



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE
LA PROTEÍNA VIRAL VP4 DE *TRITOMA VIRUS*

Alumno: Goikolea Egia, Julen

Fecha: Junio 2014

Director:

Dr. Diego Marcelo Guérin Aguilar

Curso Académico:

2013/14

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Ausencia de la proteína viral VP4 en la estructura cristalográfica de la cápside.....	4
1.2. Viroporinas	5
1.3. Mecanismos de acción de proteínas con actividad permeabilizadora de membrana.....	8
1.4. Objetivos	11
2. DESARROLLO	12
2.1. Materiales y Métodos.....	12
2.1.1. Purificación de TrV	12
2.1.2. Extracción del ARN	12
2.1.3. Clonaje de VP4-pET28a.....	13
2.1.4. Expresión de VP4-pET28a.....	14
2.1.5. Clonaje de VP4-pET28HMT.....	14
2.1.6. Expresión de VP4-pET28HMT	15
2.1.7. Purificación de HMT-VP4	16
2.1.8. Digestión de HMT-VP4 con la proteasa TEV.....	16
2.1.9. Análisis de muestras de ADN mediante electroforesis en geles de Agarosa.....	17
2.1.10. Análisis de muestras proteicas en geles de poliacrilamida.....	17
2.1.11. Análisis de muestras mediante Western-blot	18
2.2. Resultados	20
2.2.1. Purificación de TrV	20
2.2.2. Clonaje de VP4-pET28a.....	21
2.2.3. Expresión de VP4-pET28a.....	23
2.2.4. Clonaje de VP4-pET28HMT.....	23
2.2.5. Expresión de VP4-pET28HMT	25

2.2.6. Purificación de HMT-VP4	29
2.2.7. Digestión de HMT-VP4 con la proteasa TEV	30
2.3. Discusión.....	35
2.3.1. Expresión de VP4-pET28a	35
2.3.2. Expresión de VP4-pET28HMT	35
2.3.3. Digestión de HMT-VP4 con la proteasa TEV	36
3. CONCLUSIONES.....	37
4. AGRADECIMIENTOS.....	38
5. BIBLIOGRAFÍA.....	39

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Triatoma virus (TrV) es un virus patógeno de *Triatoma infestans* y otros insectos hematófagos, que son los vectores principales de la enfermedad del Chagas (tripanosomiasis americana). Esta enfermedad es un grave problema sanitario en muchos países de Latinoamérica, donde es endémica y afecta alrededor de 8 millones de personas. El agente causante de dicha enfermedad es el protozoo parásito *Tripanosoma cruzi*, que infecta al insecto vector y este a su vez, infecta hospedadores vertebrados cuando se alimenta de su sangre [Rassi *et al.*, 2010]. Al aumentar el movimiento migracional de las personas, la enfermedad ha logrado extenderse a otras regiones y convertirse en un problema de salud en zonas originariamente no endémicas [Gascon *et al.*, 2010]. Debido a esto se ha propuesto el uso de TrV como agente de control biológico frente a los vectores de la enfermedad del Chagas.

TrV es un virus esférico de simetría icosaédrica (número de triangulación $t=1$, pseudo $t=3$), sin envoltura lipídica y con un diámetro de 30 nm. Su material genético consta de ARN de hebra simple y sentido positivo, con una longitud de 9010 bases y una masa molecular teórica de 2.886,4 KDa, que se organiza de acuerdo al esquema de la **Figura 1**. Debido a la naturaleza dicistrónica de su genoma, se encuentra clasificado dentro de la familia *Dicistroviridae* [Czibener *et al.*, 2000].

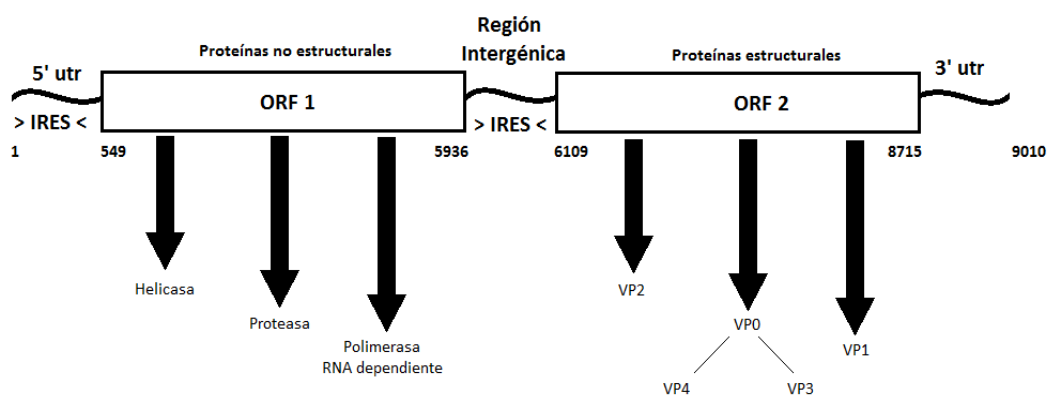


Figura 1. Organización esquemática del genoma de TrV. El genoma se encuentra organizado en dos ORF (del inglés, *Open Reading Frame*, marco abiertos de lectura), en el primero, se codifican las proteínas no estructurales y en el segundo, las proteínas estructurales. Los números indican la posición de los nucleótidos en el genoma [Czibener *et al.*, 2000].

El genoma de TrV posee dos marcos abiertos de lectura, ORF1 y ORF2, que codifican las proteínas no estructurales y las proteínas que forman la cápside respectivamente. Las proteínas no estructurales son: una helicasa, una proteasa y un ARN polimerasa ARN dependiente. Estas proteínas se encuentran codificadas en el primer marco abierto, próximo al extremo 5' de la secuencia y vienen precedidas por una estructura de ARN que sirve como sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Desde el nucleótido 5936 al nucleótido 6109 se halla una región intergénica no codificante de 172 nucleótidos de largo, en el cual se encuentra otro IRES. Esta región promueve la iniciación de la traducción del ORF2 a partir de un codón distinto de AUG, dado que el codón de iniciación del ORF2 en TrV es CUC. Ambos IRES poseen diferentes secuencias y presumiblemente diferentes mecanismos de iniciación de la traducción [McCarthy, 2000].

La cubierta proteica del virus está compuesta por 60 copias idénticas de tres de las cuatro proteínas estructurales codificadas en el genoma viral, VP1, VP2, y VP3, con unas masas teóricas de 29,7 kDa, 28,4 kDa y 31,8 kDa respectivamente. También se ha conseguido constatar la existencia de la cuarta proteína (VP4) en partículas maduras de TrV con una masa teórica de 5,5 kDa, [Agirre *et al.*, 2011]. La masa de todas las proteínas de la cápside hace un total de 5.394 kDa, que sumados a los 2.886,4 kDa del ARN, hacen un total de 8.282,4 kDa.

La estructura de la cápside de TrV que aparece en la **Figura 2**, fue resuelta a 2,5 Å de resolución mediante cristalografía de Rayos X [Rozas-Dennis *et al.*, 2004; Squires *et al.*, 2013]. Un aspecto que llamó la atención en la estructura atómica de TrV fue la ausencia total de densidad que pudiera atribuirse a la proteína VP4 no sólo por cristalografía de Rayos X sino también por diferentes metodologías de reconstrucción tridimensional por criomicroscopía electrónica (cryo-EM) [Estrozi *et al.*, 2008; Agirre *et al.*, 2013]. Estos datos sugieren que VP4, a pesar de encontrarse en TrV, no formaría parte de su estructura icosaédrica.

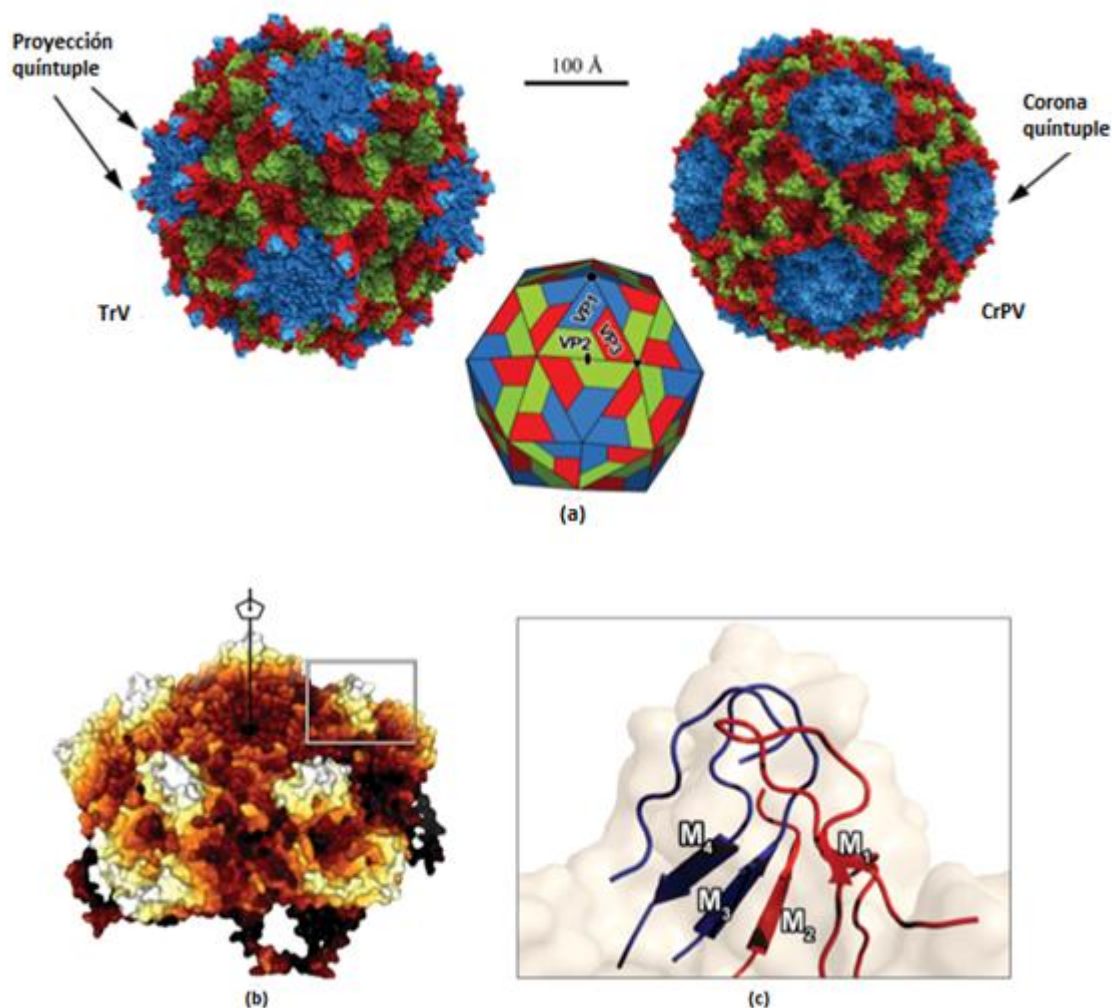


Figura 2. Superficies accesibles al solvente de la cápside de Triatoma virus (TrV), Cricket paralysis virus (CrPV) y un pentón de TrV. a) Superficie accesible al solvente de TrV (entrada PDB: 3NAP) y CrPV (entrada PDB: 1b35). Las proteínas individuales se han coloreado de acuerdo al siguiente orden: VP1, azul; VP2, verde; VP3, rojo. Estas estructuras están a la misma escala. TrV muestra proyecciones características de la superficie formadas por VP1 y VP3 alrededor del eje quintuple, y se aprecia una depresión en el eje doble de TrV. b) Superficie del pentón de TrV. Se ha destacado una proyección en uno de los rectángulos. Los colores más oscuros corresponden a las regiones más cercanas al centro de la partícula. c) Una imagen más cercana de la proyección en la cual se aprecian los loops de VP1 (azul) y VP3 (rojo), junto con las β -láminas subyacentes, identificadas como M₁, M₂, M₃ y M₄. Figura modificada obtenida de [Squires et al., 2013].

A diferencia de lo que sucede con TrV, en el caso de los picornavirus, sí existe densidad electrónica atribuible a VP4 en el interior de las partículas virales. En estos casos se ha planteado que la proteína viral participaría de forma activa en la entrada del virus a la célula según modelos propuestos hasta el momento [Brabec *et al.*, 2005; Tuthill *et al.*, 2006], desplazándose junto con el extremo N-Terminal de VP1 al exterior del virión y formando un canal en la membrana [Danthi *et al.*, 2003] con la función de permitir la liberación del ARN. Dado que no fue posible encontrar

densidad electrónica para VP4 en la estructura cristalográfica de TrV, resultó dudosa la aplicabilidad de dichos modelos a este virus.

