



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIA ZEHATZAK ETA NATUR ZIENTZIAK

**DOPC:esfingomielina:kolesterol
lipido nahasketa hirutarraren
Laurdan bifotoi azterketek fase
bakarra erakusten dute 1 baino
txikiago diren esfingomielina:
kolesterol erlazioetan**

*P. Carravilla, J.L. Nieva, F. M. Goñi,
J. Requejo-Isidro eta N. Huarte*

432-437 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.59>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



DOPC:esfingomielina:kolesterol lipido nahasketa hirutarraren Laurdan bi-fotoi azterketek fase bakarrea erakusten dute 1 baino txikiago diren esfingomielina:kolesterol erlazioetan.

Carravilla P.^{1,2}, Nieva J.L.^{1,2}, Goñi F.M.^{1,2}, Requejo-Isidro J.¹, Huarte N.^{1,2}

¹*Biofisika Unitatea (CSIC, UPV/EHU), Sarriena Auzoa, 48490 Leioa*

²*Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 644 Kutxatila, 48080 Bilbao*

Laburpena

DOPC:esfingomielina:kolesterol lipido nahasketa zelularen mintz plasmaticoaren eredu gisa erabili ohi da. Nahasketa hau Laurdanez markatutako besikula lamelabakar erraldoietan ikertu da bi-fotoi fluoreszentzia mikroskopia erabilita. Aurretik argitaratutako fotoi bakarreko ikerketetan ez bezala, zeinetan antolaketa heterogeneoa (fase banaketa) proposatzen den 1 baino txikiagoak diren esfingomielina:kolesterol erlazioa molarretan, diagramaren eremu honi dagozkion nahasketetan fase bakarreko antolaketa detektatu dugu. Fase banaketa makroskopikoa fotoi bakarreko kitzikapenez artifizialki eragin daitekela frogatu dugu ere, baita bi-fotoiaz eragotzi daitekela. Laurdanak inguruaren polaritatea antzemateko duen gaitasunaz baliatu gara mintzaren ordena-diagrama eraikitzeke.

Hitz gakoak: Polarizazio Orokortua, Bi-fotoi Mikroskopia, Mintz Domeinuak

Abstract

The ternary lipid mixture DOPC:sphingomyelin:cholesterol has been studied in the form of giant unilamellar vesicles using two-photon fluorescence microscopy. Previous publications based on single-photon fluorescence microscopy had reported heterogeneous phase behavior (phase coexistence) in the region of the phase diagram corresponding to sphingomyelin:cholesterol molar ratios <1. We have examined this region and have found that, under our conditions, only a single liquid phase exists. We have shown that macroscopic phase separation in the above region can be artifactually induced by one-photon excitation, and is prevented using two-photon excitation. The measurement of Laurdan generalized polarization allowed the representation of membrane lateral packing along the diagram.

Keywords: Generalised Polarisation, Two-photon Microscopy, Membrane Domains

1. Sarrera eta motibazioa

Mintzak zelulen osagairik garrantzitsuenetarikoa dira, izan ere bizitza eta heriotzaren arteko muga izateaz gain zelularen funtzio desberdinetan ezinbesteko papera betetzen dute: bizirauteko beharrezkoak diren prozesu biokimikoak espazialki banatzen dituzte, baita hauetan parte hartu modu zuzen edota zeharkakoan, hala nola, energia ekoizpenean, zelulen arteko komunikazioan, zelula barneko zein kanpoko molekulen garraioan... Lipidoak zelulen mintz plasmaticoen osagai nagusiak izanik, lipido hutsez eratutako bigeruzak mintz hauen eredu gisa erabiliak izan ohi dira.

Azkeneko hamarkadetan alorrean onartutako kontzeptu berri eta garrantzitsua da lipidoak mintzaren planoan modu homogeneoan ez antolatzea; are gehiago segregatutako domeinuak eratzten dituztela onartua da, lipido eta proteina zehatz batzuetan aberatsak diren *raft* izeneko domeinu zurrinak (Goni et al. 2008, Sankaram and Thompson 1990, Simons and Ikonen 1997). Nahiz eta *raft* delako hauen hainbat prozesuetako parte hartzea deskribatu den haien ezaugarri asko ezezagunak dira, adibidez tamaina edo biziraupena.

