



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Biomedikuntzan aplikazio
teranostikoak izan ditzaketen
rHDL-AuNC konplexu hibridoen
garapena**

*Endika Cabrera-Antón,
Virginia Rubio-López,
Teresa Herranz,
Beñat Larrañaga-Monasterio,
Telmo Santamaría-Zamorano,
Aitor Ordeñana-Mando,
Shifa Jebari-Benslaiman,
Unai Galicia-García,
Asier Larrea-Sebal, Cesar Martin,
Asier Benito-Vicente
eta Kepa B. Uribe*

323-330 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.05.40>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



Bizkaia
foru aldundia
diputación foral



LAGUNTZAILEAK



Biomedikuntzan aplikazio teranostikoak izan ditzaketen rHDL-AuNC konplexu hibridoen garapena

Endika Cabrera-Antón, Virginia Rubio-López, Teresa Herranz, Beñat Larrañaga-Monasterio, Telmo Santamaría-Zamorano, Aitor Ordeñana-Manso, Shifa Jebari-Benslaiman, Unai Galicia-García, Asier Larrea-Sebal, Cesar Martin, Asier Benito-Vicente, Kepa B. Uribe

Biokimika eta Biologia Molekularreko saila, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV-EHU), Santsoena auzoa z.g., 48940 Bilbo

kepa.belloso@ehu.eus

Laburpena

Gaixotasunen diagnostikoan eta terapien garapenean aurrepenak eman diren arren, funtsezkoa da ikuspuntu espezifikagoak garatzea medikuntza pertsonalizatu baterako trantsizioa eman dadin. Horretarako baliagarria suerta daitekeen ikuspuntuetako bat nanobioteknologia da. Disziplina honek sistema biologikoen zein horien osagaien nanoeskala mailako manipulazioaz baliatuta material, dispositibo edota teknika berritzaileen garapena sustatzen du. Horren harira, apolipoproteina A-1 (ApoA-1) proteinaz eta urrezko nanoklusterrez (100 atomo edo gutxiagoko urrezko multzokaketak) osatutako egitura hibridoek ikuspuntu berritzaile bat eman dezakete. Nanoklusterrek (AuNC) urrezko nanopartikula handiagoek ez bezalako propietate interesgarriak dituzte, hala nola fluoreszentzia, diagnostikorako edota tratamendueen jarraipenerako baliagarria izan daitekeena. Bestetik, ApoA-1 interes kliniko handia duten HDL partikulen (kolesterol “onaren”) osagaietako bat da eta soberazko kolesterolaren birkaptazio prozesuan funtzio nagusia du, gaixotasun kardiobaskularretan efektu terapeutikoa aurkeztuz. Hortaz, sortutako hibrido proteo-metaliko horiek interes kliniko handiko konplexuak suerta daitezke diagnostikorako zein terapiarako nanotresna gisa erabili daitezkeelako, hau da, herramienta teranostikoak gauzatzeko ahalmena ematen dutelako. Testuinguru horretan, ApoA-1 eta AuNC barnebiltzen dituzten egiturak sintetizatu dira ikerketa lan honetan. Horretarako giza jatorrizko ApoA-1 errekonbinanteki ekoitzi zen eta ezarritako metodo sintetikoen bidez ApoA-1-AuNC hibrido proteo-metalikoak sortu ziren. Behin konposatu horiek eraikita, karakterizatu eta HDL antzeko nanoplataforma birkonbinatuak (rHDL-AuNC) sortzeko gai zirela baieztatu zen. Guztira, lan honetan aurrerapen bioteknologiko gisa ApoA-1 eta AuNCn arteko konbinaketa berria sortzea lortu da. Etorkizunera begira, hibrido berrien biobateragarritasuna aztertzea garrantzizkoa izango da, hala nola helburu teranostikoa duten aplikazioetan erabilgarriak diren frogatzea.

Hitz gakoak: apolipoproteina A-1; urrezko nanoklusterak; rHDL; nanobioteknologia; teranostika.

