



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA LÍDER DE LA
CÁPSIDE DEL CALICIVIRUS FELINO”**

T E S I S

Que presenta

L. EN C. YOATZIN PEÑAFLORES TÉLLEZ

Directora de la Tesis: Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Ciudad de México

Septiembre, 2019

"I try all things, I achieve what I can."

Herman Melville, Moby-Dick

Agradecimientos

A mis padres Magnolia, Marcos y Rey David; por su incondicional apoyo en mi formación académica y personal. Este logro es solo el reflejo de los valores que, con su ejemplo y lecciones, han inculcado en mí.

A mi abuela, mis tías, tíos, hermanos y primos por su apoyo y cariño. Soy afortunado de tenerlos como familia.

A mis amigos Alejandro, Guillermo, Octavio, Jairo, Bruno y Marco. Su amistad, no importa si reciente, de algunos años o de toda la vida, me ha dado incontables risas, alegrías, consejos y palabras de aliento cuando todo se ha tornado difícil. Me siento feliz y orgulloso de poder decirme su amigo.

A Miguel, Pimienta y todo el grupo de Activismo Ateo, fuente de pláticas interesantes, debates fructíferos y un gran sentimiento de camaradería; espero seguir aprendiendo de ustedes y poder aportar mi granito de arena en los proyectos que vayan surgiendo en el camino.

A la doctora Ana Lorena Gutiérrez Escolano. No solo me ha proporcionado su guía y consejos durante el desarrollo de este proyecto de investigación, me ha apoyado en todo sentido cada vez que necesité ayuda en estos dos años, regresándome el entusiasmo y la emoción por el trabajo de laboratorio que en algún momento había perdido. Cada idea que tuve fue discutida con usted con mente abierta y cada propuesta que le hice fue justamente sopesada. No puedo agradecerle lo suficiente por haberme recibido en su equipo de trabajo y haber confiado en mí.

A los doctores Juan Ernesto Ludert de León y Nicolás Villegas Sepúlveda, por sus atenciones durante este proyecto de investigación traducidas en pláticas, propuestas, discusiones, consejos y sugerencias. Han sido parte invaluable para esta tesis y estoy agradecido con ustedes por su genuino interés en el proyecto y mi formación.

A la doctora Clotilde Cancio Lonches, que día a día estuvo atenta a mi desarrollo en el laboratorio, enseñándome técnicas nuevas y ayudándome a optimizar mis experimentos cada que solicité su ayuda.

Al biólogo Raúl Bonilla, por su ayuda en las clonaciones realizadas en este proyecto. Si su ayuda, este trabajo no hubiera podido terminarse a tiempo.

A la doctora Bibiana Chávez Munguía y la bióloga Anel Edith Lagunes Guillén por su apoyo y disponibilidad en las microscopías electrónicas de transmisión.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante esta maestría.

A Eduardo, Alex, Adrián, Adriana, Mónica y Óscar. Hicieron este trabajo mucho más ameno con su presencia día a día, dándome buenos consejos para completar y presentar este proyecto.

A todos los amigos que hice en el Cinvestav estos dos años, por tantos buenos momentos.

A Carolina Pérez Ibáñez, por ser una persona tan increíble y haberme acompañado este último tramo del camino.

ÍNDICE

RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1) Calicivirus	1
1.2) Genoma de los calicivirus.....	2
1.2.1) Genoma de Calicivirus felino.....	3
1.3) Ciclo de replicación de Calicivirus felino	3
1.4) Proteína Líder de la Cápside de Calicivirus felino es responsable de la inducción de la apoptosis.....	6
1.5) Viroporinas.....	7
1.6) Péptidos antimicrobianos	9
2. JUSTIFICACIÓN.....	10
3. HIPÓTESIS.....	10
4. OBJETIVO GENERAL.....	10
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
6.1) Construcción y propagación de plásmidos	11
6.2) Preparación de células quimiocompetentes por CaCl ₂	12
6.3) Transformación de células quimiocompetentes por choque térmico.....	12
6.4) Extracción de DNA plasmídico	13
6.5) Secuenciación de DNA	14
6.6) Inducción de expresión génica por IPTG.....	15
6.7) Obtención de extractos proteicos de bacterias.....	15
6.8) Análisis de proteínas por SDS-PAGE.....	15
6.9) Enriquecimiento de cuerpos de inclusión.....	15
6.10) Purificación de proteínas por electroelución.....	16
6.11) Ensayos de Western Blot	16
6.12) Ensayos de oligomerización	16
6.13) Ensayos de toxicidad por conteo de unidades formadoras de colonia	17
6.14) Determinación de cambios en la DO600 en bacterias expresando LC y LC-C40A	17

6.15) Microscopía electrónica de transmisión e inmunomarcaje con oro coloidal.....	18
6.16) Predicciones <i>in silico</i>	18
7. DIAGRAMA DE TRABAJO	20
7.1) Objetivo 1.....	21
7.2) Objetivo 2.....	22
7.3) Objetivo 3.....	23
7.4) Objetivo 4.....	24
8. RESULTADOS	24
8.1.1) La proteína LC de FCV tiene una localización citoplásmica	24
8.1.2) La proteína LC de FCV no tiene regiones intrínsecamente desordenadas.	25
8.1.3) La proteína LC de FCV no cumple con las características clásicas de viroporina.....	26
8.1.4) La proteína LC de FCV tiene potencial para ser fosforilada, palmitoilada y formar puentes disulfuro.	28
8.1.5) La formación de puentes disulfuro de la proteína LC de FCV coincide con la formación del efecto citopático en la infección.	30
8.1.6) La secuencia y estructura de la región CRI de la proteína LC de FCV cumple con las firmas moleculares de las defensinas.	33
8.2.1) Subclonación de LC y LC-C40A en el vector de expresión procarionte pRSETA.	36
8.2.2) Expresión y purificación de las proteínas recombinantes Histag-LC y Histag-LC-C40A.....	41
8.3.1) La proteína LC de FCV oligomeriza en condiciones no astringentes.	45
8.3.2) La oligomerización de la proteína LC de FCV depende de la formación de puentes disulfuro.	46
8.4.1) Las proteínas Histag-LC y Histag-LC-C40A son tóxicas para las bacterias.....	47
8.4.2) La inducción de la expresión de las proteínas Histag-LC y Histag-LC-C40A no cambia la densidad óptica del cultivo de bacterias.....	48
8.4.3) La proteína LC localiza en la membrana externa de la bacteria y parece causar un estrés osmótico.....	49
9. DISCUSIÓN.....	55
10. CONCLUSIONES	63
11. PERSPECTIVAS	64
12. BIBLIOGRAFÍA	64

RESUMEN

Los calicivirus son virus no envueltos con genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, que tienen relevancia médica, veterinaria y de producción ganadera, siendo Calicivirus felino un modelo ampliamente utilizado para el entendimiento del ciclo de replicación de esta familia. La proteína Líder de la Cápside es exclusiva del género de los *Vesivirus* y es responsable para el establecimiento del efecto citopático de la infección y la activación de la apoptosis por la vía mitocondrial. En este trabajo determinamos si la proteína LC de FCV cumple con las características bioinformáticas, bioquímicas y funcionales de las vioporinas, una familia de proteínas virales tóxicas capaz de oligomerizar y permeabilizar membranas. Encontramos que la proteína LC de FCV carece de los dominios transmembranales y polibásicos de las vioporinas clásicas, pero cumple con la firma molecular de vioporinas no clásicas como el Péptido delta de Ebolavirus y la familia las defensinas, perteneciente a los péptidos antimicrobianos. Demostramos que la proteína LC de FCV es capaz de formar oligómeros y que estos oligómeros son dependientes de sus puentes disulfuro, así como su toxicidad intrínseca en bacterias, donde la proteína LC es localizada en sus membranas. Micrografías electrónicas de transmisión en bacterias expresando la proteína LC de FCV demostraron que las bacterias se encuentran sometidas a estrés osmótico, y el análisis morfológico de mitocondrias en células eucariontes expresando LC de FCV a través de micrografías electrónicas de transmisión nos mostraron que la proteína LC de FCV también causa estrés osmótico en estos organelos, sugiriendo que el mecanismo de acción a través del cual LC de FCV desencadena la apoptosis es insertándose en la membrana, oligomerizando e induciendo estrés osmótico que ocasiona la ruptura de la membrana externa de la mitocondria. El conjunto de estos resultados sugiere que la proteína LC de FCV es una vioporina no clásica y proporciona nueva información para el entendimiento del ciclo de replicación de los *Vesivirus*.

ABSTRACT

Calicivirus are non-enveloped, single stranded positive sense RNA viruses that have medical, veterinary and livestock importance, being Feline calicivirus (FCV) a wide used model to study this viral family's replication cycle. The Leader of the Capsid (LC) is an exclusive protein for the *Vesivirus* genera, and in FCV it's responsible for the establishment of the cytopathic effect of the infection and apoptosis activation through the mitochondrial pathway. In this work we've determined if the LC protein of FCV has the bioinformatic, biochemical and functional characteristics of the viroporins, toxic viral proteins that oligomerize to form channels or pores and permeabilize cellular membranes. We found that LC of FCV lacks the transmembrane and polybasic domains of the classical viroporins, but in a highly conserved region it contains the molecular signature of the defensins, an antimicrobial peptide family, this signature is also shared with the non-classical viroporin from Ebolavirus known as Delta peptide. Moreover, de novo predictions of LC protein structure also shows the presence of the structural signature of the defensins family. We prove that LC of FCV oligomerize through its disulfide bonds and that it is a toxic protein when its expression is induced in *E. coli*, localizing in its internal and external membranes, seeming to cause an osmotic stress similar to bacteria growing in a hyperosmotic medium. An analysis of LC-expressing Crandell Rees Feline Kidney cells showed that their mitochondria have similar morphology to the one caused by an osmotic imbalance through ion channels malfunction, resulting in their external membrane disruption, one of the stimuli that triggers intrinsic apoptosis pathway. These results suggest that de LC protein from FCV is a non-classical viroporin that could induce an osmotic stress in the mitochondria, causing its outer membrane disruption and cell death trough apoptosis.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

