



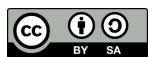
IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a  
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

### ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Kolesterol zunda bioortogonal  
baten bidezko nanoeskala mailako  
lipido hetereogeneotasunaren  
behaketa zeluletan**

*June Olazar Intxausti,  
Maier Lorizate Nogales,  
Oihana Terrones Uria,  
Jon Ander Nieto Garai  
eta F.-Xabier Contreras Gomez*

349-354 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.44>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



## Kolesterol zunda bioortogonal baten bidezko nanoeskala mailako lipido heterogeneotasunaren behaketa zeluletan

June Olazar Intxausti<sup>1,2</sup>, Maier Lorizate<sup>1</sup>, Oihana Terrones<sup>1</sup>, Jon Ander Nieto Garai<sup>1</sup>,  
Xabier Contreras<sup>1,2,3</sup>

1. *Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU/UPV), Sarriena auzoa z/g, 48940 Leioa.*
2. *Biofisika Institutua (EHU/UPV, CSIC). Sarriena auzoa z/g, 48940 Leioa.*
3. *IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48011 Bilbo.*

[june.olazar@ehu.eus](mailto:june.olazar@ehu.eus)

### Laburpena

Baltsa lipidikoaren kontzeptua proposatu zenetik 20 urte baino gehiago igaro diren arren, nanoegitura horien existentziak oraindik ere eztabaidagai izaten jarraitzen du, ez baitago egitura horien nanoantolaketa ikertzeko zelula bizietan erabili daitekeen metodo ez-inbaditzailerik. Artikulu honetan kolesterol zunda bioortogonal bat garatu da (chol-N<sub>3</sub>), zeina bereizmen handiko mikroskopiaz baliatuta, 50 nm baino gutxiagoko lipido-baltsak zelulen mintz plasmatikokoan zuzenean ikusi eta karakterizatzeko metodo baliagarria den. Zunda honek kolesterol endogenoa ordezkatzeko du mintz sintetiko eta zelularretan, asaldurarik gabe.

Hitz gakoak: Kolesterol zunda bioortogonal, lipido-baltsa, bereizmen handiko mikroskopioa

### Abstract

*Although more than 20 years have passed since the concept of lipid raft was proposed, the existence of these nanostructures is still under discussion, as there are no noninvasive methods that can be used in living cells to investigate the nanoorganization of these structures. In this article, a bioorthogonal cholesterol probe (chol-N<sub>3</sub>) has been developed which, combined with live-cell super-resolution microscopy, is a powerful method for direct observation and characterization of <50 nm lipid rafts in the plasma membrane of living cells. This probe mimics endogenous cholesterol in synthetic and cellular membranes without perturbation.*

*Keywords: Bioorthogonal-based cholesterol probe, lipid raft, super-resolution microscopy*

### 1. Sarrera eta motibazioa

Mintz biologikoetan kokatzen diren molekula bata besteari antolatzen dira, zelulen funtzionamendu egokirako plataforma definituak osatuz. Lipido-baltsen hipotesiaren arabera, mintz biologikoetan gertatzen diren lipidoen arteko zein lipido-proteina arteko elkarrekintzek kolesterolean oso aberatsak diren nanodomeinuak sor ditzakete, non mintz-proteinak kokatzen diren beren funtzio fisiologikoak betetzeko. Kolesterolez aberastutako nanoegitura horiek oso paketatuta daude, inguruko lipidoak ez bezala; azken hauek fase jariakorrago osatzen dute. Baltsa lipidikoek funtzio biologiko gehienetan parte hartzen dute eta zenbait giza gaixotasunekin erlazionatuta daude.

Hala ere, zelulen mintz plasmatikokoan nanoeskalako lipido heterogeneotasuna zuzenean ikusteko zailtasunak, lipido-baltsen existentzia kolokan jartzen du. Bereizmen handiko fluoreszentsia mikroskopioan aurrerapen handiak egin diren arren, lipido nanodomeinuen zuzeneko bistaratzeko eragozten dute lipidoen difusio azkarrak eta zelula mintzetan lipidoak duten bizi-denbora laburrak.

