

# ZELULEN FUNTZIONAMENDUA ULERTUZ PROTEINA-BIDEZIDORREN AZTERKETAREN BITARTEZ

MIKEL AZKARGORTA  
Bioteknikako eta Biologia Molekularreko Saila  
EHUko Zientzia eta Teknologia Fakultatea

**Z**elulak biziaren oinarritzko elementuak dira, izaki bizidunen unitateak alegia: izaki bizidun guztiak daude zelulaz osatuta. Gizakiak, adibidez, 70 bilioi zelulaz osatuta daudela esan ohi da. Bakoitzak funtzio zehatzak betetzen ditu organismoan, izakiaren biziraupena bermatzen duten milaka prozesu desberdin aurrera eramanez.

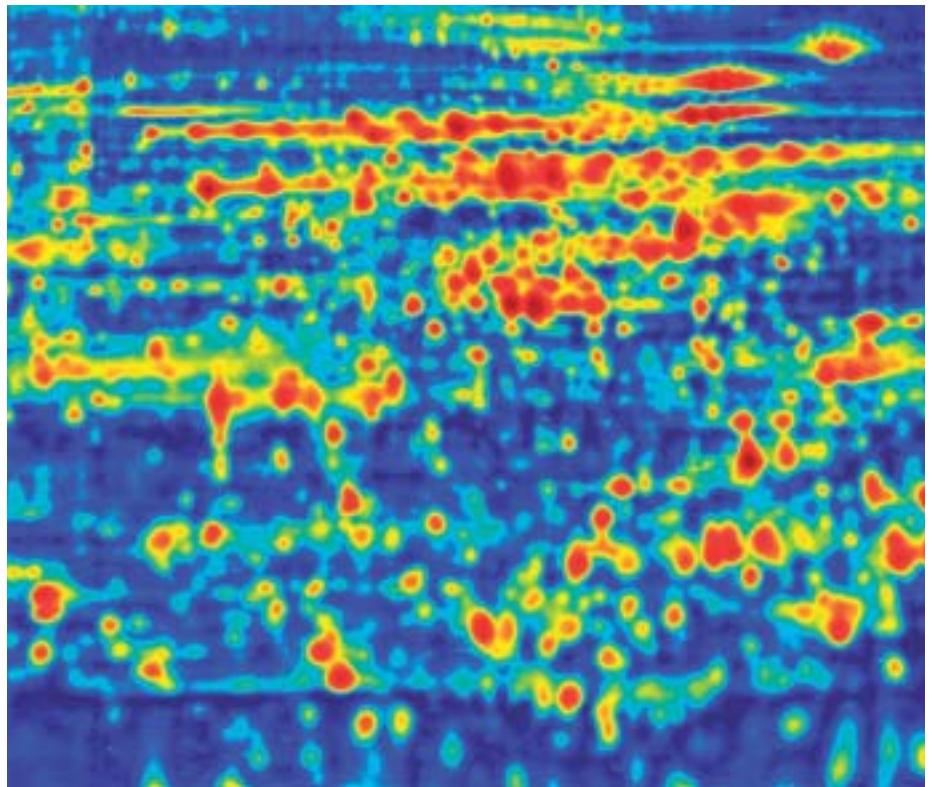
Zelulak ere izaki bizidunak diren neurrian, "jatio", hazi, eta hil egiten dira; bizirik irauteko, elikatu beharra dute, eta ugaltzea egiten dira, besteak beste. Funtzio eta gertaera guztiak aurrera eramateko, hainbat prozesu gertatzen dira zelularen barnean. Esaterako, metabolismo deritzon erreakzio-multzo konplexuaren bitartez, bizitzeko beharrezkoa duten energia lortzen dute zelulek. Zelula-zikloari jarraituz, berriz, ugaltzea egiten dira, eta, azkenik, zelulak zaharregiak direnean, hil egiten dira, apoptosia deritzon prozesuaren bitartez.

Prozesu guztietan, ezinbesteko parte-hartzea dute proteinek. Proteinak zelulen funtzionamendua erregulatzeko beharrezko aktibitatea duten molekulak dira. Aipatutako gertaera bakoitza proteina-multzo batek erregulatuta gertatzen da; proteinen aktibitatea ezinbestekoa da prozesuak modu ordenatu eta eraginkorrean aurrera eramateko.

Baina proteinek ez dute modu isolatuan betetzen beren lana: *pathway* edo bidezidor deritzen proteinen arteko elkarrekintza-sare oso konplexuak antolatzen dituzte horretarako. Proteinak ekoizteko

informazioa DNA izeneko molekulan bil-tzen da, eta gene deritzen unitatetan antolatuta dago. Geneek proteinen molde gisa jokatzen dute, eta horrelako bakoitzetik proteina-mota bat edo gehiago sor daitezke. Giza genomak 25.000 gene inguru ditu;

beraz, giza zelula batek milaka proteina desberdin ekoizteko ahalmena izango du. Haietako bakoitzak zenbait funtzio espezifiko izango ditu zelulan, eta horiek betetzeko, esan bezala, bidezidor deritzen elkarrekintza-sareetan antolatuko dira.