Abstract

Although advances have been made in the diagnosis of diseases and the development of therapies, it is essential to develop more specific approaches so that the transition to personalized medicine can take place. One of the approaches that may be useful for this is nanobiotechnology. This discipline promotes the development of innovative materials, devices, or techniques by taking advantage of the nanoscale manipulation of biological systems and their components. In this regard, hybrid structures composed of apolipoprotein A-1 (ApoA-1) protein and gold nanoclusters (clusters of <100 gold atoms) can provide an innovative perspective. Gold nanoclusters (AuNCs) have interesting properties other than larger nanoparticles, such as fluorescent properties, that can be useful for diagnosis or the following-up of treatments. On the other hand, ApoA-1 is one of the major components of high clinical interest HDL particles

("good" cholesterol) and plays a central role in the process of recapturing excess cholesterol, presenting a therapeutic effect on cardiovascular diseases. Thus, these generated proteo-metallic hybrids can become complexes of great clinical interest, as they can be used as nanotools for both diagnosis and therapy, meaning they provide the ability to develop theragnostic tools. For this purpose, recombinant human-origin ApoA-1 was produced, and ApoA-1-AuNC proteo-metallic hybrids were created using established synthetic methods. Once these compounds were built, they were characterized, and it was confirmed that they could form recombinant HDL-like nanoplateforms (rHDL-AuNC). In summary, this work has succeeded in creating a new combination between ApoA-1 and AuNCs as a biotechnological advancement. Looking to the future, it will be important to study the biocompatibility of these new hybrids as well as to demonstrate their usefulness in theragnostic applications.

Keywords: apolipoprotein A-1; gold nanoclusters; rHDL; nanobiotechnology; theranostics.

1. Sarrera eta motibazioa

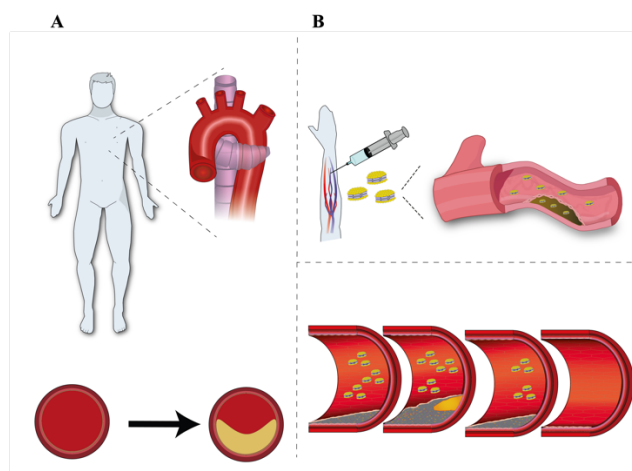
Gaixotasunen diagnostikoan eta tratamenduen garapenean aurrerapenak eman badira ere, espezifikitate altuagoa lortzeko, albo ondorioak gutxitzeko, eta medikuntza pertsonalizatuago batera trantsizioa emateko ikuspuntu berrien garapena beharrezkoa da. Hori dela eta, tresna nanobioteknologikoen garapena itxaropen handiko etorkizuna ekar dezake. Nanobioteknologia sistema biologikoen dituzten osagai molekularren eskala nanometriko berean teknika edo material berritzaileen garapenean oinarritzen den zientziaren adarra da. Material berrien garapenari dagokionez, proteinek dituzten funtzio anitzak direla eta, hauek nanoegitura egokiak izan ohi dira aplikazio biomediko berriak sustatzeko eta hurbilketa teranostikoa helburu duten irtenbide berriak garatzeko, hau da, diagnostikorako baliagarriak diren zein eragin terapeutikoak izan ditzaketen sistema bateragarriak sortzeko (Farhadi et al., 2021).

Erreminta nanobioteknologiko hauen garapenerako eta aplikazio praktikoak martxan jartzeko, gaixotasun eredu moduan aterasklerosia eta kolesterolaren metabolismoarekin zerikusia duten bestelako gaixotasunak aukera ona dira. Patologia hauek guztiak arterietan ematen den konposatu ezberdinen pilaketaz osatutako egitura konplexuen (ateroma plakak) sorrera, metaketa eta ondorioz sortzen den arteriaren diametroaren murrizketan dute bere jatorria (Williams eta Tabas, 1995). Bestetik, egoera horiek fase aurreatu batean bestelako gaixotasun kardiobaskular larrien agerpena sustatu dezakete, infartu akutua eta iktusa besteak beste (Fan eta Watanabe, 2022). Gizarteari esanguratsuki eragiten dioten arren, gaur egun erabiliak diren tratamenduak ez dira gaixotasun kardiobaskularra sendatzeko eraginkorrak, eta horren ordeztatu sintomatologia eta arriskuaren murrizketan fokatzen dira (Hetherington & Totary-Jain, 2022).