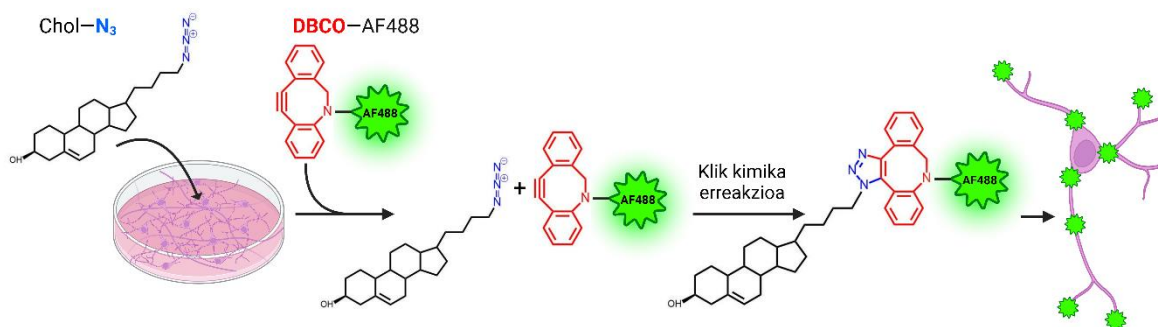
## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Orain arte, mintzaren heterogeneotasuna mikroeskalan behatu eta baieztatu da mintz-sistema modeloen eta ordenagailu bidezko simulazioen bidez, zeintzuetan lipido konposizioa moldatzeko erraza den. Kontrara, ezin izan da mintzeko lipido-baltsetan integratu daitekeen, bere analogo naturalaren banaketa eta garraio bera azaltzen dituen, eta bereizmen handiko mikroskopiarekin bateragarria den molekula fluoresenterik garatu.

Aipatutako beharrari aurre egiteko, proiektu honetan kimika bioortogonal erabilia kolesterol analogo berritzaile bat garatu da, zeinak kolesterol molekularen 24. posizioan azida talde ( $N_3$ ) bat txertatuta duen (chol- $N_3$ ). Aldaketa horrek kolesterol zundaren propietate biofisiko eta metabolikoetan duen eragina minimoa da eta, aldi berean, klik kimika erreakzioen bidez fluoresenteki markatu eta honen dinamika jarraitzea ahalbidetzen du.

Klik kimika, orokorrean, bi biomolekulen artean lotura kobalenteak eratzen dituen erreakzio bioortogonaletan oinarritzen den metodoa da; erreakzio hauek ez dute zelularen bidezidor metaboliko naturala eraginik izango. Klik kimikan talde funtzional espezifikoek hartzen dute parte, haien artean lotuz erreakzio desberdinen bidez. Biokimikaren arloan, erreakzio eta talde funtzional konbinazio ohikoena “kobreak katalizatutako azida-alkino zikloadizioa” da, zeinetan kobreak biomolekula bateko azida taldearen eta beste bateko alkino taldearen arteko lotura kobalentearen eraketa katalizatzen duen. Hala ere, kobrea zelulentzako toxikoa izanik, kobreak menpeko klik kimika erreakzioa ez da baliagarria zelula bizietan azterketa funtzionalak egiterako orduan. Horregatik, lan honetan kolesterolaren dinamika zelula bizietan ikertu denez, bestelako klik kimika erreakzio bat erabili da, azida talde baten eta dibenzozikloktinaren (DBCO) arteko loturan datzana, hain zuzen ere. Talde funtzional hauek katalizatzaileen beharrik gabe triazol lotura bat eratuz elkartzen dira eta, beraz, erreakzioa zelula bizietan egin beharreko azterketekin bateragarria da (1. irudia).