CR	Centros de Replicación
DMSO	Dimetil Sulfóxido
dsRNA	RNA de doble cadena (double astringí RNA)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FCV	Calicivirus Felino (Feline Calicivirus)
gRNA	RNA genómico (genomic RNA)
H.p.i	Horas post infección
H.p.t	Horas post transfección
HCV	Virus de la Hepatitis C (Hepatitis C Virus)
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana (Human Immunodeficiency Virus)
HuCoV	Coronavirus Humano (Human Coronavirus)
HuNoV	Norovirus Humano (Human Norovirus)
HuRV	Rotavirus Humano (Human Rotavirus)
IAP	Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (Apoptosis Inhibitor Proteins)
IPTG	isopropiltio- β -galactosidasa
LB	Luria-Bertani
LC	Líder de la Cápside
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
MNV	Norovirus Murino (Murine Norovirus)
NS	No estructural (Non-structural)
OD	Densidad óptica (Optical Density)
ORF	Marco Abierto de Lectura (Open Reading Frame)
PAGE	Electroforesis de geles de poliacrilamida (Polyacrilamye Gel Electrophoresis)
PBS	Buffer de fosfatos salinos (Phosphate Saline Buffer)
PCR	Reacción en cadena de polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PV	Poliovirus
RE	Retículo Endoplásmico
RT-PCR	Reacción en cadena de Polimerasa con Transcripción Reversa (Reverse transcription Polymerase Chain Reaction)
sgRNA	RNA sub genómico (subgenomic RNA)
ssRNA-	RNA de cadena sencilla y polaridad negativa (single stranded, negative sensed-RNA)
ssRNA+	RNA de cadena sencilla y polaridad positiva (single stranded, positive sensed-RNA)
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
VF1	Factor de Virulencia 1 (Virulence Factor 1)

1. INTRODUCCIÓN

1.1) Calicivirus

Los miembros de la familia *Caliciviridae* son virus no envueltos de estructura icosaédrica cuya cápside mide de 35 a 40 nanómetros de diámetro y que pertenecen al grupo IV de la clasificación de Baltimore. Esta familia se divide en 5 géneros aceptados (*Norovirus*, *Lagovirus*, *Nebovirus*, *Saporovirus* y *Vesivirus*) que infectan a una gran variedad de vertebrados y poseen genotipos de importancia médica, veterinaria y pecuaria. Anualmente causan pérdidas humanas y económicas millonarias alrededor del mundo, (Fields, B. N., In Knipe, D. M., 2013). Los Saporovirus y Norovirus humanos (HuNoV) son responsables de la mayoría de los brotes de gastroenteritis no bacteriana a nivel mundial (Concepts, Glass, Parashar, Estes, & Mountain, 2009), con más de 600 millones de casos y 200, 000 muertes por año (Kirk, Pires, Black, Caipo, & Crump, 2015), con riesgo de complicaciones en poblaciones vulnerables y en personas inmunocomprometidas (Bok & Green, 2012).

La ruta de transmisión de los calicivirus que infectan humanos es fecal-oral, principalmente debida al consumo de alimentos contaminados. A la fecha no existe un tratamiento farmacológico para controlar o erradicar la infección, y los candidatos a vacunas más prometedores contra norovirus humanos se encuentran en la fase de prueba clínica (Mattison, Cardemil, & Hall, 2018). A pesar de los recientes avances en el desarrollo de enteroides (cultivos tridimensionales de distintos tipos celulares organizados de manera similar al intestino) (Costantini et al., 2018) y en el uso de embriones de pez cebra (Van Dycke et al., 2019) en donde propagar la infección, los HuNoV carecen de un modelo efectivo de replicación *in vitro*, razón por la que, a la fecha, varios de los procesos moleculares involucrados en su ciclo de replicación no han sido completamente dilucidados. A falta de un modelo de cultivo eficiente de los HuNoV se han usado las últimas dos décadas como modelo de infección otros calicivirus que son capaces de replicarse de manera eficiente en cultivo

celular, y que poseen un sistema de genética reversa; de estos modelos, el Calicivirus felino (FCV) que pertenece al género *Vesivirus* y el Norovirus Murino (MNV) perteneciente al género *Norovirus* han arrojado información valiosa para el entendimiento de la biología y del ciclo de replicación de esta familia de virus; sin embargo, las particularidades de cada género en su estructura genómica y su ciclo de replicación impiden una transversalidad total de la información obtenida para aplicarse a los HuNoV. (Vashist, Balley, Putics, & Goodfellow, 2009) .

1.2) Genoma de los calicivirus

Los calicivirus tienen un genoma de RNA de cadena sencilla y de polaridad positiva (ssRNA+) con una longitud 7 a 8kpb que está unido covalentemente a la proteína Vpg en su extremo 5' y que promueve la traducción viral y en su 3' se encuentra poliadenilado (Fields, B. N., In Knipe, D. M., 2013). Este genoma contiene de 2 a 4 marcos de lectura abiertos (del inglés open reading frame u ORF) dependiendo del género; en todos los calicivirus el primero codifica para las proteínas no estructurales, y en los *Vesivirus* y *Norovirus* los marcos 2 y 3 dan lugar a las proteínas no estructurales mayoritaria y minoritaria de la cápside o VP1 y VP2 respectivamente. Particularmente en los *Vesivirus*, la VP1 es procesada para dar origen a la proteína líder de la cápside o LC y a la proteína VP1 madura(Sosnovtsev, Sosnovtseva, & Green, 1998). Los norovirus poseen además un cuarto ORF que codifica para la proteína VF1 (viral factor 1) (Thorne & Goodfellow, 2014). El genoma de los calicivirus posee dos regiones no codificantes o regiones no traducidas (RNT) en sus extremos 5' y 3' que tienen papeles regulatorios en el ciclo de replicación del virus. La RNT 5' tiene una longitud de entre 5 y 25 nucleótidos mientras que la del extremo 3' puede abarcar entre 30 y hasta 60 nucleótidos. Ambas regiones contienen estructuras secundarias conservadas a las que se asocian factores celulares para facilitar su traducción y replicación (Alhatlani, Vashist, & Goodfellow, 2015a).

1.2.1) Genoma de Calicivirus felino

El genoma de Calicivirus felino es de ~7.7kpb de largo y contiene 3 marcos abiertos de lectura, el primero se produce a partir del genoma viral, mientras que los otros dos solo se traducen a partir de un RNA subgenómico (sgRNA). El primer ORF codifica para la poliproteína precursora de las 6 proteínas no estructurales (NS1 a NS6/7), el ORF2 produce una poliproteína denominada precursor de la cápside que es escindido por la proteasa viral dando lugar a las proteínas LC y VP1; el tercer marco abierto de lectura codifica para la proteína estructural VP2 (Alhatlani, Vashist, & Goodfellow, 2015b; Fields, B. N., In Knipe, D. M., 2013).

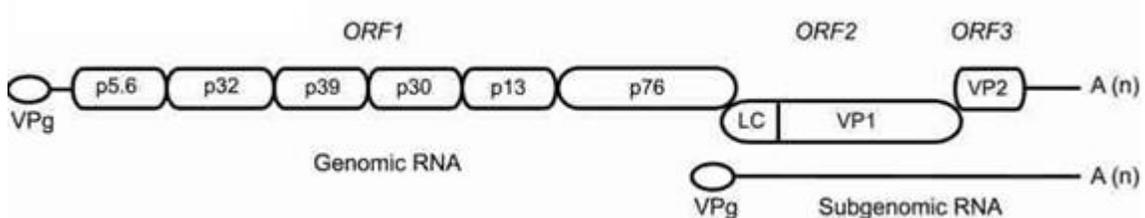


Figura 1) Diagrama del genoma de FCV El ORF1 codifica a las proteínas no estructurales (NS 1 o p5.6, NS2 o p32; NS3 o p39; NS4 o p30; NS5 o p13 o VPg; NS6/7). El ORF2 y 3 codifican a las proteínas estructurales o VP1 y VP2 que forman la cápside viral que se codifican a partir de un RNA subgenómico. Tanto el RNA genómico como el subgenómico poseen a la proteína VPg unida covalentemente en el extremo 5' y se encuentran poliadenilados. Tomado de (Alhatlani et al., 2015b).

1.3) Ciclo de replicación de Calicivirus felino

Se define como ciclo de replicación de FCV al proceso molecular que comienza con la unión y entrada del virión a la célula anfitriona y concluye con la liberación de partículas virales infecciosas al medio extracelular y la muerte celular por apoptosis.

El primer contacto virus-célula está mediado por la interacción entre la proteína estructural del virión VP1 con la molécula de adhesión JAM-1, que funge como receptor funcional, iniciando el proceso de endocitosis de la partícula viral mediada por clatrina y colesterol; la internaliza en un endosoma que se va acidificando conforme ocurre su proceso de maduración, ocasionando

cambios en la estructura de la cápside viral que derivan en la liberación del genoma del calicivirus al citoplasma, donde comienza a traducirse, tras la interacción de Vpg, con los factores canónicos de la traducción. La traducción del ORF1 da lugar a la poliproteína que es procesada en cis y trans de manera co-traduccional por la proteasa viral NS6/7 para dar lugar a las 6 proteínas no estructurales NS1 a NS6/7 cuyas funciones aun no son del todo conocidas y varían entre familias de virus. NS3 es una NTPasa, la NS5 o VPg se encuentra unida covalentemente al genoma viral en el extremo 5' y promueve el inicio de la traducción independiente de cap y la NS6/7 es la proteasa-polimerasa viral; En conjunto, las proteínas NS proporcionan el ambiente adecuado para la replicación del genoma viral. Algunos de los requisitos para que este entorno sea favorable para el virus son la inhibición de la respuesta inmune celular antiviral, un re-arreglo de membranas del retículo endoplásmico para la formación de estructuras complejas denominadas fábricas de replicación viral o complejos de replicación y la alteración del complejo del poro nuclear para la relocalización de proteínas nucleares a los complejos de replicación . La replicación del genoma viral es llevada a cabo por la función de RNA polimerasa dependiente de RNA de la proteína NS6/7 para dar lugar a la formación de un ssRNA- a partir del cual se producen el ssRNA+ genómico y el sgRNA que es idéntico en secuencia a los marcos abiertos de lectura 2 y 3 y está unido covalente en su extremo 5' a la proteína Vpg. El sgRNA es traducido para producir a un péptido precursor que da origen a la proteína mayoritaria de la cápside o VP1 madura y a la proteína 14kDa conocido como LC, ambas codificadas en el ORF 2, y a la proteína minoritaria de la cápside o VP2, codificada en el ORF3. En estos complejos ocurre la acumulación de las proteínas estructurales, que se auto ensamblan en conjunto con el RNA genómico viral y forman los viriones maduros antes de que la célula muera por apoptosis (Natoni, Kass, Carter, & Roberts, 2006), La mayoría de los viriones maduros están presentes en los cuerpos apoptóticos que son fagocitados por los macrófagos facilitando su propagación en el huésped. Asimismo, una

minoría de partículas virales es liberada directamente al medio extracelular, infectando a las células aledañas (Figura 2).