1.1. AUSENCIA DE LA PROTEÍNA VP4 EN LA ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA CÁPSIDE.

Una de las incógnitas presentadas por el modelo obtenido a partir de la resolución de la estructura de TrV por difracción de Rayos X, es la falta de densidad electrónica atribuible a VP4. Mientras que en la estructura cristalográfica de CrPV [Tate *et al.*, 1999] se pudo encontrar una región en la que inequívocamente se ajusta VP4, en el modelo tridimensional de TrV. Para explicar esta incógnita, en un principio se valoraron las siguientes hipótesis [Agirre *et al.*, 2011]:

- a) Que VP4 se hubiera perdido durante el proceso de cristalización (por efecto del pH ácido, aumento de la fuerza iónica o por la interacción con alguna de las sustancias precipitantes) y por tanto las partículas cristalizadas pudieran no ser infectivas.
- b) Que VP4 como entidad individual no existiera. Esta proteína, atendiendo a la organización del polipéptido estructural precursor, es parte de VP0 hasta que se produce un corte catalítico que genera VP3 (presente en estequiometría equivalente a VP1 y VP2 en preparaciones de virus maduro) y la misma VP4, cuya función y posicionamiento en la cápside se desconocen aún. Este supuesto estaría además cimentado en la falta de detección previa de VP4 [Muscio *et al.*, 1988; Czubener *et al.*, 2000] en geles de poliacrilamida teñidos tanto por Azul Coomassie como por Nitrato de Plata.
- c) Que VP4 estuviera presente en la cápside de TrV formando parte de VP0 (precursor de VP4 y VP3). Este supuesto estaría reforzado por la aparición de una banda de mayor peso molecular asignable a VP0 en geles de poliacrilamida. Según esta hipótesis, en la cápside podrían existir copias de VP0 sin procesar, dando lugar a plegamientos que apartarían a la estructura de una simetría icosaédrica. Esta hipótesis explicaría la falta de densidad para VP4, pero dejaría abierta la explicación para la falta de detección de VP4 en geles.

- d) Que VP4 existiera como entidad individual en la cápside de TrV, pero esté desordenada o adquiriera múltiples conformaciones. Esta posibilidad contrasta de manera importante con lo que ocurre en CrPV con la proteína homóloga, ya que en este caso, VP4 se encuentra bien estructurada alrededor del eje quintuple de la cápside. El análisis de los contactos atómicos de CrPV junto con el cálculo de la energía de unión y solvatación, han revelado que se generan 5 puentes salinos entre VP4 y el interior de la cápside. A pesar de sumar únicamente el 10 % de la energía calculada para la interconexión entre VP4 y el resto de la cápside, este puente salino permanece como la única interacción específica, siendo el resto de las interacciones de naturaleza hidrofóbica. Sin embargo, los residuos que participan en el puente salino no se conservan en TrV y la ausencia de esta interacción podría ser la causante del desorden de VP4 en las cápsides de TrV. Posibles diferencias como estas descartan la asignación de una función general para las proteínas de VP4 en la familia *Dicistroviridae* [Squires *et al.*, 2013].

Nuevas evidencias aportadas los últimos años, han arrojado más luz sobre la existencia de esta proteína en TrV. El protocolo de purificación del virus fue mejorado, permitiendo separar 2 poblaciones distintas de TrV: TrV maduro (con RNA en su interior, siendo este infectivo) y cápsides vacías [Agirre *et al.*, 2011]. El análisis de TrV maduro por SDS-PAGE descarta definitivamente las hipótesis de que VP4 no exista como entidad individual o que coexista como parte de VP0. Ello se debe a que las muestras de TrV maduro, analizadas por SDS-PAGE muestran una banda atribuible a la proteína VP4. Sin embargo, se registra el patrón contrario en las muestras de cápside vacía analizadas, mostrando una única y prominente banda atribuible a VP0, sin presencia alguna de VP4. Estos resultados fueron confirmados mediante espectrometría de masas de las muestras de TrV maduro en el que se encontró un pico correspondiente a VP4. Por lo tanto, la única hipótesis para la falta de densidad es que VP4 existiera como entidad individual en la cápside de TrV, pero se encuentre desordenada o adquiriera múltiples conformaciones.

1.2.VIROPORINAS

Una característica común observada en la infección por la mayoría de virus animales es el aumento de la permeabilidad en las células infectadas [Gonzalez y Carrasco,

2003]. De hecho, varios productos de genes virales podrían ser responsables de estas alteraciones, entre ellos, las viroporinas.

Esta familia de proteínas, muestra generalmente algunos rasgos comunes. Las viroporinas son pequeños péptidos (50-120 aminoácidos), hidrofóbicos y muy dinámicos, razón por la cual tienden a oligomerizar formando poros. Aunque algunos segmentos transmembrana se encuentran muy conservados, muestran muy poca homología entre ellos en cuanto a la secuencia de los canales iónicos generados se refiere [OuYang y Chou, 2014]. Se conocen dos modos diferentes para erosionar membranas de acuerdo al momento de la infección. Por un lado, la modificación temprana de la membrana, que no requiere de ninguna expresión génica ya que son los componentes del propio virión los que median en la alteración [Fernandez-Puentes y Carrasco 1980; Carrasco, 1994]. Por otro lado, a medida que la infección progresa, varios productos virales pueden afectar a la membrana entre los cuales se encuentran las viroporinas, responsables en parte de la alteración de la membrana en el proceso avanzado de infección [Gonzalez y Carrasco, 2003].

Generalmente, las viroporinas contienen un dominio de naturaleza muy hidrofóbica capaz de formar α -hélices anfipáticas. La inserción de estas proteínas en membrana seguida por su oligomerización crea un poro generalmente hidrofílico formado por aminoácidos hidrofóbicos, orientados hacia los fosfolípidos, y aminoácidos hidrofílicos, formando parte del poro [Pinto *et al.*, 1997; Agirre *et al.*, 2002; Melton *et al.*, 2002; Grice *et al.*, 1997]. A parte de éste dominio, existen una serie de características adicionales de la estructura de las viroporinas que participan en la desestabilización de la bicapa lipídica como son ciertas regiones hidrofóbicas adicionales.

Las primeras investigaciones sobre las viroporinas partieron de las proteínas 2B de *poliovirus*, 6K de *togavirus* y M2 de *influenza A virus* (IAV). 2B es una proteína viral implicada en la permeabilización de la membrana que implica el tránsito de iones y pequeñas moléculas durante las etapas tardías de la infección viral [Madan *et al.*, 2008; Agirre *et al.*, 2008]. En cuanto a 6K, se ha probado que forma canales catión-selectivos cuando se inserta en una bicapa lipídica [Melton *et al.*, 2002] pero todavía se desconoce el rol exacto de esta proteína en el ciclo de vida viral [Sanz *et*

al., 1994; Firth *et al.*, 2008; Antoine *et al.*, 2008]. Por su parte, el canal de protones M2 es la vioporina que más atención ha recibido por dos razones principales. Por un lado, es la diana del fármaco antigripe *amantadine* y por otro lado, porque es un canal pH-dependiente, y debido a esto generó mucho interés cuando la información acerca de este tipo de conductos era escasa [Pielak *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Cross *et al.*, 2012]. Desde el descubrimiento de estas primeras proteínas virales, la familia de las vioporinas no ha parado de aumentar. Cabe destacar, entre otras, la proteína Vpu del virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1 (HIV-1), y p7 del virus de la hepatitis C (HCV) que han demostrado también ser capaces de transportar cationes a través de la membrana celular [Schubert *et al.*, 1994; Marassi *et al.*, 1999; Romer *et al.*, 2004; Griffin *et al.*, 2003; Pavlovic *et al.*, 2003].

Aunque todavía se desconoce la función exacta de las vioporinas de muchos virus, a la gran mayoría se les ha implicado en alguna u otra etapa del proceso de infección, ya sea en la entrada a la célula hospedadora, o en la liberación de los virus maduros. Cabe destacar el rol del canal de protones M2 en la replicación de influenza ya que se encarga de acidificar el pH a través de la membrana viral durante la entrada a la célula. De esta manera, disminuye el pH del interior del virión después de la endocitosis facilitando la liberación del ARN [Martin y Helenius, 1991; Helenius, 1992]. Sin embargo, no se ha conseguido determinar de manera tan clara el rol de otras vioporinas catión-selectivas. En el caso de HCV, la actividad del canal p7 parece facilitar la liberación del virus [Jones *et al.*, 2007; Steinmann *et al.*, 2007] mediante la despolarización de la membrana celular lo que facilita la curvatura de la misma durante la externalización del virus [Nieva *et al.*, 2012; Agarkova *et al.*, 2008]. Además, también se le atribuyen a p7 otras funciones generales como la liberación de cationes o la generación de estrés celular, lo que induciría la muerte celular programada [Madan *et al.*, 2008].

A pesar de que todavía se desconocen las funciones concretas de la conducción iónica de muchas vioporinas, los avances en la caracterización estructural de M2 y BM2 de influenza, y la proteína p7 de HCV han proporcionado importantes evidencias de que las vioporinas no son simples porinas. Estas proteínas son capaces de adoptar diferentes formas y estructuras para realizar actividades de transporte regulado como el tráfico de protones pH-dependiente o la conductancia catión-

selectiva. Además, la caracterización estructural de estas proteínas permite diseñar compuestos para la inhibición de su función. Este hecho refuerza la idea de utilizar estas estructuras como dianas de futuros compuestos antivirales [OuYang y Chou, 2014].

1.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD PERMEABILIZADORA DE MEMBRANAS

Los mecanismos por los que un péptido puede inducir permeabilización en membranas lipídicas han sido estudiados en un grupo de péptidos conocido como péptidos antimicrobianos (AMPs). Estos compuestos son péptidos que protegen al hospedador de una gran variedad de patógenos debido a su actividad permeabilizadora. Además, se ha observado dificultad entre los patógenos para generar resistencia frente a estos compuestos, lo que les confiere un gran potencial como agentes terapéuticos.

Utilizando su composición de aminoácidos, su tamaño y su conformación estructural como base de una clasificación, se pueden dividir en diferentes categorías: El grupo más amplio corresponde a los péptidos catiónicos, que pueden formar α -hélices o láminas- β [Vizioli y Salzet, 2002; Brogden, 2005] como es el caso de las defensinas humanas [Mehra *et al.*, 2012].

Otro grupo de AMPs reúne péptidos aniónicos [Vizioli y Salzet, 2002]. Al igual que los péptidos catiónicos, los péptidos antimicrobianos aniónicos (AAMP) son una parte importante del sistema inmune innato y han sido identificados tanto en vertebrados como en invertebrados y plantas [Harris *et al.*, 2009].

Diferentes estudios han revelado que además de la carga del péptido (catiónico o aniónico), otras características como el tamaño, la secuencia primaria, la conformación, la estructura, la hidrofobicidad y la anfipaticidad podrían ser esenciales en la actividad antimicrobiana y en el mecanismo de acción [Friedrich *et al.*, 2000; Gennaro y Zanetti, 2000].

En lo referente a su mecanismo de acción sigue habiendo muchas incógnitas ya que se desconoce en gran medida como desempeñan su función microbicida. Sin embargo, hay datos que respaldan una interacción mediante fuerzas electroestáticas

entre los AMPs catiónicos y los grupos negativamente cargados de los fosfolípidos que causan la disrupción de la membrana [Guilhelmelli *et al.*, 2013]. Entre los mecanismos propuestos, los más extendidos son el modelo barril o *barrel stave model*, el modelo alfombra o *carpet model* y la formación de poros toroidales [Melo *et al.*, 2009] (**Figura 3**).

Según el modelo barril, los péptidos antimicrobianos se organizan formando canales perpendiculares sobre la superficie de la bicapa lipídica y adoptan una orientación transmembranal específica [Ehrenstein y Lecar, 1977]. Inicialmente, los AMPs se unen a la membrana como monómeros y una vez en ella se oligomerizan y se da la formación del poro. En este mecanismo, las estructuras secundarias del péptido como las α -hélices y las laminas- β son esenciales para la formación correcta del poro [Breukink y de Kruijff, 1999]. Las regiones hidrofóbicas de los péptidos interaccionan con las membranas lipídicas, mientras que las regiones hidrofílicas de los péptidos forman el lumen del poro [Brogden, 2005]. De esta manera, se originan canales que provocan la disrupción de las funciones de la membrana celular, provocando su ruptura y en consecuencia la muerte del microorganismo patógeno.

El segundo mecanismo, denominado modelo alfombra o *carpet model*, propone una absorción superficial de los péptidos sobre la superficie de la bicapa lipídica interrumpiendo el empaquetamiento de los fosfolípidos que forman la membrana celular. Cuando los péptidos se unen a ella y alcanzan una concentración umbral, la membrana se fragmenta y se permeabiliza de tal manera que la célula muestra incapacidad para mantener un gradiente osmótico estable, orientando la lisis celular [Oren y Shai, 1998]. Además, se ha observado que algunos péptidos pueden formar también poros a concentraciones menores de la umbral, sugiriendo que el mecanismo que utiliza el péptido para permear la membrana depende de su concentración [Lohner, 2009].

El último de los mecanismos propuestos implica la formación de poros toroidales. A diferencia de lo que ocurre en el modelo barril, en el modelo toroidal los péptidos se insertan en la membrana, induciendo un cambio en su curvatura local de tal manera que el lumen del poro se forma tanto por péptidos como por las cabezas polares de los fosfolípidos [Yang *et al.*, 2001].

Se contempla también la formación de un poro toroidal desordenado. Este modelo modificado propone una conformación y una orientación menos rígida de los péptidos según la cual, el lumen del poro estaría formado íntegramente por las cabezas de los fosfolípidos (**Figura 3**) [Melo *et al.*, 2009].