Halaber, hainbat ikerketek alterazio metaboliko horien aurka HDL lipoproteinek izan ditzaketen eragin onuragarriak deskribatu dituzte. HDL hauek "kolesterol ona" gisa ezagutzen diren partikulak dira, soberan dagoen eta ondorioz metatu daitekeen kolesterola hartu eta gibelera degradatzera garraiatzen dutelako. Partikula hauetan azaltzen den proteina esanguratsuen a polipoproteina A-1 edo ApoA-1 da, egitura eman eta kolesterolaren oreka mantentzea baititu funtzio garrantzitsuenak (Rubin et al., 1991). Biomedikuntzaren ikuspuntutik, kolesterolaren garraioa eta kanporatzea sustatzen dituzenez, kolesterolarekin arazoak dituzten pazienteen tratamendu moduan erabiltzea planteatu izan da (Shah et al., 2013) (**1. irudia**). Egindako ikerketek ApoA-1 edo birkonbinatutako HDL-tan (rHDL) oinarritutako tratamenduak eraginkorrak direla frogatuta da animalietan; aldiz, gizakietan egindako entsegu klinikoek ez dute esperotako eraginkortasuna erakutsi eta ez da horrelako tratamendurik komertzializatu oraindik (B. Uribe et al., 2021).

1. irudia. Aterosklosiaren garapena eta rHDL bidezko tratamendu terapeutikoa. (A)

Aterosklosia hanturazko gaixotasun kronikoa da, arteriak estutzen dituena, arterien pareta barruan ateroma-plakak sortu eta jalkitzearen ondorioz. (B) Gehiegizko kolesterol metaketa murrizteak duen ekintza anti-aterosklerotikoa dela eta, rHDL infusioak tratamendu terapeutiko gisa planteatu dira.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburua

Jatorrizko rHDL terapien ideari helduz eta hauen hobekuntzan saiatuz, ApoA-1 proteinan oinarritutako sistema nanobioteknologiko bat eratzea proposatzen da, zehazki ApoA-1 eta urrezko nanoklusterren (AuNC) arteko hibrido metalo-proteikoak sortzea. Gainera, berrikuntza honekin aukera irekiko da gaixotasun kardiobaskularren maneiu terapeutiko osoagoa garatzea hurbilketa teranostikoaren bidez. AuNCak 100 urre atomo edo gutxiagoko multzokaketak dira, zeintzuk urrezko nanopartikulekin alderatuz propietate fisiko-kimiko ezberdinak izango dituztenak, besteak beste biobateragarritasuna eta fluoreszentsia (Sonia et al., 2021; Uribe et al., 2021) Hortaz, planteatutako hibrido metalo-proteiko berri hauetan AuNC-ak diagnostikorako funtsezkoak izango diren propietateak izango dituzte, funtzionaltasuna, hau da eragin terapeutikoa, ApoA-1 proteinan ezartzen delarik.

Horrela, lan honen helburua ApoA-1 proteinaren eta AuNCen arteko hibrido proteo-metaliko berrien garapena izango da, ondoren rHDL antzeko partikulak sortzeko. Modu honetan rHDL partikuletan oinarritutako terapien berritzea eragin dezaketen bigarren belaunaldi baten hastapenak finkatzeko lehen pausuak emango dira.

3. Ikerketaren muina

3.1. ApoA-1-AuNC konplexu proteo-metalikoen sintesia eta karakterizazioa

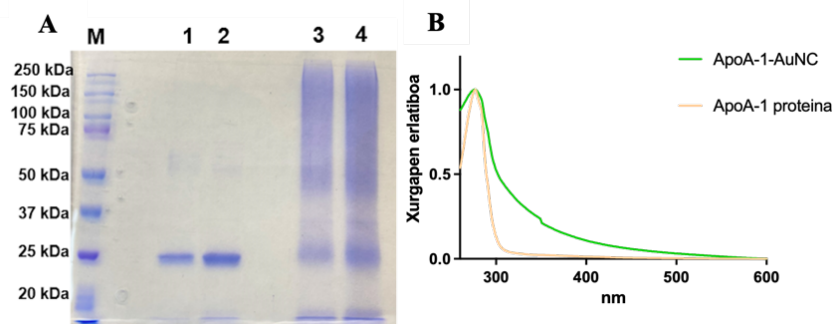
Garapen bioteknologiko berri honen lehengo pausua ApoA-1 proteina laborategian sortzea izan zen. Horretarako giza jatorriko L240C aldaeraren forma heldua (lehenengo 25-267 aminoazidoak; Uniprot #P02647) adierazten duen plasmidoa garatu zen, eta *E. coli* bakterioak erabiliz modu birkonbinatuan gainadierazi egin zen, aurretiaz azaldutako pausu bakarreko purifikazio sistema jarraituz (Jebari-Benslaiman et al., 2020). Modu honetan purutasun maila altuko (>95%) proteina lortu zen beharrezko kantitatean.