Bi dimentsioko elektroforesi-gel bat, kolore aldatuekin. ARG.: MIKEL AZKARGORTA.



## PROTEINA-BIDEZIDORRAK

Har dezagun zelula-zikloaren erregulazioa bidezidor baten funtzionamenduaren adibide moduan. Esan bezala, zelula-zikloa zelulek bikoizteko jarraitzen duten prozesua da, eta ezinbestekoa da organismo baten zelulak berriztatzeko. Zelularen barnean, eta gauzak asko sinpletuz, zenbait proteinak zelula-zikloaren alde egiten dute, eta beste batzuek, berriz, kontra. Horrela, lehen erregulazio-maila batean, E2F izeneko proteina-familiak zelula-zikloaren alde egiten du. RB familiako proteinek, berriz, E2F proteinen aktibitatea oztopatu egiten dute, hau da, zelula-zikloaren kontra egiten dute.

Hurrengo erregulazio-maila batean, CDK izeneko proteinek RB familiako proteinak inaktibatzen dituzte; beraz, zelula-zikloaren alde egiten dute. Bestalde, CKI izeneko proteinek CDK-en aktibitatea oztopatzen dute, zelula-zikloaren kontra eginez. Beraz, maila honetan beste bi elementu sartzen dira, eta prozesuaren erregulaziorako aukerak aniztu egiten dira.

Benetako konplexutasuna aipatutakoa baino askoz handiagoa den arren, adibide simple horrek balio du zelularen patua zehazten duten bidezidorrak ulertzeko. Proteinek etengailu baten moduan funtzionatzen dute: "piztu" edo "itxaltzen" den proteinaren arabera, efektu bat zein kontrako bultza daiteke zelula barnean. Horrelako prozesuak eraginkorrak izan daitezke, gauza bat ezinbestekoa da: zehaztasuna. Proteina jakin baten aktibitatea behar den baino handiagoa edo txikiagoa bada, zelularen funtzionamendu egokia kokolan jartzen duten arazoak sor daitezke, eta horiek, garaiz saihesten ez badira, organismoaren biziraupena baldintzatu dezakete. Beraz, prozesuok sakon aztertu eta ulertu behar dira, haien funtzionamendu akastunaren ondorioz sortzen diren kalteak ulertzeko eta haiei aurre egiteko.

## SAGUAK LABORATEGIAN

Helburu horrekin garatu ziren *knockout* saguak (KO edo  $^{-/-}$ ). KO sagu baten zelula guztiek intereseko gene baten funtzioa etenda dute. Horretarako, ingeniariatza genetikoko teknikak direla medio, enbrioi mailan gene hori suntsitu egiten da. Horrela, genea suntsituta, hark ekoizten duen proteinaren ga-



Knockout saguak. ARG.: MAGGIE BARTLETT/NHGRI.

bezia duten sagu helduak sortzen dira. Proteina baten desagertzea ondorio globala izango du: haren aktibitatea desagertzeaz gain, erregulatzen dituen proteinen aktibitatea ere aldatuko da. Aldaketa horien azterketaren bitartez, proteina horrek organismoan betetzen dituen funtzioak sakon azter daitezke.

Lan honetan E2F2 *knockout* (E2F2 $^{-/-}$ ) saguak erabili dira. Sagu horiek E2F2 genea suntsituta dutenez, E2F2 proteinaren aktibitatea ere etenda dute. Hasiara batean normal garatzen diren arren, denborarekin zenbait arazo pairatzen dituzte. Halakoen karakterizazioak agerian jarri zuen E2F2 ezinbestekoa dela T linfozitoen funtzionamendu egokia gertatzeko. T linfozitoak organismoaren defentsa-sistemaren atal garrantzitsua dira, eta organismoari arrotz zaizkion elementuen aurrean erantzuten dute, haiek suntsituz.

E2F2rik gabeko T linfozitoak E2F2dun T linfozitoak baino askoz sentikorrak dira. Hori dela eta, defendatu behar duten organismoaren beraren kontra egiten dute. Horren ondorioz, saguek sindrome larri bat

pairatzen dute, gizakien Lupus Eritematoso Sistemikoarekiko (LES) oso antzekoa, eta, hainbat arazoren ostean, E2F2 aktibitate normala duten saguak baino lehenago hiltzen dira.

E2F2k, beraz, saguen T linfozitoen aktibazioaren aurka egiten du, baina zer mekanismori jarraitzen dio hori egiteko? Hori argitzeko, hurbilketa proteomiko bat erabili da lan honetan. *Proteoma* hitzak zelula batek une eta egoera jakin batzuetan duen proteina-multzoa definitzen du. Proteomikak, beraz, proteina-multzoen karakterizazioa eta azterketa egiteko teknikak biltzen ditu.

