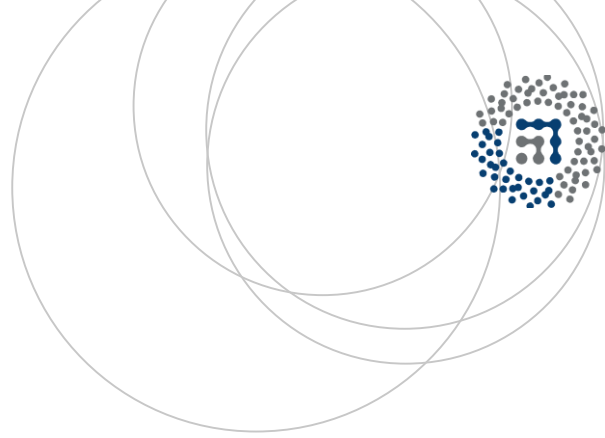


eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana  
Bioteknologiako Gradua

# Pestivirus-en p7 biroporinaren adierazpena eta purifikazioa bakterioetan

Egilea:

Johana Torralba Iturbe

Zuzendaria:

Jose Luis Nieva Escandon

Zuzendarikidea:

Eneko Largo Pereda

<b>1. SARRERA ETA HELBURUAK</b> .....	1
<b>1.1 FLAVIVIRUSAK</b> .....	1
<b>1.2 BIROPORINAK</b> .....	2
<b>1.2.1. Garrantzia patogenikoa duten biroporinak</b> .....	4
1.2.1.1. Influenza birusaren M2 biroporina .....	4
1.2.1.2. GIB-I birusaren Vpu biroporina .....	4
1.2.1.3. HCV birusaren p7 biroporina .....	5
<b>1.3 CSFV BIRUSAREN p7 BIROPORINA</b> .....	5
<b>1.4. HELBURUAK</b> .....	7
<b>2. GARAPENA</b> .....	7
<b>2.1 MATERIALAK ETA METODOAK</b> .....	7
<b>2.1.1 Materialak</b> .....	7
<b>2.1.2 GST-p7 fusio-proteinaren eraikuntza</b> .....	8
2.1.2.1 PCR bidezko anplifikazioa .....	8
2.1.2.2. PCR produktuaren eta bektorearen digestioa .....	9
2.1.1.3. Ligazioa.....	10
2.1.1.4. Transformazioa .....	11
<b>2.1.3. GST-6His-p7 fusio-proteinaren eraikuntza</b> .....	12
<b>2.1.4. Adierazpena</b> .....	12
<b>2.1.5. Purifikazioa</b> .....	13
2.1.5.1. Frakzionamendua.....	13
2.1.5.2. GSTan oinarritutako afinitate kromatografia .....	13
2.1.5.3. Detergenteak erabiliz proteina disolbagarri bihurtu .....	14
2.1.5.4. Western Plapaketa .....	14
<b>2.2. EMAITZAK</b> .....	15
<b>2.2.1. GST- p7 fusio-proteinaren klonazioa</b> .....	15
<b>2.2.2. GST-6His-p7 fusio-proteinaren klonazioa</b> .....	16
<b>2.2.3. Adierazpena</b> .....	17
2.2.3.1. GST-p7 fusio-proteinaren adierazpena.....	17
2.2.3.2. GST-6His-p7 fusio-proteinaren adierazpena .....	18
<b>2.2.4. Purifikazioa</b> .....	18
2.2.4.1. GST-p7 fusio-proteinaren purifikazioa .....	18
2.2.4.2. GST-6His-p7 fusio proteinaren purifikazioa .....	19
2.2.4.3. Purifikazioarako aukera desberdinak .....	20
<b>2.2.5. Oligomerizazio egoeraren azterketa</b> .....	21
<b>2.3. EZTABAIDA</b> .....	22
<b>3. ONDORIOAK</b> .....	23
<b>4. BIBLIOGRAFIA</b> .....	24

# 1. SARRERA ETA HELBURUAK

## 1.1 FLAVIVIRUSAK

*Flaviviridae* familia, kate bakuneko RNA genoma duten birusek osatzen dute eta hiru generotan klasifika daitezke: Hepacivirus, Flavivirus eta Pestivirus (Becher, Avalos Ramirez et al. 2003). Birus hauek animalia zein gizakientzako patogenoak izan daitezkeenez eta ondorioz, osasun eta abeltzaintza arloetan garrantzia handia dutenez, hauen inguruko ikerketak areagotu egin dira azken urte hauetan.

Hepatitis C birusa (Ingelesetik Hepatitis C Virus, HCV), Hepacivirus generokoa da eta gizakion patogeno garrantzitsua da. Hain zuzen, gibeledu hainbat gaixotasun eragiten ditu; hala nola, zirrosia, hepatitis kronikoa eta kartzinoma hepatozelularra (Choo, Kuo et al. 1992). Izan ere, gibeledu hepatozitoetan erreplikatzeko da gaixotasuna eraginez. Oso mutazio tasa altua du eta uste da gaur egun 170 milioi pertsona inguru daudela infektatuta, urteko 3-4 milioi kutsadura berri ematen direlarik.

Txerri izurri klasikoa oso kutsagarria eta askotan hilkorra den gaixotasuna da. Gaixotasun hau eragiten duen birusa, txerri izurri klasikoaren birusa (Ingelesetik Classical Swine Fever Virus, CSFV) da eta behien beherako birusarekin (Ingelesetik Bovine Virus Diarrhea, BVDV) batera, Pestivirus generokoa da (Becher, Avalos Ramirez et al. 2003). Ekonomikoki garrantzia handia duten animalia patogenoak dira hauek, izan ere, abereetan hilkortasun tasa altuak eragiten baitituzte.

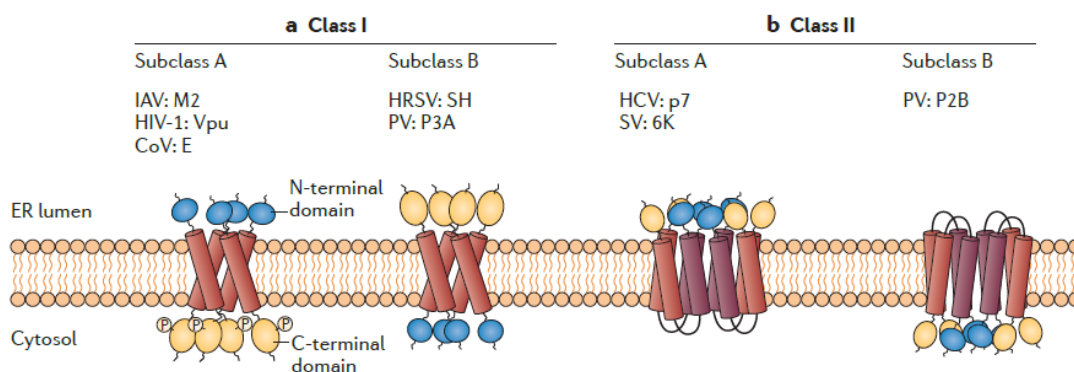
Hepacivirus eta Pestivirus generoen artean antzekotasun handia dago, bai genomaren egituran zein erreplikazio mekanismoetan. Antzekotasun hau ez da ematen aldiz, Flavivirus generoko birusekin.

Hepacivirus zein Pestivirus generoko birusek euren RNA poliproteina aitzindari bakar batera itzultzen dute; jarraian, birus beraren zein ostalariaren proteasa espezifikoek aitzindari honen prozesamendu proteolitikoa burutuko dute, era honetan, birusaren infekzioa aurrera eraman ahal izateko proteina estruktural eta ez estrukturalak lortuz.

## 1.2 BIROPORINAK

Zenbait birusek eragiten dituzten infekzioetan azertu den ezaugarri bereizgarri bat ostalariaren zelulen mintzen iragazkortasunaren emendapena da (Gonzalez and Carrasco 2003). Aldaketa honen eragileak bioporinak izan daitezke, beste birusen gene produktu batzuen artean.

Bioporinak birusen bizi zikloan duten eginkizun garrantzitsuagatik oso ikertuak izaten ari diren mintz-proteinak dira. Hain zuzen, birusari zelula ostalarira sarrera eta irteera baimentzen dioten proteinak dira, genomaren erreplikazioan parte hartuz batez ere. Gainera, geroz eta ebidentzia gehiago daude zenbait bioporinak zelula ostalariaren proteinekin eraginkortasun altuaz elkar eragiten dutela baieztatzen dutenak (Fischer, Li et al. 2014).



**1 Irudia.** Bioporinen sailkapen estrukturala mintza zeharkatzen duten domeinuen arabera. Talde bakoitzean bioporina ezagunak agertzen dira. (Irudia Nieva, Madan et al. 2012-tik egokitu da).

