar-a kitzikatzeko HeNe laserra erabili zen (633 nm) eta Alexa488-rako Ar laserra (488 nm). Fluoroforo guztien kasuan, igorpena jasotzeko detektagailu fotobiderkatzaileak erabili ziren (PMT, *photomultiplier*), bakoitzari egokitutako uhin-luzera tartean: Laurdan (435-480 nm), Alexa (500-600 nm), Quasar (695-765 nm).

FCS soluziotan

Soluziotan Fab-ek duten difusio-abiadura zehazte aldera FCS saioak egin dira Alexa488rekin markatutako Fab-ekin (4E10 WT, 4E10 Δ loop, 10E8 WT eta 10E8 W100bD). Fab bakoitzarekin kontzentrazio ezberdinetako hainbat soluzio prestatzen dira HEPES tanpoian (10 mM, 150 mM KCl, pH 7,4), mikroskopiorako erretiluan. Soluzioan 3 dimentsiotako puntu zehatz bat aukeratzeko da: X eta Y ardatzetan erretiluaren erdian kokatzen da; eta Z ardatzean objektiboaren distantzia fokal optimora (160 μm gure objektiboaren kasuan). 111,41 μm -ko *pinhole*-a ezartzen da. Alexa488 kitzikatzeko Ar laserra erabiltzen da (488 nm) eta igorpena jasotzeko argia 500-530 nm-ko filtrotik pasa eta APD detektagailuan jasotzen da. Denbora modu zehatzean kalkulatzeko kanpoko erloju gisa 20 MHz-ko laserra erabiltzen da. Neurketak 2 minututakoak dira.

Neurketen emaitzen autokorrelazio-funtzioa kalkulatu da, eta horien emaitza autokorrelazionatu egiten da MatLab-en bidez, τ_{max} 100 ms-tan finkatuz [10]. Horrela autokorrelazio-kurba sortzen da, zeinetatik Fab-aren kontzentrazioa eta difusio-koefizientea estrapolatzen diren, 3 dimentsiotan zeharreko difusioaren formula erabiliz.

Edozein FCS saiorekin hasi aurretik bolumen fokala kalibratu beharra dago, aldakorra baita. FCSko parametroen kalkulua zehatza izan dadin beharrezkoa da neurketa bakoitzeko bolumen fokalaren neurri errealak ezagutzea. Alexa488 askedun kontzentrazio ezberdinetako soluzioekin (30, 60, 90 eta 120 nM) neurketak egin behar dira. Alexa488 askearen difusio-koefizientea zehaztuta (435 $\mu\text{m}^2/\text{s}$), formulatik gainontzeko parametroak kalkula daitezke: C, z_0 eta ω_0 . Azken bi parametro hauek definitzen dute bolumen fokala.

FCS mintzean

Ekorketazko FCSa egiteko soluziotako konfigurazioa egokitu beharra dago. Laserra eskaner modura mugitzen da marra bakar batean (xt modua) $15.3 \mu\text{m}$ luzerako lerroan zehar (zoom x15), lerroko 64 pixel neurtuz (240 nm pixel tamaina). 1400 Hz -ko maiztasuna erabiltzen da, pixel bakoitza $714 \mu\text{s}$ -ro neurtzen delarik. Eskaneatze-lerroa GUV-aren mintzean zehar kokatzen da eta 5 minututako neurketak egiten dira.

Prozesamenduari dagokionez, eskaneatutako lerroetatik mintzari dagozkion pixelak aukeratu ondoren soluziotako modu berean lortzen da autokorrelazio-funtzioa. Bi dimentsiotan zeharreko difusiorako funtzioa erabiliz D eta C kalkulatzen dira. Bolumen fokalaren neurri zehatzak neurtu beharrean bi parametroen arteko erlazioak definitzen duen eszentrikotasun-koefizientea erabiltzen da ($S = z_0/\omega_0$), 5 balioa konstante mantentzen delarik neurketa guztietarako.