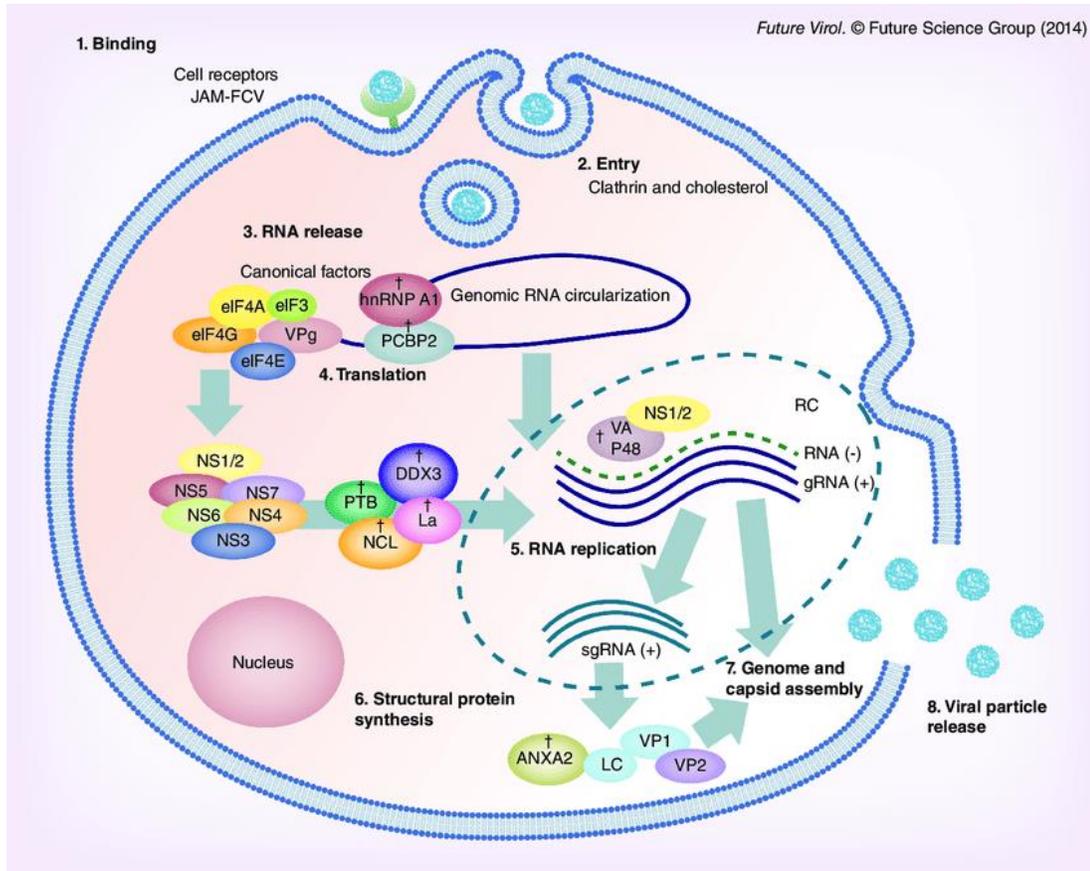


Figura 2) Ciclo de replicación de FCV. El ciclo de replicación de FCV comienza con la interacción de la proteína de la cápside VP1 con la proteína de unión estrecha JAM-1. El virión es internalizado por endocitosis mediada por receptor, donde la acidificación de la vesícula en la que se encuentra permite cambios estructurales en la cápside que culminan con el escape del genoma viral al citoplasma. Éste es reconocido como mRNA por la maquinaria de traducción celular y da lugar a la poliproteína que se escinde para dar lugar a las proteínas no estructurales. Estas proteínas llevan a la célula a un estado alterado óptimo para la replicación viral. Se forman los compartimentos de replicación (RC) donde el genoma es replicado para dar lugar al gRNA y sgRNA, la expresión y acumulación de las proteínas virales VP 1, VP2 y LC, así como el ensamblaje y maduración de virones. Finalmente, el virus sale de la célula principalmente por medio de apoptosis causada por la proteína LC. (Imagen tomada de Gutiérrez-Escolano 2014)

1.4) Proteína Líder de la Cápside de Calicivirus felino es responsable de la inducción de la apoptosis.

Descrita por primera vez en 1998 por Sosnovstev y colaboradores (Sosnovtsev et al., 1998), la proteína LC se encuentra codificada en el ORF2 del genoma de los *Vesivirus*. El ORF2 es traducido como una poliproteína de 73kDa prontamente escindida por la proteasa viral para liberar a LC y a la proteína estructural VP1 (Tohya et al., 1999). Con una longitud de 124 aminoácidos y un peso de aproximadamente 14kDa, la proteína LC es exclusiva de los *Vesivirus* y se necesita para la correcta producción de partículas virales maduras.

La proteína LC de todos los *Vesivirus* posee dos regiones conservadas o CR (del inglés conserved regions), denominadas CRI y CRII; en la LC del FCV, la CRI comprende a los aminoácidos 33-40 y contiene 3 cisteínas conservadas en las posiciones 33, 39 y 40, un aspartato conservado en la posición 34 y una prolina conservada en la posición 36. La CRII del FCV se encuentra en los aminoácidos 108-112 y consiste en tres prolinas conservadas en las posiciones 108, 111 y 112 (Figura 3). Se ha identificado que en la infección por FCV las cisteínas de la CRI de la proteína LC son responsables del efecto citopático característico de la infección, porque éste se pierde cuando cualquiera de ellas es sustituida por una alanina. Asimismo, mutaciones en la CRII disminuyen el efecto citopático del virus únicamente si las tres prolinas conservadas son reemplazadas por alaninas simultáneamente; En la infección con los mutantes que no son capaces de establecer el efecto citopático característico de la infección, también se observa una reducción en la producción de partículas virales, a pesar de que es posible la detección del genoma viral por medio de la técnica de transcripción reversa acoplada a una reacción en cadena de polimerasa o RT-PCR (del inglés reverse transcription and polymerase chain reaction). Lo anterior sugiere que el establecimiento del efecto citopático está asociado con un ciclo de replicación viral efectivo. (Abente et al., 2013).

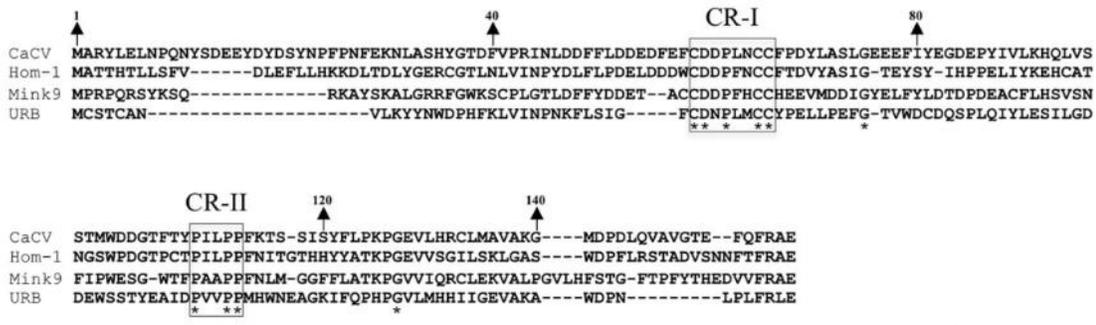


Figura 3) Alineamiento de la proteína Líder de la Cápside de distintos Vesivirus. Se señalan las regiones conservadas I y II (Abente et al., 2013).

Trabajo reciente en nuestro laboratorio por (Barrera-Vázquez et al., 2019), demostró que la expresión de LC en células CRFK ocasiona un efecto citopático similar al de las células infectadas con FCV e induce apoptosis por la vía intrínseca al ocasionar la relocalización de proteínas mitocondriales como Smac/DIABLO al citoplasma, la degradación de proteínas inhibitorias de la apoptosis de la familia de las IAP (del inglés Inhibitor of apoptosis proteins) como XIAP y survivina y la activación de la caspasa efectora 3. Asimismo, se observó la localización de la proteína LC en la membrana externa de la mitocondria, particularmente cerca de zonas de disrupción de la membrana, lo que nos lleva a pensar que la LC es una proteína tóxica que induce la apoptosis mediante algún mecanismo aún desconocido.

1.5) Viroporinas

Las viroporinas son una amplia familia de proteínas virales organizadas por sus características generales y su función. Son pequeñas, generalmente de un tamaño menor a 200 aminoácidos y se insertan en membranas donde oligomerizan para formar poros o canales alterando funciones celulares que le permiten al virus una replicación exitosa (Giorda & Hebert, 2013), (Scott & Griffin, 2015). Las viroporinas se encuentran codificadas a lo largo de todos los tipos de genoma viral y la mayoría de ellas comparte motivos específicos, entre los que se encuentran al menos un dominio transmembranal y una región

conservada rica en aminoácidos básicos (Luis Martinez-Gil & Mingarro, 2015). Algunas viroporinas tienen un mecanismo de acción intracelular, como la proteína 2B de Poliovirus (PV) (L. Martinez-Gil et al., 2011), mientras que otras son liberadas para actuar en células aledañas o en otros sitios del organismo infectado, cumpliendo también la función de toxinas como en el caso de la viroporina NSP4 del Rotavirus Humano (HuRVs) (Tafazoli, Zeng, Estes, Magnusson, & Svensson, 2001). Las funciones de las viroporinas intracelulares son múltiples y se relacionan con la reorganización de membranas del retículo endoplásmico, para la formación de fábricas de replicación viral; ayudan a la gemación de partículas virales maduras, como M2 de Influenza (Rossman, Jing, Leser, 2011); alteran el equilibrio iónico, como en el caso de la toxina NSP4 de Rotavirus humano, (Hyser, Collinson-Pautz, Utama, & Estes, 2010); alteran severamente el tráfico vesicular, como Vpu del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) (González, 2015) o inducen apoptosis a través de distintas vías de señalización, como en los casos de la proteína P7 de virus de la Hepatitis C (HCV) y M2 de Influenza (Madan, Castelló, & Carrasco, 2008), (Aweya, Mak, Lim, & Tan, 2013). La clasificación más usada para las viroporinas se hace acorde al número de dominios transmembranales que posee, la mayoría pertenece al grupo I o II; sin embargo, a medida que se van descubriendo nuevas viroporinas este agrupamiento se modifica; ejemplo de ello es que se han descrito nuevas viroporinas putativas que poseen hasta 7 regiones transmembranales (Shrivastava et al., 2017). Otro parámetro que influye en su clasificación, es el hecho de que las regiones transmembranales de algunas viroporinas no se requieren para su funcionamiento; por ejemplo, el péptido delta del virus Ébola, a pesar de poseer una región transmembranal precedida de una región polibásica, no depende de ellas para oligomerizar o permeabilizar membranas celulares (He et al., 2017). En este caso, se ha reportado que su función de permeabilización de membranas es mediante la formación de puentes disulfuro entre aminoácidos de cisteínas (He et al., 2017). De igual manera, la proteína E del Coronavirus humano (HuCoV) aumenta su capacidad de

oligomerización gracias a la formación de estos puentes disulfuro (Liao, Yuan, Torres, Tam, & Liu, 2006). El papel de las modificaciones post traduccionales, particularmente de los puentes disulfuro en viroporinas, no ha sido explorado a detalle aún; sin embargo, su importancia ha sido ampliamente descrita en los péptidos antimicrobianos.