Laborategian mintz modelo sinpleak ezinbestekoak dira honi lotutako prozesuak ikertzeko. Zelulen mintzak fisikoki imitatzeke, domeinuetan banatzeko joera hau betetzen duten lipido

nahasketak erabili ohi dira, mintz plasmaticoetan nagusi diren hurrengo hiru lipidoez eratuta: fosfokolina (PC) espezie asegabea:fosfokolina espezie ase (edo esfingomielina (SM)):kolesterola (CHOL), azken bi lipidoak *raft* domeinuetan aberastuta daudelarik. Nahasketa-eredu hauen inguruko berrikuspina (Veatch and Keller 2003b)-n aurkitu daiteke. Mintz-eredu hauen propietate fisiko-kimikoak hainbat teknika erabiliz aztertu dira, haien artean: fluoreszentzia, mikroskopia, elektrospin erresonantzia edo erresonantzia magnetiko nuklearra.

Gure taldeko aurretiko GIBaren inguruko ikerketak (Apellaniz et al. 2014) kolesterol kopuru handiko mintzen azterketara bultzatu gintuen, lipido hau birusaren mintzaren osagai nagusia baita (%46) (Brugger et al. 2006) eta infekzioarako lehen urratserako ezinbestekoa; izan ere, birusak kolesterola behar du bere mintza eta linfozitoarena fusionatu ahal izateko. Horrela SM:CHOL erlazioa 1 baino txikiagoa den fase diagramaren eremua aztertu da, kolesterol baino esfingomielina gehiago duten mintzak alegia, birusarena kasu. Argitaratutako lan anitzetan oinarrituta, gune honetan bi faseetan antolatutako mintza espero genuen. Bestalde besikula lipidikoak ikusi ahal izateko beharrezkoak diren fluoroforoak kitzikatzean mintzaren osagaien aldaketa kimikoak eragiteko arriskua dagoela deskribatua izan da alde aurretik. Hau guztia kontuan hartu eta DOPC:CHOL:eSM (*eggSM*, arraultzetik erauzitako SMA) nahasketaren ikerketari ekin genion. Horretarako Laurdan fluoroforoa erabili genuen besikulak markatzeko, banaketa lateralari eta ordenari buruzko informazioa eskaintzen duena.

2. Arloko egoera eta ikerketa helburuak

PC:SM:CHOL lipido nahasketa hirutarren inguruko ikerketa ugari argitaratu dira. SM:CHOL < 1 eremua bereziki garrantzitsua da, birus eta zelula mintz gehienetan kolesterola SMA baino kopuru handiagoan agertzen delako. Giro tenperaturan egindakoak soilik kontuan hartuta (lan honetan bezala), eremu honetan desadostasun handiak daudela agerikoa da: batzuen arabera mintzak fase bakarrean antolatzen dira, beste batzuk ordea, lipidoak bi faseetan antolatzen direla proposatzen dute. Ezberdintasun hauen oinarrian teknika desberdinak erabili izana egon daiteke. Adibidez mikroskopia optikoen ebatzen mugak (200 nm ingurukoa) nanodomeinuen detekzioa ekiditen du, teknika espektroskopikoetatik baliatuz gainditu daitekeena. Hala ere, gure kezka nagusia foto-eragindako domeinu makroskopikoak izan dira.

Ikerketa anitzen arabera floreszentzia mikroskopian erabili ohi diren zunda askok nahasketa lipidikoen fase portaerari eragin diezaiokete. Texas Red edo DiIC12 zundek ez bezala, Laurdan-ak fase banaketan eraginik ez izatea frogatzen duten lanak aipagarriak dira (Leung et al. 2014). Are gehiago, zunda honek ez du inongo zaletasunik fase espezifikoekiko, hau da, modu homogeenan banatzen da mintzaren barne. Azken ezaugarri honek mintzaren ordena molekularren kuantifikazioa ahalbidetzen du.

Lan honen helburua DOPC:CHOL:eSM lipido nahasketaren fase diagrama eraikitzea izan da, fase portaera eta mintzaren ordenaren inguruko informazioa barnean hartuko dituen. Aipaturiko guztia kontuan hartuz, artefaktuak ekiditeko arretaz jardun gara.