Ondoren, ApoA-1-urrezko nanokluster (ApoA-1-AuNC) konplexu hibridoak sortu ziren. Horretarako, Couleaud eta kolaboratzaileek (Couleaud et al., 2015) deskribatutako agente erreduktoreek lagundutako sintesi metodoa jarraitu zen. Laburrean azalduta, medio basikoan dauden ApoA-1 proteinak urrearekin nahasten badira (AuCl_3), hauek Au(III) batuko dute, eta

ondoren nahasketara azido askorbikoa bezalako agente erreduktore bat gehitzen zaionean, urea erreduzitu egingo da $[Au(I)/Au(0)]$ eta AuNC bezalako konplexuak sortuko dira. Horrela, urea proteinari batuta dagoenez nanoklusterak sortu aurretik, konplexu proteo-metaliko egonkorra modu kontrolatu batean sor daitezke.

2. irudiak erakusten duen moduan, erraz ikusi daiteke deskribatutako sintesi metodoa jarraituz eta ApoA-1 “aldamio proteina” moduan erabiliz ApoA-1-AuNC konplexuak sortu zirela. Alde batetik, SDS-PAGE gelak (proteinen tamainen inguruko informazioa ematen digun teknika biokimikoa) konplexu proteo-metalikoak eratzerakoan ApoA-1 proteina baino tamaina handiagoko egiturak sortu zirela erakusten du (25 kDa vs. 50-200 kDa). Urrezko nanoklusterak 1-2 nm-ko egiturak direnez (Van De Looij et al., 2022), hauek proteina bakunaren pisu molekularra handitzen dute eta horregatik ikusten dira >50 kDa-tako proteina-bandak. Gainera, tamaina handiagoko banda horiek azaltzeak 25 kDa-tako bandaren intentsitatearen gutxitzea ekarri zuen, ApoA-1 proteinak aldamio funtzioa egiten duela adieraziz. Eta bestetik, UM/Ikuskor xurgapen espektroskopia (materiari argiarekin duen interakuntza aztertzeko erabiltzen den teknika espektroskopikoa) bidez ere ApoA-1-AuNC konplexuen presentzia ikusi zen. Aztertu ziren espektroetan proteinaren presentzia argi azaldu zen (proteinen aminoazido aromatikoaren xurgapen maximoa 280 nm-ko xurgapen banda da), baino are garrantzitsuagoa da ApoA-1-AuNC laginetan aurkeztzen den 310-370 nm arteko xurgapen-banda berria. Xurgapen banda honen presentzia lehenik ere ikusi izan da antzeko konplexuak eratzerakoan eta AuNCen presentziarekin lotu izan da (Couleaud et al., 2015). Beraz, emaitza honek ere frogatuko luke ApoA-1-AuNC konplexuak eratu zirela eta teknika ezberdinen bidez aztertu daitezkeela.

2. irudia. ApoA-1-AuNC konplexuen formakuntza. (A) SDS-PAGE gela (%8,5 poliakrilamida) non ApoA-1 proteinaren eta ApoA-1-AuNCen laginak kargatu diren. M: pisu molekularren markatzailea; 1 eta 2 kaleak: ApoA-1 proteina (2,5 eta 5 µg); 3 eta 4 kaleak: ApoA-1-AuNC (15 eta 25 µg). (B) ApoA-1 eta ApoA-1-AuNC laginen UM/Ikuskor xurgapen espektroak. Xurgapena 280 nm-ra erlatibizatu da.



Behin hibridoaren presentzia balioztatuta, hurrengo urratsa hauen karakterizazio biofisikoa eta AuNCen propietate fotoluminiszentek aztertzea izan zen. Karakterizazio biofisikorako, konplexuen tamaina eta proteinaren egitura analizatu ziren. **1. taulan** laburbiltzen dira lortutako datuak. Argi dispersio dinamiko (DLS) deritzon teknikaren bidez molekulen tamaina molekularra kalkulatu daiteke dispersatzen duten argiaren arabera. Horrela, lortutako tamainei erreparaturaz, emaitzek informazio esanguratsua eman zutela azpimarratu daiteke. ApoA-1 proteinak ~8 nm-ko egitura sortzen zituela ikusi zen. Tamaina hau antzeko pisu molekularreko proteina globularrek izaten duten tamainarekin alderatuz, handiagoa da, eta aurretik deskribatu izan den 3,3 nm-tatik hurrin geratzen da (Melchior et al., 2017). Horrela, ApoA-1 molekulek elkarri lotzeko eta dimerok eratze gaitasuna dutenez (Frank eta Marcel, 2000), emaitzek proteina modu dimerikoan dagoela iradokitzen dute. ApoA-1-AuNC konplexuek, aldiz, ~11,5 nm-ko egitura eratu dituztela frogatu zen. Honek esan nahiko luke konplexu hauek ere ApoA-1 dimeroez osatuak izan zirela eta konplexuen parte diren AuNC-k 4 nm-ko “itxurazko tamaina” izan zezaketela, bai 4 nm-ko AuNC bakarra edo 2 nm-ko bi AuNC (proteina edo monomero