Bioporinak proteina txiki (50-120 aminoazido artekoak), oso hidrofobiko eta dinamikoak dira, oligomerizatzeko gaitasuna daukatenak. Zelula ostalariaren mintzean txertatu eta honek dituen hainbat funtzio fisiologiko (mintzaren iragazkortasuna eta besikulen bidezko sistema adibidez) oztopatzen dituzten poro hidrofobikoak eratzeko gaitasuna daukate. Orokorrean, proteina integralak dira eta gutxienez,  $\alpha$ -helize anfitipiko bat izaten dute, askotan, bigarren domeinu hidrofobiko bat ere azalduz. Azken urteotan aurrerapen handiak egin dira bioporinen estrukturaren azterketan, horrela, proteina hauek bi taldetan sailkatuz: mintza zeharkatzen duen domeinu bakarra dutenak (I taldea) eta bi dituztenak (II taldea). Sailkapen hau **1 Irudian** ikus

daiteke. Talde hauek azpitaldeetan banatu daitezke mintzean duten topologiaren arabera. Alde batetik, IA taldeko bioporinek amino muturra erretikulu endoplasmaticoaren (EE) lumenean aurkeztuko dute, karboxilo muturra aldiz, zitosolean. Bestetik, IB taldeko bioporinek EEaren lumenean karboxilo muturra dute eta amino muturra zitosolean. IIA taldekoak amino eta karboxilo muturrak EEaren lumenari begira dituzte; IIB taldekoek ordea, kontrako orientazioa dute, amino eta karboxilo muturrak zitosol aldean dituztelarik (Nieva, Madan et al. 2012).

Proteina hauen funtzio nagusia infekzioaren amaieran partikula biralen kanporaketa erraztea da eta horretarako, oligomerizazio maila desberdinak izan ditzaketen poroak eratuko dituzte. Poroaren estruktura bioporinaren araberakoa da, beraz, ondoriozta daiteke bioporina bakoitzak proteina zelular edo biriko espezifikoekin elkar eragin dezakeela (Gonzalez and Carrasco 2003). Bioporinak birusen erreplikaziorako ezinbestekoak ez diren arren, birioien heltze prozesuan eta infekzioaren azkeneko urratsetan zeregin garrantzitsua dute. Hain zuzen, infektatutako zeluletan proteina hauen adierazpenaren ondorioz, ostalariaren mintzaren ioiekiko eta pisu molekular baxua duten molekulekiko iragazkortasunaren emendioa ematen da (Gonzalez and Carrasco 2003). Birusak eragiten duen infekzioan zehar, bioporinen metaketa ematen da eta ondorioz, zelulen lisia eta ondorengo birus partikulen askapena gertatzen da. Gainera, zenbait bioporinak kaspasen menpeko zelulen apoptosia eragiteko gai direla frogatu da (Madan, Castello et al. 2008).

Bioporinek beste eragin garrantzitsu bat dute zelula ostalariaren: hain zuzen, aske dagoen kaltzio intrazelularren kontzentrazioaren emendioa eragitea. Katioi hau, proteinek sortutako poroetatik sartu daiteke zitoplasmara edo mitokondrio, EE eta Golgi aparatutik askatu. Kaltzioak eragin negatiboak izango ditu zelula ostalariaren, izan ere, prozesu eta entzima askoren erregulatuzailea da. Hori dela eta, funtzio zelular ugari alda ditzake, ondorioz, zelula ostalariaren heriotzean funtzio garrantzitsua izanik (Hyser, Collinson-Pautz et al. 2010).

Bioporinen adierazpena bakterioetan, legamietan zein ugaztun zeluletan bideratu daiteke euren funtzioa ikertzeko helburuarekin. Bioporinen adierazpenak mintz zelularren iragazkortasuna emendatzen duela behatu da (Lama and Carrasco 1992).

Bioporina purifikatuak bestalde, bigeruz lipidiko laueta eta liposometan ioi kanalak eratzeko ahalmena dutela ikusia izan da ere (Fischer and Hsu 2011).

Interes klinikoa duten birus askok bioporinak kodetzen dituzte, besteak beste: Giza Immunoeskasiaren Birusak (Ingelesetik Human Immunodeficiency Virus, HIV) Vpu proteina kodetzen du, HCV birusak p7 proteina eta A gripea eragiten duen birusak (Ingelesetik Influenza A virus) M2 proteina (Nieva, Madan et al. 2012). Birusen bizi zikloan duten garrantzia altuagatik, terapiak garatzeko itu proteina egokiak bilakatu dira. Are gehiago, proteina hauek zelula ostalariaren mintzean poroak eratzeko daukaten gaitasuna eragozten duten zenbait konposatu deskribatu dira birusen bizi zikloa eteteko helburuarekin, ondorioz, antibiralak sortzeko erabili izan direnak (Wang, Qiu et al. 2011). Bukatzeko, bioporina akastuna daramaten birusak txerto indargabetu moduan erabiltzearen inguruko hainbat ikerketa deskribatu dira ere (Watanabe, Watanabe et al. 2009).

### **1.2.1. Garrantzia patogenikoa duten bioporinak**

#### 1.2.1.1. Influenza birusaren M2 bioporina

Influenza birusa arnas gaixotasun akutuen eragilea da. Hori dela eta, gizakion sufrimendua eragiteaz gain, galera ekonomiko garrantzitsuak sortzen ditu.

M2 bioporina 97 aminoazido dituen mintzeko proteina integrala da. 3 domeinutan banatuta dago eta bakoitzak funtzio desberdinak betetzen ditu. Amino muturreko domeinua birioiaren sarrera eman ahal izateko garrantzitsua da. Mintza zeharkatzen duen domeinua protoien kanala sortzeko eta tetrameroen eraketarako da garrantzitsua. Hirugarren domeinua, buztan zitosolikoa, garrantzitsua da birioien mihiztaketan eta hauen askapena emateko prozesuan (Wang, Li et al. 2015).

M2a beraz, ezinbestekoa izango da birioien eraketa eta askapen egokia emateko, batez ere, poro tetramerikoak eratzeko gaitasuna duelako. Oso bioporina ikasia da eta gripea ekiditeko txerto askotan izaten da itu proteina.

#### 1.2.1.2. HIV-I birusaren Vpu bioporina

HIV birusak HIESa (Hartutako Immuno Eskasiaren Sindromea) sortzen du, mundu osoan 35 milioi pertsoneri eragiten dien gaixotasuna.

Vpu bioporina mintzeko proteina integrala da eta hiru domeinutan banaturik dago: amino terminaleko domeinua, mintza zeharkatzen duen domeinua eta domeinu zitosolikoa. Azkeneko domeinu honek, bi  $\alpha$ -helize ditu begizta batez banatuak (Ruiz, Guatelli et al. 2010).

Bioporina honek birioien sintesian laguntzen du, baita hauen askapenean zelula ostalaritik: hain zuzen ere, partikula birikoen askapena hobetu egiten du ostalariaren faktoreekin elkar eraginez eta poroak sortuz (Fischer, Li et al. 2014). Vpu-aren estruktura oligomeriko funtzionala ezezaguna da gaur egun, baina ikerketa desberdinek aditzera ematen dute tretameroetatik heptameroetara doazen oligomeroak eratzen dituela, ugarienak pentameroak izanik (Li, Hsu et al. 2013).

### 1.2.1.3. HCV birusaren p7 bioporina

HCVren p7 proteina infekzio birikoa eragiteko beharrezkoa den proteina txiki eta hidrofobikoa da, poliproteina aitzindarian eskualde estruktural eta ez-estrukturalen artean kokaturik dagoena (Selby, Glazer et al. 1994). *In-vivo* frogatua izan da mintzean hexameroak eratzeko gaitasuna duela (Griffin, Beales et al. 2003).

p7 bioporinak 67 aminoazido ditu eta mintza zeharkatzen duten bi  $\alpha$ -helizez eraturik dago, zitosolean kokaturik dagoen begizta batez elkarturik daudenak (Brohm, Steinmann et al. 2009).

## 1.3 CSFV BIRUSAREN p7 BIROPORINA

CSFV birusak, HCV birusaren p7 bioporinaren analogoa den p7 proteina kodetzen du. Beraz, modelo egokia izan daiteke HCV bioporinarentzat. Hori dela eta, HCVren aurkako antibiralak sintetizatzeke erabilgarria izan daiteke CSFV p7 proteina (Luscombe, Huang et al. 2010).