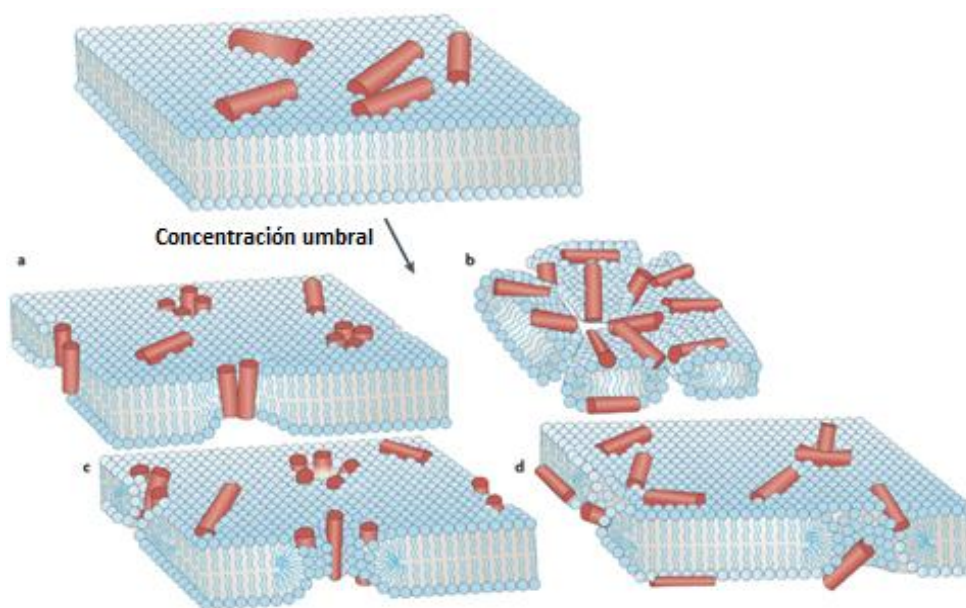


Figura 3. Diferentes mecanismos de acción propuestos para los péptidos antimicrobianos (AMP). a) Representación del modelo barril. b) Representación del modelo alfombra. c) Representación del modelo del poro toroidal. d) Representación del poro toroidal desordenado. Imagen modificada [Melo *et al.*, 2009].

Debido a su posible función como viroporina, observada anteriormente en otras proteínas VP4 de familias de virus similares, VP4 de TrV podría ser empleada con fines antimicrobianos. Además, algunos de los mecanismos de acción hallados entre los AMP figuran también entre los mecanismos empleados por las viroporinas para fragmentar las membranas celulares de los organismos hospedadores. Es por ello que la posibilidad de clonar, expresar y caracterizar VP4 de TrV podría propiciar el uso de una proteína viral como péptido antimicrobiano generado de manera recombinante y además podría desencadenar el descubrimiento de otras muchas proteínas virales con el mismo fin. De esta manera se conseguiría ampliar el abanico de compuestos antimicrobianos disponibles tanto para investigación como para usos sanitarios en la lucha contra los microorganismos multirresistentes.

Recientemente se ha observado la actividad permeabilizadora de membranas en proteínas VP4 de la familia *Picornaviridae* [Martín-Belmonte *et al.*, 2000], [Danthi *et al.*, 2003]. Como TrV es filogenéticamente cercano a esta familia de virus, se ha considerado la posibilidad de que la proteína VP4 de TrV pudiera tener actividad como viroporina. Sin embargo, a día de hoy sus características y propiedades funcionales siguen siendo un misterio. Con el objetivo de caracterizar dichas funciones, en el presente trabajo se ha procedido a la clonación, expresión y purificación de esta proteína viral.

1.4. OBJETIVOS

El objetivo final de este trabajo es la clonación, expresión y purificación de la proteína estructural VP4 de TrV para la posterior caracterización de sus funciones. Esta meta final está formada por varios objetivos individuales.

El primer objetivo consiste en insertar la secuencia que codifica la proteína viral en plásmidos funcionales, para su expresión en el sistema de expresión heterólogo de *Escherichia coli*. De esta manera se pudo valorar de manera preliminar los efectos de la síntesis de VP4 en células.

El segundo objetivo consiste en clonar y expresar VP4 como una proteína de fusión a MBP introduciendo un punto de corte para la proteasa TEV entre ambas secuencias.

El tercer objetivo propuesto para este trabajo consiste en la purificación por cromatografía de afinidad de la proteína de fusión.

El último objetivo consistió en evaluar la viabilidad para obtener VP4 libre tras el corte con TEV de la proteína de fusión purificada. Para esto se probaron una gran cantidad de condiciones de corte distintas.

2. DESARROLLO

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1. Purificación de TrV

Se han utilizado heces secas de insectos infectados con TrV como principal fuente de virus. La purificación se llevó a cabo de la manera descrita en estudios previos de TrV [Rozas-Dennis *et al.*, 2004] pero introduciendo ciertas modificaciones recopiladas en investigaciones posteriores [Agirre *et al.*, 2011].

En resumen, aproximadamente 2 g de heces se resuspendieron en tampón NMT (10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 50 mM Tris, pH 7) y tras un proceso de clarificado, se centrifugó el sobrenadante a 180.000 g durante 3 horas con el objetivo de sedimentar todas las partículas virales. Una vez el *pellet* se hubo resuspendido, las muestras se cargaron en un gradiente discontinuo de sacarosa del 10-30 % en un volumen de 35 mL, y se centrifugaron a 100.000 g durante 3 horas. A continuación, el gradiente fue fraccionado de abajo a arriba en alícuotas de 1 mL. Estas fracciones se sometieron a medición de absorbancia en un espectrofotómetro (*Nanophotometer*, Implen) a longitudes de onda de 260 nm (absorbe más el ARN que la proteína) y 280 nm (absorbe más la proteína que el ARN). De esta manera, se pudieron separar las 2 especies de partículas: Por un lado, aquellas cuya absorbancia a 260 nm era superior a la absorbancia a 280 nm, correspondían a TrV maduro (con ARN en su interior) y aquellas cuya absorbancia a 280 nm era superior a la absorbancia a 260 nm que correspondían a cápsides vacías. Se seleccionaron aquellas fracciones que contenían mayor concentración de virus maduro para extraer el ARN viral de su interior.

2.1.2. Extracción del ARN

Todo el proceso se realizó con especial cuidado para evitar contaminación con RNAsa. Por cada 50 µL de virus maduro a 0,1 mg/mL, se añadieron 450 µL de Trizol (Invitrogen) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 90 µL de CHCl₃ y la mezcla se agitó y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Cumplido ese plazo, se centrifugó la muestra 15 minutos a 12.000 g a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a otro eppendorf, se le añadieron 225 µL de isopropanol y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se

centrifugó la muestra 10 minutos a 12000 g a 4 °C y el *pellet* se lavó dos veces con 1 mL de Etanol al 75 % y se centrifugó 5 minutos a 7.500 g y 4 °C de temperatura. El *pellet* se dejó secar durante 10 minutos y se resuspendió en 20 µL de H₂O previamente tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC).

2.1.3. Clonaje de VP4-pET28a

El ADN codificante para VP4 se obtuvo por RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) utilizando el ARN purificado de TrV y los siguientes oligonucleótidos:

(Forward) 5'-

GGAATTCCCATATGGGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCC-3', incorporando la secuencia de restricción para *NdeI* (subrayado) y el codón de iniciación ATG (negrita);

(Reverse) 5'-

TCCGGGATCCCTAAAAACCTAAAGCTGACAATAACCC-3', incorporando el sitio de restricción para *BamHI* (subrayado) y el codón de parada CTA (negrita).

El producto de PCR resultante se digirió durante 30 minutos con la enzima de restricción *NdeI* y durante 5 minutos adicionales con *BamHI*. Por su parte el plásmido pET28a (Novagen) se digirió durante 10 minutos con *NdeI* y durante 5 minutos adicionales con *BamHI*. Todas las digestiones se realizaron a 37 °C y seguidamente se inactivaron a 80 °C durante 5 minutos. Tras esto, se llevó a cabo la ligación de VP4-pET28a mediante la enzima T4 ADN ligasa a 22 °C durante 30 minutos. La desactivación de la enzima ligasa se realizó a 65 °C durante 10 minutos.

El producto de la ligación se usó para transformar la cepa competente BSJ de *Escherichia coli* mediante choque térmico. Las transformaciones se sembraron en placas de LB-agar (Luria Broth) con 50 µM de kanamicina y se incubaron a 37 °C durante 14 horas para permitir la proliferación celular. Tras observar crecimiento en la placa, se realizó una PCR partiendo de las colonias (*colony-PCR*) con el objetivo de amplificar el inserto (VP4) dentro del ADN plasmídico. De esta manera se comprobó y se seleccionaron aquellas colonias recombinadas correctamente. Las colonias recombinantes (VP4-pET28a-BSJ) se cultivaron en 10 mL de medio LB que contenía kanamicina (50 µM) y se crecieron durante 14 horas en agitación constante.

Los cultivos líquidos crecidos se usaron para purificar el ADN plasmídico recombinante (VP4-pET28a) usando el kit *GeneJET Plasmid MiniPrep Kit* (Thermo Scientific). Los plásmidos recombinantes fueron secuenciados para comprobar que la secuencia de VP4 insertado era correcta.

2.1.4. Expresión de VP4-pET28a

Los plásmidos recombinantes comprobados por secuenciación se usaron para transformar la cepa BL21(DE3) de *E. coli*. Para ello, BL21(DE3) se transformó mediante electroporación y se incubó en placa de LB-agar con 50 μ M de kanamicina a 37 °C durante 14 horas.

Una colonia positiva de BL21(DE3) se inoculó en 50 ml de medio líquido LB que contenía kanamicina (50 μ M) y se incubó durante 14 horas en agitación constante. Este cultivo se diluyó 1:20 en 1 L de medio LB con 50 μ M de kanamicina. Las células se incubaron a 37 °C con agitación hasta obtener una densidad óptica de 0,6-0,8 a 600 nm (OD600). A continuación, se indujo la expresión proteica utilizando 0,5 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se incubó el cultivo durante 3 horas a 37 °C.

2.1.5. Clonaje de VP4-pET28HMT

Con el objetivo de obtener un clon en el que VP4 se expresara como una proteína de fusión con MBP (*Maltose Binding Protein*), VP4 se extrajo mediante digestión enzimática del plásmido recombinante construido anteriormente y se introdujo en el plásmido pET28HMT (un plásmido pET28a modificado para contener la secuencia para MBP flanqueada en el 5' por una secuencia codificante para 6 Histidinas y en el 3' por un sitio de corte para TEV). Para ello, tanto VP4-pET28a como pET28HMT se digirieron durante 5 minutos con *NdeI* y 10 minutos adicionales con *HindIII*. Todas las digestiones se llevaron a cabo a 37 °C y seguidamente se inactivaron a 80 °C durante 5 minutos. Tras esto, se llevó a cabo la ligación de VP4-pET28HMT mediante la enzima T4 ADN ligasa a 22 °C durante 30 minutos y la posterior desactivación de la ligasa se realizó a 65 °C durante 10 minutos.

El producto de la ligación se usó para transformar la cepa competente BSJ de *Escherichia coli* mediante choque térmico. Las transformaciones se sembraron en placas de LB-agar con 50 μ M de kanamicina. Para comprobar y seleccionar aquellas colonias recombinadas correctamente, se realizó una *colony*-PCR con el objetivo de amplificar el inserto dentro del ADN plasmídico. Las colonias recombinantes (VP4-pET28HMT-BSJ) se cultivaron en 10 mL de medio LB que contenía kanamicina (50 μ M) y se crecieron durante 14 horas en agitación constante.

Los cultivos líquidos crecidos se usaron para purificar el ADN plasmídico recombinante (pET28HMT-VP4) usando el kit *GeneJET Plasmid MiniPrep Kit* (Thermo Scientific). Los plásmidos recombinantes fueron secuenciados para comprobar que la secuencia de HMT-VP4 era correcta.

2.1.6. Expresión de VP4-pET28HMT

Los plásmidos recombinantes comprobados por secuenciación se usaron para transformar las cepas BL21(DE3) y Rosetta2(DE3)pLysS de *E. coli*. Por un lado, BL21(DE3) se transformó mediante electroporación y se incubó en placa de LB-agar con 50 μ M de kanamicina a 37 °C durante 14 horas. Por otro lado, la cepa Rosetta2(DE3)pLysS se transformó mediante choque térmico y se incubó en placa de LB-agar con 50 μ M de kanamicina y 100 μ M de cloranfenicol a 37 °C durante 14 horas. Una colonia positiva de VP4-pET28HMT-BL21(DE3) se inoculó en 50 mL de medio LB que contenía kanamicina (50 μ M) y se incubó durante 14 horas en agitación constante. Este cultivo se diluyó 1:20 en 1 L de medio LB con 50 μ M de kanamicina. Las células se incubaron a 37 °C con agitación hasta obtener una densidad óptica de 0,6-0,8 a 600 nm. Por su parte, para el caso de Rosetta2(DE3)pLysS se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente.

La expresión de la proteína se estudió en tres condiciones distintas: 3 horas a 37 °C, 5 horas a 25 °C y 14 horas a 18 °C (en todos los casos, una vez añadido el IPTG). En la expresión se analizó por un lado la proteína total expresada (usando los *pellets* celulares tras la expresión) y por otro, la proteína expresada de forma soluble. Este análisis de la solubilidad se realizó de la siguiente manera: A los *pellets* celulares de cada condición se les añadió *Bugbuster Protein Extraction Reagent* (Novagen) suplementado con una pastilla de inhibidor de proteasas (Roche) y 2,5 U/mL de

Benzonasa (Invitrogen). Las mezclas se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente con agitación para romper las células. Finalmente la proteína soluble se separó de la insoluble por centrifugación a 25.000 g durante 20 minutos. Todas las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y Western-blot como se explica en las secciones 2.1.10. y 2.1.11.