**1. irudia. Azida-DBCO klik kimika erreakzioaren irudikapen grafikoa.** Neurona kortikalen kultibo zelularrean, chol- $N_3$ -a gehitzen da, kolesterol molekularen 24. posizioan azida talde bat txertatuta duen kolesterol endogenoaren analogoa. Zeluletan txertatu ondoren, Alexa Fluor 488 (AF488) fluoroforoari lotutako DBCO molekularekin batuko da berezko klik kimika erreakzio bioortogonal baten bidez. Hala, neuronetan kolesterola txertatu den guneak fluoresenteki markatuta azaltzen dira.



Azken urteetan, klik kimikak orain arte behatzeko zailak ziren biomolekulen markaketa espezifikoa eta hauen jarraipena egitea ahalbidetu du eta, bide honetatik, kimikaren, biologiarren zein biokimikaren alorretan metodo baliagarria dela frogatu da. Hori dela eta, teknika garatzeagatik Bertozzik, Meldal eta Sharplessek Kimikako Nobel saria jaso zuten 2022an.

## 3. Ikerketaren muina

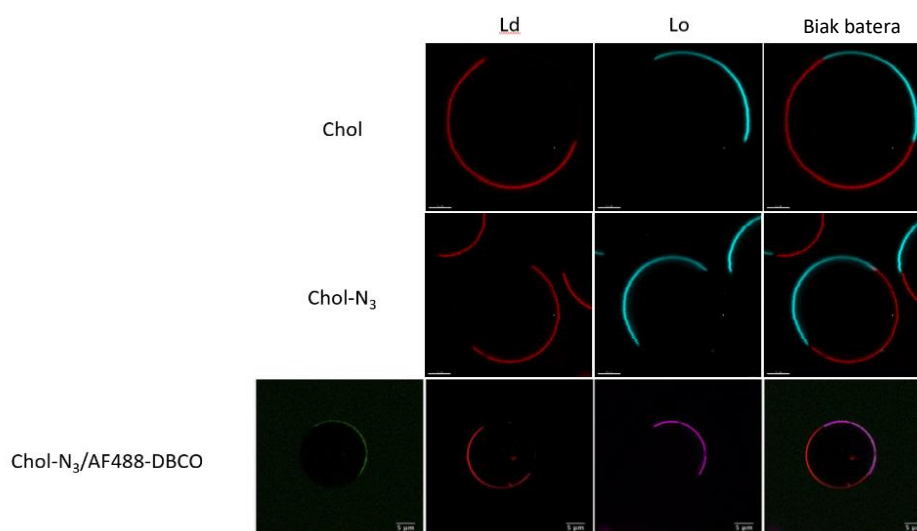
Lehenik, kolesterol zundak duen portaera ikertu zen bere analogo endogenoarekin alderatuta. Ordenagailu bidezko esperimintuek, ingurune hidrofobiko batean kokatutako chol- $N_3$ -aren erabateko estereokimika eta topologia molekularra kolesterol naturalean (chol) antzemandakoen oso antzekoak direla erakutsi zuten.

### 3.1. Kolesterol bioortogonalaren azterketa

Zundan txertatutako modifikazio kimikoak jatorrizko molekularen jokabidean eraginik bazuen aztertzeke, zenbait kontrol esperimentu burutu ziren. Horietan, chol-N<sub>3</sub>, markatua (AF488-DBCOekin lotua klik kimika erreazio baten bidez) zein ez-markatua, eta chol-aren jokamolde biofisikoak alderatu ziren mintz-modelo eta mintz zelularrak erabilia.

Lehenengo eta behin, Laurdan zunda fluoreszentea erabili zen. Molekula hau mintzean txertatzen da eta ingurunearen polartasunaren arabera, bere emisio espektroa aldatzen da. Horrela, likido ordenatu fasean dagoenean, bere emisio maximoa urdinerantz desplazatzen da eta likido desordenatu fasean dagoenean gorriantantz. Mintzeko baltsak batez ere likido ordenatu fasean azaltzea esperoenez, Laurdan zundaren aipatutako propietateak mintzaren paketamenduan ematen diren aldaketak detektatzeko erabili daitezke. Horretarako, likido ordenatu eta likido desordenatu faseetan banatuko zirela jakina zen konposizio zehatzeko lamela bakarreko besikula erraldoiak erabili ziren. Horietan, Laurdan molekula txertatu zen, chol, chol-N<sub>3</sub> edo chol-N<sub>3</sub>/AF488-DBCO-rekin batera. Guztiek mintzaren ordenamendu maila eta fase-banaketa bera erakutsi zuten, erabilitako kolesterol analogoa edozein zela ere. Gainera, chol-N<sub>3</sub>-ak mintzeko domeinu lipidikoak indutzeko gaitasuna duela baieztatu zen, nanodomeinuen sorrera antzekoak behatu baitziren kolesterol molekula edozein izanda ere (2. irudia).