bakoitzak bana). Datu hauek transmisiozko mikroskopia elektroniko (TEM) bidez lortutako datuekin alderatuz, eskala nanometriko antzekoko emaitzak lortu zirela ikusi zen, izatez bibliografian aurkitzen diren 1-2 nm-ko tamainen antzekoagoak (Van De Looij et al., 2022). Lan honetarako ere saiakerak egin ziren arren TEM bidezko ApoA-1-AuNC hibridoak mikrografiak lortzeko, eskuragarri zeuden ekipoen ebatzen mugak zirela eta, ezin izan zen behin betiko emaitzarik lortu. Hala ere, lortutako guztiarekin, guztiz frogatuta geratuko litzateke konplexu proteo-metalikoen formakuntza eta AuNC-ekin bateragarriak diren egituren presentzia.

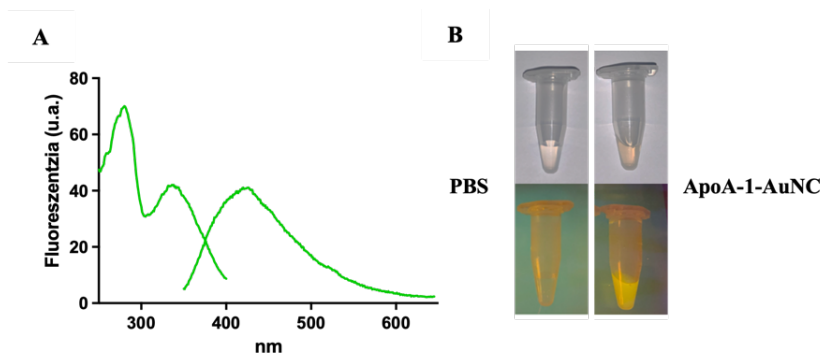
Azkenik, dikroismo zirkular (CD) bidez (materiak argi zirkularki polarizatuarekin duen interakuntza aztertzeko erabiltzen den teknika espektroskopikoa) proteinaren “barne” egitura aztertzerakoan agerian geratu zen ApoA-1-AuNC konplexua osatzen duten proteinek % 40 inguru galtzen zutela jatorrizko egitura. Parametro hau proteinaren egituraren osotasunarekin lotuta dagoenez, konplexuen formakuntzak ApoA-1 proteinaren egituraren ageriko eragina duela esan daiteke. Honek, berez, ez lioke proteinaren jardura funtzionalari eragin behar, baina kontuan izan beharreko datua izango da hurrengo garapen pausuetan lortutako emaitzak alderatzerakoan.

1. taula. ApoA-1 eta ApoA-1-AuNC hibridoak ezaugarri biofisikoen karakterizazioa. DLS eta TEM datuak batazbestekoa $\pm$ desbideraketa dira. DLS, *Dynamic light scattering*; TEM, *transmission electron microscopy*; z.g., zehaztu gabea.

Lagina	Tamainua (nm)		α -helizea (%)
	DLS	TEM	
ApoA-1	7,90 $\pm$ 0,69	z.g.	36,10
ApoA-1-AuNC	11,47 $\pm$ 0,44	1,12 $\pm$ 0,72	20,56