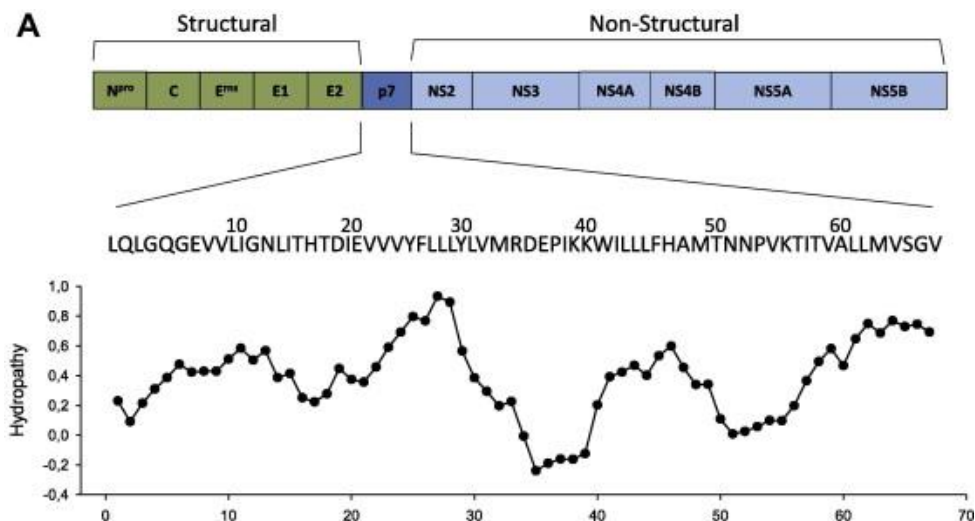
CSFV birusaren genomak 12,3 kb ditu eta 3898 aminoazido dituen aitzindari poliproteiko bakar batera itzultzen du RNA zuzenean. Honetatik, birusaren eta zelula ostalariaren proteasen prozesamenduen ondorioz, 12 produktu lortzen dira (Gladue, Holinka et al. 2012). Horien artean, p7 bioporina dago, zelula ostalariaren Top peptidasaren prozesamenduaren bitartez lortzen dena.

p7 60-70 aminoazido inguru eta 6-7 kDa-eko pisu molekularra duen proteina txiki hidrofobikoa da, mintzarekin asoziatu dagoen proteina integrala alegia (Harada, Tautz et al. 2000). Bere estrukturari dagokionez, mintza zeharkatzen duten bi eskualde hidrofobiko ditu: lehenengoa, 1-32 aminoazidoek osatzen dute eta bigarrena, 41-67 aminoazidoek. Eskualde hauen artean, 7 aminoazido polar (33-40) daude, birusaren eraketarako, baina ez RNAREN erreplikaziorako ezinbestekoak direnak (Largo, Gladue et al. 2014). Estructura honi esker, proteina honek mintza zeharkatzen duen urkila bat eratzeko gaitasuna du. Hau da, bi eskualde hidrofobikoek mintza zeharkatuko duten helizeak eratzen dituzte, aminoazido polarrek aldiz, zitosoleko begizta eratuz (Gladue, Holinka et al. 2012).

p7 proteinak oso funtzio garrantzitsua du birusaren bizi zikloan, bere patogenotasunean lagunduz. Izan ere, poroak eratuz ostalariaren mintza iragazkorra bihurtzeko gaitasuna duen proteina da, baita, birusaren erreplikazioan ezinbestekoa dena. Poroek mintza zeharkatzen duten egitura helikoidala daukate, hain zuzen, aminoazido polarren bitartez banatuta dauden bi helizeez. Lipido monogeruzetan egindako entsegu baten arabera poroak eratzeko gaitasuna duen eskualdea C-terminal eskualde hidrofobikoa (39-67 aminoazidoak) dela iradokitzen da, amino terminaleko aminoazido batzuk prozesua erregulatzen dutelarik (Largo, Gladue et al. 2014).

p7 bioporinak ostalariaren mintz plasmatikoko poroak eratzeaz gain, EE eta golgi aparatuan ere eratu ditzake. Prozesu hau, pHaren mendekoa izango da; hain zuzen, pHa jaitsi ahala, golgi aparatuen iragazkortasuna emendatu egiten da (Largo, Gladue et al. 2014).





**2 Irudia.** CSFV p7ren sekuentzia eta mintzean hartzen duen 2 dimentsiotako estruktura. (A) p7ren aminoazido sekuentzia eta hidrofobizitate banaketa. Bi eskualde hidrofobiko ditu, horien artean aminoazido polarrak dituelarik. (Irudia Largo, Gladue et al. 2014-tik egokitu da)

## 1.4. HELBURUAK

Lan honen helburua CSFV birusaren p7 biroporina bakterioetan klonatzea, adieraztea eta purifikatzea da. Behin proteina purifikatuta, mintzean duen oligomerizazio egoera aztertuko da zer nolako poroak eratzen dituen jakiteko.

## 2. GARAPENA

### 2.1 MATERIALAK ETA METODOAK

#### 2.1.1 Materialak

Fast Digest<sup>TM</sup> errestrikzio entzimak Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, AEB) enpresan erosi dira.

Hurrengo detergenteak Affimetrix Inc (Kalifornia, AEB) enpresan erosi dira: n-octyl- $\beta$ -D-glucoside (OG), n-decyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DM), n-undecyl- $\beta$ -d-maltoside (UDM), n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM), lauryldimethyl amine oxide (LDAO) eta CYMAL-7. Triton X-100 eta SDS detergenteak Sigma (AEB) enpresan erosi dira. CHAPS detergentea BioVision, Inc. (Kalifornia, AEB) enpresan erosi da.

## 2.1.2 GST-p7 fusio-proteinaren eraikuntza

### 2.1.2.1 PCR bidezko amplifikazioa

Lehenik eta behin, CSFV birusaren p7 bioporinaren gene sintetikoa Epoch Life Science Inc. (Texas, AEB) enpresara eskatu da eta pBSK plasmidoan integratua lortu da. DNA sekuentzia Codon Usage Database ([www.kazusa.or.jp/codon](http://www.kazusa.or.jp/codon)) bidez optimizatu da:

CTGCAGCTGGGTCAGGGTGAAGTTGTTCTGATCGGTAACCTGATCACCCA  
CACCGACATCGAAGTTGTTGTTTACTTCCTGCTGCTGTACCTGGTTATGCG  
TGACGAACCGATCAAAAATGGATTCTGCTGCTGTTCCACGCGATGACCA  
ACAACCCGGTTAAAACCATCACCGTTGCGCTGCTGATGGTTTCTGGTGTT

Sekuentzia lortzeko eta interesatzen zaizkigun errestrikzio guneak txertatzeko, PCR (*Polimerase Chain Reaction*) teknika erabili da hurrengo hasleen bitartez (Sigma, AEB):

*Forward (F):* 5'CCCTGGGATCCCCGGAATTCCTGCAG 3'

*Reverse (R):* 5'GCGGCCGCTCGAGTTAACACCAGAAAC 3'

F haslean letra lodiz dagoen sekuentzia BamHI errestrikzio entzimari dagokio eta azpimarratuta dagoena EcoRI-i. R haslean letra lodiz dagoen sekuentzia XhoI errestrikzio entzimari dagokio eta azpimarratutakoa amaiera kodoia da.

PCRa **1 taula**-ko erreakzio nahastearekin (**A**) eta protokoloarekin (**B**) burutu da. Lorturiko produktuekin elektroforesia egin da % 1,3ko agarosazko gel batean. Jarraian, bandak moztu eta purifikatu egin dira GeneJET Plasmid Miniprep kit-a (Thermo Fisher Scientific Inc. Massachusetts, AEB) erabiliz.

1 Taula. (A) PCR bidezko amplifikazioa burutzeko erabili den nahasketa. (B) PCR bidezko amplifikazioan erabilitako protokoloa

**A**

F haslea (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
R haslea (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
DNA	1 $\mu$ L
Pfu turbo Agilent polimerasa	1 $\mu$ L
Pfu reaction disolbatzaile indargetzailea (10x)	5 $\mu$ L
dNTPak	2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	37 $\mu$ L

**B**

Temperatura (°C)	Denbora (min)	Zikloak
95	5	1
95	1	30
55	1	
72	1	
72	5	1

#### 2.1.2.2. PCR produktuaren eta bektorearen digestioa

PCR produktuaren eta bektorearen (pGEX-6P-1) digestioa burutu da BamHI eta XhoI errestrikzio entzimen bitartez **2 Taulan** agertzen den nahasketa erabiliz. Hau 15 minutuz inkubatu da 37°Ctan eta 1  $\mu$ L fosfatasa alkalino eta 5  $\mu$ L fosfatasa alkalinoaren disolbatzaile indargetzailez 20 minutuz. Fosfatasa alkalinoak, errestrikzio entzimek digeritutako bi muturrak defosforilatuko ditu, bektorea bere buruarekiko ixtea oztopatuz eta era berean, intsertoaren ligazioa baimenduz.

2 Taula. Bektorea eta intsertoaren digestioa burutzeko erreakzio nahasketa.

	INTSERTOIA	BEKTOREA
<b>DNA</b>	39 $\mu$ L (PCR produktua)	18 $\mu$ L
<b>BamHI</b>	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
<b>XhoI</b>	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
<b>FD disolbatzaile indargetzailea</b>	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2 $\mu$ L	23 $\mu$ L