Emaitzak

Difusio koefizienteak soluziotan

FCS teknikak molekulen difusio-koefizienteak modu oso zehatzean kuantifikatzea baimentzen du, eta horretan datza bere erabilgarritasuna. Baina baldintza esperimentalei dagokionez, tarte estuak baino ez ditu onartzen; eta bibliografiatik erreferentziak lor daitezkeen arren, lagin eta mikroskopia bakoitzera egokitzeko froga ugari egin beharra dago. Gure kasuan, aukera guztiak frogatu ostean, baldintza optimoak definitu genituen: Fab-en kontzentrazio tarte (30-120 nM), laserraren potentzia ($10 \mu\text{W}$), neurketen iraupena (2 min), Z planoko posizioa ($160 \mu\text{m}$), eta abar. Lagin guztiek daukate Fab-ari lotutakoaz gain medioan aske dagoen Alexa488-a ($\sim 6\%$), arinago mugitzen dena. Autokorrelazio-kurba aztertzerakoan garrantzitsua da 2 osagaitarako funtzioa erabiltzea, bi populazio horiek ezberdindu eta Fab-aren D eta C balioak zehaztasunez neurtzeko. Behin teknika optimizatuta, Fab-en soluzioan aske daudeneko difusio koefizienteak neurtu ziren (**1 taula**).

FCS esperimentuak egin aurretik, Fab-en sekuentziatik abiatuta euren difusio-koefizienteen gutxi gorabeherako balioa aurreikusi zen, molekula globularren masa molekularra eta difusio-koefizientea erlazionatzen dituen Stokes-Einstein formularen bidez [12]. Fab-en masa molekularra 48kDa -ekoa denez, estimatutako D $91,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ -koa da. Neurtutako balioak ez dira estimazio horrengandik askorik aldentzen. Honek adierazten digu lagina egoera onean dagoela, modu egoki eta monomerikoan egituratuta, Fab-ak disoluzioan benetan aske mugitzen direla eta neurketak egokiak direla; hau da, teknika optimizatzea lortu dela.

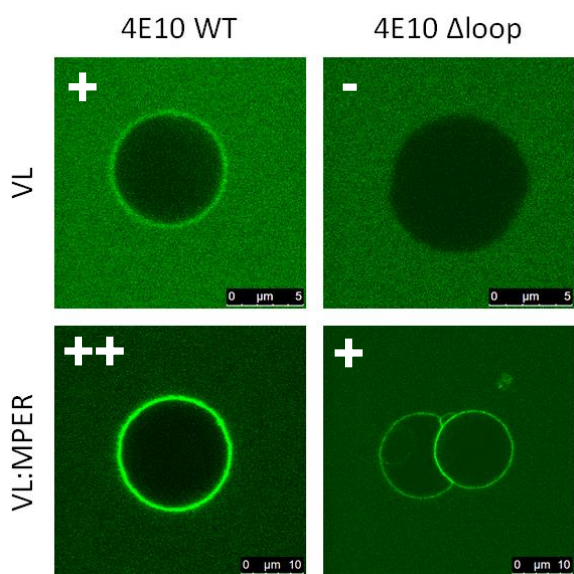
1 taula. Fab-en soluzioko difusio-koefizienteak. Soluzioan FCS bidez lortutako emaitzak.

	4E10 WT	4E10 Δ loop	10E8 WT	10E8 W100bD
D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	99,8	102,7	110	111,9

Bestalde, peptido ezberdinen soluzioekin ezin izan zen emaitzarik lortu, optimizazio prozesuan gainditu ezineko bi oztopo agertu baitziren. Alde batetik, mintzeko peptidoak izanik euren izaera hidrofobikoak agregazioa eragiten du; disolbatzaile ezberdinak frogatu arren (HFIP, DMSO, CH_3OH) peptidoa monomerikoki egituratzea ezinezkoa izanik. Honek difusio-koefiziente oso ezberdindun peptido-populazio heterogeneoa sortzen du, peptido askearen seinalea agregatutakoarengandik banatzea ezinezko bihurtuz. Gainera, peptidoei lotutako fluoroforoa (Quasar-a) ez da FCS-rako nahikoa fotoegonkorra, neurketak aurrera egin ahala bere igorpenaren jaitsierak autokorrelazioa akastuna izatea eragiten duelarik.