1.6) Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos, son una familia de proteínas ampliamente distribuida entre organismos pluricelulares, forman parte de su sistema inmune innato y tienen la capacidad de formar poros en la superficie de microorganismos potencialmente patógenos alterando su equilibrio osmótico e induciendo su lisis (Ma et al., 2016).

Dada su gran distribución, los péptidos antimicrobianos no poseen secuencias conservadas, pero se han identificado firmas moleculares con fórmulas generales en secuencia y estructura para identificar péptidos antimicrobianos putativos (Schmitt, Rosa, & Destoumieux-Garzón, 2016). Una de estas firmas moleculares se encuentra conservada en la familia de las defensinas y consiste en la secuencia de cisteínas conservadas [GxC(X₃₋₉)C] que forman los puentes disulfuro, y se arreglan tridimensionalmente en un asa flexible conservada denominada motivo- γ (Figura 3) (Yount, 2004). Se ha reportado que la formación de estos puentes es necesaria para la integración de algunos péptidos en la membrana o en la pared bacteriana (Harwig, 1996), (Patil et al., 2015), (Ma et al., 2016), (He et al., 2017).



Figura 4) Firmas moleculares de péptidos antimicrobianos. A) Firma molecular de péptidos antimicrobianos que contienen cisteínas. B) Estructura tridimensional de péptidos antimicrobianos con el motivo-γ estructural resaltado en rojo.

2. JUSTIFICACIÓN

Diversos miembros de la familia *Caliciviridae* tienen relevancia médica, pecuaria y veterinaria. La falta de un modelo de replicación efectiva *in vitro* de norovirus humanos ha dificultado su estudio; el FCV es uno de los modelos alternativos más usados para el estudio de su biología en las últimas décadas, por su capacidad de ser replicado efectivamente *in vitro* y por tener un sistema de genética reversa. La proteína líder de la cápside, exclusiva de los *Vesivirus*, induce la apoptosis, un evento crucial para la dispersión de los calicivirus en el huésped; sin embargo, se desconoce cuál es el mecanismo de acción y si posee un papel adicional en el ciclo de replicación viral. Determinar si la proteína LC es una vioporina y caracterizar bioquímica y celularmente su mecanismo de acción, contribuirá a dilucidar los procesos moleculares que permiten una producción eficiente de la progenie viral y al entendimiento de la biología molecular de estos virus.

3. HIPÓTESIS

La proteína Líder de la Cápside de FCV es una vioporina.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la proteína Líder de la Cápside de FCV posee características de vioporina clásica y cuál es su mecanismo de acción.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar mediante análisis bioinformáticos si la proteína LC de FCV tiene características de viroporina clásica o no clásica.
- Sub clonar los genes de la proteína LC y LC-C40A de FCV en el modelo de expresión procarionte pRSETA.
- Determinar la capacidad de oligomerización de las proteínas LC y LC-C40A de FCV, así como la importancia de los puentes disulfuro en la formación de los oligómeros.
- Determinar la toxicidad de las proteínas LC y LC-C40A de FCV en bacterias.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1) Construcción y propagación de plásmidos

Para la construcción de pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A, se realizó una reacción de digestión de los vectores de expresión eucariota pAm-Cyan-LC y pAm-Cyan-LC-C40A con las enzimas XhoI y HindIII (5µl Universal Buffer Jenna Life Biosciences 10X, 1.5µg DNA, 20U de XhoI, Jenna Life Biosciences 15U HindIII New England Biolabs y ddH₂O necesaria para llevar la reacción a un volumen final de 50µl. La reacción se incubó 16hrs a 37°C y la liberación del fragmento de LC o LC-C40A se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X (Tris base 100mM, ácido bórico 100mM, EDTA 2mM). Estos fragmentos fueron aislados y purificados a partir del gel con el kit de purificación de QIAGEN QIAquick® siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Por otro lado, el vector pRSETA fue digerido con las enzimas XhoI y HindIII bajo las condiciones anteriormente descritas y purificado por medio de 3 ciclos de congelación y descongelación repetida a -80°C seguidos de separación de la fase líquida del gel, precipitación del DNA por medio de 2 volúmenes de isopropanol frío por 2hrs a -20°C, centrifugación por 30min en

tubos de microcentrífuga de 1.5ml a 14,800 RPM 4°C y finalmente resuspensión en 20 µl de ddH₂O) siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.2) Preparación de células quimiocompetentes por CaCl₂

Las bacterias *E. Coli* cepa DH5-α, o BL21(DE3)pLysS se sembraron en una placa de Luria Bertani (LB) + Agar (10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl y 15g de agar para 1l de ddH₂O) o LB, Agar y Cloranfenicol (25mg/ml) según sea el caso y se incubaron de 12 a 16hrs a 37°C. Se picó una colonia con un palillo estéril y se inoculó en 10ml de medio SOB (2g de triptona, 0.5g de extracto de levadura, 0.05g de NaCl, 1ml de KCl 250mM y ddH₂O cuanto baste para 100ml finales) o SOB con Cloranfenicol y se incubó de 12 a 16hrs a 37°C. Se utilizó ese pie de cultivo para inocular 100ml de medio LB (10g de bacto triptona, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl para 1000ml de ddH₂O) cuya densidad óptica (OD) se analizó por espectrofotómetro de haz de luz de incidencia horizontal (Bio Rad Smart Spec Plus®) a una longitud de onda de 600 nanómetros (OD₆₀₀) hasta que el cultivo llegó a la fase de crecimiento exponencial (0.4-0.5), momento en el que se recolectaron las bacterias para centrifugar a 4,000 RPM por 15 min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla celular se re suspendió suavemente en 8ml de solución de CaCl₂ (CaCl₂ 50mM, KCl 100mM, KAc pH 7.5 10mM, glicerol 10% (w/v)) previamente enfriado a -20°C. Las células se incubaron por 15min a 4°C y se centrifugaron en las condiciones descritas anteriormente, se descartó el sobrenadante y las células se re suspendieron en 2ml de SFB frío a los que se les añadieron 70µl de DMSO a temperatura ambiente dos veces, con incubaciones a 4°C de 15min cada una y finalmente se hicieron alícuotas en tubos de microcentrífuga de 0.6ml con 100µl de bacterias cada uno, almacenándose a 80°C para su posterior uso.

6.3) Transformación de células quimiocompetentes por choque térmico

Células *E. coli* DH5-α o BL-21 quimiocompetentes fueron incubadas en hielo con 50-100ng de DNA plasmídico de 10 a 20 min antes de ser sometidas a un choque térmico por 60 segundos a 42°C; inmediatamente se incubaron 2min

a 4°C antes de ser transferidas a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml, donde se les suplementó con 1ml de medio LB y se incubaron durante una hora a 37°C. Posteriormente, se sembraron en cajas de medio LB con agar suplementadas con el antibiótico de selección correspondiente (Ampicilina 100mg/ml, cloranfenicol 25mg/ml o ambos, según sea el caso) incubándose de 12 a 15hrs a 37°C. Se picaron colonias del centro de las cajas de Petri para inocular cultivos de 5ml de LB con los antibióticos correspondientes. Se hicieron respaldos de glicerol (medio LB con antibiótico y 30% de glicerol) de las bacterias transformadas y se almacenaron a -80°C.

6.4) Extracción de DNA plasmídico

Para la extracción del DNA plasmídico se utilizó el kit de Fast Plasmid Midi Kit® de IBI Lifesciences, siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente: a partir de colonias crecidas en cajas de LB agar o de respaldos de glicerol, se inoculó medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se dejó crecer de 12 a 16hrs a 37°C en las condiciones previamente descritas. Se transfirieron las bacterias a tubos para centrífuga, y se centrifugaron por 20 min a 3000 RCF. Se descartó el sobrenadante y la pastilla celular se re suspendió en 4ml de solución de resuspensión PM1 previamente enfriada a 4°C y suplementada con RNAsa I. Se adicionaron 4ml de PM2 para la lisis de las bacterias, invirtiendo el tubo 10 veces con cuidado de no romper el precipitado formado; inmediatamente después se neutralizó la solución de lisis con 4ml de PM3 y se volvió a mezclar por inversión para dejar el lisado incubándose a 4°C por 20min. Pasado este tiempo, se centrifugaron los lisados a 15,000 RCF por 30min y se recuperó el sobrenadante para purificarse por una columna de unión a DNA previamente equilibrada con 5ml de PEQ, se lavó la columna con 12ml de PW y se eluyó el plásmido con 8ml de PEL, que fue precipitado por 0.75 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente y centrifugado a 15,000 RCF 4°C durante 30min. Se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado con Etanol al 75% en ddH₂O, centrifugando a 15,000 RCF a 4°C por 15min antes de finalmente re suspender la pastilla en 1ml de ddH₂O para la primera elución y 0.5ml para la segunda.