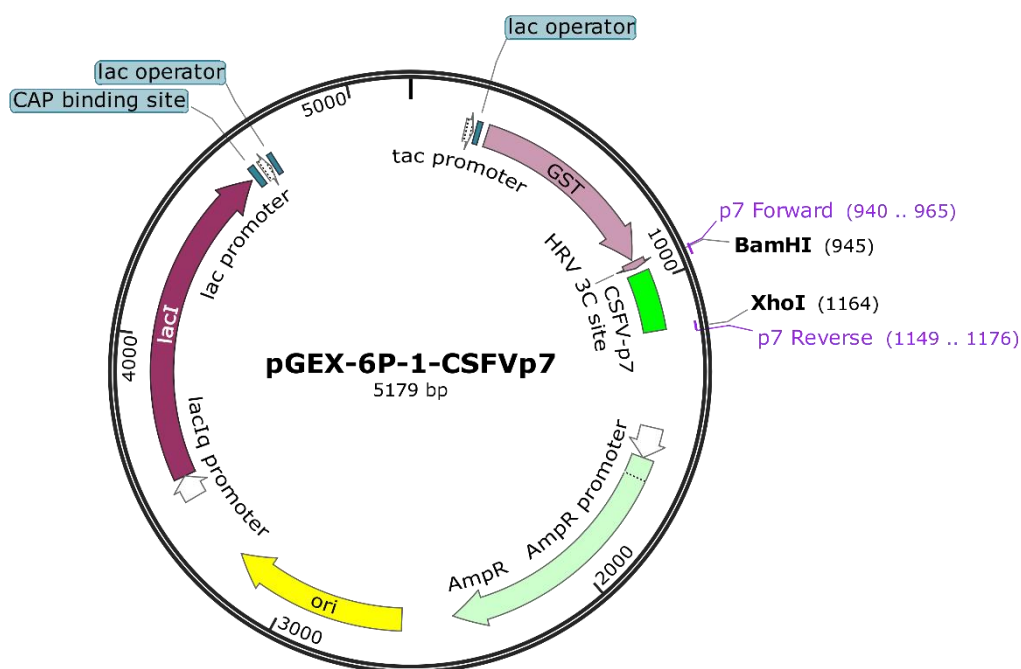
Digeritutako intsertoa, digeritutako bektorea eta digeritu gabeko bektorea erabili dira % 1eko agarosazko gel bat egiteko. Bektorearen eta intsertoaren katean dauden bandak moztu eta GeneJET Gel Extraction kit-a (Thermo Fisher Scientific Inc. Massachusetts, AEB) erabiliz erauzi dira.

### 2.1.1.3. Ligazioa

Behin errestrikzio entzimen bitartez lorturiko zatiak (intsertoa eta bektorea) ditugula, euren arteko ligazioa egin da. Horretarako, **3 Taulako** erreakzio nahasketa hiru orduz inkubatu da giro tenperaturan.

**3 Taula. Ligaziorako erreakzio nahasketa.** Goiko lerroan bektore:intserto proportzioak ageri dira.

	<b>1:0</b>	<b>1:1</b>	<b>1:3</b>	<b>1:7</b>
<b>Bektorea</b>	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
<b>Intsertoa</b>	-	1 µL	3 µL	7 µL
<b>T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific Inc. Massachusetts, AEB)</b>	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
<b>Buffer T4 DNA ligasa disolbatzaile indargetzailea (Thermo Fisher Scientific Inc. Massachusetts, AEB)</b>	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
<b>Ura</b>	7 µL	6 µL	4 µL	-



3 Irudia. pGEX-6P-1-CSFVp7 plasmidoaren mapa. Snapgene viwer programaz egin da.

#### 2.1.1.4. Transformazioa

Transformaziorako *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  anduia erabili da. Lehenik eta behin, -80°Ctan dauden zelulak izotzetan 30 minutuz mantenduz desizoztu dira. Jarraian, ligazio-produktuak (1:0, 1:1, 1:3 eta 1:7) gehitu eta 5 minutuz mantendu da nahastea izotzetan. Txoke termikoa eragiteko, nahastea 42°Ctan jarri da minutu batez eta oso arin pasa da berriro izotzetara, bertan 10 minutu mantenduz. Gero, 1ml Luria Bertani (LB) hazkuntza medioa gehitu da eta ordu batez bakterioak hazten utzi dira. Azkenik, transformaturiko bakterioak plaketan erein dira LB eta anpizilina (1mM) dituen medioa erabiliz eta gau osoz inkubatu dira.

1:3 ligazio produktutik lortu dira kolonia gehien, beraz, plaka horretako kolonia baten DNA plasmidikoa erauzi eta GeneJET Plasmid Miniprep kit-a (Thermo Fisher Scientific Inc. Massachusetts, AEB) erabiliz purifikatu da. Purifikatutakoarekin PCRA burutu da aurrean aipaturiko hasleen bitartez eta azaldutako protokoloa jarraituz (**1 Taula**). Era honetan, plasmidoa eta insertoaren ligazioa eman dela ziurtatu da. Insertoak mutaziorik ez duela baieztatzeko plasmidoa Secugen (Madril, Espainia) enpresara bidali da sekuentziatzera.

### 2.1.3. GST-6His-p7 fusio-proteinaren eraikuntza

GST-6His-p7 fusio-proteinaren eraikuntzarako GST-p7ren eraikuntza egiteko erabilitako prozedura erabili da. Baina, F haslea desberdina izango da eta BamHI errestrikzio entzimaren ordez EcoRI erabili da. Beraz, F haslea hurrengoa da:

*Forward (F')*: 5' TCCCCGGAATTCCATCATCACCATCACCACCTGCAGCTGG  
GTCAGGGT 3'

F' haslean letra lodiz dagoen sekuentzia EcoRI errestrikzio guneari dagokio eta azpimarratutakoa gehitu den 6 histidanadun etiketa da.

### 2.1.4. Adierazpena

Saiakuntza desberdinak burutu dira p7 bioporinaren adierazpenerako erabiliko den prozedura optimizatzeko.

Hurrengo *Escherichia coli* zelula anduiak transformatu dira gure intsertoa duen DNA plasmidikoa erabiliz: B1-21, C-41 eta C-43. C-41 eta C-43 eraginkorragoak dira mintz proteinak adierazteko, beste mutazio batzuen artean, mintz inbaginazioak dituztelako. Transformaziorako, aurretik azaldutako txoke termikoa erabili da. Fusio-proteinaren adierazpena baldintza desberdinetan egin da; hain zuzen, bi temperatura desberdin (18°C eta 37°C) eta bi inkubazio-denbora desberdin erabili dira (4 orduz eta gau osoz).

Lehenengoz, transformatutako zelula anduia gau osoz inkubatu da 50 ml LB hazkuntza medio likidoan, anpizilina (1mM) gehituz eta 37°C-tan. Inkubazio aldia igaro ostean, lagina litro bateko LB hazkuntza medio likidoan inokulatu da eta anpizilina (1mM) gehitu da. 0,6-0,8 arteko dentsitate optikoa (600nm) eskuratu arte 37°C-tan inkubatu da; une horretan, proteinaren adierazpena induzitu da isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosidoa (IPTG) (1mM) gehituz. Fusio-proteinaren adierazpenerako, aurretik aipaturiko baldintza desberdinak (tenperatura eta inkubazio-denbora desberdinak) erabili dira.

Inkubazioa egin ostean, lagina zentrifugatu da 5.000 x g-tan 15 minutuz Avanti J-25I Beckman Coulter (Kalifornia, AEB) zentrifuga eta JA-25.50 errotorea erabiliz. Gainjalkina deuseztatu (frakzio honetan apurtu ez diren zelulak egongo dira) eta jalkina izoztu eta gorde egin da.

### 2.1.5. Purifikazioa

#### 2.1.5.1. Frakzionamendua

Adierazpen osteko zentrifugazioan lorturiko jalkina berreseki da PBS, 1mM azido etilendiaminotetraazetiko (EDTA) eta 1mM tris-2-karboxietilfosfina (TCEP) disolbatzaile indargetzailea (A disolbatzaile indargetzailea) erabiliz eta proteasen inhibitzailea den pastilla bat gehituz.

Berreseki ostean, zelulak apurtzeko, nahastea sonikatu da (Soniprep 150 MSE, Sanyo, Londres, EB) hurrengo protokoloa 5 aldiz errepikatuz: 10 segundo sonikatzen eta 10 segundo sonikatu gabe 3 minutuz (10/10/3).

Behin zelulak apurtuta, laginaren frakzionamendua egin da zentrifugazio diferentzialaren bitartez. Horretarako, lehenik eta behin, Beckman Coulter Avanti J-25I (Kalifornia, AEB) zentrifuga eta JA-25.50 errotorea erabiliz zentrifugatu da 5.000 x g-tan 20 minutuz. Lortutako jalkina deuseztatu eta gainjalkina berriz zentrifugatu da (20.000 x g, 20 minutu) aurreko zentrifuga eta JLA-9.1000 errotorea erabiliz. Jalkina A disolbatzaile indargetzailean berreseki da eta gainjalkina 100.000 x g-tan ordu batez zentrifugatu da Beckman Coulter Optima L-90K (Kalifornia, AEB) ultrazentrifuga erabiliz. Lortutako jalkina A disolbatzaile indargetzailean berreseki da CHAPS (%1) detergentea gehituz.

#### 2.1.5.2. GSTan oinarritutako afinitate kromatografia

Zutabeen egindako afinitate kromatografia Glutathione Agarose Beads (ABT, Madril, Espainia) erretxina erabiliz burutu da.

Lehenik eta behin, erretxina orekatu da hurrengo konposatuak dituen disolbatzaile indargetzailea (pH 7,3) erabiliz: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl eta 140 mM NaCl. Jarraian, lagina zutabera gehitu da eta erretxinara lotu ez den frakzioa jaso da. Hurrengo pausua erretxina garbitzea izango da (bi aldiz egin dena); horretarako, aurreko disolbatzaile indargetzailea erabili da eta frakzioak jaso dira. Azkenik, fusio-proteinaren eluzioa burutu da hurrengo konposatuak dituen disolbatzaile indargetzailea (pH 8) erabiliz: 10 mM glutation erreduzitu eta 50 mM Tris-HCl. Urrats hau birritan burutu da dagozkion frakzioak jasoz.