Fab-en batuketaren neurketa kualitatiboa

Antigorputzak MPER peptidoa mintz birikoaren testuinguruan ezagutzeko darabilen mekanismoa aztertzeko, birusaren mintza imitatzen duten peptidodun GUVak erabili genituen. VL (*Virus-like*) konposizioa erabili zen (DOPC:Chol:SM:DOPE:DOPS, 14:46:17:16:7) eta MPER:lipido 1:1000 mol erlazioa. Batuketa saioek emaitza positiboa eman zuten kasu guztietan, 10E8 W100bD-renean izan ezik (2 taula). Emaitza positiboa dutenen kasuan, ezagu-mendu horretan mintzarekiko lotura inespezifikoaren ekarpenik dagoen aztertzeko peptidorik gabeko VL GUVak erabili ziren, 4E10 WT izan zelarik emaitza positiboa eduki zuen bakarra (2 taula). 10E8ren emaitzek esperotakoa berresten dute: antigorputzak ez du lipidoarekin elkarrekintzarik eratzten; eta, beraz, peptidoa ezagutzeko W100b hondarra ezinbestekoa da [8].



4 irudia. Batuketa saioetako Fab-en seinalea. Alexarekin markatutako Fab-en seinalea peptidorik gabeko (VL) eta peptidodun (VL:MPER) GUVetara batuta.

4E10en emaitzek WT eta Δ loop-en arteko ezberdintasunak azaleratzen dituzte (4 irudia). Δ loop-aren emaitzek adierazten digute begiztako erpin hidrofobikoko bi triptofanoak ezinbestekoak direla lipidoarekin elkarrekintza sortzeko. Mutazioak eragindako hidrofobizitate murrizpenak ez dio MPER testuinguru lipidikoan ezagutzea galarazten, baina afinitate galera dakarkio mintzean. Emaitza hauen arabera, elkarrekintza hidrofobikoak 4E10 mintzean kokatzen laguntzen du; baina ez da beharrezkoa

CDR-H3 begiztak mintzean egituratutako peptidoarenganako eskuragarritasuna izan dezan. WTaren kasuan, afinitatearen emendatzea erpin hidrofobikoak Fab-a mintzera bideratzearen ondorioz azal daiteke, mintzeko Fab kontzentrazio lokala handitzen baitu, MPER ezagutzeko aukerak areagotuz. Beste aukera bat da 4E10ena mintzak eta peptidoak osatutako epitopo konplexu gisa ulertzea; bi horiekiko elkarrekintzek antigorputzaren afinitatea handitzeko modu kooperatiboan funtzionatzen dutelarik.

Begiztaz gain 4E10ek badu karga positibodun gune bat, PS bezalako lipido elektronegatiboekin interakzioa ezar dezakeena. Lipidoarekiko elkarrekintzan osagai elektrostatiakoaren garrantzia aztertzeke, PS-rik gabeko VL konposaketadun GUVak prestatu genituen. GUV horietan 4E10 WTen batuketarik ezak (**2 taula**) adierazten digu lipidoari lotzeko begiztaz gain gune elektropositiboa ere beharrezkoa dela. Gune honen gabeziak azal dezake 4E10 eta 10E8ren arteko ezberdintasuna autoerreaktibotasunari dagokionez. Birusean badago PSrik (% 7), 4E10en batuketa inespezifikoan laguntzen duena.

2 taula. Fab-ekin mintz birikoaren GUV modeloetan egindako batuketa saioak. Birusaren mintza imitatzen duten GUVetan peptidorik gabe (VL), PSrik gabe (VL – PS) eta peptidoarekin (VL:MPER) lortutako emaitzak. Batuketa saioan emaitza negatiboak (-), batuketaren seinale leuna (+) eta seinale intentsuagoa (++) ezberdintzen dira.