## PROTEINEN PRESENTZIA IRAKURTZEN

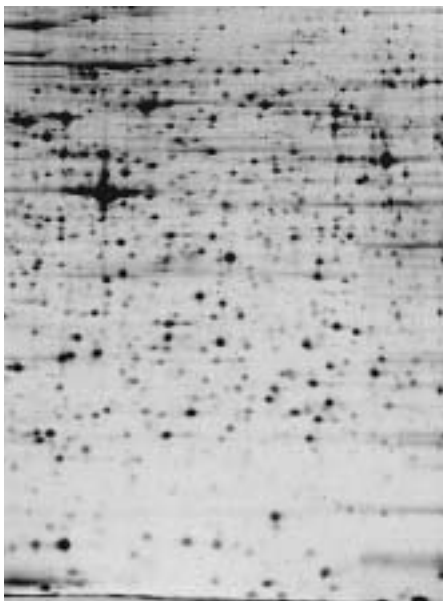
Funtsean, saguen T linfozitoen proteina- edukia aztertu da lan honetan, eta hori bi egoera desberdinetan egin da: E2F2 aktibitatea normala denean (kontrol egoera, WT deritzona) eta E2F2 aktibitate ez dagoenean (E2F2 $^{-/-}$ ). Proteina-multzoak konparatu egin dira eta, ondoren, E2F2 aktibitatea desagertzekoan zein proteina aldatzen diren identifikatu da. Horrela, aldatutako



proteinak zein diren zehaztuz, E2F2k saguen T linfzitoetan jarraitzen duen mekanismoa azter daiteke.

Horretarako, bi dimentsioko elektroforesia (2DE) eta masa-espektrometria (MS) teknikak erabili ziren. 2DEa milaka proteina desberdinen aldibereko azterketa bermatzeko duen teknika da, proteomak konparatzeko oso erabilgarria. Bertan, proteinak orbanak eratuz banatzen dira gelseuskarri batean. Orban bakoitzean proteina bakarra banatuko da, eta orbanen bolumena bertan pilatutako proteina-kantitatearekiko zuzenki proportzionala da. Beraz, orbanen bolumena konparatuz, aztertutako proteomen arteko aldaketak detekta daitezke.

Baina 2DEak zein orban den desberdina esaten duen arren, ez du esaten orban horretan banatutako proteina zein den. Horretarako ezinbestekoa da masa-espektrometria (MS). Masa-espektrometroak molekula kimikoen masa zehaztasun oso handiarekin determinatzeko gai diren aparatuak dira. Printzipio horretan oinarrituta, eta datu-baseetan bilaketak eginez,



Bi dimentsioko elektroforesi-gel bat. Proteinek orbanak eratzen dituzte bertan, eta haien bolumena konparatuz desberdintasunak detekta daitezke.

ARG.: MIKEL AZKARGORTA.



Masa-espektrometro bat. Molekulen tamaina zehaztasun handiz determinatuz, proteinak identifika daitezke masa-espektrometriaren bitartez. ARG.: MICHAEL PERECKAS.

orban diferentzialetan banatutako proteinak identifikatzen dira.

E2F2 desagertzean aldatutako proteinen artean T linfzitoen aktibazio-bidezidortan parte hartzen duten COR1A, GRB2, ARHGDI eta PAK2 proteinak aurkitu ziren. Hau da, ikusi zen E2F2rik gabeko T linfzitoek, inolako estimulurik jaso gabe ere, aktibazioerako makineria (proteinak) prest dutela. Ondorio hori bat dator E2F2<sup>-/-</sup> linfzitoek duten sentikortasun handiarekin. Esperimentua, beraz, baliagarria izan zaigu T linfzitoen aktibazioa erregulatzeko E2F2k "piztu" edota "itxaltzen" dituen etengailuetariko batzuk identifikatzeko.

Laburbilduz, gure emaitzek erakusten dute hurbilketa hau E2F2k jarraitzen duen mekanismoa ulertzeko erabilgarria dela, eta zelularen funtzionamenduan barrentzeko erabil daitezkeen ikerketen adibide bat da. ●

## BIBLIOGRAFIA

AZKARGORTA, M.; ARIZMENDI, J.M.; ELORTZA, F.; ALKORTA, N.; ZUBIAGA, A.M.; FULLAONDO, A.: "Differential proteome profiles in E2F2-deficient T lymphocytes", *in* Proteomics 6, Suppl 1, (2006), S42-50.

FANG, Z.H.; HAN, Z.C.: "The transcription factor E2F: a crucial switch in the control of homeostasis and tumorigenesis", *in* Histol. Histopathol., 21 (2006), 403-413.

MURGA, M.; FERNÁNDEZ-CAPETILLO, O.; FIELD, S.J.; MORENO, B.; BORLADO, L.R.; FUJIWARA, Y.; BALOMENOS, D.; VICARIO, A.; CARRERA, A.C.; ORKIN, S.H.; GREENBERG, M.E.; ZUBIAGA, A.M.: "Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity", *in* Immunity, 15 (2001), 959-970.

ANDERSON, N.L.; ANDERSON, N.G.: "Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words", *in* Electrophoresis, 19 (1998), 1853-1861.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J.: "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics", *in* Proteomics, 4 (2004), 3665-3685.

AEBERSOLD, R.; MANN, M.: "Mass spectrometry-based proteomics", *in* Nature, 422 (2003), 198-207.