3. Ikerketaren muina

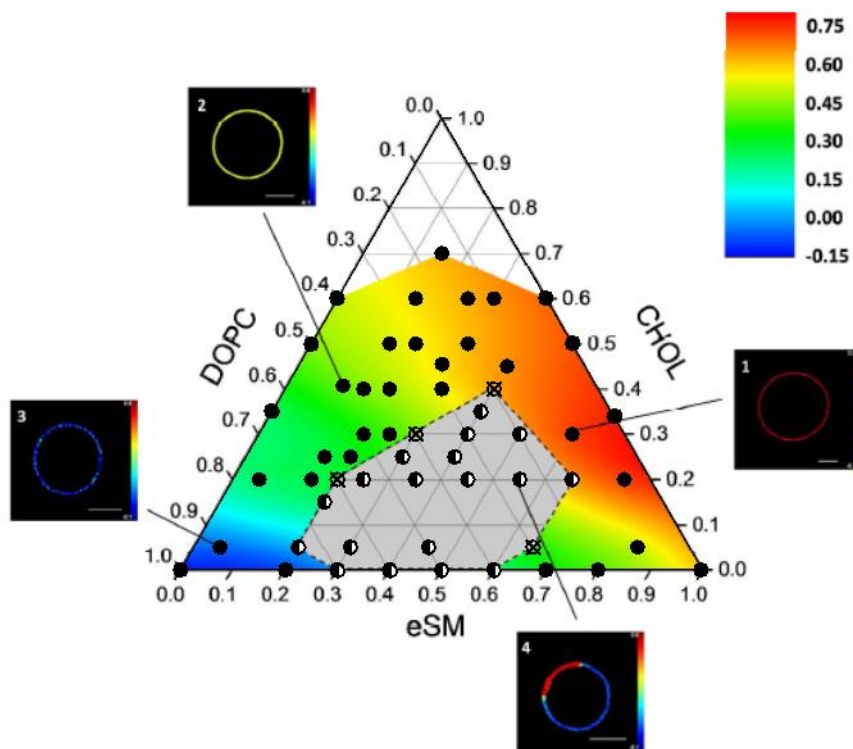
3.1 Kolesterol:esfingomielina erlazio molarrek zuzentzen du mintzen banaketa lateral makroskopikoa

Hemen aurkezten dugun lana sakonki deskribatutako Laurdan zundaren erabilpenean oinarritzen da eta DOPC:eSM:CHOL nahasketaz osatutako besikula erraldoien bigeruzen banaketa lateralaren portaera deskribatzen du. Nahasketa lipidiko hauek mintzetako *raft* domeinuak aztertzeke eta erreproduzitzeko erabili dira, beraz hauen izaera sakonki deskribatzea izango dugu helburu.

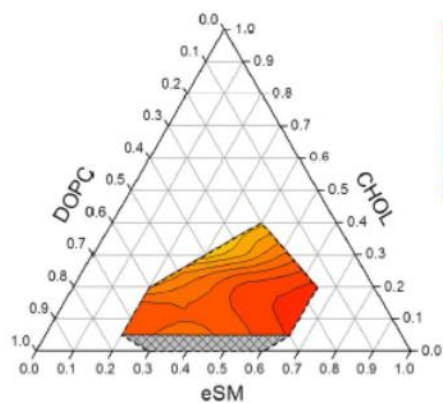
Laurdan zunda mintzen banaketa lateral jarraitzeko erabili ohi da, bere igorpen fluoreszentea uhin-luzera handiagoetara (gorriruntz) mugitzen baita ingurune polarretan eta txikiagoetara (urdineruntz) apolarretan. Mintzetan aldaketa hau zurruntasunarekin zuzenki lotuta dago, beraz Laurdan-a bigeruzen ordena molekularra kuantifikatzeko zunda erabilgarria da. Zoritzarrez Laurdan-aren txuritzeko joera oso handia da, hau da, kitzikapen-igorpen ziklo kopuru txiki bat jasan dezake. Desabantaila honi aurre egiteko energia erdiko bi-fotoietako laser infragorria erabili izan zen argi-iturri bezala, horrekin kitzikapena plano fokalera mugatzen delako. Plano honetatik at zundak bi fotoi xurgatzeko probabilitatea txikia izango da, beraz ez da kitzikatuko eta argiak induzitutako kaltea murriztuko da.