	4E10 WT	4E10 Δ loop	10E8 WT	10E8 W100bD
VL	+	-	-	-
VL (- PS)	-			
VL:MPER	++	+	+	-

Begiztak ezarritako elkarrekintzari dagokionez, GIBarena bezalako mintz kolesterolean aberats batean begiztako bi triptofanoak interakziorako ezinbestekoak izateak pentsarazi egin zuen Trp eta kolesterolaren arteko elkarrekintza espezifikoa egon zitekeela, pi orbitalen teilakatzean oinarritutakoa (*pi stacking*). Hori frogatzeko kolesteroldun (% 50) eta kolesterolik gabeko (% 50 DOPC) mintz-konposaketak prestatu ziren. Gainera, mintz-birikoak paketamendu-maila oso altua dauka bere konposaketa kolesterol eta esfingomielinan aberatsa dela eta [4]. Zurruntasun honek antigorputzaren lipidoarekiko elkarrekintza inespezifikoan izan dezakeen eragina aztertzeke POPS eta DOPSdun GUVak prestatu ziren (**3 taula**). Lipido-nahaste guztiak 1:1 mol erlazioan prestatu ziren, guztietan % 50a PS izanik, Fab-en lipidoarekiko batura areagotzeko.

4E10 WTen emaitzek erakusten dute kolesterolaren presentzia ez dela batuketarako erabakigarria eta, hortaz, pi orbitalen teilakatzean oinarritutako elkarrekintza espezifikoaren hipotesia baztertzen da. Beraz, triptofanoek burututako ezinbesteko elkarrekintza horrek

hidrofobiko inespezifiko soila behar du izan. DOPSDun mintzetan zurrungoak diren POPSDunetan baino batuketa gehiago antzemateak adierazten digu mintzaren jariakortasunak Fab-aren batuketa errazten duela. Honek CDR-H3 begiztaren erpina mintzean txertatzen delako ideia baieztatzen du. GIBarena edo Chol:POPS bezalako mintz oso zurrunetan afinitatea murriztu egiten da, baina batuketa galarazi barik. Beraz, 4E10en lipidoarekiko batura elkarrekintza hidrofobiko eta elektrostatiko inespezifikoetan oinarritutakoa dela baieztatu daiteke.

3 taula. Fab-ekin jariakortasun ezberdineko GUVetan egindako batuketa saioa. Lipido-konposaketa guztietan bi espezieak 1:1 mol erlazioan nahastuta daude.

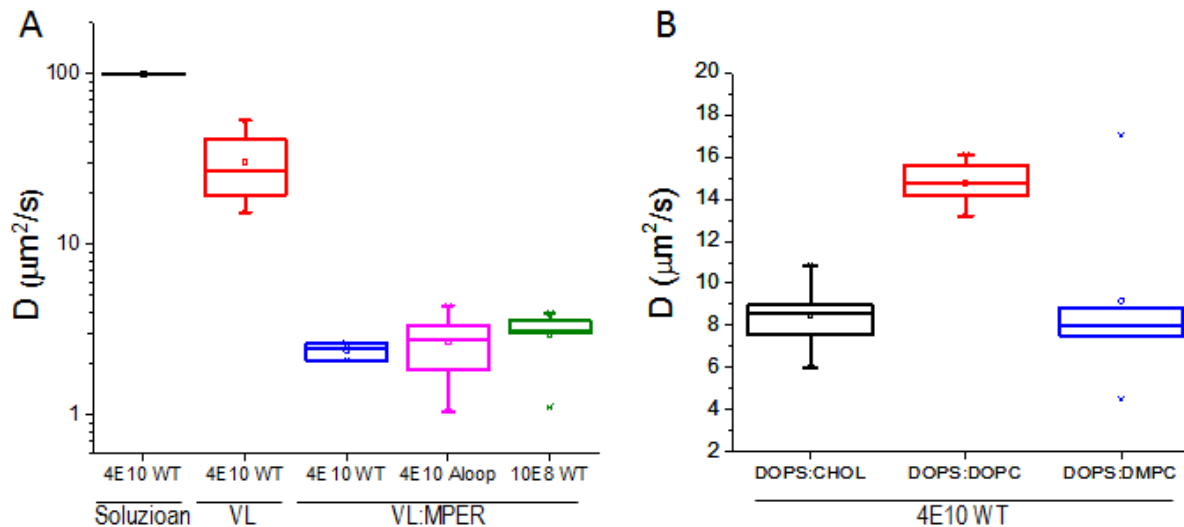
	+ Chol		- Chol	
	Chol:DOPS	Chol:POPS	POPC:DOPS	POPC:POPS
4E10 WT	++	+	++	+
4E10 Δ loop	-		-	