### 2.1.5.3. Detergenteak erabiliz proteina disolbagarri bihurtu

Zelulak sonikatu aurretik hurrengo detergenteak gehitu dira proteina disolbatzeko: SDS (%1 eta %0,02), CHAPS (%1), CYMAL-7 (%1), OG (%2), DM (%1), UDM (%1), DDM (%1), LDAO (%1) eta Triton x 100 detergentea (%1).

Detergenteak gehitu ostean, aurretik aipaturiko prozedura erabiliz, lagina sonikatu da (Soniprep 150 MSE, Sanyo, Londres, EB). Jarraian, aurrean azaldutako frakzionamendua burutu da.

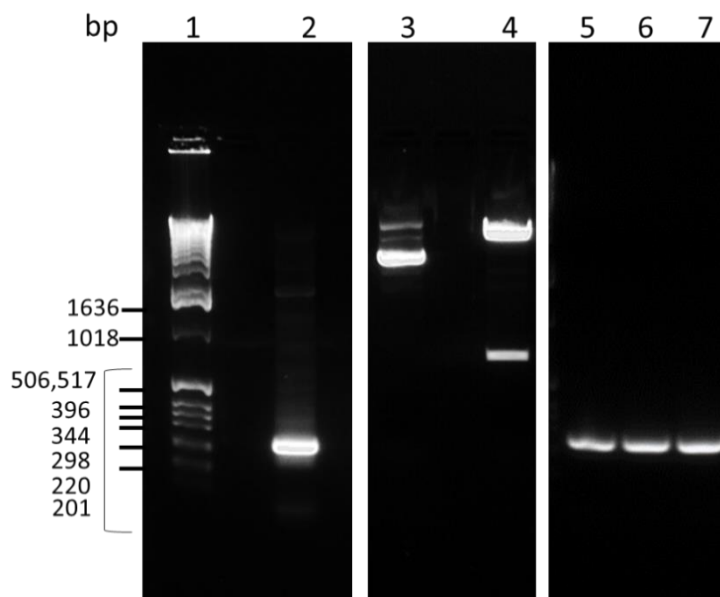
### 2.1.5.4. Western Plapaketa

Laginak SDS-PAGE elektroforesi bidez haien pisu molekularren arabera banandu dira. Poliakrilamidazko gel honen edukia nitrozelulosazko mintz batera transferitu da elektropapaketa erdilehorreko protokoloa jarraituz %20 metanola duen %1 SDSan. Mintza PBST disolbatzaile indargetzailean (PBS + %0,05 Tween 20) disolbatutako gantz gabeko esnearekin (%5eko proportzioan) 45 minutuz blokeatu da. Ondoren, %2,5 esnea duen PBST-an disolbatutako antigorputz primarioarekin (Anti GST 1:2000 kontzentrazioan) inkubatu da gau osoz 4° C-tan. Hurrengo egunean, mintza PBSTan disolbatutako (1:5000) HRP deituriko entzimara (Horseradish peroxidase) batuta daraman antigorputz sekundarioarekin (Anti Mouse IgG-HRP) inkubatu da. Entzimaren aktibitatearen ondorioz, kemolumineszente izango den substratu bat gehitu da (SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate), mintza X-izpiko filmen aurrean jarri eta AGFA Curix 60 batean errebelatu da.



## 2.2. EMAITZAK

### 2.2.1. GST- p7 fusio-proteinaren klonazioa



**4 Irudia. GST-p7 fusio-proteinaren klonazioaren azterketa Western plaketaren bitartez.** 1) 1Kb DNA ladder markatzailea. 2) PCR produktua. 3) Ebaki gabeko pGEX-6P-1 bektorea. 4) pGEX-6P-1 bektore ebakia. 5, 6, 7) Kolonia positiboak.

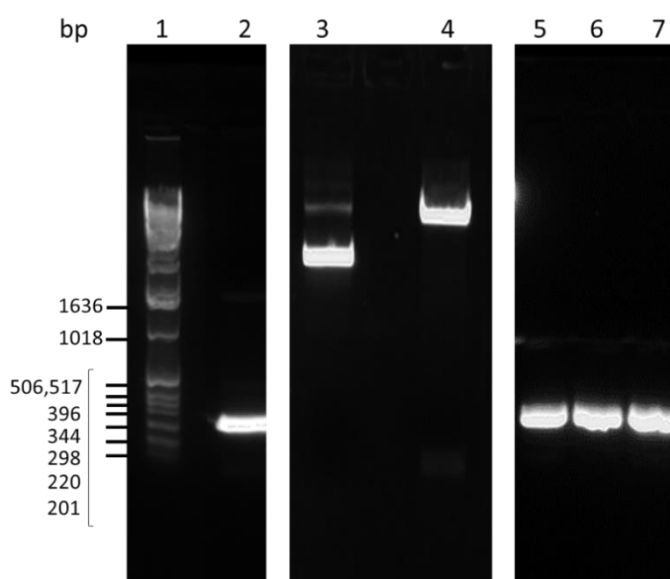
PCR bidez p7 sekuentziari dagokion DNA zatia amplifikatu da eta agarosazko gel batean elektroforesi bidez ikusarazi da (**4 Irudia**). DNA zati hau, pGEX-6P-1-p7 plasmido birkonbinatua sortzeko erabili da geroago. Klonazio eta adierazpenerako erabilitako plasmidoa GSTan oinarritutako fusio-proteinak eraikitzeke erabilia da. Izan ere, plasmidoaren sekuentzian GSTaren sekuentzia ageri da.

GST-p7 fusio proteina eraikitzeke, PCR produktua eta plasmidoa BamHI eta XhoI errestrikzio entzimekin digeritu dira. Jarraian, bien arteko ligazioa burutu da intsertoaren kontzentrazio desberdinak erabiliz eta *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  andua transformatu da produktu hauekin, jarraian bakterioen hazkuntza plaketan bideratuz. Plaketan emandako hazkuntza aztertuz, ikusi da kontrolean (1:0) koloniarik ez dagoela. Honekin ondorioztatu daiteke beste plaketan koloniak hazi baldin badira, gure intsertoa duen plasmidoa izango dutela. Izan ere, 1:0 plakan ez da intsertorik egongo eta plasmidoa bere buruarekiko itxi ez bada, bakterioek DNA hau degradatu egingo dute lineala delako. 1:3 ligazio produktutik lortu dira kolonia gehien, beraz,

bertako 3 kolonia hartu eta PCRa burutu da plasmidoak gure intsertoa duela egiaztatzeko. Gainera, kolonia hauek Secugen (Madril, Espainia) enpresara bidali dira sekuentziatzera intsertoak mutaziorik duen ikusteko. Kolonia guztien sekuentzia egokia izan da (**4 Irudia**).

### 2.2.2. GST-6His-p7 fusio-proteinaren klonazioa

Fusio-proteinaren adierazpena, purifikazioa eta egonkortasuna hobetzeko helburuarekin 6 histidinadun isats bat gehitu da GST eta p7 sekuentzien artean (Griffin, Beales et al. 2003). Honi esker, fusio-proteina IMAC (Immobilized Metal Chelating Chromatography) afinitate kromatografia bitartez purifikatu ahal izango da. Gainera, kromatografia mota honek zenbait detergenteen presentzia baimentzen du, erabili behar izatekotan ezaugarri abantailatsua izango delarik.



**5 Irudia. GST-6His-p7 fusio proteinaren klonazioaren azterketa Western plaketaren bitartez.** 1) 1Kb DNA ladder markatzailea. 2) PCR produktua. 3) Ebaki gabeko pGEX-6P-1 bektorea. 4) pGEX-6P-1 bektore ebakia. 5, 6, 7) Kolonia positiboak

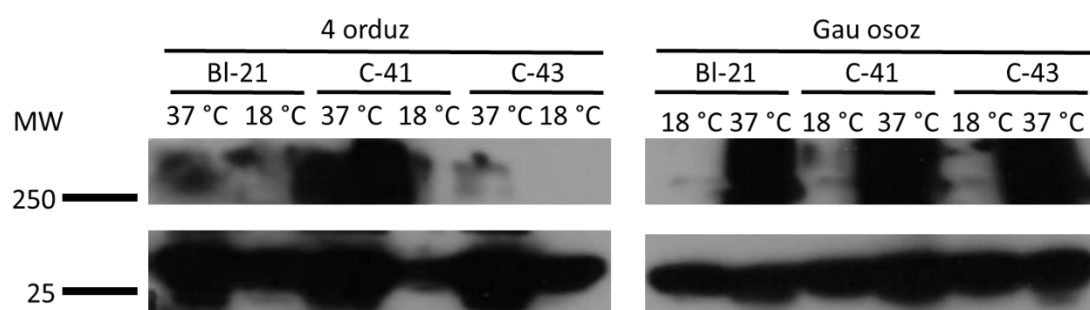
GST-p7 fusio-proteinarekin egin den moduan, PCR bidez eta material eta metodoak atalean zehaztatutako hasleen bitartez anplifikatu da p7ren DNA sekuentzia. Jarraian, bektore eta PCR produktuaren digestioa burutu da EcoRI eta XhoI errestrikzio

entzimak erabiliz eta bien arteko ligazioa egin da. Azkenik, *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  anduia transformatu da eta lorturiko koloniak gure intsertoa duen plasmidoa dutela ziurtatu da aurrean azaldu den moduan (**5 Irudia**).