1. irudia. DOPC:eSM:Chol nahasketaren GP fase diagrama

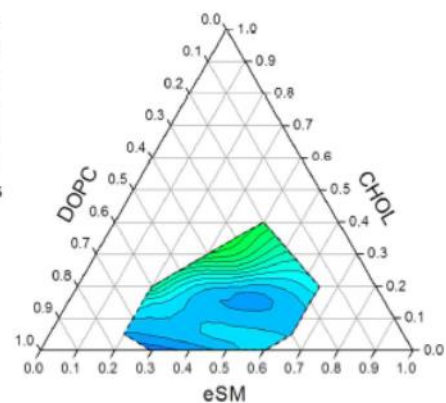
A



B



C



Lehen irudian neurtu ditugun lipido nahasketak desberdin guztiak ikus ditzakegu irudikatuta Gibbs-en triangulu batean, non puntu bakoitza lipido bakoitzaren proportzio zehatzei dagokion. Fase bakarra erakusten duten nahasketak (1-3 besikulen kasua) zirkulu beltz moduan irudikatuta daude eta banaketa laterala erakusten dutenak (4 besikula adibidez) zirkulu zuri-beltzak bezala. Irudikapen hirutar honetan argi ikus daiteke, momenturarte argitaratu denaren aurka, 1 baino txikiagoak diren SM:CHOL erlazio molarra aurkezten duten lipido nahasketetan ez dela fase banaketarik antzematen (Bezlyepkina et al. 2013, Kahya et al. 2003, Lindblom et al. 2006, Tian et al. 2007). Gainera, esfingomielina eta kolesterol kantitate berberak dauzkaten nahasketek besikula populazio heterogeneoak osatzen dituzte: bai fase desberdinak dauzkaten besikulak zein mintz homogeneoak ikuskatzen dira kasu guztietan, aurretik deskribatua izan den moduan (Veatch and Keller 2003a), bi lipido hauen arteko erlazioa faktore kritiko bat dela iradokiz.

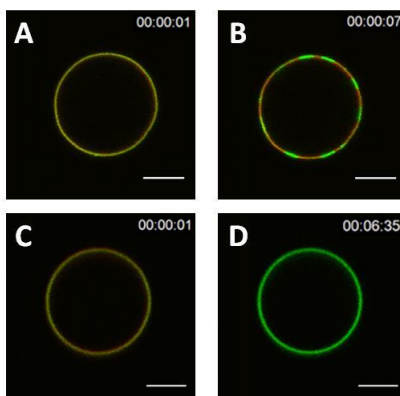
Laurdan zundak, mintzen antolaketa lateralari buruzko informazio kualitatiboa eskaintzeaz gain, konposaketa bakoitzari dagokion lipidoen ordena maila zehatza kuantifikatzeko ahalmena ematen digu. Mintz lipidikoen ordena hauen propietate oso garrantzitsua da, proteina zen ligando desberdinen gerturatze eta txertatzeko ahalmena baldintzatuko baitu. Mintzen paketatze maila Polarizazio Orokortua deitutakoaren bidez kuantifikatuko da (GP, ingelesezko *Generalized Polarization*) eta 1 irudian azaltzen da Gibbs-en hiruki bat osatzeko kolore eskala bat erabiliz: kolore gorriak mintzen zurruntasun maximoa emango du eta urdinak minimoa. Fase banaketarik azaltzen ez duten nahasketak 1A irudian azalduko dira deskribatuta, 1B eta C irudiek ordena desberdineko gunetan banatzen diren mintzak erakusten dituzten bitartean: 1B irudiak gunen zurrunen GP balioak erakutsiko ditu eta 1C-ak gunen fluidoak.