Mintzei lotutako Fab-en difusioa

Batuketa saioen bidez Fab bakoitza ze mintz lotzeko gai den aztertu ostean, elkarrekintza horien karakterizazio xehea egiteko sFCS teknikaz baliatu ginen. Neurketetatik mintzei lotuta dauden Fab-en difusio-koefizienteak kalkulatu genituen. VL konposaketadun GUVen emaitzei esker, 4E10 WTen 3 egoera ezberdinu daitezke (**5A irudia**): soluziotako difusioa, VL mintzari lotuta eta VL:MPER mintzari lotuta. VL mintzarekin eratzen duen interakzio inespezifikoaren ondorioz Fab-aren difusioa 2 dimentsiotara mugatzen da, bere difusio-koefizientearen murrizpen handiarekin ($D \sim 30 \mu\text{m}^2/\text{s}$). MPER:VL besikulen emaitzek erakusten dute peptidoarekiko elkarrekintza espezifikoak Fab-aren difusio-abiadura $2,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ -ra murrizten duela. Mintza inespezifikoki batzen ez duen Δ loop-aren kasuan, MPER:VL GUVetara lotzean 4E10 WTen difusio-koefiziente berdinarekin mugitzen da ($D = 2,7 \mu\text{m}^2/\text{s}$), behin peptidoari lotuta elkarrekintza hidrofobikoak difusioarengan eraginik ez duela adieraziz. Gainera, epitopo ezberdina izan arren 10^8 Fab-aren difusioa ez da 4E10enarengandik bereizten ($D = 3 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Beraz, MPERi lotutako Fab-en difusio-abiadura peptidoak ezartzen du; eta ez da Fab-aren loturak eragin lezakeen konformazio, sakonera edota orientazio aldaketarik antzematen.

4E10en begiztaren elkarrekintza hidrofobikoaren ulermen sakonagoa lortzeko, mintz-konposizio ezberdindun GUVen mintzean duen difusio-koefizientea neurtu genuen (**5B irudia**). Konposaketa guztietan DOPSa 1:1 mol erlazioan nahastu da mintzaren jariakortasunarengan

eragin ezberdina duten lipido banarekin. Emaitzek erakusten dute jariakorrak den DOPS:DOPC mintza lotzean, Fab-aren difusio-koefizientea ($D = 14,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$) beste bi konposaketa zurrunagoetan baino arinagoa dela. DOPS:Chol eta DOPS:DMPCren D balioak baliokideak dira ($8,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ eta $9,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$, hurrenez hurren), kolesterolak Fab-aren mugimenduarengan eragina duen elkarrekintza espezifikorik sortzen ez duela adieraziz. Behaketa hauek bat datoz batuketa-saiotako emaitzekin eta, beraz, berretsi egiten dute 4E10en begiztaren elkarrekintzaren izaera inespezifikoa.



5 irudia. Fab-en difusio-koefizienteak. FCS bidez neurtutako difusio-koefizienteak. A) Fab ezberdinek VL mintzak lotzean jasaten duten difusio-abiaduraren murrizpena. B) Mintzaren jariakortasunak 4E10 WT Fab-aren difusioarengan duen eragina.

Eztabaida

4E10 eta 10E8 antigorputz neutralizatzaileak GIB birusari aurre egiteko tresna oso eraginkorrak dira; eta euren ezagumendu mekanismoaren ulermenean sakontzea gaixotasunaren tratamendu edota prebentzioan oso lagungarria litzateke. Orain arte egindako ikerketa gehienetan, antigorputz hauek MPERekin duten elkarrekintza soluzioan karakterizatu izan da gehienbat. Mintz testuinguruan ematen den elkarrekintzari buruz, aldiz, informazio oso orokorra eta kualitatiboa baino ez dago. Baina egoera fisiologikoan MPER mintz birikoan txertatuta egoteak bere orientazio eta eskuragarritasuna mugatzen ditu, elkarrekintza baldintzatuz. Gainera, 4E10en kasuan epitopoa ez da peptidikoa soilik, eta bere konplexutasunean aztertu beharra dago, lipido eta guzti. Beraz, elkarrekintza mintz-sistemetan aztertzeko beharrari erantzunez, FCS teknika GIB birusaren modelora egokitu dugu, honek ahalbidetzen duen karakterizazio xehea mintzean burutzeko.