### 2.2.3. Adierazpena

#### 2.2.3.1. GST-p7 fusio-proteinaren adierazpena

DNA plasmidikoa erauzi eta *Escherichia coli*-ren hiru andui desberdin transformatu dira: BI-21, C-41 eta C-43. Horretaz gain, fusio-proteinaren adierazpena bi inkubazio tenperaturetan egin da, 37 eta 18°C-tan alegia. Gainera, behin zelulak induzituta (IPTG bitartez) bi inkubazio-denbora desberdin erabili dira (4 orduz eta gau osoz).

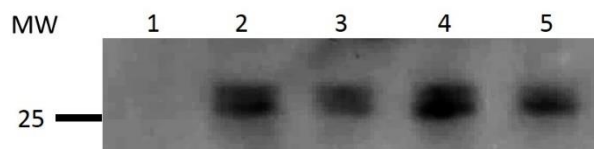


**6 Irudia.** GST-p7 fusio proteinaren adierazpenaren optimizazioaren azterketa Western plaketaren bitartez.

GST-p7 fusio-proteina SDSarekin kontaktuan jartzean egituratu egiten denez, 25 kDa-aren markatzailearen gainetik ageri da (Pisu molekularrak: GST 27 kDa eta GST-p7 fusio-proteina 29 kDa). 250 kDa-eko markatzailearen inguruan agregatutako proteina ageri da. Erabilitako baldintzak aztertuz, esan daiteke gau osoz inkubatuz agregatutako proteina gehiago dagoela eta ez dela adierazpena hobetzen. Hau da, inkubazioa 4 orduz eginez nahikoa da proteinaren adierazpen egokia emateko. *Escherichia coli* zelula anduiak ez du eragin handirik proteinaren adierazpenean, baina hurrengo saioak egiteko, orokorrean C-41 zelula anduia erabili da. Tenperatura igoz (37°C-tan) adierazpena hobetu egiten da, hau da, proteina kantitate gehiago lortzen da. 18°C-tan aldiz, adierazpena geldoagoa denez, proteina kantitate gutxiago lortzen da.

### 2.2.3.2. GST-6His-p7 fusio-proteinaren adierazpena

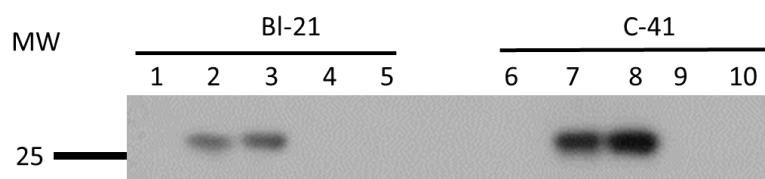
GST-6His-p7 fusio-proteinaren adierazpenerako GST-p7 fusio proteinarekin optimizatutako baldintzak erabili dira emaitza egokiak lortuz (**7 irudia**).



**7 irudia. GST-6His-p7 fusio-proteinaren adierazpen test-a.** 1) Kontrola, IPTG gehitu gabeko bakterioak. 2, 3, 4, 5) GST-6His-p7 fusio-proteina adierazten duten bakterio koloniak.

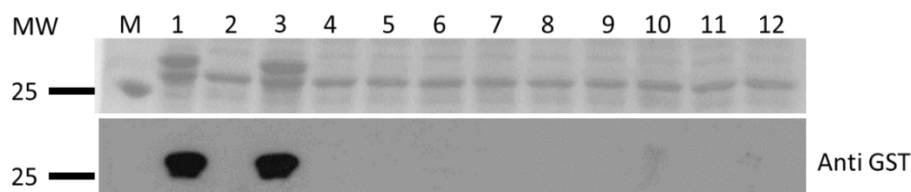
### 2.2.4. Purifikazioa

#### 2.2.4.1. GST-p7 fusio-proteinaren purifikazioa



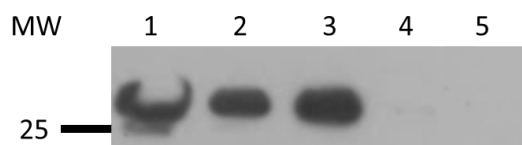
**8 irudia. Frakzionamenduaren azterketa Western plaketaren bitartez.** 1-5) BI-21 zelula anduia erabiliz. 1) Kontrola, induzitu gabeko bakterioak. 2) Zelula osoak. 3) Inklusio gorputzen frakzioa. 4) Mintzen frakzioa. 5) Disolbagarria den frakzioa. 6-12) C-41 zelula anduia erabiliz. 6) Kontrola, induzitutako bakterioak. 7) Zelula osoak. 8) Inklusio gorputzen frakzioa. 9) Mintzen frakzioa. 10) Disolbagarria den frakzioa

**8 irudiko** SDS-PAGEa aztertuz ondorioztatu daiteke gure fusio-proteina inklusio gorputzen frakzioan lortzen dela. Hau da, proteinak inklusio gorputzak eratzen dituen lehengo zentrifugazioaren jalkinean galtzen da eta ez da ezer ez lortzen disolbagarria den frakzioan. Disolbagarri bihurtzeko, zelulak sonikatu aurretik detergente desberdinak gehitu dira laginera (**9 Irudia**). Izan ere, disolbagarri bihurtuta GSTan oinarritutako afinitate kromatografia bidez purifikatu ahal izango litzateke; hau ez da posible izaten aldiz, inklusio gorputzak eratzen baditu (**10 Irudia**).



**9 Irudia. Detergenteen bidezko GST-p7 fusio-proteinaren purifikazioaren azterketa Coomassie gel batean eta Western plaketaren bitartez.** M) Precision Plus Protein Dual xtra markatzailea. 1) Zelula osoak. 2) Disolbagarria den frakzioa detergentirik gehitu gabe. 3-12) Disolbagarria den frakzioa laginera detergente desberdinak gehituz. 3) SDS (%1). 4) SDS (%0,2). 5) LDAO (%1). 6) Triton X-100 (%1) 7) CYMAL-7 (%1). 8) OG (%1). 9) DM (%1). 10) UDM (%1). 11) DDM (%1). 12) CHAPS (%4).

Soilik %1eko SDS kontzentrazioa erabiliz lortzen da fusio-proteina disolbagarri bihurtzea (**9 Irudia**). Baina, SDS kontzentrazio horrekin ezin da GSTan oinarritutako afinitate kromatografiaz proteina purifikatu. Izan ere, SDSa desnaturizatzailea da eta GST desnaturizatua ez da glutation-a duen erretxinara batzen (**10 Irudia**).

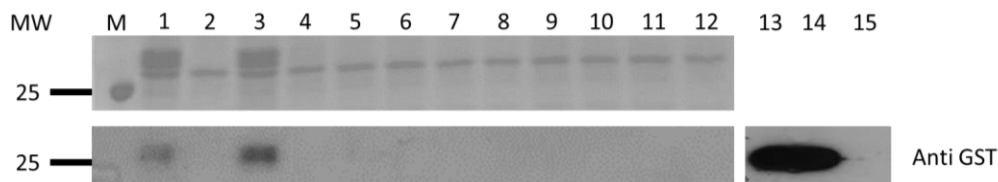


**10 Irudia. Afinitate kromatografiaren (glutacion-a duen erretxina) azterketa Western plaketaren bitartez.** 1) Zelula osoak. 2) Zentrifugazio diferentziala eginez lortu den disolbagarria den frakzioa. 3) Erretxinara lotu ez den hasierako frakzioa. 4) Erretxina garbitu ondorengo frakzioa. 5) Eluzioa glutacion erreduzitua erabiliz, erretxinara lotu den frakzioa.

#### 2.2.4.2. GST-6His-p7 fusio proteinaren purifikazioa

GSTan oinarritutako afinitate kromatografiaren bitartez ezin denez purifikazioa burutu, sei histidinadun isatsa gehitu da fusio-proteinaren disolbagarritasuna emendatzeko helburuarekin (Griffin, Beales et al. 2003). Hala ere, soilik SDS (%1) detergentearekin lortzen da proteina disolbagarria den frakzioan (**11 Irudia**). Aipaturiko frakzio hau IMAC kromatografia bitartez purifikatzen saiatu da. Izan ere, kromatografia mota honek SDSaren presentzia baimentzen du %1 portzentaiarekin.

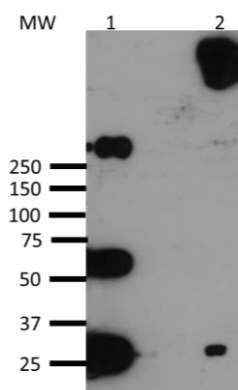
Baina, gure kasuan, ez da lagina erretxinara itsatsi (**11 Irudia**). Beraz, ikusi izan da histidina isatsa ez dela metodo erabilgarria fusio-proteinaren disolbagarritasuna areagotzeko.