Argi ikus daitekeen moduan, fase banaketarik erakusten ez duten lipido nahasketen artean, esfingomielina gutxi daukaten konposaketetan kolesterol ehunekoa handiagoak mintzaren paketatze maila areagotzen du, alderantziz gertatzen den moduan. Mintz zurruntan (DOPC gutxi) eta fase bakarra duten mintzetan ordea, Laurdan zunda bidez neurtutako fluidotasuna esfingomielina:kolesterol erlazioaren bidez modulatu dagoela ikusten da, bietako lipido bakar baten arabera izan beharrean. X-izpien difrakzio teknika erabiliz argitaratu berri den beste lan baten harian (Quinn 2013), ondoko irakurketa egin daiteke: kolesterol gutxi duten mintzetan, honek esfingomielina molekulen arteko elkarrekintza sustatuko du, beste modu batean molekula barruko edo urarekiko hidrogeno loturak izango liratekeenak, honela mintzaren paketatzea handituz eta neurtutako ordena maximoa jasoz SM:CHOL 80:20 erlazioan.

3.2 Bi-fotoiko mikroskopiak argiaren bidez eragindako domeinu artifizialen eraketa ekiditen du

Laurdan zunda erabiliz ikuskatutako emaitzek mintz homogeneoak deskribatzen dituzte 1 baino txikiagoak diren SM:CHOL erlazioetan, orain arte literaturan azaldu denaren aurka. Honek Laurdan zundaren eragina zein den aztertzea eraman digu. Lagin berdinak beste ohiko zunda fluoreszente batzuk erabiliz prestatu dira: TopFluor-Kolesterol (argi berdea emititzen duen kolesterolaren analogoa, mintz gunen zurruntan, kokatuko dena) eta Rhodamine-DOPE-a (argi gorria igortzen duen DOPE lipidoaren analogoa, mintz gunen fluidoetan, ikusiko duguna).

2. irudia. Argiarekin eragindako mintz banaketa



Bigarren irudian ikus daitekeen moduan, jatorrian homogeneous diren mintzen (2A Irudia) fase segregazioa eragin daiteke segundu gutxi batzutan ikuskatu ahal izateko argi txurra erabiltzen denean (2B Irudia). Ordea, zunda berdinak daramatzen lipidoharri nahasketa bi-fotoi argia erabiliz aztertzen badugu, aurreko efektua ekidinda geratzen da, benetazko mintzaren antolaketa jasoz minutu luzez begiratzen egonda ere (2 C eta D irudiak). Hau da, esan genezake, sistema aztertzeko erabiltzen dugun teknikak eragin zuzena izango duela azken honetan, Edwin Schrödinger-ek bere katuaren paradoxa edo saioarekin azaldu zuenarekin bat eginda. Aurreko lan desberdinetan deskribatua izan da argi bidez lipidoen portaera aldatzeko efektua (Veatch and Keller 2003b), baita prozesu hau ekiditeko saiakerak agente antioxidatzaileak edo erreduzitzaileak erabiliz (Sezgin et al. 2013). Gure lanak, ordea, argi eta garbi frogatzen du argiak eragindako artefaktua den fase banaketa hau ekidin daitekeela bi-fotoi bidezko zunden kitzikapena eraginez.

4. Ondorioak

DOPC:CHOL:eSM nahasketetan SM:CHOL < 1 denean mintza fase bakarrean antolatzen dela frogatu dugu. Diagramaren eremu honetan fotoi bakarreko kitzikapenak fase segregazioa eragin dezakela baieztatu dugu ere; honek aurretik argitaratutako fase diagrametikiko desadostasunak azaldu dezake. Artefaktu hau baldintza egokiak finkatuz ekidin daitekela frogatu dugu, adibidez Laurdan zunda eta bi-fotoieko kitzikapena erabiliz. Azkenik mintzaren ordena SM:CHOL erlazioarekiko menpekota dela frogatu dugu, bai mintz homogeneousotan baita domeinuetan banatutakoetan ere.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan deskribatutako fase diagrama erreminta erabilgarria izan daiteke mintz modeloekin lan egiteko orduan. Laurdan-a zelulen edo birusen mintzen ordena kuantifikatzeko erabili izan da alde aurretik, beraz hauen Polarizazio Orokorua neurtu daiteke eta zurruntasun berdina izango duen nahasketa bat aukeratu diagraman oinarrituta. Nahasketa modelo hauen propietate fisikoetan agente desberdinek, proteinak adibidez, duten eragina kuantifikatu daiteke. Gure asmoa GIB-aren gp41 fusio proteinak birusaren eta linfuzitoaren mintzak fusionatzeko mekanismoa ulertzea da eta horretarako mintz hauen eredu zehatzak behar ditugu, bai lipido bakoitzaren eginkizuna ulertzeko, baita beharrezkoak diren aldaketa fisikoen eragileak identifikatzeko.