Teknikari buruz

Mintzean neurtzen hasi aurretik, teknika soluziotan optimizatu eta Fab-en difusio-koefizienteak neurtu genituen. Peptidoekin, ordea, ez zen posible izan euren izaera hidrofobikoak eragindako agregazioarengatik. pFCStik elkarrekintzari buruzko informaziorik lortu ez dugun arren, teknika optimizatuta izateak hainbat aukera eskaintzen ditu etorkizunerako. Bereziki interesgarria litzateke pFCS bidez soluziotan Fab-ak birusei zelan lotzen zaizkien aztertzea; birusen tamaina dela eta batuketak Fab-en D-ren murrizpena eragingo bailuke, lotuta eta aske dauden Fab-en populazioak ezberdintzea baimenduz. Horri esker, bakoitzaren kontzentrazioetik batuketaren afinitatea modu errazean kalkula liteke.

GIBaren mintzean sFCS bidez Fab-ak aztertuz interakzioari buruzko informazio asko lortu dugun arren, sFCS teknikak berezko duen muga batekin topo egin dugu. Izan ere, 1,4 kHz-ko maiztasunaz eskaneatzearen ondorioz pixel bakoitza 714 μs -ro neurtzen bada; fokuan hori baino denbora gutxiago dauden molekulen D determinatzea ezinezkoa da. Honen arabera, zehaztasunez neurtu daitekeen D balio maximoa 17 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ -koa da, hori baino arinago mugitzen diren molekulen difusioa ezberdintzea ezinezkoa izanik. GIBaren mintza imitatzen duen VL konposizioaren kasuan, peptidorik gabe lotzen diren Fab-ak 17 μ^2/s baino arinago mugitzen dira eta, beraz, ezin zaie D balio bat esleitu. Ez da beharrezkoa balio zehatz bat izatea VL:MPER mintzean baino arinago mugitzen dela ondorioztatzeko (**5A irudia**); baina mintzeko osagai ezberdinen eragina aztertzeko VL modeloa ez da baliagarria. Horren ordez, % 50eko PS edukia duten mintz-konposaketak erabili dira; azaleko elektronegativitate handia izateagatik Fab-arekiko elkarrekintza elektrostatikoa areagotzen dutenak, D murriztuz. Mintz konposaketa hauetan posible izan dugu jariakortasuna eta kolesterolak Fab-en difusioarengan duten eragina aztertzea (**5B irudia**).

Antigorputz eta lipidoaren arteko elkarrekintzari buruz

Aurretik argitaratutako lan batean frogatu genuen 4E10ek lipidoekin eratzen duen elkarrekintza ezinbestekoa dela bere ahalmen neutralizatzailea mantentzeko [1]. Eragin hori zelan lortzen duen ulertzeko, beharrezkoa da ezer baino lehen elkarrekintza horren izaera ezagutzea. GIBaren mintzeko kolesterol ugaritasunak pentsarazi zigun, begiztaren erpineko triptofanoek pi orbitalen teilakatzean oinarritutako elkarrekintza elektrostatiko espezifikoak sor zezaketela kolesterolarekin. Aitzitik, batuketa-saioen eta sFCS neurketen emaitzek erakusten dute kolesterolaren eliminazioak ez duela Fab-en afinitate ezta difusio-abiadurarengan eraginik, aurreko ideia deuseztatuz (**3 taula, 5B irudia**). Epitopo peptidikoari soluzioan lotutako 4E10en egiturak iradokitzen du CDR-H3 begiztaren erpina mintzean txertatzen dela [14].

Jariakortasun ezberdineko mintzetan neurtutako Fab-en batuketa eta difusioak ezberdinak izateak txertaketa hori ematen dela baieztatzen du (3 taula, 5B irudia). Gainera, 4E10eko gune positiboak mintzarekin eratutako elkarrekintza elektrostatikoaren garrantzia ere frogatu dugu. Honen arabera, 4E10 GIBaren mintzeko lipidoei lotzen zaie elkarrekintza hidrofobiko zein elektrostatiko inespezifikoaren bidez.