2.1.7. Purificación de HMT-VP4

El cultivo de VP4-pET28HMT-BL21(DE3) inducido con 0,5 mM IPTG e incubando a 37 °C durante 3 horas, se centrifugó 20 minutos a 5.000 g y el *pellet* de células sedimentadas se resuspendió en 15 mL/L de *Binding Buffer* (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 30 mM pH 7,5) suplementado con inhibidor de proteasas. Mediante 4 ciclos de disrupción en el Homogeneizador (Emulsiflex-C5) se realizó la ruptura celular y la mezcla se centrifugó a 30.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante producto de la centrifugación, se incubó 20 minutos a temperatura ambiente con Benzonasa (2,5 U/mL) y a continuación la mezcla se cargó en la columna *HisTrap* (GE Healthcare Life Sciences) a un flujo de 1 ml/min. La proteína unida a la columna se eluyó en un gradiente ascendente de *Elution Buffer* (tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM pH 7,5) a 1 mL/min desde el 0 % hasta el 60%. Las fracciones se recogieron y analizaron por SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) y Western-blot, realizado de la manera descrita en 2.1.10.

2.1.8. Digestión de HMT-VP4 con la proteasa TEV

Tras la identificación mediante SDS-PAGE y Western-blot de las fracciones puras de HMT-VP4, estas se digirieron con la enzima TEV y simultáneamente se dializaron para eliminar el Imidazol usado en la purificación. Con el objetivo de obtener las mejores condiciones para la digestión con TEV (mayor cantidad de proteína HMT-VP4 cortada y mayor cantidad de VP4 soluble) se hizo un cribado en distintas condiciones. En todo el *screening*, la concentración de la proteína fue de 0,9 mg/mL y la proteasa TEV se añadió en una relación 1:30 (mg/mg) respecto a la proteína HMT-VP4. Las fracciones seleccionadas se transfirieron a membranas de diálisis junto con la proteasa y se incubaron con agitación a 4°C durante 14 horas en cada

una de las diez condiciones mencionadas a continuación: La primera condición contenía Buffer A (150 mM NaCl, Tris 50 mM, 1mM DTT, 0,5 mM EDTA, pH 7,5) y se incubó con agitación. La segunda condición contenía también el Buffer A pero se incubó sin agitación. A excepción de esta segunda condición, en el resto se incluyó la agitación como parte del proceso de incubación a 4 °C. La tercera condición contenía el mismo buffer pero ajustado a pH 8,5. La cuarta condición, en cambio, contenía un pH más ácido, pH 5,5. En la siguiente, se restableció el pH 7,5 original pero se modificó la concentración de NaCl empleado, pasando de 150 mM (condiciones originales) a 0,5 M. En la sexta, se redujo la concentración de NaCl a tan sólo 10 mM. En la séptima condición, al Buffer A se le añadió glicerol al 20 % (v/v). A la octava condición se le añadió 50 mM Arginina y 50 mM Glutámico. En la novena condición, se le añadió 0,75 mM de *n-Dodecyl- β -D-maltoside* (DDM). Por último, en la décima condición se le añadió 2 mM de *Octyl β -D-glucopyranoside* (OG). En cada una de las fracciones se analizó la proteína total y la proteína soluble, siendo ésta el sobrenadante de una centrifugación a 25.000 g durante 1 hora. Todas las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y Western-blot como se explica en 2.1.10. y 2.1.11.

2.1.9. Análisis de muestras de ADN mediante electroforesis en geles de Agarosa

Se pesó 1 g de Agarosa (*Agarose D-1 Low EEO*, Pronadisa) y se disolvió en 100 mL de buffer TAE, *Tris/Acetic acid/EDTA* (40 mM Tris, 20 mM Ácido acético, 1 mM EDTA). La mezcla se calentó hasta ebullición y a continuación se le añadió la tinción de ácidos nucleicos *GelGreen Nucleic Acid Stain* (Biotium) en una relación de 1:10.000 (v/v). Seguidamente se agitó para mezclar bien los compuestos y se vertió al molde, donde se colocó el peine que delimita el lugar de las calles.

Las muestras a analizar se mezclaron con la preparación para carga de geles de DNA (*6 X DNA Loading Dye*, Thermo Scientific) y se corrieron en tampón TAE a 135 V durante 30 minutos.

2.1.10. Análisis de muestras proteicas en geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida están formados por dos fases. La fase de *Resolving* o resolución y la fase de *Stacking* o apilamiento. La fase de *Resolving* se preparó haciendo una disolución formada por Tris 0,38 M pH 8,8, dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1 % (p/v), Acrilamida/Bisacrilamida (Sigma) (30:0,8) al 10 % (p/v), persulfato amónico (PSA) al 0,1% (p/v) y TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, Sigma) al 0,003 % (v/v). Por otro lado, la fase de *stacking* se preparó haciendo una disolución formada por Tris 0,125 M pH 6,8, SDS al 0,1 % (p/v), Acrilamida/Bisacrilamida (30:0,8) al 4,5 % (p/v), PSA al 0,1 % y TEMED 0,0015 % (v/v). En ambos casos, tanto el APS como el TEMED se añadieron en último lugar ya que son los encargados de desencadenar la reacción (catalizador e iniciador). Para formar los geles, primeramente se añadió el *Resolving* y tras haber polimerizado, se añadió el *Stacking* al que se le colocó el peine para formar las calles.

Las muestras para su análisis se prepararon diluyéndolas en Loading Buffer (Tris.HCl 0,25 M pH 6,8, SDS al 10 % (p/v), EDTA 60 mM, Glicerol al 50 % (v/v), Azul de Bromofenol al 0,01 % (p/v)) + 0,1 M DTT (dithiothreitol). Tras mezclar correctamente, las muestras se calientan a 95 °C durante 10 minutos.

Una vez cargadas las muestras en el gel de poliacrilamida éstas se corrieron en el tampón de electroforesis Tris-Glicina (0,25 M Tris.HCl, 1% SDS y 1,92 M Glicina) a 135 V durante 40 minutos.

Por otro lado, para el análisis de pequeñas proteínas se usaron geles comerciales prehechos del 10-20 % *Mini-PROTEAN Tris-Tricine Precast Gels* (Bio-Rad). Estos geles se corrieron en tampón de electroforesis Tris-Tricina (Tris-HCl 1 M, Tricina 1 M, y SDS al 1 %) a 100 V durante 100 minutos.

Por último, una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron durante 15 minutos con la solución de tinción (50 % metanol (v/v) 10 % Acético (v/v) y 0,25 % Coomassie R-250 (m/v)). Después, los geles se lavaron varias veces con la solución de destinción formada por ácido acético al 10 %.

2.1.11. Análisis de muestras mediante Western-blot

Con el objetivo de analizar la presencia específica de ciertas proteínas mediante el uso de anticuerpos tras correr las muestras proteicas en gel de poliacrilamida y sin haberlos teñido, se procedió con la electrotransferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa. En este caso se usó el método de electrotransferencia semi-seca. Para ello, se apilaron en el orden descrito los siguientes elementos (del polo negativo o ánodo al positivo o cátodo): esponja, varios papeles de filtro empapados en buffer de transferencia (Metanol al 20 %, Tris 48 mM pH 9,2, SDS 1,3 mM, Glicina 39 mM) gel, membrana y papeles de filtro empapados. Este montaje, llamado coloquialmente *sandwich*, se dispone en el sistema de transferencia y se le aplicó un voltaje de 15 V durante 45 minutos.

A continuación se lavó la membrana con TBST, *Tris Buffered Saline* con Tween 20, (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5 % Tween-20 (v/v)) y se bloqueó en leche al 5 % en TBST durante 45 minutos. Transcurrido ese tiempo se añadió el anticuerpo en relación 1:2.000 y se incubó en agitación durante 60 minutos. Finalmente se realizaron 3 lavados con TBST de 5 minutos cada uno y las membranas se revelaron incubándolas durante 20 minutos en una disolución de TBS (TBST sin Tween) que contenía 0,02 % (m/v) de 1-clor-4-naftol y 0,006% (v/v) de H₂O₂.

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Purificación de TrV

La purificación de TrV se llevó a cabo en la manera descrita en Materiales y Métodos. Las fracciones de 1 mL extraídas del gradiente se sometieron a medición de absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm. De esta manera, se pudieron separar las dos especies de partículas en las diferentes fracciones, tal y como se refleja en la **Figura 4**: Una de ellas mostraba mayor absorbancia a 260 nm que a 280 nm y la otra, de menor intensidad, mostraba mayor intensidad a 280 nm que a 260 nm. Para extraer el ARN genómico para el clonaje de constructos de VP4, se seleccionaron aquellas fracciones que mostraran mayor absorbancia a longitudes de onda a 260 nm. Esta longitud de onda garantiza la absorbancia del ARN, en este caso ARN viral, lo que indica la localización en esas fracciones de partículas de virus maduro. Las fracciones utilizadas para el siguiente paso de extracción del ARN de TrV fueron, por lo tanto, las fracciones 7-16.

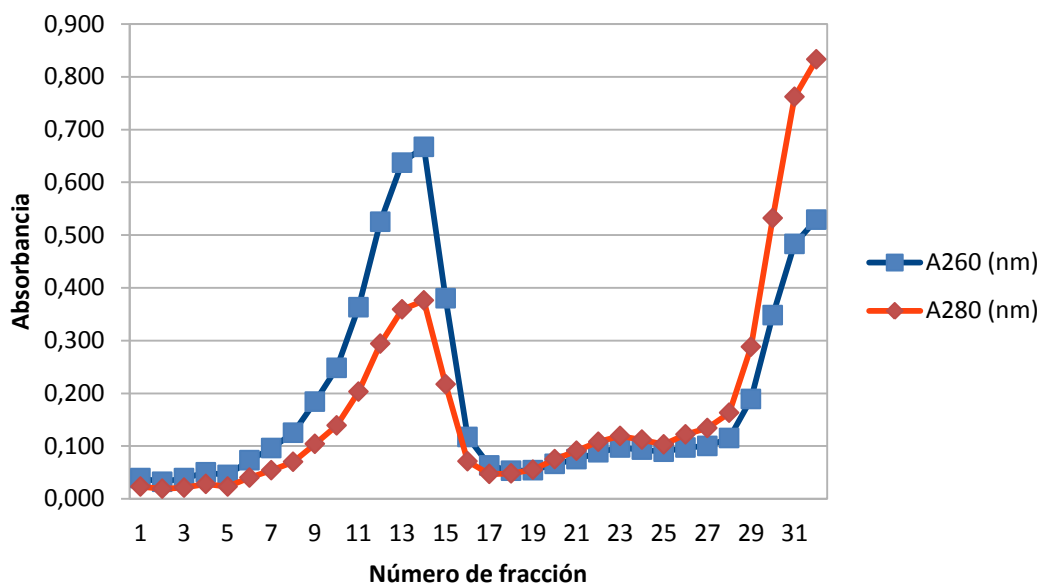


Figura 4. Medición de la absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm de las diferentes fracciones obtenidas en el gradiente de sacarosa. Se obtuvieron 32 fracciones de 1 mL cada una del gradiente de sacarosa (5-30 %). La fracción 1 contiene el comienzo del gradiente (sacarosa 30%) y la fracción 32 por su parte, contiene el final del gradiente (sacarosa 5%). Dos picos destacados: Pico de absorbancia predominante a longitud de onda de 260 nm formado por las fracciones 5-17; Pico de absorbancia predominante a longitud de onda a 280 nm formado por las fracciones 26-32.

2.2.2. Clonaje de VP4-pET28a

Mediante RT-PCR y usando los oligonucleótidos descritos en Materiales y Métodos se obtuvo un fragmento de ADN correspondiente al péptido VP4 (170 bp) (**Figura 5**) a partir del ARN del genoma de TrV. Esta secuencia de ADN codificante se utilizó más tarde como inserto para construir el plásmido recombinante VP4-pET28a.

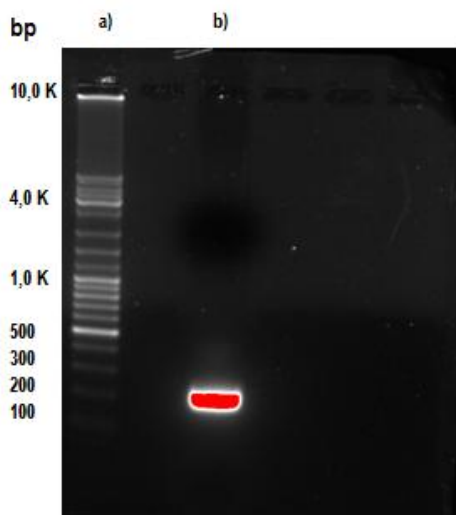


Figura 5. Secuencia de ADN correspondiente a la proteína viral VP4. La secuencia fue obtenida mediante RT-PCR del ARN genómico de TrV. a) Marcador de ADN *Long Range DNA Loader* (Jena Bioscience) b) Secuencia de ADN de VP4. Gel de agarosa al 1 %.

Tras la amplificación del segmento se llevó a cabo la digestión de la forma descrita en Materiales y Métodos obteniéndose una correcta digestión tanto para VP4 como para pET28a como se aprecia en la **Figura 6**. A pesar de que a simple vista en el gel no se puede determinar si ambas enzimas cortaron, se consideró que la digestión fue correcta debido a que 1) los fragmentos de ADN no han sido completamente degradados y 2) el ADN plasmídico corrió como una sola banda (y por lo tanto habría sido linealizado).

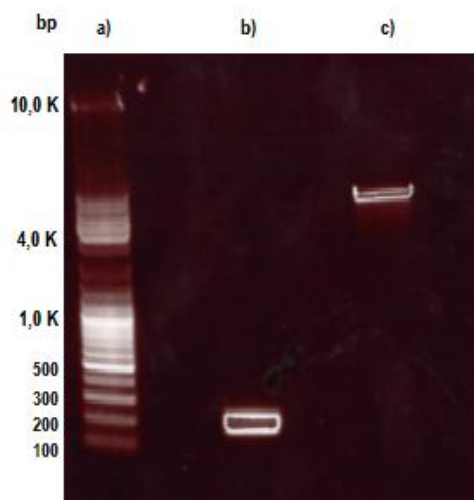


Figura 6. Digestión de VP4 y pET28a con enzimas *NdeI* y *BamHI*. a) Marcador de ADN *Long Range DNA Loader* (Jena Bioscience), b) secuencia de VP4 digerida, c) Plásmido pET28a digerida. Gel de Agarosa al 1 %.