**2. irudia. Lipidoen fasekako banaketa gaitasuna lamela bakarreko besikula erraldoietan.** Konposizio ezberdineko lamela bakarreko besikula erraldoietan lipidoak likido desordenatu (Ld) eta likido ordenatu (Lo) bezala banatzen dira, chol-aren, chol-N<sub>3</sub> analogoaren zein fluoreszente markatutako analogoaren presentzian.



Azkenik, chol-ak eta chol-N<sub>3</sub>-ak zeluletan baneratzeko bidezidor bera baliatzen zuten aztertu nahi izan zen. Horretarako, zeluletan lehia froga bat egin zen: chol-N<sub>3</sub>-aren kontzentrazioa konstante mantendu bitartean, chol-aren kontzentrazioa handitzen joan zen. Espero bezala, chol-aren kontzentrazioaren handipenak, chol-N<sub>3</sub>-aren absortzio-maila murriztu zuen. Honek chol-N<sub>3</sub>-ak chol-aren absortzio bidezidor bera jarraitzen zuela baieztatu zen.

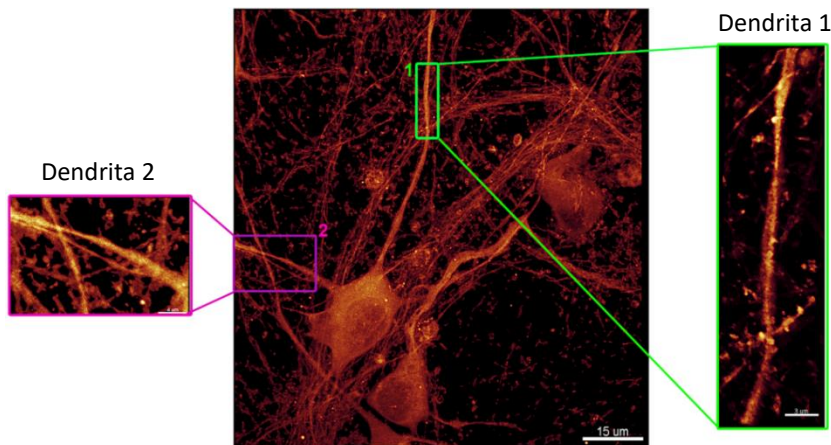
Orokorki, egindako esperimentuek chol-N<sub>3</sub>-ak, markatuta egon zein ez, bere analogo endogenoaren modu berean jokatzen duela erakusten dute eta zelula bizietan honen jarraipenerako aproposa dela baieztatzen dute.

Behin kolesterol zundaren azterketa biofisikoa eginda, kolesterolaren detekziorako chol-N<sub>3</sub> zundaren bateragarritasuna aztertu zen neurona kortikaletan.

Horretarako, alde zuzenetik zeluletan gehitutako chol-N<sub>3</sub>-a, AF555-DBCO molekularrekin batu zen kobrerik gabeko klik kimika erreazio baten bidez. Markatzaileak fluoroforoa eta erreazioan parte hartzen duen DBCO taldearen artean lotzaile bat dauka, fluoroforoak lipidoaren propietate fisiko-kimikoetan izan dezakeen eragina minimoa izate asmoz.

Neuronetan chol-N<sub>3</sub>-aren irudi konfokalek molekularen markaketa intentsua erakusten dute, batez ere soma, axoi eta dendritetan (3. irudia). Beraz, emaitza hauek zelula bizidunetan kolesterolaren dinamika jarraitzeko zunda bioortogonalaren erabilera balioztatzen dute.