También se realizaron extracciones de plásmido por medio de lisis alcalina, partiendo de 1ml de cultivo de bacterias transformadas crecidas a 37°C por 16hrs en medio LB con el antibiótico de selección correspondiente. Las bacterias fueron centrifugadas a 14,800 RPM por 5 min y el sobrenadante fue descartado. Se realizó una resuspensión en ddH₂O y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones y de nuevo se descartó el sobrenadante. Las bacterias fueron re suspendidas en 100µl de solución I (50mM glucosa, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH 8.0) por medio de pipeteo suave, para poder ser lisadas en su totalidad con 200µl de solución II (0.2N NaOH, 1% SDS) al ser agitadas por inversión suavemente 10 veces e incubarse a temperatura ambiente 3min. La reacción de lisis fue interrumpida con 300µl de solución III (3M KAc, 2M ácido acético) y agitación por inversión en 10 ocasiones, antes de incubar a 4°C por 3min previamente a la centrifugación a 14, 8000 RPM a 4°C por 15min. El sobrenadante fue recuperado en un tubo de 1.5ml nuevo y se precipitó el DNA con 1ml de EtOH absoluto previamente enfriado a -20°C incubándose a temperatura ambiente por 10min antes de ser centrifugado con las condiciones anteriores. El pellet de DNA lavado con 500µl de EtOH al 75% y el tubo es incubado a temperatura ambiente por 10min boca abajo para que trazas de EtOH se evaporen antes de ser re suspendido en 20-30µl de ddH₂O recién esterilizada en autoclave.

6.5) Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA se llevó a cabo por la Unidad de Secuenciación y Síntesis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (IBt-UNAM) con el protocolo que se encuentra en su servidor y utilizando el oligonucleótido del promotor de T7 forward (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3') que ellos proveen. Los electroferogramas resultantes fueron analizados por medio del software libre Finch TV (Geospiza, Inc.), alineados con T-Coffee y se buscaron marcos abiertos de lectura con Open Reading Frame Finder del NCBI.

6.6) Inducción de expresión génica por IPTG

Medio LB con el antibiótico correspondiente fue inoculado con las colonias de interés e incubado en las condiciones anteriormente descritas. Una vez alcanzada la densidad adecuada para cada plásmido (OD 600 0.4-0.6), se indujo la expresión del plásmido por medio de isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG, Thermo Fisher Scientific) a una concentración final de 1mM.

6.7) Obtención de extractos proteicos de bacterias

Células de *E. coli* fueron centrifugadas a 5,000 RPM a temperatura ambiente por 10 min, el sobrenadante fue descartado y la pastilla celular se resuspendió en 200 μ l de medio Laemmli 2X (4% SDS, 20% glicerol, 0.125M Tris-HCl pH 6.8, 10% β -mercaptoetanol, 0.04% azul de bromofenol) por cada mililitro de cultivo celular. La muestra se incubó a baño maría por 10min para posteriores realizar los ensayos de SDS-PAGE.

6.8) Análisis de proteínas por SDS-PAGE

Extractos celulares obtenidos en buffer Laemmli 2X fueron hervidos por 5min y sometidos a SDS-PAGE a voltaje constante en un gel desnaturizante de acrilamida al porcentaje correspondiente. El gel se tiñó con solución de azul de Coomassie (40% metanol, 10%ácido acético glacial, 0.02% azul de Coomassie Brilliant Blue-R) durante 10 min a temperatura ambiente y se destiñó con solución de desteñido (40% v/v metanol y 10% v/v ácido acético glacial) o ddH₂O.

6.9) Enriquecimiento de cuerpos de inclusión

Cultivos de bacterias de 50ml a las 4h.p.i. fueron centrifugados en tubos cónicos de 50ml a 300g 5'; el sobrenadante fue descartado y el pellet lavado con 5ml totales de PBS. Las pastillas celulares fueron re suspendidas en 1ml de PBS cada una y se juntaron en un tubo cónico de 15ml. Se adicionaron 1mg de lizozima y 10 μ l de coctel inhibidor de proteasas incubándose en hielo 30 min. Se sonicaron los esferoplastos con en 10 pulsos de 10 seg cada uno con 100% de amplitud. Se centrifugó la muestra a 14,8000RPM a 4°C por 20min y se re suspendió el botón en 1.5ml de Laemmli 2X.

6.10) Purificación de proteínas por electroelución

Extractos celulares en Laemmli 2X fueron hervidos por 5 min y se corrieron en los diez carriles de un gel de SDS-PAGE como se describe previamente. Se escindió con un bisturí un carril y se tiñó con solución de azul de Coomassie por 5 min. Se alineó el resto del gel al carril teñido con azul y se escindió en un corte horizontal a lo largo de los nueve carriles a la altura de la proteína de nuestro interés, que se cortó en trozos cúbicos de menos de 0.5mm por lado para ser electroeluidos en la cámara de electroelución Little Blue Tank® al tiempo y voltaje correspondiente. Se confirmó la presencia de la proteína por medio de SDS-PAGE y/o western blot.

6.11) Ensayos de Western Blot

Extractos celulares en Laemmli 2X fueron hervidos por 5 min y se sometieron a SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de diámetro de poro de 0.22µm por medio de una cámara de transferencia húmeda a voltaje constante. Se bloqueó la membrana por 2hrs en TBS (50mM Tris, 150mM NaCl) - Tween 0.05% v/v con 5% w/v de leche descremada sin grasa y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario correspondiente a la concentración indicada a 4°C durante 12-16hrs en agitación.

Se realizaron 3 lavados de 5min c/u con TBS-Tween 0.05% y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente a la concentración previamente determinada a temperatura ambiente durante 2hrs en agitación.

El revelado de los western blots se hizo con el kit de quimioluminiscencia SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) y placas fotosensibles Carestream en las membranas previamente lavadas 3 veces de la misma manera que antes e incubadas con el ECL durante 3min.

6.12) Ensayos de oligomerización

Proteína Histag-LC o LC-C40A aislada y purificada de cuerpos de inclusión de bacterias transformadas se corrió en concentraciones crecientes en un gel de

poliacrilamida al 11% en condiciones no desnaturalizantes (sin hervir la muestra 5 min y sin adición de agente reductor al buffer Laemmli 2X, se hizo un western blot con el anticuerpo α -Histag a una concentración de 1:1000 en TBS-Tween 0.05% (3ml) a 4°C durante 24hrs, el anticuerpo secundario usado fue α -Inmunoglobulina G de ratón acoplado a peroxidasa de rábano en TBS-Tween al 0.05% y con 1% de leche a una concentración de 1:5000 (5ml) a 4°C durante 24hrs, revelándose con las condiciones previamente descritas.

6.13) Ensayos de toxicidad por conteo de unidades formadoras de colonia

Gliceroles de células *E. coli* B121(DE3)pLysS quimiocompetentes transformadas con el plásmido pRSETA, pRSETA-LC o pRSETA-LC-C40A se crecieron en 5ml de medio LB con ampicilina y cloranfenicol por 16hrs. Se hicieron diluciones 1:1,000,000 en un volumen final de 1ml, de los cuales una quinta parte se usó para inocular cajas de LB+Agar o LB+Agar+IPTG1mM, incubándose a 37°C por 12hrs. Las colonias fueron cuantificadas con el software Image J. Se hicieron comparaciones entre el número de unidades formadoras de colonia (UFC) de células crecidas en presencia o ausencia de IPTG y se realizó una prueba estadística de los experimentos por triplicado por medio de la prueba de T student.

6.14) Determinación de cambios en la DO600 en bacterias expresando LC y LC-C40A

Gliceroles de células *E. coli* B121(DE3)pLysS quimiocompetentes transformadas con el plásmido pRSETA, pRSETA-LC o pRSETA-LC-C40A se crecieron en 5ml de medio LB con ampicilina y cloranfenicol por 16h. Se hicieron diluciones 1:100 para sembrar 160 μ l en placas de 96 pozos. Al alcanzar la densidad óptica 600 de 0.4, en tres pozos por condición se indujo la expresión de LC y LC-C40A por IPTG1mM y se analizaron cambios en la OD600 cada 15 min durante 3h. Se compararon las condiciones de cada clona transformada con o sin IPTG y LC o LC-C40A comparadas con la clona transformada con pRSETA por medio de la prueba estadística Anova en un solo sentido.

6.15) Microscopía electrónica de transmisión e inmunomarcaje con oro coloidal

Células *E. coli* BI21(DE3)pLysS transformadas con pRSETA, pRSETA-LC o pRSETA-LC-C40 se llevaron a una densidad óptica de 0.4 y se indujo la expresión de sus proteínas recombinantes con IPTG 1M por 3hrs antes de ser lavadas 3 veces con PBS y fijadas con glutaraldehído al 0.5% y paraformaldehído al 4% en PBS por 1 hora en agitación a temperatura ambiente a 4°C 16hrs. Las muestras fueron deshidratadas gradualmente con concentraciones crecientes de etanol y embebidas en resina LR White entrecruzándose por irradiación con luz ultravioleta a 4°C por 48hrs.

Cortes de ~60nm de grosor fueron colocados en gradillas de níquel e incubados con anticuerpo H3 anti histidinas (Santa Cruz Biotechnology) sin dilución por 16hrs y 1hr con anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con partículas de oro de 20nm de diámetro dilución 1:50 en PBS con 5% suero fetal bovino. Para contraste electrónico, las bacterias fueron tratadas con citrato de plomo y uranil-acetato. Las muestras fueron analizadas con el microscopio electrónico de transmisión Joel JEM-1011.

6.16) Predicciones *in silico*

Para el análisis *in silico*, la secuencia de LC de FCV cepa Urbana se obtuvo de la base de datos del National Center for Biotechnology Information y corroboró con la base de datos de ViPR. Los alineamientos de las secuencias se hicieron en el programa T-Coffee del European Bioinformatics Institute.