Tras la digestión enzimática se realizó la ligación del constructo inserto-plásmido utilizando las condiciones mencionadas en Materiales y Métodos y seguidamente se transformaron las cepas competentes BSJ de *E. coli*. A continuación, se llevó a cabo una *colony-PCR* para comprobar la correcta transformación mediante choque térmico de las células BSJ con el plásmido recombinante VP4-pET28a (**Figura 7**). Todas las colonias analizadas fueron positivas y de entre ellas se seleccionó la **f**) para ser secuenciada. Como su secuencia resultó correcta, la colonia **f**) se usó para posteriores estudios.

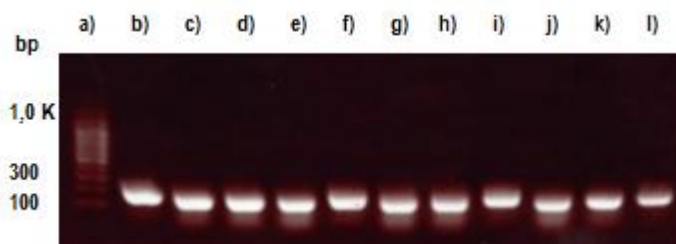


Figura 7. *colony-PCR* a partir de células BSJ transformadas con el plásmido recombinante VP4-pET28a. Se seleccionaron 10 colonias que proliferaron en el medio selectivo (c-l). Tras la amplificación se compararon con el marcador (a), *Long Range DNA Loader* (Jena Bioscience) y con el control positivo b) que es la amplificación de la secuencia de VP4. Entre todas ellas se seleccionó la colonia **f**). Gel de agarosa al 1%.

2.2.3. Expresión de VP4-pET28a

La extracción del ADN plasmídico a partir de las células BSJ recombinantes antes seleccionadas, se utilizó para transformar la cepa de expresión BL21(DE3). La transformación resultó exitosa y la cepa transformada, VP4-pET28a-BL21(DE3) se cultivó en 1 L de medio selectivo (composición detallada en Materiales y Métodos) y se incubó a 37 °C con agitación. Tras 1 hora y 20 minutos de incubación, el cultivo alcanzó una densidad celular adecuada ya que mostró un valor de absorbancia a 600 nm de 0,720. En ese momento se añadió 0,5 mM de IPTG para inducir la expresión de VP4 y se volvió a medir la absorbancia del cultivo (**Tabla 1**) tras 30 minutos de incubación. A simple vista el cultivo carecía de turbidez característica de un medio crecido y se asemejaba a un medio estéril recién preparado. Como se puede ver en la **Tabla 1**, la absorbancia sufrió una caída del 75 % aproximadamente lo cual es indicativo de muerte celular en el cultivo.

Tabla 1. Variación de la absorbancia a 600 nm de de las células recombinantes VP4-pET28a-BL21(DE3), en el tiempo tras la inducción. Entre ambas mediciones el cultivo se incubó a 37 °C con agitación.

Tiempo de incubación tras inducción con IPTG (min)	Absorbancia 600 nm
0	0,720
30	0,180

El intento de análisis de la expresión por SDS-PAGE y Western-blot (información no mostrada) no resultó fructífero debido probablemente a la ausencia de células viables en el cultivo.

2.2.4. Clonaje de VP4-pET28HMT

Como se comentó en Materiales y Métodos, la estrategia para realizar este clonaje consistió en extraer VP4 del clon anteriormente descrito, VP4-pET28a, e introducirlo en pET28HMT, extrayéndole un inserto previo que contenía. La digestión de VP4-pET28a y pET28HMT con las enzimas *NdeI* y *HindIII* resultó exitosa como se aprecia en la **Figura 8**. Se purificaron las bandas señalizadas con flechas, que

correspondían a la secuencia de VP4 y la secuencia del plásmido pET28HMT y se sometieron a la ligación. En esta ocasión, hubo que repetir la digestión y purificación de VP4 varias veces ya que el rendimiento de este proceso era bajo, como se puede observar en la baja densidad de la señal de VP4 en la **Figura 8**.

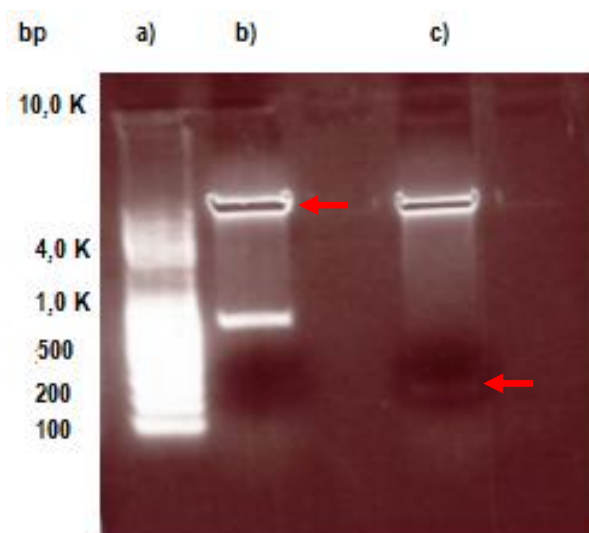


Figura 8. Digestión de pET28HMT y VP4-pET28a. a) Marcador de ADN *Long Range DNA Loader* (Jena Bioscience), b) pET28HMT digerido, c) VP4-pET28a digerido. La banda inferior (alrededor de 200 bp) indicada por la flecha, corresponde a VP4 digerida. La flecha superior señala la banda que contiene pET28HMT digerida. Gel de agarosa al 1 %.

Tras la ligación, se transformó la cepa competente BSJ de *E. coli* (descripción detallada del proceso en *Materiales y Métodos*) y se llevó a cabo una *colony-PCR* para comprobar la correcta transformación (**Figura 9**). Todas las colonias analizadas resultaron positivas y de ellas se seleccionaron finalmente las colonias 1 y 4 correspondientes a las bandas de las calles **c)** y **f)**. Estas fueron comprobadas por secuenciación y ante su correcta secuencia, se seleccionó la colonia 1 para estudios posteriores.

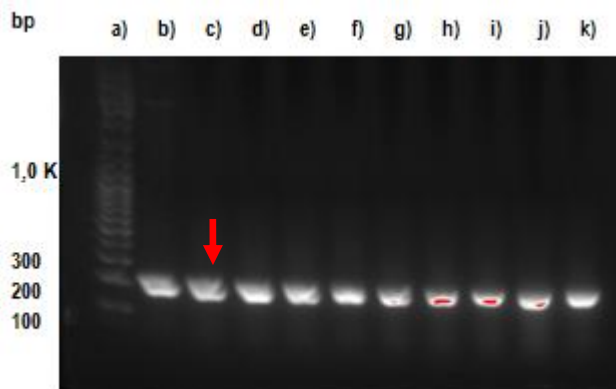


Figura 9. colony-PCR a partir de células BSJ transformadas con el plásmido recombinante VP4-pET28HMT. a) Marcador de ADN *Long Range DNA Loader*, b) control positivo (amplificación de VP4), el resto de calles (c-k) corresponden a 9 colonias que proliferaron en el medio selectivo. La flecha señala la banda correspondiente a la colonia 1, la colonia seleccionada para realizar los estudios. Gel de agarosa al 1%.

2.2.5. Expresión de VP4-pET28HMT

El ADN plasmídico de la colonia 1 se extrajo para posteriormente, transformar la cepa BL21(DE3) mediante electroporación y la cepa Rosetta2(DE3)pLysS mediante choque térmico con resultados positivos para ambas cepas. A las cepas transformadas, VP4-pET28HMT-BL21(DE3) y VP4-pET28HMT-Rosetta2(DE3)pLysS y crecidas en cultivo líquido como se describe en Materiales y Métodos, se les añadió 0,5 mM IPTG. De esta manera, se indujo la expresión del constructo HMT-VP4 (polihistidina-MBP-Sitio de corte para TEV-VP4) y los cultivos se incubaron en tres condiciones distintas: A 37 °C 3 horas, a 25 °C 5 horas y a 18 °C 14 horas.

Las *pellets* celulares de cada condición se trataron de la manera explicada en Materiales y Métodos y se analizaron por SDS-PAGE (**Figura 10** y **Figura 12**) y por Western-blot (**Figura 11** y **Figura 13**).

Los geles SDS-PAGE en ambas cepas muestran la sobreexpresión de una banda de unos 50 KDa (tamaño esperable para HMT-VP4 50,3 KDa). Estos resultados fueron además confirmados por los Western-blot anti-Histidina llevados a cabo.

En células BL21(DE3) se observan resultados positivos en todas las temperaturas de incubación y en todas las fracciones, “t=3” que contienen la proteína total, “SN”, que contiene la proteína soluble y “*pellet*” que contiene proteína insoluble y proteínas de

membrana. La proteína se expresa de forma abundante (a mayor temperatura, mayor expresión) y se reparte tanto en proteína soluble como proteína insoluble (cuerpos de inclusión).

Por su parte, en las células Rosetta2(DE3)pLysS sólo se observan resultados positivos a 37 °C. El Western-blot revela que a esa temperatura únicamente las calles que albergan las muestras que corresponden a proteína total y *pellet* muestran la presencia de la proteína recombinante HMT-VP4.

Ante estos resultados, BL21(DE3) se seleccionó como cepa de expresión para los posteriores trabajos y como condición, 3 horas a 37 °C.

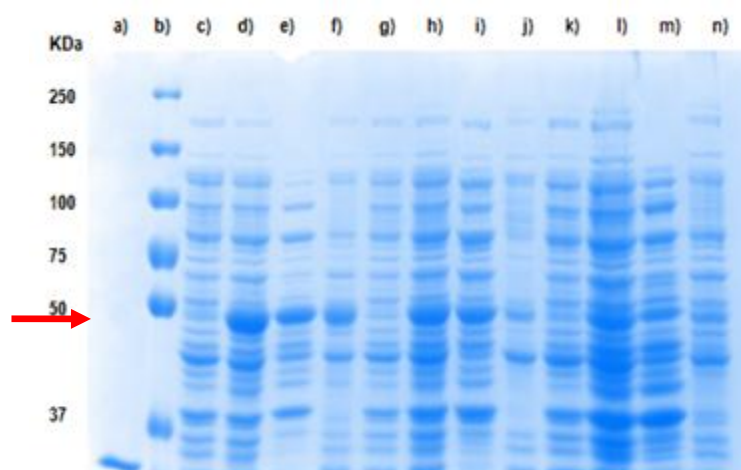


Figura 10. Ensayo de expresión de HMT-VP4 en células BL21(DE3) incubadas a 37 °C, 25 °C y 18 °C. a) control de Histidina, b) *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad). c)-f) ensayo de expresión proteica a 37 °C; c) muestra del medio de cultivo en el momento de la inducción de la expresión (t=0), d) muestra del medio de cultivo tras 3 horas de incubación a 37 °C (t=3), e) proteínas solubles del interior celular (sobrenadante de la centrifugación celular, SN), f) Proteínas insolubles y proteínas de la membrana celular (*pellet* del centrifugado celular). g)-j) ensayo de expresión proteica a 25 °C; g) muestra del medio de cultivo en el momento de la inducción de la expresión (t=0), h) muestra del medio de cultivo celular tras 5 horas de incubación a 25 °C (t=5), i) SN, j) *pellet*. k)-n) ensayo de expresión proteica a 18 °C; k) muestra del medio de cultivo en el momento de la inducción de la expresión (t=0), l) muestra del medio de cultivo celular tras 14 horas de incubación a 18 °C (t=14), m) SN n) *pellet*. Gel de poliacrilamida. SDS-PAGE. Tinción con azul de Coomassie. La flecha señala una banda sobrepresada tras la inducción.

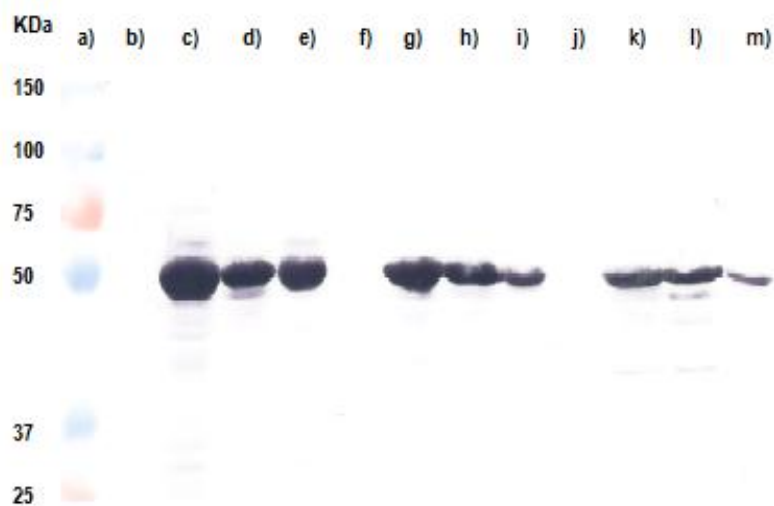


Figura 11. Western-Blot del ensayo de expresión de HMT-VP4 en células BL21(DE3) incubadas a 37°C, 25 °C y 18 °C las cuales son réplicas de la Figura 10. En resumen: a) *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad). b)-e) ensayo de expresión proteica a 37 °C; b) t=0, c) t=3, d) SN, e) *pellet*. f)-i) ensayo de expresión proteica a 25 °C; f) t=0, g) t=5, h) SN, i) *pellet*. j)-m) ensayo de expresión proteica a 18 °C; j) t=0, k) t=14, l) SN m) *pellet*.