**3. irudia. Chol-N<sub>3</sub>-az tratatutako neurona kortikalen irudi konfokala.** Neurona hauek kobre gabeko zikloadizio erreakzio baten bidez AF555-DBCOekin markatu dira. Karratu berdea eta arrosa dendritetan zehar ematen den chol-N<sub>3</sub>-aren banaketa behatzeko handipenak dira.

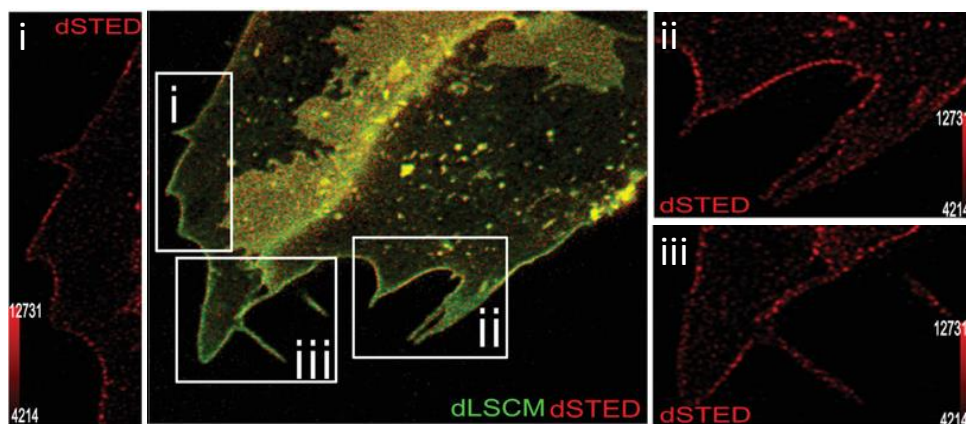


### 3.2. Nanoeskalako lipido heterogeneotasunaren detekzioa atsedeneko zelula bizietan

Behin kolesterol zunda berria balioztatua, kolesterolean aberatsak diren nanodomeinuen irudikapena egin zen SH-SY5Y zeluletan. Horretarako, zunda kimikoa STED (*stimulated emission depletion* siglak ingelesez) mikroskopiarekin konbinatu zen. Mikroskopia mota hau bereizmen handikoa da, nanoeskalan prozesu biologikoak xehetasun handiz (<50 nm) ebazteko erabilia, oro har.

Chol-N<sub>3</sub>-arekin tratatutako zelulak AF488-DBCO molekularrekin markatu eta bi dimentsiotako STED nanoskopia bidez ikusi ziren. Zelulen mintz plasmatikoa zeharreko kolesterolaren banaketa espazialaren bereizmen handiz ikus daiteke STED mikroskopia bidez, eta bertan domeinu nanoskopikoak daudela ikusi daiteke. Jasotako irudien handipenek 20-40 nm-tako nanomeinuak erakusten dituzte (4. irudia).

**4. irudia. Kolesterolean aberatsak diren nanodomeinuak SH-SY5Y zelulen mintz plasmatikoa.** Irudian STED mikroskopia (gorriz) eta mikroskopia konfokal (berdez) bidez lortutako argazkien konbinazioa beha daitezke. Chol-N<sub>3</sub>-ren zelulan zeharreko banaketak domeinu nanoskopikoen presentzia azaltzen du mintz plasmatikoa perspektiba basaletik (i, ii eta iii).



Emaitzek kolesterolean aberatsak diren nanodomeinuak mintz plasmatikoa heterogeneoki banatuta daudela, eta tamaina eta morfologia desberdinak dituztela adierazten dute.