Para la detectar secuencias de localización subcelular de la proteína LC de FCV se utilizaron los siguientes programas de libre acceso:

Localización subcelular	Nombre del programa	Enlace
Núcleo	cNLS Mapper	http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi
Retículo endoplásmico	SignalP 4.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Periplasma citoplasmático mitocondrial	MitoFates	http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi

Los análisis de homología estructural, la predicción de estructuras secundarias y la creación de modelos de estructura terciaria *Ab Initio* se hizo con el software Quark de I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>). El software que utilizamos para predecir regiones intrínsecamente desordenadas de la proteína LC de FCV fue PrDOS (<http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>)

Las predicciones de modificaciones post traduccionales fueron las siguientes:

Modificación post traduccional	Programa	Enlace
Ubiquitilación	UbPred	http://www.ubpred.org/
SUMOilación	GPS-SUMO	http://sumosp.biocuckoo.org/
Fosforilación	NetPhos 3.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/
Adición de lípidos	GPS-Lipid	http://lipid.biocuckoo.org/presult.php

Puentes disulfuro	Disulfind	http://disulfind.dsi.unifi.it/
--------------------------	-----------	---

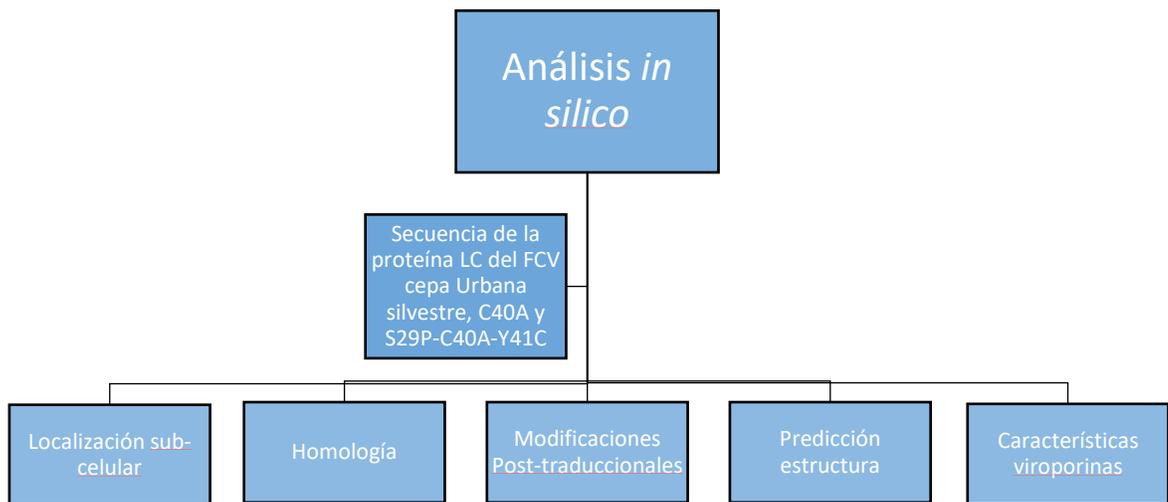
Para predecir las características de viroporina, se usaron los siguientes programas:

Característica	Programa	Enlace
Arreglo de α-hélice	NetWheels	http://lbqp.unb.br/NetWheels/
Hélice transmembranal	TMHMM 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/

7. DIAGRAMA DE TRABAJO

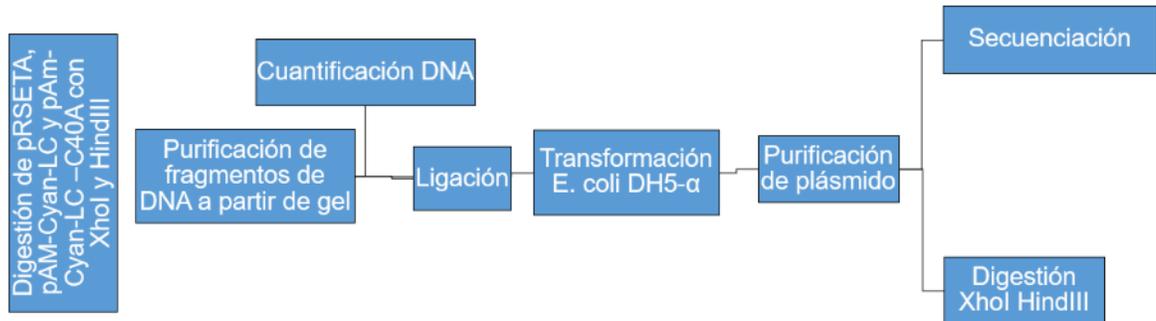
Para cumplir con los objetivos de este proyecto de investigación, se siguió el siguiente diagrama de trabajo.

7.1) Objetivo 1



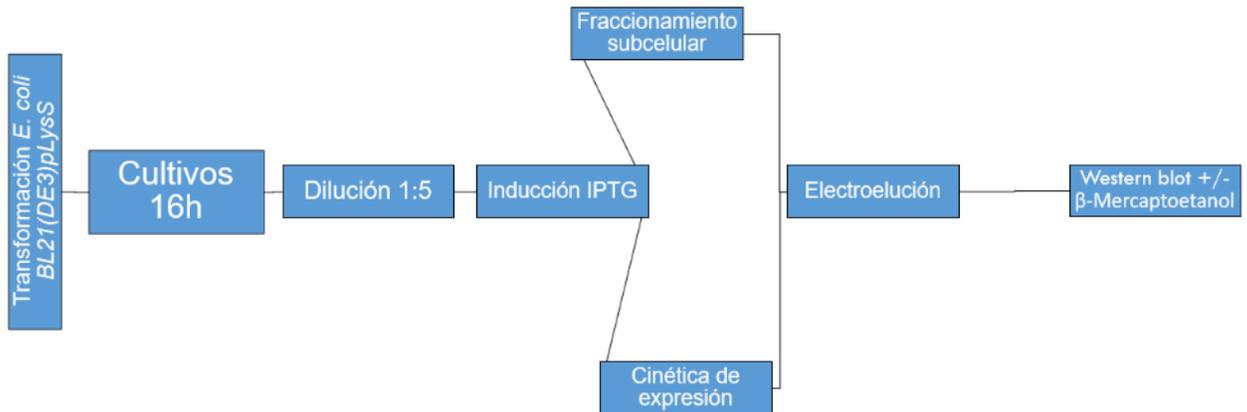
Para cumplir el objetivo 1 se obtuvieron las secuencias de NSP4 de HuRV, 2B de PV y LC cepa Urbana de FCV y se usaron los programas mencionados en materiales y métodos para analizarlas. Cuando se indique, se trabajó con las secuencias de LC C40A y LC S29P, C40A y Y41C.

7.2) Objetivo 2



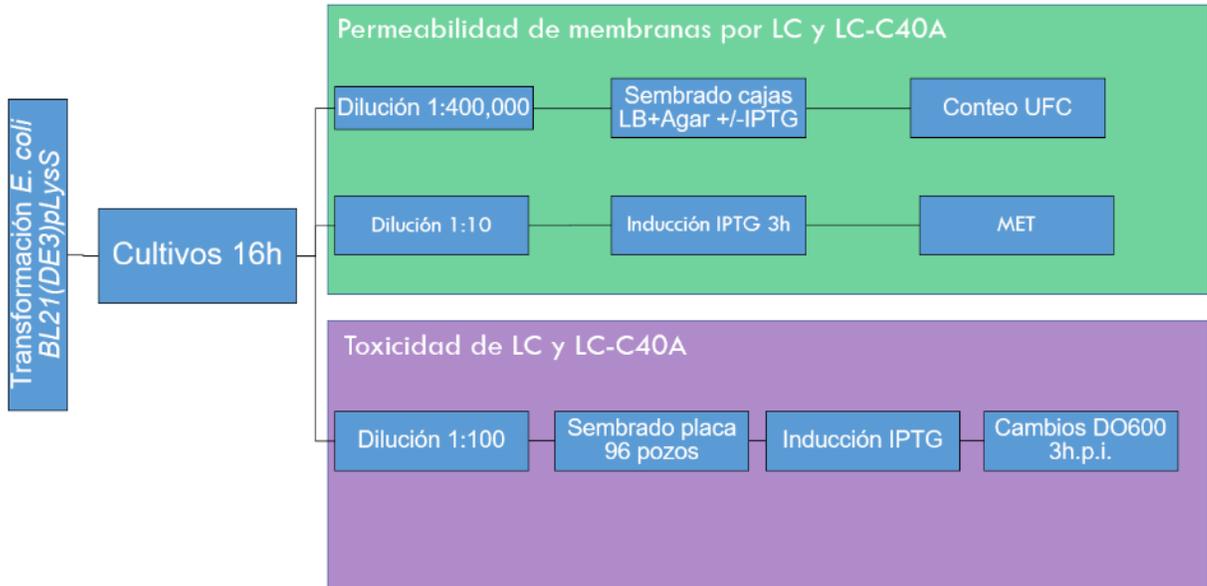
Se clonaron las secuencias codificantes de las proteínas LC silvestre y LC-C40A en el vector de expresión procarionte pRSETA a partir de los vectores pAm-Cyan-LC y pAm-Cyan-LC-C40A respectivamente, digiriendo los 3 vectores con las enzimas de restricción XhoI y HindIII, purificando los fragmentos a partir de geles de agarosa y estimando su concentración por electroforésis y espectrofotómetro. Se realizó una reacción de ligación y se transformaron bacterias *E. coli* DH5- α sembrándose en cajas con ampicilina para la selección de colonias positivas al plásmido. Se hicieron cultivos de LB+Amp a partir de esas colonias y se purificó plásmido de ellas para confirmar la ligación por medio de digestión por las enzimas de restricción XhoI y HindIII o secuenciando la región que sucede al promotor T7.

7.3) Objetivo 3



Se transformaron con nuestras construcciones bacterias *E. coli* quimiocompetentes cepa BL21(DE3)pLysS por medio de choque de calor y se estandarizaron las condiciones de expresión de las proteínas recombinantes Histag-LC y Histag-LC-C40A para su purificación por electroelución. Las proteínas purificadas fueron cuantificadas por medio de un kit de BSA (ThermoFisher Scientific) y se confirmó su tamaño por western blot con un anticuerpo anti Histag. La capacidad de oligomerización de estas proteínas fue evaluada por medio de SDS-PAGE en condiciones no astringentes y revelado por western blot con anti Histag.

7.4) Objetivo 4



E. coli BL21(DE3)pLysS transformadas con nuestras construcciones y con el plásmido pRSETA fueron crecidas en cultivos de LB+Amp+Clo 16h. Se hicieron las diluciones correspondientes acorde al ensayo y se sembraron en cajas de Petri con LB con Agar para conteo de UFC o de 96 pozos en LB para los ensayos de cambios de cambios en la DO600, donde se llevaron los cultivos a la DO de 0.4, se realizó la inducción con IPTG y se monitoreó la DO600 cada 15 min por 3h. Bacterias transformadas e inducidas por IPTG durante 3h fueron fijadas con glutaraldehído en PBS y procesadas para microscopía electrónica de transmisión (MET) e inmunomarcaje con partículas de oro coloidal en colaboración con la Dra. Bibiana Chávez-Munguía.

8. RESULTADOS

8.1.1) La proteína LC de FCV tiene una localización citoplásmica

Mediante el uso de programas que detectan las secuencias necesarias para que una proteína sea importada al núcleo, insertada cotraduccionalmente en

el retículo endoplásmico (RE), o vaya a la región periplásmica o a membranas mitocondriales, encontramos que esta proteína no tiene señales de localización para ninguno de estos compartimentos celulares (Tabla 1).