AuNCen propietate fotoluminiszenteak edo argia igortzeko propietateak aztertzeko hibrido proteo-metalikoak espektrofluorimetro batean aztertu ziren (**3. irudia**). Oro har, lortutako espektroak beste sistema proteo-metaliko batzuentzat deskribatzen direnen antzekoak izan ziren (Couleaud et al., 2015). Kitzapenaren aldetik, ApoA-1-AuNC konplexuek bi maximo aurkeztu zituzten, 280 nm-tan eta 335 nm-tan. 280 nm-tan proteinen berezko xurgapena azaltzen denez, honek proteinaren presentziaz eta honen eta AuNCen arteko erlazio estuaz hitz egiten liguke. 335 nm-tako maximoa aldiz, AuNCek duten xurgapen/kitzikapen banda izango litzateke, lehen ikusi izan den moduan (ikusi **2. eta 3. irudiak**). Kitzikapen banda estua izanik, ApoA-1-AuNC konplexuen kitzikapena ultramore zonaldean (<400 nm) gertatuko da. Igorpena aldiz, 425 nm-tan maximoa duen banda bakarra ikusi arren, tarte zabala hartzen zuela nabari geratu zen, ia 200 nm barne hartuz. Honek, besteak beste, ultramore lanparan ApoA-1-AuNC prestakinek argi berde-horia izatea azalduko luke, indargetzaileak edo proteina bakunak ez bezala (*erakutsi gabe*) (**ikusi 3. irudia**). Propietate fotoluminiszente hauek kontutan izanik, garatutako ApoA-1-AuNC konplexu hauen aplikazioa diagnostikorako edo tratamenduen jarraipenerako nahiko mugatua geratu daiteke. Izan ere, gorputzeko proteinek eta beste molekula batzuek fluoreszentzia edo dispersioa eragin dezakete 500 nm azpiko uhin-luzeeretan. Hori gainditzeko, fluoreszentzia bidezko irudi teknikak “lehiot optiko biologiko” (650-1000 nm) deritzon tartean erabiltzen dira, non intrintsekoak diren fenomeno hauek gutxituta dauden eta fluoroforeen propietate fotoluminiszenteak modu optimoan aprobezka daitezkeen (Weissleder, 2001). Hortaz, etorkizunari begira, ApoA-1-AuNC konplexuen kitzikapen/igorpen maximoak “gorrira” bultzatzen dituzten metodo sintetikoak ala proteina aldaera berriak ikertu egin beharko dira.

3. irudia. ApoA-1-AuNC konplexuen fluoreszentzia. (A) ApoA-1-AuNC (10 μ M) laginen fluoreszentiaren kitzikapen eta igorpen espektroak ($\lambda_{\text{igor}} = 420$ nm eta $\lambda_{\text{kitz}} = 330$ nm). (B) PBS eta ApoA-1-AuNC (80 μ M) laginak argi ikusgaiarekin (goian) eta argi ultramorearekin (behean) argizatuta. PBS, *phosphate-buffered saline*.