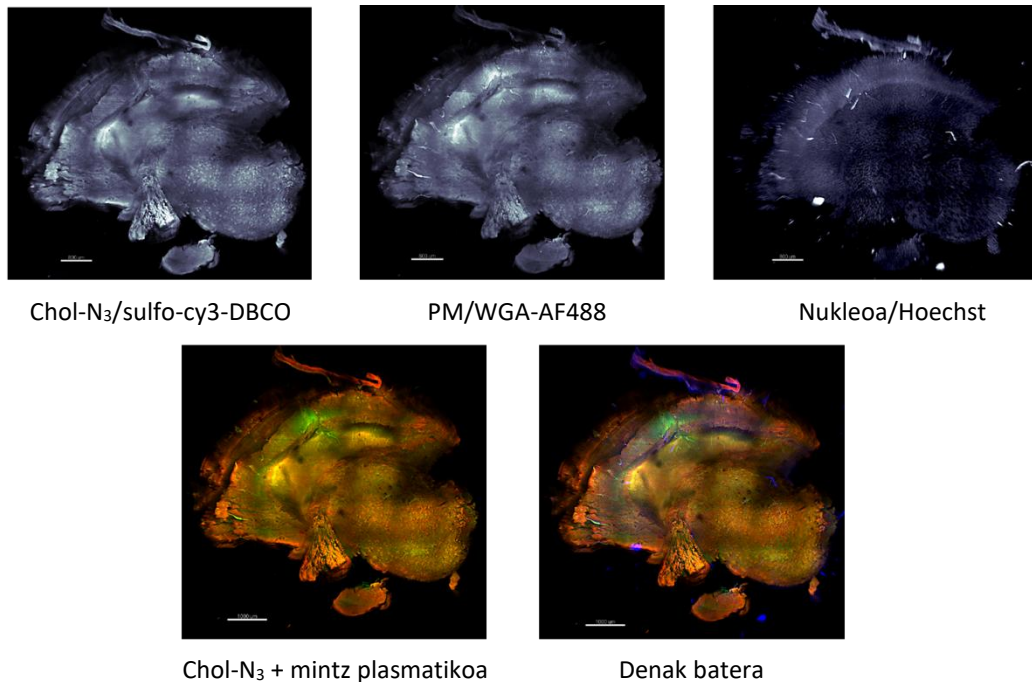
### 3.3. Kolesterola eta garuna

Ehunetan lipido espezieak bakarka bereizmen handian ikustea zaila izaten da, batez ere garunean, non lipido eta kolesterol kontzentrazio handiak aurki daitezkeen. Hala ere, chol-N<sub>3</sub>-ak zeluletan azaltzen duen portaera chol-aren parekoa dela frogatu ostean, garunean hiru dimentsiotako kolesterolaren banaketa aztertu zen fluoreszentsia mikroskopioaren bidez.

Horretarako, 500 µm-tik 1 mm-ra bitarteko lodiera zuten arratoiaren garun-xerrak ex vivo tratatu ziren sulfo-cy3-DBCOekin markatutako chol-N<sub>3</sub>-arekin. Arratoiaren burmuinaren xerrak mikroskopio konfokal bat erabiliz jaso ziren eta irudikapen software baten bidez, burmuinaren hiru dimentsiotako berreraikuntza osoa burutu zen. Zelulak modu trinko eta homogeenan markatuta azaltzen dira lagin osoan zehar (5. irudia). Emaitza horiek bat datoz burmuin zeluletan espero zitezkeen kolesterolaren banaketa orokorrarekin.

Mintz plasmaticoan kolesterolean aberatsak diren egituren presentzia are gehiago berresteko, garun laginak fluoreszentezki markatutako lektina batekin (WGA-AF488) tratatu ziren, mintz plasmaticoaren markatzaile ezagun bat. Ko-lokalizazio handia behatu zen kolesterol zunda eta mintz plasmaticoaren markatzailearen artean (5. irudia).

**5. irudia. Kolesterolaren banaketa garunean.** Kolesterol sintetikoa sulfo-cy3-DBCO fluoroforoarekin markatu da klik kimika erreakzio baten bidez. Mintz plasmaticoa eta nukleoa WGA-AF488 eta Hoechst bidez markatu dira, hurrenez hurren.