**11 Irudia. Detergenteen bidezko GST-6His-p7 fusio-proteinaren purifikazioaren azterketa Coomassie gel batean eta Western plaketaren bitartez.** M) Precision Plus Protein Dual xtra markatzailea. 1) Zelula osoak. 2) Detergentetik gabeko disolbagarria den frakzioa. 3-12) Disolbagarria den frakzioa, detergente desberdinak laginera gehituz 3) SDS (%1). 4) SDS (%0,2). 5) CHAPS (%4). 6) Triton X-100 (%1). 7) CYMAL-7 (%1). 8) OG (%1). 9) LDAO (%1). 10) DM (%1). 11) UDM (%1). 12) DDM (%1). **IMAC afinitate kromatografia bidezko purifikazioa.** 13) SDS (%1) detergentearekin disolbatutako frakzioa. 14) Erretxinara itsatsi ez den frakzioa. 15) 250mM Imidazolekin egindako eluzioa.

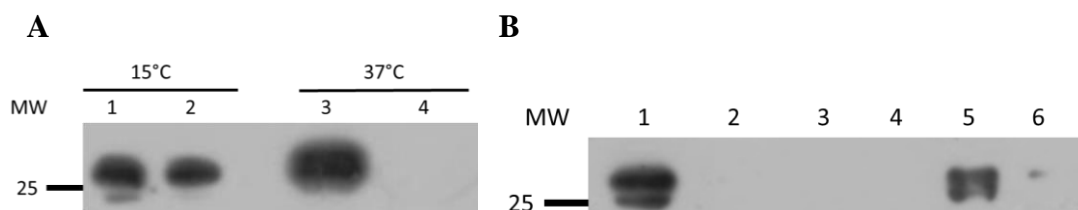
#### 2.2.4.3. Purifikaziorako aukera desberdinak

Fusio-proteina disolbagarri bihurtzeko bi irtenbide aurkitu dira; alde batetik, inklusio gorputzak guanidinio kloruroarekin berresekitea (**12 Irudia**) eta bestetik, fusio-proteinaren adierazpena tenperatura baxuagoan (15°C-tan) burutzea (**13 Irudia**). Lehenengo aukeran, inklusio gorputzei guanidinio kloruro gatza (6M) gehitzen zaie proteina disolbagarri bihurtzeko. Gero, zentrifugatu egin da eta ez da jalkinik lortu, proteina disolbagarri dagoela aditzera emanez. Fusio-proteina berriro tolesteko eta berreskuratu ahal izateko, gatzaren kontzentrazioa murriztu da dialisi sekuentzialak eginez. Gainera, proteina agregatu ez dadin, glizina gehitu da.



**12 Irudia. Guanidinio kloruro bidezko saiakuntzaren azterketa Western plaketaren bidez.** 1) Kontrola, SDS (%1) detergentea duen disolbagarria den frakzioa. 2) Guanidinio kloruroa duen disolbagarria den frakzioa.

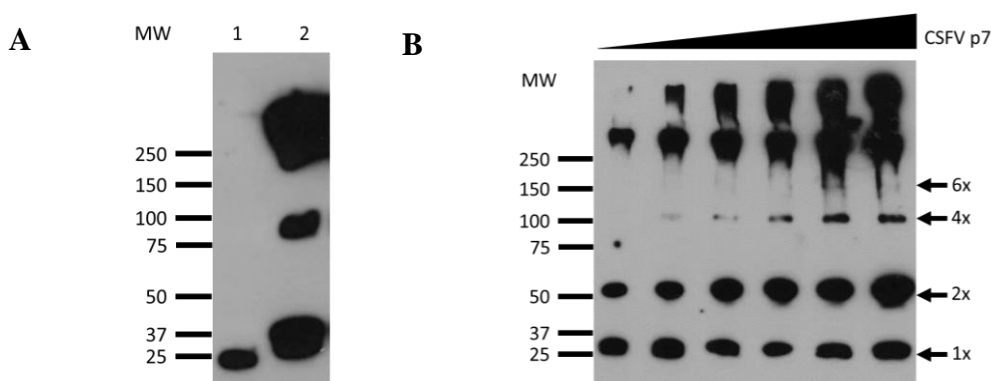
Bigarren aukeran, fusio-proteinak inklusio gorputzik ez eratzeko honen kantitatea murriztu da 15°C-tan adieraziz (**13 A Irudia**). Era honetan, adierazpen tasa murriztu egin da eta fusio-proteina disolbagarria den frakzioan lortu da. Frakzio hau erabili da IMAC afinitate kromatografia egiteko eta **13 B Irudian** ikus daitekeen moduan, erretxinara itsatsi egin da, bere purifikazioa lortuz. Hala ere, purifikazio maila baxua lortu da.



**13 Irudia. A) Adierazpenaren gutxitzearen saiakuntzaren azterketa Western plaketaz.** 1 eta 2) 15°C-tan buruturiko adierazpenaren saiakuntzakoa. 1) Zelula osoak. 2) Disolbagarria den frakzioa. 3 eta 4) Kontrolak. 37°C-tan egindako adierazpena. 3) Zelula osoak. 4) Disolbagarria den frakzioa. **B) IMAC afinitate kromatografiaren azterketa SDS-PAGEan.** 1) 2A kalean lortu den disolbagarria den frakzioa. 2) Erretxinara itsatsi ez den frakzioa. 3 eta 4) Erretxinaren bi garbiketen frakzioak. 5 eta 6) 250mM Imidazolekin egindako eluzioak.

### 2.2.5. Oligomerizazio egoeraren azterketa

Proteinaren oligomerizazio egoera aztertzeko %7,5eko akrilamida kontzentrazioa duen gela egin da (**14 Irudia**). Fusio-proteinak monomeroak (1x), dimeroak (2x), tetrameroak (4x) eta proteina kontzentrazio altuetan hexameroak (6x) eratzten dituela ikus daiteke. Gainera, estruktura handiagoak ere daudela ondorioztatu daiteke; hain zuzen, bi estruktura desberdindu daitezke: *stacking* eta *resolving* artean dagoena eta gelean sartzen ez dena.



**14 Irudia. Oligomerizazio egoeraren azterketa Western plaketaren bitartez.** **A)** GST hutsaren eta p7-GST fusio-proteinaren oligomerizazio egoera SDSarekin kontaktuan. 1) GST hutsa. 2) GST-p7 fusio-proteina. **B)** p7ren kontzentrazio gorakorak SDSarekin.

### 2.3. EZTABAIDA

Bioporinen adierazpena eta purifikazioa burutzea ez da lan erraza hainbat arrazoi direla eta: mintz proteina hauek disolbagarritasun baxua dute eta bakterioentzako toxikoak izan daitezke. Hori dela eta, fusio-proteinen bitartez adierazi eta purifikatu izan dira. Hain zuzen, GST proteina disolbagarria bioporinarekin fusionatuz, GSTak bioporinaren disolbagarritasuna emendatzen du eta gainera, fusio-proteinaren adierazpena baimentzen du bakterioetan. Era berean, bioporinek izan dezaketen toxizitatea murriztu egiten du. Baita, fusio-proteina disolbagarri bihurtzen denez, hau GSTan oinarritutako afinitate kromatografia erabiliz (glutation-a duen erretxinarekin) purifikatu ahalko da. Simian birus 40 (SV-40)-ren Vp4 bioporina GSTarekin fusionatuz adierazi izan da *Escherichia coli* bakterioan (Raghava, Giorda et al. 2011). Kasu honetan ere, inklusio gorputzak eratu dira eta proteina disolbagarri bihurtzeko, prolina gehitu da bakterioen hazkuntza mediora. Aminoazido hau proteinak egonkortzeko eta euren disolbagarritasuna emendatzeko erabiltzen da. Gure kasuan, glizina erabili izan da fusio-proteinak agregatuak eratu ez ditzan bere disolbagarritasuna emendatzeko helburuarekin, baina ez da lortu. Purifikazio bide hau beraz, hobetu beharra dago; adibidez, prolina edo arginina aminoazidoak erabiliz saiatu daiteke. Baita, adierazpena tenperatura baxuagotan (16°C) egin dute (Raghava, Giorda et al. 2011). Gure kasuan, CSFV p7 bioporinaren adierazpena tenperatura baxuagoan (15°C) egin da eta proteina disolbagarria den frakzioan lortu da. Hala ere, gutxi gora behera, 20 aldiz proteina kantitate gutxiago lortu denez, metodo hau hobetu beharra dago, baina erabilgarria izan daiteke. HCVren p7 bioporina ere GST-arekin asoziatu adierazi da eta Triton X-100 detergentearekin disolbagarri bihurtu (Clarke, Griffin et al. 2006). Gure kasuan, Triton X-100 detergentea ez da nahikoa izan proteina disolbagarri bihurtzeko. Izan ere, erabilitako detergenteen artean, soilik SDSak (%1) bihurtzen du proteina disolbagarri eta era honetan, ezin da lagina glutacion-a duen erretxinaren bitartez purifikatu.