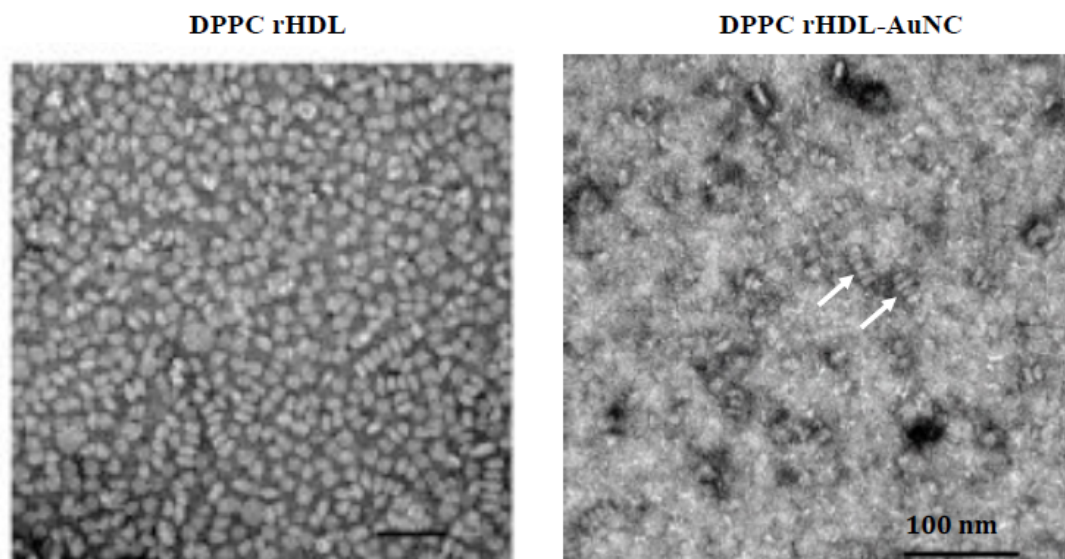


3.2. rHDL-AuNC konplexu hibridoen sintesia eta karakterizazioa

Behin ApoA-1-AuNC konplexuen sintesia burututa, hurrengo pausua hibridoak erabiliz rHDLn sintesia izan zen. Laburki azalduta, saiodi batean lipido dispersio bat prestatzen da hautatutako lipidoak indargetzailearekin nahastuz, eta ondoren ApoA-1 proteina gehitzen da konplexu proteo-lipidikoak sortuz. Konplexu hauek solubilizatzeko kolato sodiko detergentea gehitzen da eta 24-48 orduko dialisi baten ondoren 10 nm inguruko nanodisko forma duten rHDLak sortzen dira (Jebari-Benslaiman et al., 2020). Metodo bera jarraituz, oraingoan, ApoA-1-AuNC konplexuak eraibili ziren ApoA-1 proteina beharrean rHDL-AuNCen sintesia egiteko.

4. irudian TEM bidez lortutako rHDL eta rHDL-AuNC-en mikrografiak erakusten dira. Bertan argi eta garbi ikusi daiteke bi lagin motetan naturan aurkitzen diren HDL antzeko nanoegiturak aurkitu zirela. Morfologia eta tamainaren arabera, disko formako nanoegiturak dira eta 14-15 nm-ko diametroa erakutsi zuten. Kontuan hartuta ApoA-1-AuNC konplexuek 11-12 nm-ko tamaina zutela, esan daiteke rHDL-AuNC nanoegitura hauek handiagoak zirela lipidoak batu zituztelako eta, beraz, konplexu proteo-metal-lipidikoak lortu zirela. Gainera, irudiak arretaz aztertuz gero, rHDL-AuNCn alboetan 2-4 nanometrotako “puntu” edo tanta beltzak ageri zirela nabaritu zitekeen. Urreak elektroioak dispersatzeko ahalmena duenez, kontraste-agente moduan erabiltzen da TEM teknikan. Horregatik, “puntu” beltz hauek nanodiskoaren ondoan egonik eta aurretik aipatu diren nanokluster tamaina balioekin bateragarriak direnez, AuNCen seinalea zirela ondorioztatu daiteke. Honekin guztiarekin, lortutako datu sortak baliozkotzat emango luke rHDL-AuNC hibridoaren sintesi prozesua eta emaitza, eta hurrengo garapen pausuak emateko abiapuntutzat hartzeko hautagai aproposa izan daiteke.

4. irudia. rHDL eta rHDL-AuNC-en TEM bidezko irudiak. Dipalmitoilfosfatidilkolina (DPPC) fosfolipidoa erabiliz eratutako rHDL (ezkerrean) eta rHDL-AuNC-ak (eskuinean). Laginak tindaketa negatiboaren ostean TEM bidez ikusi ziren (NS-TEM). Gezi zuriek rHDL-AuNC partikulen presentzia nabarmentzen dute. DPPC rHDL irudia Jebari-Benslaiman eta kolaboratzaileak (Jebari-Benslaiman et al., 2020) artikulutik hartu da egilearen baimenarekin.



4. Ondorioak

Ikerketa lan honetan konplexu proteo-metaliko (ApoA-1-AuNC) eta proteo-metalo-lipidikoak (rHDL-AuNC) garatzea helburu izan da nanobioteknologiaren eta ApoA-1 proteinaren abantailak konbinatuz, eta aterosklerosia bezalako gaixotasun kardiobaskularretan alternatiba terapeutiko-diagnostiko gisa etorkizunean erabili ahal izateko. Egindako ibilbidean, lortutako emaitzek frogatu dute bai ApoA-1-AuNC bai rHDL-AuNC konplexuak sintetizatzeko metodologia eta karakterizazio teknikak doitu daudela eta eraginkorrak direla. Sortutako ApoA-1-AuNC konplexuak nanometro gutxiko egiturak direla, proteinaren egitura mantentzen dela eta ultramorean fluoreszenteak direla ikusi da. Eta are garrantzitsuagoa, rHDL-ak sortzeko gaitasunari eusten diotela frogatu da ere, rHDL-AuNC moduan antolatuta.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Egindako ahaleginek emaitza positiboak eman dituzte eta aurrerapausu garrantzitsuak egin dira herramienta teranostiko honen garapen bidean. Hala ere, lehen astapenak besterik ez dira izan. Aurrerantzean funtsezkoa izango da nanotresna honen potentzialtasuna aztertzea eta albo-efektu negatibo posibleen agerpena aztertzea.