### 4. Ondorioak

Oro har, fluoreszentezki markatzean jatorrizko molekularen propietate fisiko-kimiko berak mantentzen dituen eta bereizmen handiko fluoreszentsia mikroskopioarekin bateragarria den kolesterol zunda bioortogonal bat diseinatu eta garatu da. Honek, asaldurarik jasan ez duten zelula bizien gainazalean lipido-baltsak bistaratzea ahalbidetu du.

### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Sintetizatutako chol-N<sub>3</sub>-ak lipido-baltsek zelula bizien funtsezko funtzio biologikoetan duten eragina aztertzeko ikuspegi berri bat eskaintzen du. Adibidez, chol-N<sub>3</sub>-a bereizmen altuko zelula bizien behaketarako mikroskopioarekin bateragarriak diren fluoroforoekin edo fluoreszentezki markatutako biomolekulekin (proteinak, kasurako) konbinatu daiteke. Estrategia honen bidez, nanoeskalako lipido heterogeneotasunak hartzaile bidezko seinalizazioan eta garraioan edo

bestelako prozesu zelularretan duen eragina ikertzea erraztu dezake. Amaitzeko, zunda bioortogonal honek kolesterolaren ehunetako banaketan, zein osasun eta gaixotasunetan duen eraginean sakontzeko bide berriak zabaltzen ditu, eta, horrekin batera, zunda bioortogonal berrien sintesia bultzatzen du.

## 6. Erreferentziak

- Bernabé-Rubio, Miguel, et al. "Adaptive lipid immiscibility and membrane remodeling are active functional determinants of primary ciliogenesis." *Small Methods* 5.2 (2021): 2000711. <https://doi.org/10.1002/smt.202000711>
- Ipsen, J. H., Karlström, G., Mourtisen, O. G., Wennerström, H., & Zuckermann, M. J. (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 905(1), 162-172. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(87\)90020-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(87)90020-4)
- Jacobson, K., Liu, P., & Lagerholm, B. C. (2019). The lateral organization and mobility of plasma membrane components. *Cell*, 177(4), 806-819. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.018>
- Králová, J., Jurásek, M., Mikšátková, L., Marešová, A., Fährnich, J., Cihlářová, P., ... & Král, V. (2020). Influence of fluorophore and linker length on the localization and trafficking of fluorescent sterol probes. *Scientific Reports*, 10(1), 22053. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78085-9>
- Levental, I., Levental, K. R., & Heberle, F. A. (2020). Lipid rafts: controversies resolved, mysteries remain. *Trends in cell biology*, 30(5), 341-353. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.01.009>
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961), 46-50. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>
- Lorizate, M., Brügger, B., Akiyama, H., Glass, B., Müller, B., Anderluh, 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>
- Mollinedo, F., & Gajate, C. (2020). Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy: thematic review series: biology of lipid rafts. *Journal of lipid research*, 61(5), 611-635. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000439>
- Nieto-Garai, J. A., Lorizate, M., eta Contreras, F. X. (2022). Shedding light on membrane rafts structure and dynamics in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1864(1), 183813. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183813>
- Róg, T., & Vattulainen, I. (2014). Cholesterol, sphingolipids, and glycolipids: what do we know about their role in raft-like membranes?. *Chemistry and physics of lipids*, 184, 82-104. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.10.004>
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(6), 361-374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>
- Vance, J. E. (2012). Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Disease models & mechanisms*, 5(6), 746-755. <https://doi.org/10.1242/dmm.010124>

## 7. Eskerrak eta oharrak

Proiektu hau Espainiako Zientzia, Berrikuntza eta Unibertsitate Ministerioaren (Beka Zb. PID2020-117405GB100) eta Eusko Jaurlaritzaren (Beka Zb. IT1625-22) diru-laguntzekin finantzatu da. Esker onak SGIker zerbitzuari (EHUko Biomedikuntza Zerbitzuko Mikroskopia Analitikoa eta Bereizmen Handiko Mikroskopia) eta Eusko Jaurlaritzari J.O.-I-ren doktoreak ez diren ikertzaileak prestatzeko Doktoratu Aurreko Programako laguntzagatik (2021-2022).