Localización subcelular	Nombre del programa	Resultado
Núcleo	cNLS Mapper	Negativo
Retículo endoplásmico	SignalP 4.1	Negativo
Periplasma citoplasma mitocondrial	◦ MitoFates	Negativo

Tabla 1) Secuencias putativas de localización subcelular de la proteína LC de FCV. No se encontraron secuencias que determinen localización distinta a la citoplásmica

Estos resultados sugieren que la proteína LC de FCV se puede localizar principalmente en el citoplasma.

8.1.2) La proteína LC de FCV no tiene regiones intrínsecamente desordenadas.

Debido a que las proteínas LC de los *Vesivirus* no presentan homología con otras proteínas reportadas hasta la fecha, se pensó que podría tener regiones intrínsecamente desordenadas, por lo que utilizamos el programa PrDOS con la secuencia de LC cepa Urbana buscando regiones que cumplieran estas características. Como podemos ver en la figura 5, prácticamente la totalidad de la proteína se mantiene sobre el umbral de ordenamiento (loops), y no posee regiones que puedan clasificarse como hot loops, que son un indicador de desorden. Estos resultados nos sugieren que la familia de proteínas LC

mantiene una estructura terciaria definida, si bien no presenta homología con otras proteínas reportadas en las bases de datos.

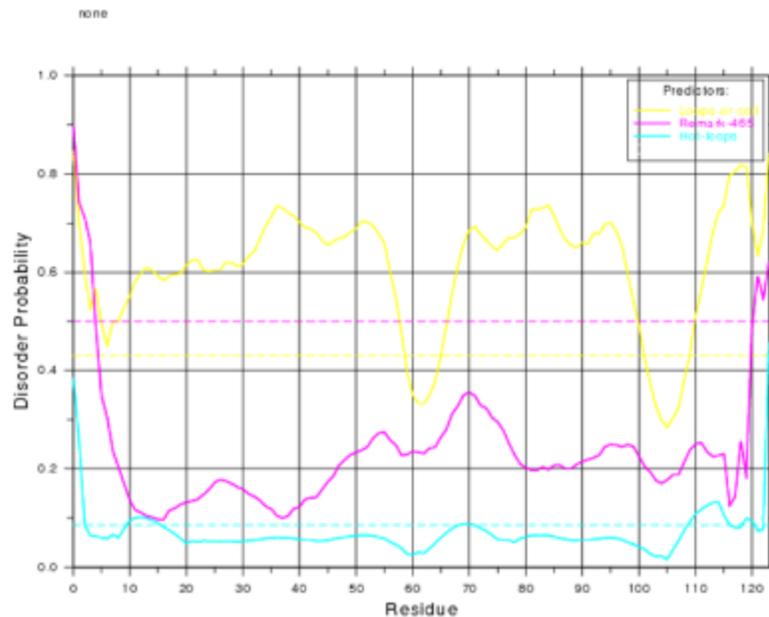


Figura 5) Análisis de desorden de la proteína LC de FCV. Los resultados del programa Protein Disorder Prediction System muestran como la proteína LC mantiene una región ordenada (loops) en casi su totalidad (amarillo), mientras que las regiones de Remark 465 y Hot Loops (rosa y azul), indicadores de desorden, no rebasan sus umbrales a lo largo de la proteína.

8.1.3) La proteína LC de FCV no cumple con las características clásicas de viroporina.

Para determinar si la proteína LC tiene características de viroporina, investigamos *in silico* la posible presencia de alguna región polibásica, ya que se ha reportado que diversas viroporinas tienen estas regiones conservadas que distribuyen sus cargas positivas en una cara de α -hélice, lo que le permite interactuar con las cargas de su membrana blanco, desestabilizándola y facilitando la inserción de una hélice transmembranal en la misma. La proteína LC de la cepa Urbana de FCV posee 3 lisinas en las posiciones 10, 20 y 26,

así como una histidina en la posición 17 (Figura 3). Su arreglo en α -hélice, sin embargo, muestra que solo dos cargas positivas se encuentran distribuidas del mismo lado de la hélice, mientras que la tercera lisina y la histidina se encuentran del lado contrario; esto es distinto a lo reportado en las viroporinas 2B de PV, NSP4 de HuRVa, Vpu y LLT de VIH, M2 de Influenza, E de HuCoV y péptido δ de Ébola, donde al menos 3 cargas positivas se encuentran distribuidas en una cara de la hélice, y están precedidas por un dominio de hélice transmembranal (Figura 6A). Se sometió la secuencia de la proteína LC de FCV al programa de predicción de dominios transmembranales y el resultado fue negativo (Figura 6B), por lo que concluimos que la proteína LC no tiene las cualidades de viroporina clásica.

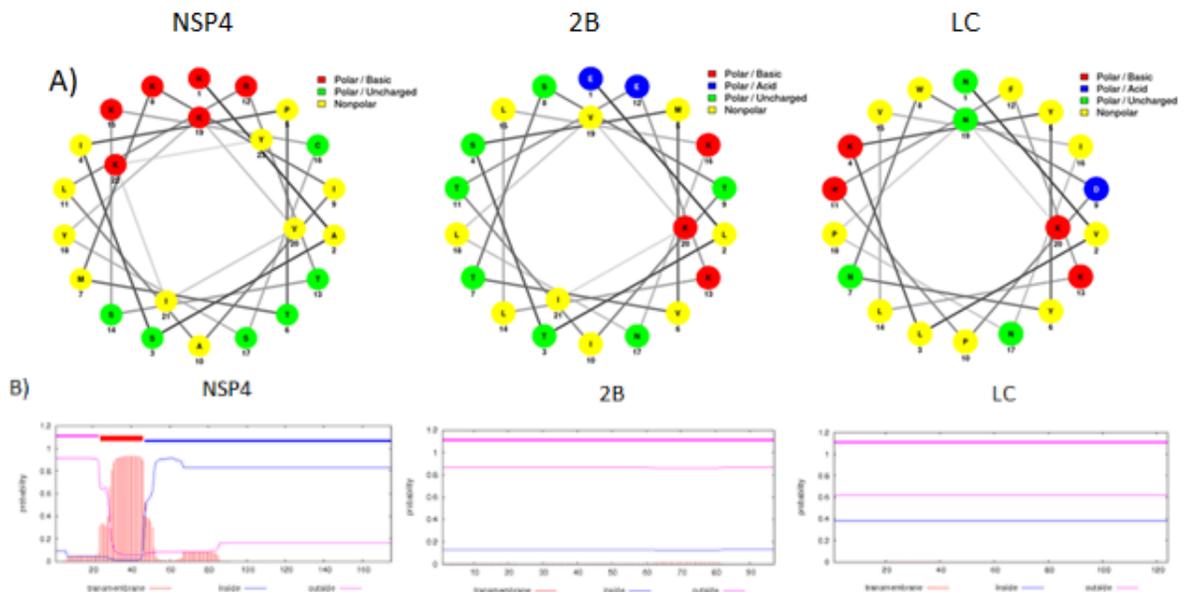
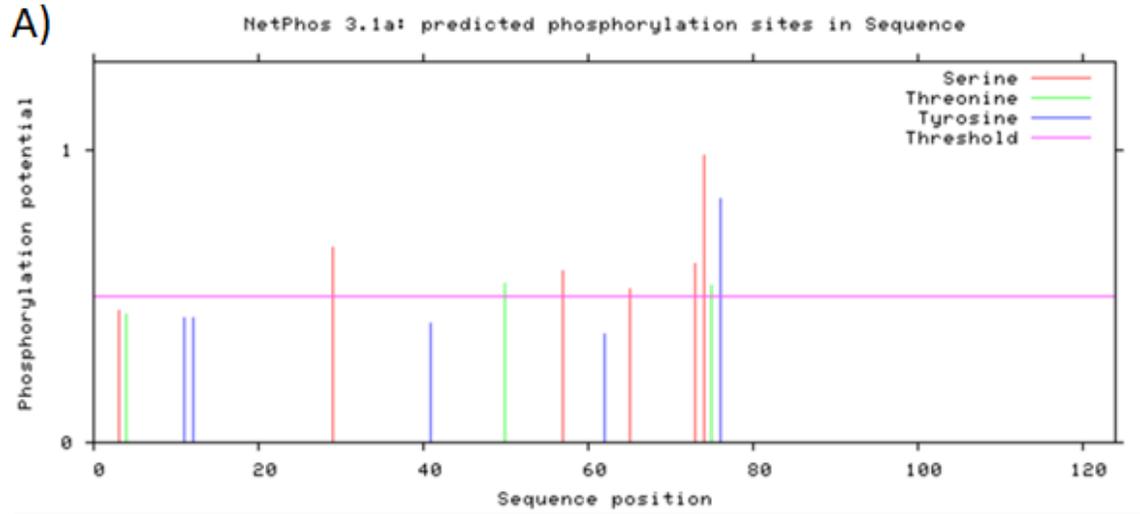


Figura 6) Análisis de dominios de viroporina de la proteína LC de FCV. A) Modelo de rueda helicoidal de proteínas generado por NetWheel marcando la distribución de aminoácidos de la región polibásica de NSP4 de HuRV, 2B de PV y LC de FCV. Vemos que en LC la distribución de las cargas positivas se concentra en dos caras opuestas de la hélice. B) Predicción de hélices transmembranales de la proteína NSP4 de HuRV, 2B de PV y LC de FCV por TMHMM 2.0. La probabilidad por aminoácidos en la región 20-40 de LC es la mayor de toda la proteína, y es menor de 5%.

8.1.4) La proteína LC de FCV tiene potencial para ser fosforilada, palmitoilada y formar puentes disulfuro.

Dado que la mayoría de las proteínas sufren alguna modificación post traduccional para modular su función, utilizamos diversos programas para identificar si la proteína LC de FCV tiene señales para ser fosforilada, ubiquitilada, sumoilada o para que se le adicionen ácidos grasos; se eligieron estas modificaciones porque está reportado que son ubicuas en la modulación de actividades de proteínas y se tienen identificada las secuencias consenso que son reconocidas por las enzimas que llevan a cabo estas modificaciones. Más aún, la adición de ácidos grasos está involucrada en la localización subcelular de proteínas, al ser capaz de interactuar con membranas de fosfolípidos, característica que es de nuestro interés para determinar la posible función de viroporina de la proteína LC. Los programas de predicción de sitios de ubiquitilación y SUMOilación no detectaron secuencias susceptibles a ser modificadas; por otro lado, los programas de predicción de fosforilación, creación de puentes disulfuro y adición de ácidos grasos sí encuentran las secuencias consenso para que residuos sean fosforilados, palmitoilados o usados para la formación de puentes disulfuro. Estos resultados indican que la proteína LC de calicivirus puede ser fosforilada, palmitoilada o estar formando puentes disulfuro para modular su actividad su actividad (Figura 7).