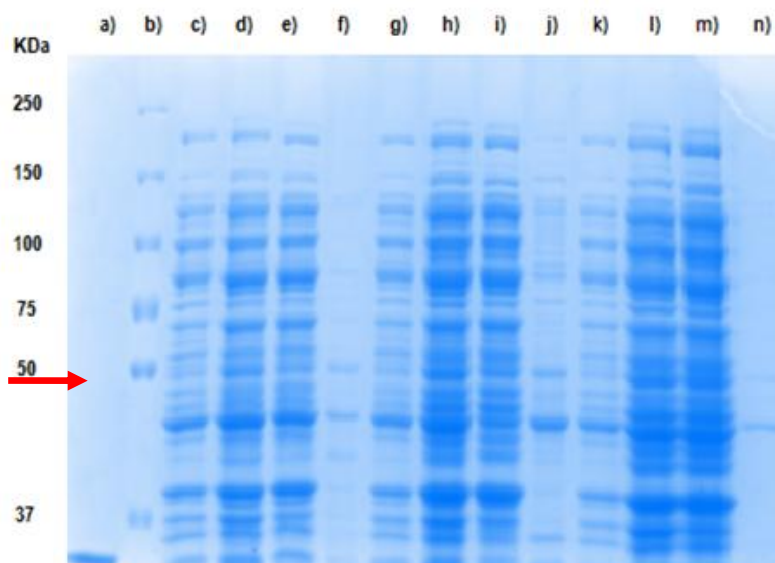


Figura 12. Ensayo de expresión de HMT-VP4 en células Rosetta2(DE3)pLysS incubadas a 37 °C, 25 °C y 18 °C. a) control de Histidina, b) *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad). c)-f) ensayo de expresión proteica a 37 °C; c) muestra del medio de cultivo en el momento de la inducción de la expresión (t=0), d) muestra del medio de cultivo tras 3 horas de incubación a 37 °C (t=3), e) proteínas solubles del interior celular (sobrenadante de la centrifugación celular, SN), f) Proteínas insolubles y proteínas de la membrana celular (*pellet* del centrifugado celular). g)-j) ensayo de expresión proteica a 25 °C; g) muestra del medio de cultivo en el momento de la inducción de la expresión (t=0), h) muestra del medio de cultivo celular tras 5 horas de incubación a 25 °C (t=5), i) SN, j) *pellet*. k)-n) ensayo de expresión proteica a 18 °C; k) muestra del medio de cultivo en el momento de la inducción de la expresión (t=0), l) muestra del medio de cultivo celular tras 14 horas de incubación a 18 °C (t=14), m) SN n) *pellet*. Gel de poliacrilamida. SDS-PAGE. Tinción con azul de Coomassie. La flecha señala una banda claramente sobrepresada tras la inducción.

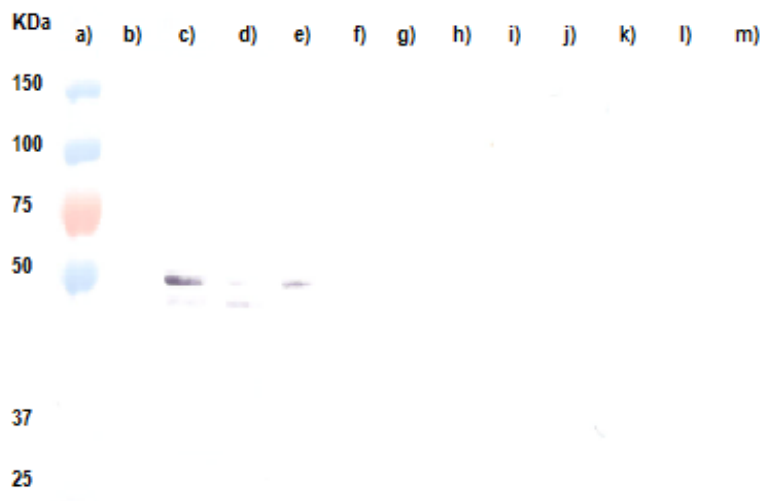


Figura 13. Western-blot del ensayo de expresión de HMT-VP4 en células Rosetta2(DE3)pLysS incubadas a 37 °C, 25 °C y 18 °C las cuales son réplicas de la Figura 12. En resumen: a) Marcador *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad). b)-e) ensayo de expresión proteica a 37 °C; b) t=0, c) t=3, d) SN, e) *pellet / 10*. f)-i) ensayo de expresión proteica a 25 °C; f) t=0, g) t=5, h) SN, i) *pellet / 10*. j)-m) ensayo de expresión proteica a 18 °C; j) t=0, k) t=14, l) SN m) *pellet / 10*.

2.2.6. Purificación de HMT-VP4

Tras cargar el sobrenadante del lisado celular en la columna His-Trap y tras eluir su contenido mediante un gradiente ascendente de *Elution Buffer* desde 0 % hasta el 60% se obtuvo el siguiente cromatograma (**Figura 14**).

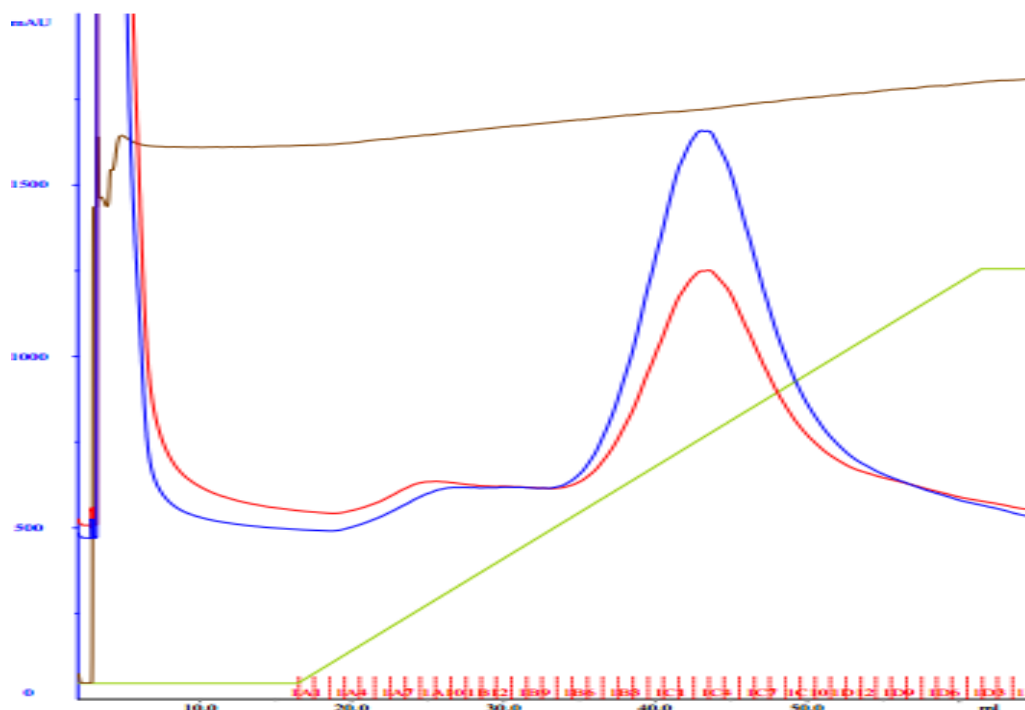


Figura 14. Cromatograma de la elución de HMT-VP4 con un gradiente ascendente de *Elution buffer* de 0-60 %. Línea azul, absorbancia a 280 nm; Línea roja, absorbancia a 260 nm; Línea verde, porcentaje de *Elution buffer* empleado.

En el cromatograma se puede observar que aparece un único pico que comienza a eluir aproximadamente al 35 % de *Elution Buffer*. Las fracciones correspondientes al pico: B5, B3, B1, C2, C4, C6, C8, C10 y C12 se analizaron por SDS-PAGE y Wester-blot. Se analizaron también muestras de las fracciones previas al pico del cromatograma como medida de control: A12 y B9. Además, se añadieron también muestras de la proteína total, una muestra del sobrenadante (SN), obtenido tras la centrifugación durante 30 minutos a 30.000 g realizada tras la ruptura celular en el homogeneizador, y una muestra del *Flow-Through* (FT), muestra de todo el material que no se unió a la resina de la columna His-Trap al cargar la proteína en la columna.

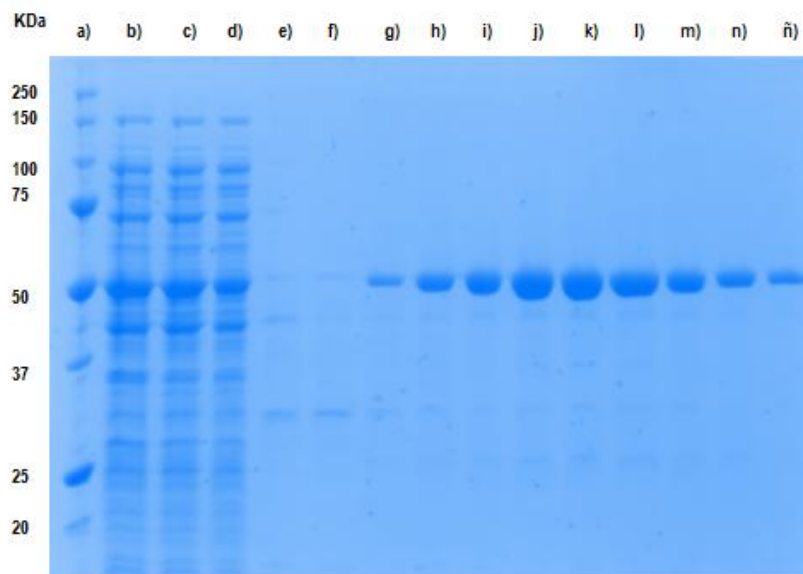


Figura 15. Gel de poliacrilamida que contiene las diferentes fracciones obtenidas de la purificación de HMT-VP4 tras la cromatografía de afinidad. a) Marcador *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad); b) Proteína total c) SN, d) FT, e) A12, f) B9, g) B5, h) B3, i) B1, j) C2, k) C4, l) C6, m) C8, n) C10, ñ) C12. Gel de poliacrilamida al 10%. Tinción Azul de Coomassie.

Como se puede apreciar en el gel (**Figura 15**), todas las bandas excepto las fracciones A12 y B9 muestran la presencia de HMT-VP4. Las calles que contienen fracciones del pico del cromatograma, g)-ñ), contienen casi en exclusiva una única banda gruesa, de unos 50 KDa y sin otras bandas contaminantes. Los Western-blot demostraron que esta banda se trataba de HMT-VP4 (información no disponible). Por lo tanto, aunque hay parte de proteína que se pierde en el FT, no se une a la columna, la purificación consigue una cantidad aceptable de proteína (4 mg aproximadamente por cada litro de cultivo) y de una pureza significativa (aproximadamente 95 %).

2.2.7. Digestión de HMT-VP4 con la proteasa TEV

Una vez purificada, la proteína HMT-VP4 fue sometida a digestión con la proteasa TEV con la intención de liberar VP4. La digestión fue llevada a cabo en distintas condiciones (**Tabla 2**). Con el objetivo de hallar las mejores condiciones tanto para el rendimiento del corte como para el rendimiento de VP4 soluble obtenida. Las muestras de las distintas digestiones fueron analizadas en geles del 10 % de poliacrilamida de Tris-Glicina (**Figura 16** y **Figura 17**), para analizar el porcentaje de corte de HMT-VP4, y en los geles de gradiente 10-20 % de poliacrilamida de

Tris-Tricina (**Figura 18** y **Figura 19**), para analizar la presencia de VP4 (ver Materiales y Métodos). Como se describe en la sección 2.1.8. de Materiales y Métodos, en cada condición se analizaron dos muestras distintas. El producto total del corte (Total) y el producto soluble (SN) tras una centrifugación a 25.000 g durante 1 hora (**Figura 16**, **Figura 17**, **Figura 18** y **Figura 19**).

Mediante los geles de poliacrilamida al 10 % se observa de manera clara el cambio de tamaño que sufre la proteína al desprenderse VP4. En las condiciones en la hay una menor tasa de digestión, en las calles **i)-I)** de la **Figura 16**, se aprecian claramente dos bandas. La superior, situada a una altura correspondiente a 50 KDa, equivale a la proteína HMT-VP4 sin digerir. La inferior en cambio, supera los 40 KDa pero se encuentra bastante por debajo de la barrera de los 50 KDa, lo que indicaría la liberación de un fragmento equivalente a 5 KDa, el peso aproximado de VP4.

Sin embargo, estos geles de poliacrilamida del 10% no permiten la retención de una proteína tan pequeña como VP4. Para ello se han empleado los geles de poliacrilamida del 10-20 %, en estos, **Figura 16** y **Figura 17**, se aprecia una banda por debajo del tamaño de 10 KDa que se repite en todas las calles, salvo en los controles de HMT-VP4 sin digerir. Ambos resultados apuntan a que la digestión de HMT-VP4 con TEV, libera un péptido de unos 5 KDa que muy probablemente se trataría de VP4.