VL:MPER konposaketadun GUVekin burututako batuketa-saioetan frogatu dugu 4E10 WTek afinitate handiagoa duela Δ loop-ak baino (2 taula, 4 irudia). Beraz, epitopo peptidikoaren presentzian lipidoarekiko elkarrekintza beharrezkoa ez den arren, batuketa areagotzen laguntzen du. Orain arte, begiztak 4E10en neutralizazioan duen funtzioaren inguruko azalpen ezberdinak planteatu dira. Batek dio begiztak peptidoa mintzetik erauzten duela, hau antigorputzak MPER lotzeko beharrezkoa delarik [2]. Antigorputzaren ezagumendu-mekanismoa hau balitz, begiztaren erpinean mutazioa duen Δ loop Fab-ak ezingo luke MPER lotu, baina gure batuketa-saioetan ezagumendua badagoela frogatzen dugu (2 taula, 4 irudia). Beste azalpen baten arabera, peptidoa lotu ondoren barneratzen da begizta mintzean, antigorputzak neutralizaziorako beharrezko duen konformazioa hartuz [15]. Hirugarren azalpenaren arabera, ordea, lehenbizi begiztak antigorputza mintzera bideratzen du, MPERengandik gertu kokatuz; bigarren urrats batean elkarrekintza espezifikoaren bidez lotu dezan erraztuz. Gure emaitzak azken bi hauekin bat datoz, batuketaren ordena edozein dela ere, begiztak horren afinitatea handitzen duela frogatzen baitute.

MPERen ezagumenduari buruz

MPERen ezagumendu espezifikoari dagokionez, batuketa-saioetan ikusi dugunaren arabera 4E10en begiztaren erpineko elkarrekintza inespezifikoa ez da beharrezkoa antigorputzak bere epitopoa mintzean ezagutu dezan (2 taula, 4 irudia). Emaitza hau ez dator bat birusekin egindako batuketa esperimenduekin, zeintzuetan ez zen Δ loop-aren ezagumendurik antzeman [1]. GUVetan emaitza ezberdinak lortu izanaren arrazoa MPER peptidoaren eskuragarritasuna izan daiteke, birusetako *Env* glikoproteinarekin alderatuta epitopoa ageriago uzten baitu. Hau da, baliteke birusetan MPERek duen eskuragarritasun murriztuagoarengatik Δ loop-en batuketa eragotzita egotea. Hau horrela izatekotan, eta begizta mintzean egituratutako MPERen ezagumendu espezifikorako beharrezkoa ez dela frogatu ostean, birusetan WTa batzeko gai izateak adierazten digu begiztak MPERen eskuragarritasuna handituz egiten duela posible ezagumendua eta horren ondoriozko neutralizazioa. Hau da, birusei buruz ari garenean, soluzioan dauden Fab-entzako eskuragarri ez dagoen MPER

sekuentzia lotu ahal izateko, beharrezkoa dela lehenengo urrats batean elkarrekintza inespezifikoaren bidez mintzean kontzentrazio nahikoan lokalizatzea.

Fab ezberdinekin sFCS bidez egindako esperimentuan neurtutako D balioen artean ezberdintasun oso txikiak baino ez ditugu antzeman, difusio-abiadura peptidoak definitzen duela ondorioztatuz. Badira hainbat ikerketa Fab ezberdinek MPER lotzerakoan bere orientazio, konformazio edota sakonerarengan duten eragin ezberdina deskribatzen dutenak [2]. Hau horrela balitz, pentsatzekoa da aldaketa horiek MPERen mintzean zeharreko mugimenduan eragina izango luketela, baina gure emaitzetan ez da horrelakorik antzematen, Fab ezberdinek MPER lotzeko batuketa-mekanismo berdina darabiltela iradokiz. Aurrerago, MPER peptidoa FCSrekin bateragarria den fluoroforo batekin markatzeari esker, posible izango dugu MPER askearen mintzean zeharreko D neurtzea. Horrela, D hau Fab-MPER konplexuarekin alderatuta, Fab-en loturek MPERengan aldaketarik eragiten duten aztertzea posible izango dugu. Gainera, MPER eta Fab-en seinalearen korrelazio gurutzatua eginez (FCCS), mintzean kokatutako Fab-en MPERekiko loturaren afinitatea neurtu dezakegu.