6. Erreferentziak

- B. Uribe, K., Benito-Vicente, A., Martin, C., Blanco-Vaca, F., & Rotllan, N. (2021). (r)HDL in theranostics: How do we apply HDL's biology for precision medicine in atherosclerosis management? *Biomaterials Science*, 9(9), 3185-3208. <https://doi.org/10.1039/D0BM01838D>
- Couleaud, P., Adan-Bermudez, S., Aires, A., Mejías, S. H., Sot, B., Somoza, A., & Cortajarena, A. L. (2015). Designed Modular Proteins as Scaffolds To Stabilize Fluorescent Nanoclusters. *Biomacromolecules*, 16(12), 3836-3844. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01147>
- Fan, J., & Watanabe, T. (2022). Atherosclerosis: Known and unknown. *Pathology International*, 72(3), 151-160. <https://doi.org/10.1111/pin.13202>
- Farhadi, A., Sigmund, F., Westmeyer, G. G., & Shapiro, M. G. (2021). Genetically encodable materials for non-invasive biological imaging. *Nature Materials*, 20(5), 585-592. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-00883-3>

- Frank, P. G., & Marcel, Y. L. (2000). Apolipoprotein A-I: Structure-function relationships. *Journal of Lipid Research*, 41(6), 853-872.
- Hetherington, I., & Totary-Jain, H. (2022). Anti-atherosclerotic therapies: Milestones, challenges, and emerging innovations. *Molecular Therapy*, 30(10), 3106-3117. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.08.024>
- Jebari-Benslaiman, S., Uribe, K. B., Benito-Vicente, A., Galicia-Garcia, U., Larrea-Sebal, A., Alloza, I., Vandenbroeck, K., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Cholesterol Efflux Efficiency of Reconstituted HDL Is Affected by Nanoparticle Lipid Composition. *Biomedicines*, 8(10), 373. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100373>
- Melchior, J. T., Walker, R. G., Cooke, A. L., Morris, J., Castleberry, M., Thompson, T. B., Jones, M. K., Song, H. D., Rye, K.-A., Oda, M. N., Sorci-Thomas, M. G., Thomas, M. J., Heinecke, J. W., Mei, X., Atkinson, D., Segrest, J. P., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., & Davidson, W. S. (2017). A consensus model of human apolipoprotein A-I in its monomeric and lipid-free state. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(12), 1093-1099. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3501>
- Rubin, E. M., Krauss, R. M., Spangler, E. A., Verstuyft, J. G., & Clift, S. M. (1991). Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature*, 353(6341), 265-267. <https://doi.org/10.1038/353265a0>
- Shah, A. S., Tan, L., Long, J. L., & Davidson, W. S. (2013). Proteomic diversity of high density lipoproteins: Our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *Journal of Lipid Research*, 54(10), 2575-2585. <https://doi.org/10.1194/jlr.R035725>
- Sonia, Komal, Kukreti, S., & Kaushik, M. (2021). Gold nanoclusters: An ultrasmall platform for multifaceted applications. *Talanta*, 234, 122623. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122623>
- Uribe, K. B., Guisasola, E., Aires, A., López-Martínez, E., Guedes, G., Sasselli, I. R., & Cortajarena, A. L. (2021). Engineered Repeat Protein Hybrids: The New Horizon for Biologic Medicines and Diagnostic Tools. *Accounts of Chemical Research*, 54(22), 4166-4177. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00440>
- Van De Looij, S. M., Hebels, E. R., Viola, M., Hembury, M., Oliveira, S., & Vermonden, T. (2022). Gold Nanoclusters: Imaging, Therapy, and Theranostic Roles in Biomedical Applications. *Bioconjugate Chemistry*, 33(1), 4-23. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00475>
- Weissleder, R. (2001). A clearer vision for in vivo imaging. *Nature Biotechnology*, 19(4), 316-317. <https://doi.org/10.1038/86684>
- Williams, K. J., & Tabas, I. (1995). The Response-to-Retention Hypothesis of Early Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15(5), 551-561. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.15.5.551>

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau Eusko Jaurlaritzaren 2021eko Talde Kontsolidatuek (449IT1720-22) eta Zientzia, Berrikuntza eta Unibertsitate Ministerioaren Ezagutza Sortzeko Proiektuak (PID2022-136788OB-I00) finantziatu zuten. E. C-A, B. L-M. eta T. S-Z. Ikasikerrek (2024-2025) emandako dirulaguntzaren bidez sostengatuak izan ziren; A. O-M. aldiz, JAE Introk (CSIC 24-25) emandako dirulaguntza baten bidez.