El análisis del porcentaje de proteína cortada y el porcentaje de VP4 soluble se llevó a cabo por densitometría (cálculo de las intensidades relativas de las bandas) y se muestra en la **Tabla 2**. En esta tabla se puede observar que las mejores condiciones para el corte son Tris 50 mM, NaCl 10 mM, DTT 1 mM y EDTA 0,5 mM ajustado pH 7,5 (sexta condición), mientras que en las que se obtiene mayor cantidad de VP4 soluble son Tris 50 mM, NaCl 500 mM, DTT 1 mM y EDTA 0,5 mM ajustado pH 7,5 (séptima condición).

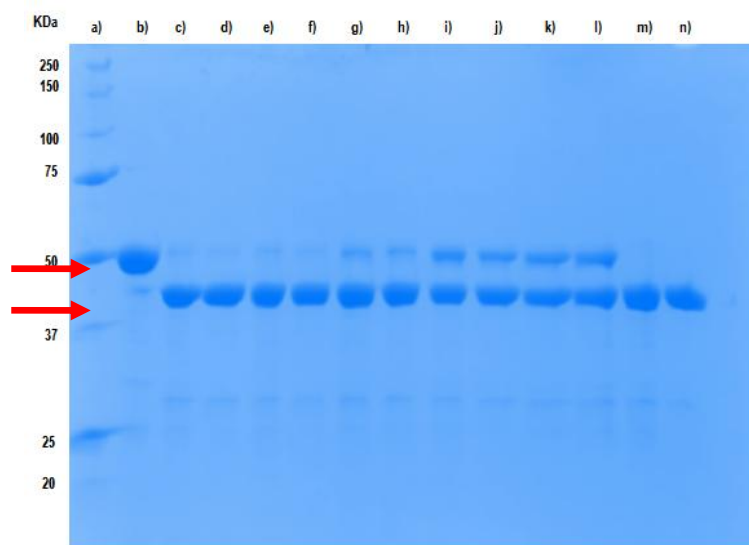


Figura 16. Screening de condiciones para digestión con TEV de HMT-VP4 purificada 1/2. a) Marcador *Precision Plus Protein Standards*, b) Muestra de HMT-VP4 sin digerir; Primera condición de medio (c-d), c) Cond. 1; Total, d) Cond. 1; SN; Segunda condición de medio (e-f), e) Cond. 2; Total, f) Cond. 2; Tercera condición de medio (g-h), g) Cond. 3; Total, h) Cond. 3; SN; Cuarta condición de medio (i-j), i) Cond. 4; Total, j) Cond. 4; SN; Quinta condición de medio (k-l), k) Cond. 5; Total, l) Cond. 5; SN; Sexta condición de medio (m-n), m) Cond. 6; Total, n) Cond. 6; SN. La flecha superior señala las bandas correspondientes a HMT-VP4. La flecha inferior señala las bandas correspondientes a HMT digerida. Gel de poliacrilamida al 10 %. Tinción con Azul de Coomassie.

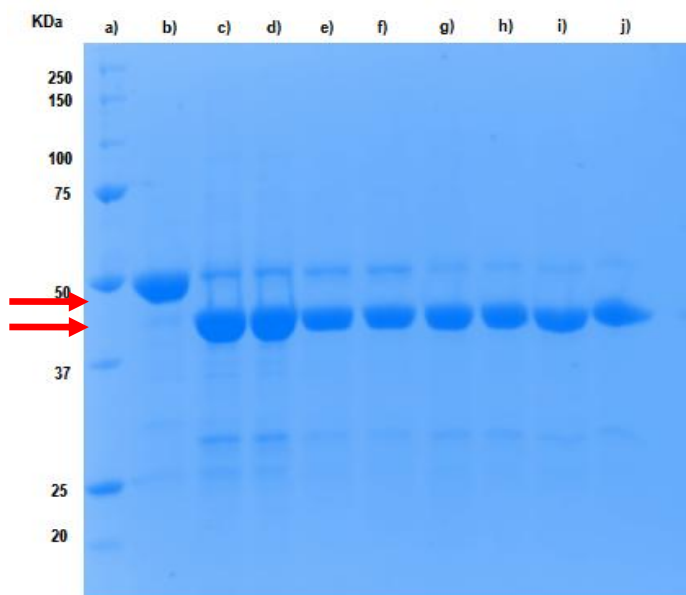


Figura 17. Screening de condiciones para digestión con TEV de HMT-VP4 purificada 2/2. a) Marcador *Precision Plus Protein Standards*, b) Muestra de HMT-VP4 sin digerir; Séptima condición de medio (c-d), c) Cond. 7, Total, d) Cond. 7, SN; Octava condición de medio (e-f), e) Cond. 8, Total, f) Cond. 8, SN; Novena condición de medio (g-h), g) Cond. 9, Total, h) Cond. 9, SN; Décima condición de medio (i-j), i) Cond. 10, Total, j) Cond. 10, SN. La flecha superior señala las bandas correspondientes a HMT-VP4. La flecha inferior señala las bandas correspondientes a HMT digerida. Gel de poliacrilamida al 10 %. Tinción con Azul de Coomassie.

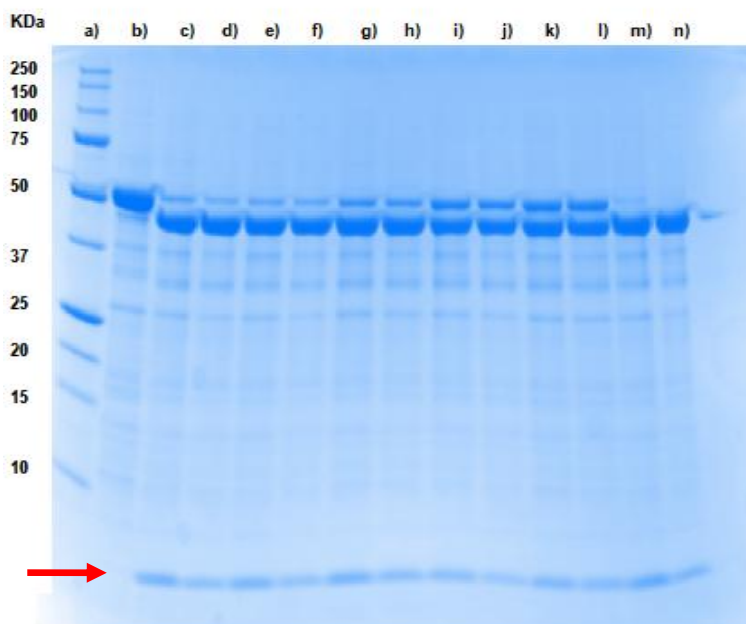


Figura 18. Screening de condiciones para digestión con TEV de HMT-VP4 purificada 1/2. a) Marcador *Precision Plus Protein Standards*, b) Muestra de HMT-VP4 sin digerir; Primera condición de medio (c-d), c) Cond. 1; Total, d) Cond. 1; SN; Segunda condición de medio (e-f), e) Cond. 2; Total, f) Cond. 2; Tercera condición de medio (g-h), g) Cond. 3; Total, h) Cond. 3; SN; Cuarta condición de medio (i-j), i) Cond. 4; Total, j) Cond. 4; SN; Quinta condición de medio (k-l), k) Cond. 5; Total, l) Cond. 5; SN; Sexta condición de medio (m-n), m) Cond. 6; Total, n) Cond. 6; SN. La flecha indica la banda atribuible a VP4 liberada. Gel de poliacrilamida Tris-Tricina *Mini-PROTEAN Tris-Tricine Precast Gels* (Bio-Rad).

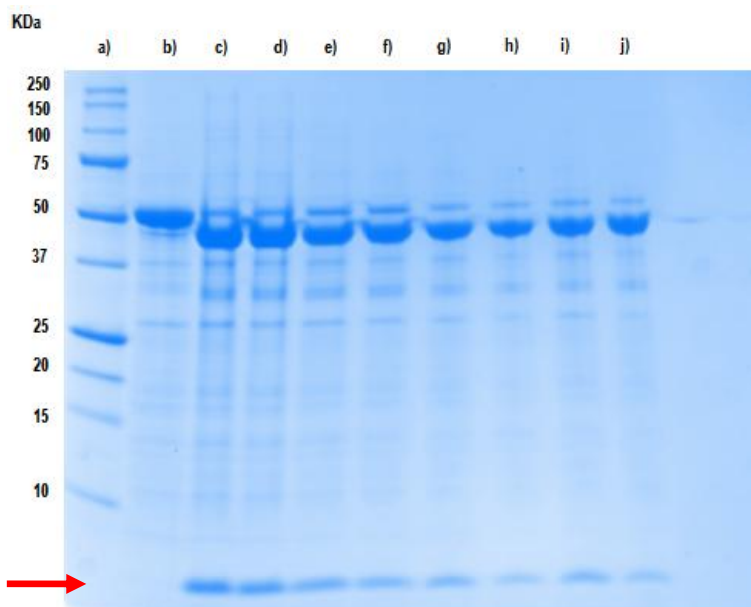


Figura 19. Screening de condiciones para digestión con TEV de HMT-VP4 purificada en geles de Tricina 2/2. a) Marcador *Precision Plus Protein Standards*, b) Muestra de HMT-VP4 sin digerir; Séptima condición de medio (c-d), c) Cond. 7, Total, d) Cond. 7, SN; Octava condición de medio (e-f), e) Cond. 8, Total, f) Cond. 8, SN; Novena condición de medio (g-h), g) Cond. 9, Total, h) Cond. 9, SN; Décima condición de medio (i-j), i) Cond. 10, Total, j) Cond. 10, SN. La flecha indica la banda atribuible a VP4 liberada. Gel de poliacrilamida Tris-Tricina *Mini-PROTEAN Tris-Tricine Precast Gels* (Bio-Rad).

Tabla2: Composición de las diferentes condiciones empleadas en la digestión de HMT-VP4 con la proteasa TEV. También se indican los resultados de la digestión en cada condición como porcentaje de proteína cortada y como porcentaje de VP4 soluble tras el corte.

Condición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)
Tris	50	50	50	50 (citrato)	50	50	50	50	50	50
pH	7,5	7,5	8,5	5,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
NaCl	150	150	150	150	500	10	150	150	150	150
DTT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
EDTA	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Glicerol	-	-	-	-	-	-	20%	-	-	-
Arg	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-
Glu	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-
DDM	-	-	-	-	-	-	-	-	0,75	-
OG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Porcentaje de proteína cortada (%)	94	95	85	67	66	98	86	84	93	95
Porcentaje VP4 soluble tras el corte (%)	65	66	78	66	80	63	81	80	55	52

Los números en rojo reflejan el cambio frente a las concentraciones iniciales. (-) indica ausencia de ese compuesto en la condición determinada.

2.3. DISCUSIÓN

2.3.1. Expresión de VP4-pET28a

El descenso de un 75 % en la absorbancia a 600 nm del cultivo de BL21(DE3) tras 30 minutos desde el momento de la inducción, se debe realmente a un descenso en la turbidez de la muestra. Este hecho se puede interpretar como, un descenso en el número de partículas con el tamaño suficiente para dispersar la luz lo que puede deberse a una ruptura celular generalizada ocurrida después de la adición del IPTG. Por lo tanto, se puede concluir que la expresión de VP4 inducida por el mismo IPTG es la causante de dicha ruptura. Esta capacidad le atribuye a la proteína VP4 de TrV una gran similitud con la familia de las vioporinas [Danthi *et al.*, 2003].

El hecho de que la muerte celular suceda en los primeros 30 minutos, junto a que no se haya podido localizar la presencia de VP4 en esas muestras sugiere que la cantidad de VP4 expresada es mínima. Por un lado esto significaría una proteína muy activa, pero por otro lado, para caracterizar *In vitro* bioquímica y biofísicamente a VP4 se requiere una producción proteica en mayor cantidad y de forma más estable. Debido a esto, se decidió intentar expresar VP4 como proteína de fusión con MBP, separada por un sitio de corte para la proteasa TEV. Además, se le añadió una secuencia de polihistidina para facilitar la purificación. A este constructo se le denominó HMT-VP4.

2.3.2. Expresión de HMT-VP4

El motivo de utilizar diferentes cepas recombinantes en la expresión de la proteína HMT-VP4 fue el de valorar y comparar el rendimiento y los niveles de expresión mostrados por una y otra cepa. Como se puede apreciar en los Western-blots (**Figura 11** y **Figura 13**), existe una gran diferencia en la cantidad de proteína expresada entre ambas cepas, correspondiendo a una expresión mucho mayor en las muestras de BL21(DE3) (**Figura 11**) respecto al Western-blot que contenía las muestras de Rosetta2(DE3)pLysS (**Figura 13**).

Por otro lado, con el objetivo de lograr obtener la mayor cantidad de proteína expresada de forma soluble, se decidió estudiar la expresión a distintas temperaturas.

Como era esperable, la mayor tasa de producción proteica se aprecia a temperatura de 37 °C. Este resultado es coherente con la temperatura óptima de crecimiento de *E. coli*, situándose más próxima a esta temperatura que a la de 25 o 18 °C. Sin embargo, el ratio de proteína soluble respecto de la proteína total no es mayor a 37 °C, sino que mejora cuanto menor es la temperatura en el caso de BL21(DE3). Esto se puede interpretar como que una temperatura menor provoca una expresión proteica más lenta y por tanto un posible mejor plegamiento de la proteína sobrepresada. A pesar de esto, gradualmente la mayor cantidad de proteína soluble se obtiene a 37 °C y por lo tanto esta fue la temperatura seleccionada para trabajar.

Como se puede ver en la sección de Resultados, la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a Ni⁺ inmovilizados, concretamente His-Trap en este caso, es un paso suficiente para obtener una proteína con un nivel de pureza de un 95 % aproximadamente. Por lo tanto se decidió utilizar este único paso de purificación cromatográfica.