Begiztaren garrantzia neutralizazioan

Lan honi esker 4E10en begiztak neutralizazioan duen funtzioa sakonago ulertu ahal izan dugu. Lipidoekin eratzen duen elkarrekintza inespezifikoaren bi osagaien izaerak identifikatu ditugu: elektrostatikoa eta mintzean txertatzea eragiten duen hidrofobikoa. Batuketa-saioen bidez frogatu dugu ez dela peptidoaren ezagumendu espezifikorako beharrezkoa, baina batuketaren afinitatea handitzen laguntzen duela, seguruenik antigorputzen mintzeko kontzentrazio lokala handituz. Birusak ezagutzerako orduan 4E10 WT eta Δ loop-en artean eragiten duen ezberdintasunaren azalpen bat proposatzen dugu: begiztaren bidezko lipidoekiko elkarrekintza inespezifikoak antigorputzak mintzean lokalizatzen ditu, *Env* glikoproteinen baitan ezkatatuta dagoen MPER sekuentziarenganako eskuragarritasuna handituz 4E10i.

Erreferentziak

1. Rujas, E., et al., *Structural and Thermodynamic Basis of Epitope Binding by Neutralizing and Nonneutralizing Forms of the Anti-HIV-1 Antibody 4E10*. J Virol, 2015. **89**(23): p. 11975-89.
2. Song, L., et al., *Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies disrupt a hinge-related function of gp41 at the membrane interface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(22): p. 9057-62.
3. Ivankin, A., et al., *Mechanism of membrane perturbation by the HIV-1 gp41 membrane-proximal external region and its modulation by cholesterol*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(11): p. 2521-8.
4. Brugger, B., et al., *The HIV lipidome: a raft with an unusual composition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2641-6.
5. Finton, K.A., et al., *Autoreactivity and exceptional CDR plasticity (but not unusual polyspecificity) hinder elicitation of the anti-HIV antibody 4E10*. PLoS Pathog, 2013. **9**(9): p. e1003639.
6. Irimia, A., et al., *Crystallographic Identification of Lipid as an Integral Component of the Epitope of HIV Broadly Neutralizing Antibody 4E10*. Immunity, 2016. **44**(1): p. 21-31.
7. Alam, S.M., et al., *The role of antibody polyspecificity and lipid reactivity in binding of broadly neutralizing anti-HIV-1 envelope human monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 to glycoprotein 41 membrane proximal envelope epitopes*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4424-35.
8. Huang, J., et al., *Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody*. Nature, 2012. **491**(7424): p. 406-12.
9. Bacia, K., E. Haustein, and P. Schuille, *Fluorescence correlation spectroscopy: principles and applications*. Cold Spring Harb Protoc, 2014. **2014**(7): p. 709-25.
10. de las Heras, G., *The ptdIns(3,4,5)P3 and PtdSer dependent mechanism of PDK1 regulation in cancer cells : an in situ study by advanced quantitative imaging*, in *Biokimika eta Biologia Molekularra saila*. 2015, Euskal Herriko Unibertsitatea.
11. Carravilla, P., et al., *Two-photon Laurdan studies of the ternary lipid mixture DOPC:SM:cholesterol reveal a single liquid phase at sphingomyelin:cholesterol ratios lower than 1*. Langmuir, 2015. **31**(9): p. 2808-17.
12. Edward, J.T., *Molecular Volumes and the Stokes-Einstein Equation*. Journal of Chemical Education, 1970. **47**(4): p. 261-270.
13. Ruan, Q. and S.Y. Tetin, *Applications of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy in antibody binding studies*. Anal Biochem, 2008. **374**(1): p. 182-95.
14. Cardoso, R.M., et al., *Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41*. Immunity, 2005. **22**(2): p. 163-73.
15. Sanchez-Martinez, S., et al., *Membrane association and epitope recognition by HIV-1 neutralizing anti-gp41 2F5 and 4E10 antibodies*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2006. **22**(10): p. 998-1006.