HCVren GST-p7 fusio-proteinaren adierazpena eta egonkortasuna hobetu dute 6 histidinadun etiketa gehituz (Griffin, Beales et al. 2003). Gainera, etiketa honek, purifikazioa errazten du IMAC afinitate kromatografiak (histidina isatsa duten fusio-proteinekin erabiltzen dena) zenbait detergenteen presentzia baimentzen duelako. Gure kasuan aldiz, etiketa honen gehitzeak ez du fusio-proteinaren adierazpena



kualitatiboki hobetu, bereziki histidina etiketa gabe ondo adierazten zelako. Gainera, nahiz eta fusio-proteinaren egonkortasuna hobetzea espero zen inklusio gorputzak eratu dira.

Ondorioz, lan honetan zehar, CSFVren p7 biroporina purifikatzeko bi bide ireki dira: inklusio gorputzak guanidinio kloruroaren bitartez disolbatzea eta fusio-proteinaren adierazpena tenperatura baxuetan egitea. Lehenengo metodoaren bitartez, proteina kantitate altuagoa lortzen da adierazpen prozesua 37°C-tan burutzen delako. Baina, ikusi izan da ez dela lan erreza guanidinio kloruroa kentzea proteinaren tolespen egokia lortzeko. Gure kasuan, dialisi sekuentzialak egin dira, baina proteinak agregatuak eratu ditu. Bigarren metodoaren bitartez aldiz, nahiz eta gutxi gora behera 20 aldiz proteina kantitate gutxiago lortu, disolbagarri lortu da. Era honetan, histidina isatsa gehitu baldin badiogu, IMAC afinitate kromatografia erabili daiteke purifikatzeko. Metodo hau egokiagoa dirudi purifikaziorako; hala ere, oraindik optimizatu beharra dago purifikazio maila altuagoa lortzeko.

HCV p7 biroporinari dagokionez, jakina da mintzean poroak eratzen dituela. Poro hauen egitura sakonki aztertua izan da eta oligomerizazio egoera desberdinak aurkitu izan dira. Oligomerizazio egoera ohikoena hexameroak dira (Griffin, Beales et al. 2003, Luik, Chew et al. 2009), baina heptameroak ere eratu ahal dituela ikusi da (Clarke, Griffin et al. 2006). CSFVren p7 biroporinaren kasuan, SDSaren aurrean egonkorak diren egiturak eratzen dituela ikusi da. SDSak proteina-proteina elkarrekintza hidrofobikoak emateko behar diren baldintzak islatzen ditu; hau da, SDSaren bitartez, mintzaren baldintzak islatu daitezke. Guk, dimeroak, tetrameroak, hexameroak eta estruktura handiagoak eratzen dituela ikusi dugu. Hala ere, egitura handiago hauek soilik agregatuak edo estruktura funtzionalak diren ikasi behar da.

### **3. ONDORIOAK**

Lan honetan zehar ikusi egin da CSFV birusaren p7 biroporina adierazteko BI-21, C-41 zein C-43 *Escherichia coli* anduiak egokiak direla eta 4 orduko prozesua nahikoa dela hau lortzeko. Aipatu beharra dago oraindik ez dela purifikazio metodo egokirik aurkitu baina zenbait bide zabalduak izan direla. Horien artean, biroporinaren adierazpena tenperatura baxuetan (15°C-tan) burutzea, guanidinio kloruroa erabiltzea inklusio gorputzak disolbagarri bihurtzeko eta fusio-proteinari histidina isatsa gehitzea

IMAC afinitate kromatografiaren bidez purifikatzeko. Hala ere, metodo hauetan sakon aritzea falta da, hauek optimizatu behar baitira. Azkenik, p7 biroporinaren oligomerizazio egoerari dagokionez, SDSari erresistenteak diren dimeroak, tetrameroak, hexameroak eta egitura handiagoak eratzen dituela aurkitu da, mintzean tamaina horietako poroak eratu ditzakeela aditzera emanez. Baina, kasu honetan ere, azterketa sakonagoa burutu beharko da benetan guk ikusitako egiturak estruktura funtzionalak diren aztertzeko.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

- Becher, P., R. Avalos Ramirez, M. Orlich, S. Cedillo Rosales, M. Konig, M. Schweizer, H. Stalder, H. Schirrmeyer and H. J. Thiel (2003). "Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification." *Virology* **311**(1): 96-104.
- Brohm, C., E. Steinmann, M. Friesland, I. C. Lorenz, A. Patel, F. Penin, R. Bartenschlager and T. Pietschmann (2009). "Characterization of determinants important for hepatitis C virus p7 function in morphogenesis by using trans-complementation." *J Virol* **83**(22): 11682-11693.
- Clarke, D., S. Griffin, L. Beales, C. S. Gelais, S. Burgess, M. Harris and D. Rowlands (2006). "Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro." *J Biol Chem* **281**(48): 37057-37068.
- Choo, Q. L., G. Kuo, A. Weiner, K. S. Wang, L. Overby, D. Bradley and M. Houghton (1992). "Identification of the major, parenteral non-A, non-B hepatitis agent (hepatitis C virus) using a recombinant cDNA approach." *Semin Liver Dis* **12**(3): 279-288.
- Fischer, W. B. and H. J. Hsu (2011). "Viral channel forming proteins - modeling the target." *Biochim Biophys Acta* **1808**(2): 561-571.
- Fischer, W. B., L. H. Li, D. R. Mahato, Y. T. Wang and C. P. Chen (2014). "Viral channel proteins in intracellular protein-protein communication: Vpu of HIV-1, E5 of HPV16 and p7 of HCV." *Biochim Biophys Acta* **1838**(4): 1113-1121.
- Gladue, D. P., L. G. Holinka, E. Largo, I. Fernandez Sainz, C. Carrillo, V. O'Donnell, R. Baker-Branstetter, Z. Lu, X. Ambroggio, G. R. Risatti, J. L. Nieva and M. V. Borca (2012). "Classical swine fever virus p7 protein is a viroporin involved in virulence in swine." *J Virol* **86**(12): 6778-6791.
- Gonzalez, M. E. and L. Carrasco (2003). "Viroporins." *FEBS Lett* **552**(1): 28-34.
- Griffin, S. D., L. P. Beales, D. S. Clarke, O. Worsfold, S. D. Evans, J. Jaeger, M. P. Harris and D. J. Rowlands (2003). "The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine." *FEBS Lett* **535**(1-3): 34-38.
- Harada, T., N. Tautz and H. J. Thiel (2000). "E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies." *J Virol* **74**(20): 9498-9506.
- Hyser, J. M., M. R. Collinson-Pautz, B. Utama and M. K. Estes (2010). "Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity." *MBio* **1**(5).

- Lama, J. and L. Carrasco (1992). "Expression of poliovirus nonstructural proteins in *Escherichia coli* cells. Modification of membrane permeability induced by 2B and 3A." *J Biol Chem* **267**(22): 15932-15937.
- Largo, E., D. P. Gladue, N. Huarte, M. V. Borca and J. L. Nieva (2014). "Pore-forming activity of pestivirus p7 in a minimal model system supports genus-specific viroporin function." *Antiviral Res* **101**: 30-36.
- Li, L. H., H. J. Hsu and W. B. Fischer (2013). "Assembling viral channel forming proteins: Vpu from HIV-1." *Biopolymers* **99**(8): 517-529.
- Luik, P., C. Chew, J. Aittoniemi, J. Chang, P. Wentworth, Jr., R. A. Dwek, P. C. Biggin, C. Venien-Bryan and N. Zitzmann (2009). "The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(31): 12712-12716.
- Luscombe, C. A., Z. Huang, M. G. Murray, M. Miller, J. Wilkinson and G. D. Ewart (2010). "A novel Hepatitis C virus p7 ion channel inhibitor, BIT225, inhibits bovine viral diarrhea virus in vitro and shows synergism with recombinant interferon-alpha-2b and nucleoside analogues." *Antiviral Res* **86**(2): 144-153.
- Madan, V., A. Castello and L. Carrasco (2008). "Viroporins from RNA viruses induce caspase-dependent apoptosis." *Cell Microbiol* **10**(2): 437-451.
- Nieva, J. L., V. Madan and L. Carrasco (2012). "Viroporins: structure and biological functions." *Nat Rev Microbiol* **10**(8): 563-574.
- Raghava, S., K. M. Giorda, F. B. Romano, A. P. Heuck and D. N. Hebert (2011). "The SV40 late protein VP4 is a viroporin that forms pores to disrupt membranes for viral release." *PLoS Pathog* **7**(6): e1002116.
- Ruiz, A., J. C. Guatelli and E. B. Stephens (2010). "The Vpu protein: new concepts in virus release and CD4 down-modulation." *Curr HIV Res* **8**(3): 240-252.
- Selby, M. J., E. Glazer, F. Masiarz and M. Houghton (1994). "Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV." *Virology* **204**(1): 114-122.
- Wang, J., F. Li and C. Ma (2015). "Recent Progress in Designing Inhibitors That Target the Drug-resistant M2 Proton Channels from the Influenza A Viruses." *Biopolymers*.
- Wang, J., J. X. Qiu, C. Soto and W. F. DeGrado (2011). "Structural and dynamic mechanisms for the function and inhibition of the M2 proton channel from influenza A virus." *Curr Opin Struct Biol* **21**(1): 68-80.
- Watanabe, S., T. Watanabe and Y. Kawaoka (2009). "Influenza A virus lacking M2 protein as a live attenuated vaccine." *J Virol* **83**(11): 5947-5950.