2.3.3. Digestión de HMT-VP4 con la proteasa TEV

En la sección de Resultados 2.2.7. se mostraba una tabla con los resultados del porcentaje de proteína cortada y porcentaje de VP4 soluble (**Tabla 2**). Las condiciones en las que más corte se obtenía eran aquellas cuyo pH era neutro y la concentración de sal era menor. Sin embargo, y curiosamente, las condiciones en las que mayor porcentaje de VP4 soluble se obtenía eran las contrarias: pH básicos y altas concentraciones de NaCl. Este comportamiento hacía difícil la selección de una condición concreta para obtener el mejor resultado y podría deberse a que un corte muy rápido provocara una liberación excesivamente rápida de VP4 desencadenando su agregación. Por lo tanto, y a la falta de más estudios, una posible condición para llevar a cabo la digestión podría ser la 7, con glicerol al 20 %, en la que tanto el porcentaje de proteína cortada como el porcentaje de VP4 soluble están por encima del 80 %.

3. CONCLUSIONES

La expresión de VP4 en el interior de la bacteria *E. coli* provocó un descenso de un 75 % de la absorbancia. Este hecho, atribuible a una ruptura celular generalizada, indica la posible función de VP4 como viroporina debido a esa aparente capacidad bactericida [Gonzalez y Carrasco, 2003; OuYang y Chou, 2014].

Sin embargo, para posteriores estudios más detallados de la actividad de esta proteína viral, se tuvo que recurrir a la expresión de VP4 como proteína de fusión junto con MBP. Para ello, se diseñó un plásmido recombinante que codificaba conjuntamente y en este orden para: una etiqueta de Histidinas, la proteína MBP, un punto de corte para la proteasa TEV y la proteína viral VP4. Este plásmido se usó para expresar la proteína denominada HMT-VP4 en las cepas BL21(DE3) y Rosetta2(DE3)pLysS de *E. coli*. Además se determinó que BL21(DE3) era mejor cepa de expresión, en cuanto a cantidad de proteína expresada y que la temperatura de 37 °C, a pesar de que provocaba una disminución del ratio de proteína soluble, era la más adecuada debido a que permitía obtener grandes cantidades de proteína.

La proteína HMT-VP4 se consiguió purificar a niveles del 95 % mediante cromatografía de afinidad, la cual permitió los primeros ensayos de corte con la proteasa TEV sin necesidad de añadir ningún paso adicional de purificación. Las condiciones en las que más corte se obtenía eran aquellas cuyo pH era neutro y la concentración de sal era menor, a diferencia, de las condiciones en las que el porcentaje de VP4 soluble era mayor, pH básicos y altas concentraciones de NaCl. Por lo tanto, ante este comportamiento opuesto, se decidió utilizar una condición (Glicerol 20 %), en la que tanto el porcentaje de proteína cortada como el porcentaje de VP4 soluble estaban por encima del 80 %.

Avances como estos en la obtención de VP4, permitirán en próximos estudios realizar investigaciones sobre el mecanismo empleado por VP4 para provocar la muerte de las células. Fundamentalmente se estudiará si esa acción de VP4 se debe a la desestabilización de la membrana celular mediante distintas pruebas bioquímicas y biofísicas. De esta manera, se conseguirá caracterizar la función de la proteína VP4 y se podrán estudiar tanto sus implicaciones biológicas como su posible aplicabilidad tecnológica como péptido antibacteriano.

4. AGRADECIMIENTOS

Los trabajos aquí descritos fueron realizados en el laboratorio de Cristalografía de Proteínas y Virus de la Unidad de Biofísica (UBF, CSIC, UPV/EHU). Agradezco la colaboración de los integrantes del grupo, al personal técnico y administrativo de la UBF, y en particular la ayuda de movilidad otorgada por la Fundación Biofísica Bizkaia.

5. BIBLIOGRAFÍA

Agarkova, I., Dunigan, D., Gurnon, J., Greiner, T., Barres, J., Thiel, G., Van Etten, J.L. 2008. Chlorovirus-mediated membrane depolarization of *Chlorella* alters secondary active transport of solutes. *J. Virol.* 82: 12181–12190.

Agirre, A., Barco, A., Carrasco, L., Nieva, J.L. 2002. Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein. *J. Biol. Chem.* 277(43):40434-41.

Agirre, A., Lorizate, M., Nir, S., Nieva, J.L. 2008. Poliovirus 2b insertion into lipid monolayers and pore formation in vesicles modulated by anionic phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778(11):2621-6.

Agirre, J., Aloria, K., Arizmendi, J.M., Iloro, I., Elortza, F., Sánchez-Eugenia, R., Marti, G.A., Neumann, E., Rey, F.A., Guérin, D.M. 2011. Capsid protein identification and analysis of mature *Triatoma* virus (TrV) virions and naturally occurring empty particles. *Virology.* 409: 91-101.

Agirre, J., Goret, G., LeGoff, M., Sánchez-Eugenia, R., Marti, G.A., Navaza, J., Guérin, D.M., Neumann, E. 2013. Cryo-electron microscopy reconstructions of triatoma virus particles: a clue to unravel genome delivery and capsid disassembly. *J Gen Virol.* 94(Pt 5):1058-68.

Antoine, A.F., Montpellier, C., Cailliau, K., Browaeys-Poly, E., Vilain, J.P., Dubuisson, J. 2008. The alphavirus 6K protein activates endogenous ionic conductances when expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Membr. Biol.* 215(1):37-48.

Brabec, M., Schober, D., Wagner, E., Bayer, N., Murphy, R.F., Blaas, D., Fuchs, R. 2005. Opening of size-selective pores in endosomes during human rhinovirus serotype 2 in vivo uncoating monitored by single-organelle flow analysis. *J Virol.* 79(2):1008-16.

Breukink, E., and de Kruijff, B. 1999. The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 223–234.

Brogden, K.A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238–250.

- Carrasco, L. 1994. Entry of animal viruses and macromolecules into cells. *FEBS Letters* 350: 151-154.
- Cross, T.A., Dong, H., Sharma, M., Busath, D.D., Zhou, H.X. 2012. M2 protein from influenza A: from multiple structures to biophysical and functional insights, *Curr. Opin. Virol.* 2: 128–133.
- Czibener, C., La Torre, J.L., Muscio, O.A., Ugalde, R.A., Scodeller, E.A. 2000. Nucleotide sequence analysis of Triatoma virus shows that it is a member of a novel group of insect RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 81(Pt 4):1149-54.
- Danthi, P., Tosteson, M., Li Q.H., Chow, M. 2003. Genome delivery and ion channel properties are altered in VP4 mutants of poliovirus. *J. Virol.* 77: 5266-74.
- Ehrenstein, G., and Lecar, H. 1977. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* 10: 1–34.
- Estrozi, L.F., Neumann, E., Squires, G., Rozas-Dennis, G., Costabel, M., Rey, F.A., Guérin, D.M., Navaza, J. 2008. Phasing of the Triatoma virus diffraction data using a cryo-electron microscopy reconstruction. *Virology.* 375(1):85-93.
- Fernández-Puentes, C., Carrasco, L. 1980. Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins. *Cell.* 20(3):769-75.
- Firth, A.E., Chung, B.Y., Fleeton, M.N., Atkins, J.F. 2008. Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Virol. J.* 5:108.
- Friedrich, C. L., Moyles, D., Beveridge, T. J., Hancock, R. E. 2000. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2086–2092.
- Gascon, J., Bern, C., Pinazo, M.J. 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 115(1-2):22-7.
- Gennaro, R., and Zanetti, M. 2000. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55: 31–49.
- Gonzalez, M.E., Carrasco, L. 2003. Viroporins. *FEBS Lett.* 552: 28-34.
- Grice, A.L., Kerr, I.D., Sansom, M.S. 1997. Ion channels formed by HIV-1 Vpu: a modelling and simulation study. *FEBS Lett.* 405(3):299-304.

Griffin, S.D., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P., Rowlands, D.J. 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, amantadine, *FEBS Lett.* 535: 34–38.

Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L.D., Silva-Pereira, I., Kyaw, C.M. 2013. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front. Microbiol.* 9;4:353.

Harris, F., Dennison, S. R., and Phoenix, D. A. 2009. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* 10: 585–606.

Helenius, A. 1992. Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* 69: 577–578.

Jones, C.T., Murray, C.L., Eastman, D.K., Tassello, J., Rice, C.M. 2007. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J. Virol.* 81: 8374–8383.

Lohner, K. 2009. New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *Gen. Physiol. Biophys.* 28: 105–116.

Madan, V., Castelló, A., Carrasco, L. 2008. Viroporins from RNA viruses induce caspase-dependent apoptosis. *Cell. Microbiol.*, 10: 437–451.

Marassi, F.M., Ma, C., Gratkowski, H., Straus, S.K., Strebel, K., Oblatt-Montal, M., Montal, M., Opella, S.J., 1999. Correlation of the structural and functional domains in the membrane protein Vpu from HIV-1, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 14336–14341.

Martín-Belmonte, F., López-Guerrero, J.A., Carrasco, L., Alonso, M.A. 2000. The amino-terminal nine amino acid sequence of poliovirus capsid VP4 protein is sufficient to confer N-myristoylation and targeting to detergent-insoluble membranes. *Biochemistry.* 39: 1083-90.

Martin, K., Helenius, A. 1991. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J. Virol.* 65(1):232-44.

McCarthy, J.E. 2000. Translation initiation: insect virus RNAs rewrite the rule book. *Curr Biol.* 10(19):R715-7.

- Mehra, T., Koberle, M., Braunsdorf, C., Mailander-Sanchez, D., Borelli, C., Schaller, M. 2012. Alternative approaches to antifungal therapies. *Exp. Dermatol.* 21: 778–782.
- Melo, M.N., Ferre, R., Castanho, M.A. 2009. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(3):245-50.
- Melton, J.V., Ewart, G.D., Weir, R.C., Board, P.G., Lee, E., Gage, P.W. 2002. Alphavirus 6K proteins form ion channels. *J. Biol. Chem.* 277(49):46923-31.
- Muscio, O.A., La Torre, J.L., Scodeller, E.A. 1988. Characterization of Triatoma virus, a picorna-like virus isolated from the triatomine bug *Triatoma infestans*. *J. Gen. Virol.* 69(Pt 11):2929-34.
- Nieva, J.L., Madan, V., Carrasco, L. 2012. Viroporins: structure and biological functions. *Nat. Rev. Microbiol.* 10(8):563-74.
- Oren, Z., and Shai, Y. 1998. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47: 451–463.
- OuYang, B., Chou, J.J. 2014. The minimalist architectures of viroporins and their therapeutic implications. *Biochim. Biophys. Acta.* 1838: 1058-67.
- Pavlovic, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B., Zitzmann, N. 2003. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 6104–6108.
- Pielak, R.M., Chou, J.J. 2011. Influenza M2 proton channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1808:522–529.
- Pinto, L.H., Dieckmann, G.R., Gandhi, C.S., Papworth, C.G., Braman, J., Shaughnessy, M.A., Lear, J.D., Lamb, R.A., DeGrado, W.F. 1997. A functionally defined model for the M2 proton channel of influenza A virus suggests a mechanism for its ion selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94(21):11301-6.
- Rassi, A. Jr., Rassi, A., Marin-Neto, J.A. 2010. Chagas disease. *Lancet.* 375(9723): 1388-402.

Romer, W., Lam, Y.H., Fischer, D., Watts, A., Fischer, W.B., Goring, P., Wehrspohn, R.B., Gosele, U., Steinem, C. 2004. Channel activity of a viral transmembrane peptide in micro-BLMs: Vpu(1–32) from HIV-1. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 16267–16274

Rozas-Dennis, G.S., Squires, G., Pous, J., Costabel, M.D., Lepault, J., Navaza, J., Rey F.A., Guérin D.M. 2004. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of Triatoma virus (TrV) from Triatoma infestans. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60: 1647-50.

Sanz, M.A., Pérez, L., Carrasco, L. 1994. Semliki Forest virus 6K protein modifies membrane permeability after inducible expression in Escherichia coli cells. *J. Biol. Chem.* 269(16):12106-10.

Schubert, U., Ferrer-Montiel, A.V., Oblatt-Montal, M., Henklein, P., Strebel, K., Montal, M. 1994. Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Lett.* 398: 12–18.

Squires, G., Pous, J., Agirre, J., Rozas-Dennis, G.S., Costabel, M.D., Marti, G.A., Navaza, J., Bressanelli, S., Guérin, D.M., Rey, F.A. 2013. Structure of the Triatoma virus capsid. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69: 1026-37.

Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A.H., Bartenschlager, R., Pietschmann, T. 2007. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog.* 3(7):e103.

Tate, J., Liljas, L., Scotti, P., Christian, P., Lin, T., Johnson, J.E. 1999. The crystal structure of cricket paralysis virus: the first view of a new virus family. *Nat. Struct. Biol.* 6(8):765-74.

Tuthill, T.J., Bubeck, D., Rowlands, D.J., Hogle, J.M. 2006. Characterization of early steps in the poliovirus infection process: receptor-decorated liposomes induce conversion of the virus to membrane-anchored entry-intermediate particles. *J. Virol.* 80(1):172-80.

Vizioli, J., and Salzet, M. 2002. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 494–496.

Wang, J., Qiu, J.X., Soto, C., DeGrado, W.F. 2011. Structural and dynamic mechanisms for the function and inhibition of the M2 proton channel from influenza A virus. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21; 68–80.

Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. 2001. Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophysical Journal.* 81: 1475–148.