6. Erreferentziak

- Apellaniz, B., Rujas, E., Carravilla, P., Requejo-Isidro, J., Huarte, N., Domene, C. and Nieva, J. L. (2014), Cholesterol-Dependent Membrane Fusion Induced by the gp41 Membrane-Proximal External Region-Transmembrane Domain Connection Suggests a Mechanism for Broad HIV-1 Neutralization, *J Virol*, 88(22): 13367-13377.
- Bezlyepkina, N., Gracia, R. S., Shchelokovskyy, P., Lipowsky, R. and Dimova, R. (2013), Phase diagram and tie-line determination for the ternary mixture DOPC/eSM/cholesterol, *Biophys J*, 104(7): 1456-1464.
- Brugger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F. T. and Krausslich, H. G. (2006), The HIV lipidome: a raft with an unusual composition, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(8): 2641-2646.
- Goni, F. M., Alonso, A., Bagatolli, L. A., Brown, R. E., Marsh, D., Prieto, M. and Thewalt, J. L. (2008), Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts, *Biochim Biophys Acta*, 1781(11-12): 665-684.
- Kahya, N., Scherfeld, D., Bacia, K., Poolman, B. and Schwille, P. (2003), Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy, *J Biol Chem*, 278(30): 28109-28115.
- Leung, S. S., Brewer, J. R., Thewalt, J. L. and Bagatolli, L. A. (2014), Effects of fluorescent probes on lipid membrane physical properties, *Biophys J*, 106: 507a-508a.
- Lindblom, G., Oradd, G. and Filippov, A. (2006), Lipid lateral diffusion in bilayers with phosphatidylcholine, sphingomyelin and cholesterol. An NMR study of dynamics and lateral phase separation, *Chem Phys Lipids*, 141(1-2): 179-184.
- Quinn, P. J. (2013), Structure of sphingomyelin bilayers and complexes with cholesterol forming membrane rafts, *Langmuir*, 29(30): 9447-9456.
- Sankaram, M. B. and Thompson, T. E. (1990), Modulation of phospholipid acyl chain order by cholesterol. A solid-state ²H nuclear magnetic resonance study, *Biochemistry*, 29(47): 10676-10684.
- Sezgin, E., Chwastek, G., Aydogan, G., Levental, I., Simons, K. and Schwille, P. (2013), Photoconversion of Bodipy-Labeled Lipid Analogues, *Chembiochem*, 14(6): 695-698.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997), Functional rafts in cell membranes, *Nature*, 387(6633): 569-572.
- Tian, A., Johnson, C., Wang, W. and Baumgart, T. (2007), Line tension at fluid membrane domain boundaries measured by micropipette aspiration, *Phys Rev Lett*, 98(20): 208102.
- Veatch, S. L. and Keller, S. L. (2003a), A closer look at the canonical 'Raft Mixture' in model membrane studies, *Biophys J*, 84(1): 725-726.
- Veatch, S. L. and Keller, S. L. (2003b), Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol, *Biophys J*, 85(5): 3074-3083.

7. Eskerrak eta oharrak

J.L.N., P.C. eta N.H.-k AEB-etako National Institutes of Health 1R01AI097051-01 eta Eusko Jaurlaritzako IT838-13 diru-laguntzak jaso dituzte. J.R.I.-k Ministerio de Economía y Competitividad MINECO FIS2009-07966 laguntza eskertzen du.

Lan hau *Langmuir* aldizkarian 2015eko otsailaren 6an argitaratutako *Two-photon Laurdan studies of the ternary lipid mixture DOPC:SM:cholesterol reveal a single liquid phase at sphingomyelin:cholesterol ratios lower than 1* artikuluan (doi: 10.1021/la504251u) oinarrituta dago, egileak hemen gaineratutako berdinak izanik.