B)

Peptide	Score	Cutoff	Type
*****MCSTCANVL	7.797	2.293	S-Palmitoylation: Cluster B
***MCSTCANVLKYY	19.455	1.079	S-Palmitoylation: Cluster A
FCDNPLMCCYPELLP	1.533	1.072	S-Palmitoylation: Cluster C

C)

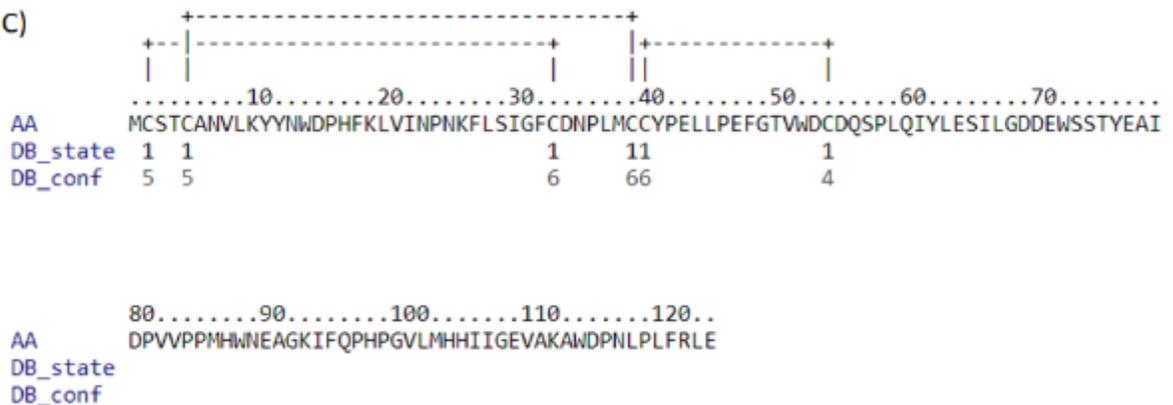
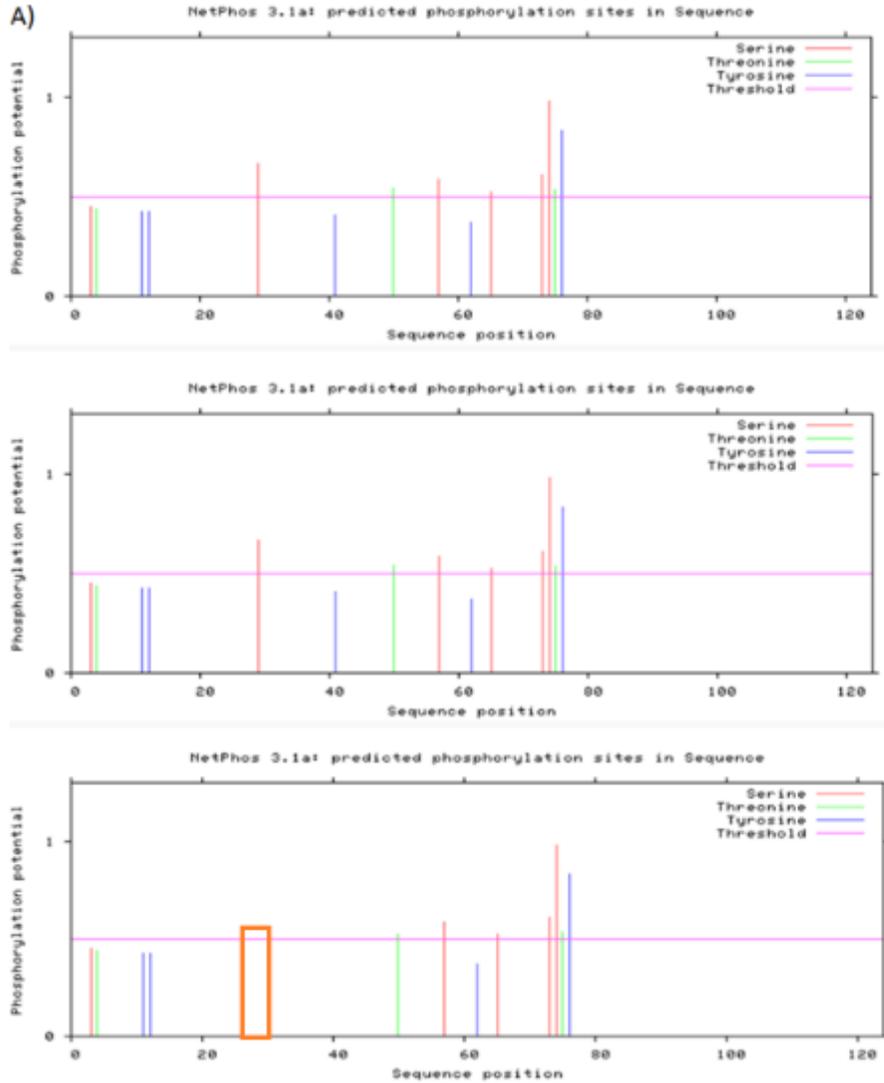


Figura 7) Predicción de modificaciones post traduccionales de la proteína LC. A) Patrón de predicción de la fosforilación de la proteína LC. La mutación S29P se resalta en el recuadro rojo. B) Residuos de cisteínas posiblemente palmitoilados. Score: puntuación de cada residuo candidato a palmitoilación. Cutoff: valor mínimo de cada residuo para ser considerado candidato a palmitoilación. C) Posibles puentes disulfuro de la proteína LC AA: aminoácido. DB_state: estado binario del puente disulfuro (1 = se forma, 0 = no se forma). DB_conf: confianza en la formación de puentes disulfuro (1, 10).

8.1.5) La formación de puentes disulfuro de la proteína LC de FCV coincide con la formación del efecto citopático en la infección.

Para determinar si algunas de estas modificaciones puede regular la actividad citotóxica de la proteína LC, quisimos comparar las distintas posibles modificaciones post traduccionales de la proteína LC de FCV silvestre con una serie de proteínas LC mutadas que fueron previamente reportadas por Abente y colaboradores y que pierden la capacidad de inducir el efecto citopático debido a una mutación en el aminoácido C40A o la recuperan por los cambios S29P, C40A y Y41C (Abente et al., 2013).

Como se puede apreciar en la figura 8 A y B, hay cambios en los patrones de predicción de fosforilación y palmitoilación de las distintas LC, pero no corresponden con la pérdida o recuperación de la capacidad del virus para inducir el efecto citopático. Sin embargo, encontramos una correlación en la capacidad de inducir puentes disulfuro y el efecto citopático; mientras que la proteína LC C40A que no causa efecto citopático, pierde la capacidad de formar puentes disulfuro al compararla con la LC silvestre, la proteína mutada revertante LC-S29P, C40A, Y41C que recupera su capacidad de inducir efecto citopático, sí tienen la capacidad de formar los puentes disulfuro (Figure 6C).



B)

Peptide	Score	Cutoff	Type
*****MCSTCANVL	7.797	2.293	S-Palmitoylation: Cluster B
**MCSTCANVLKYY	19.455	1.079	S-Palmitoylation: Cluster A
FCDNPLMCCYPELLP	1.533	1.072	S-Palmitoylation: Cluster C

Peptide	Score	Cutoff	Type
*****MCSTCANVL	7.797	2.293	S-Palmitoylation: Cluster B
**MCSTCANVLKYY	19.455	1.079	S-Palmitoylation: Cluster A

Peptide	Score	Cutoff	Type
*****MCSTCANVL	7.797	2.293	S-Palmitoylation: Cluster B
**MCSTCANVLKYY	19.455	1.079	S-Palmitoylation: Cluster A

que la formación de puentes disulfuro de la proteína LC, no su fosforilación o palmitoilación, puede estar involucrada en el establecimiento del efecto citopático característico de la infección de FCV. Este comportamiento se asemeja con el recientemente descrito en el péptido δ de Ébola (He et al., 2017), una viroporina que requiere de puentes disulfuro para cumplir su función, independientemente de su región polibásica y transmembranal; de manera que la proteína LC de FCV podría ser una viroporina “no clásica” que no tiene los dominios polibásico o transmembranal conservados en otras viroporinas y aun así cumple las características de toxicidad, oligomerización y permeabilización de membranas.

Secuencia CRI	Mutación	Efecto citopático	Detección por RT-PCR	Puentes disulfuro
CDNPLMCC	-	+	+	+
ADNPLMCC	C33A	-	+	-
CANPLMCC	D34A	+	+	+
CDNALMCC	P36A	+	+	+
CDNPLMAC	C39A	-	+	-
CDNPLMCA	C40A	-	+	-

Tabla 2) Correlación entre la formación de puentes disulfuro de la proteína LC de FCV con la capacidad de establecer el efecto citopático.

8.1.6) La secuencia y estructura de la región CRI de la proteína LC de FCV cumple con las firmas moleculares de las defensinas.

Dados los resultados anteriores, es posible que la formación de puentes disulfuro sea importante en la actividad de la proteína LC del FCV, como ocurre con otras viroporinas. Es por ello que nos dimos a la tarea de comparar a la proteína LC con las defensinas, buscando su firma molecular en secuencia y estructura (Figura 4).

Para determinar si la proteína LC cumplía con esta firma molecular, se analizó la secuencia de la región CRI de la proteína LC silvestre y de las mutantes previamente descritas para determinar si existía una correlación entre el establecimiento del efecto citopático característico de infección por FCV y la presencia de esta firma molecular. Los resultados indican que, a excepción de la mutación C33A, la proteína LC cumple con la firma molecular de las defensinas, GxC(X₃₋₉)C (Tabla 3). Estos resultados no correlacionan con la formación de puentes disulfuro o del efecto citopático, pues en las mutaciones C39A y C40A la firma molecular de las defensinas se cumple, debido a su relativa flexibilidad del número de aminoácidos permitidos entre cisteínas.

Secuencia CRI	Mutación	Efecto citopático	Detección por RT-PCR	Puentes disulfuro	GxC(X₃₋₉)C
CDNPLMCC	-	+	+	+	+
ADNPLMCC	C33A	-	+	-	-
CANPLMCC	D34A	+	+	+	+
CDNALMCC	P36A	+	+	+	+
CDNPLMAC	C39A	-	+	-	+
CDNPLMCA	C40A	-	+	-	+

Tabla 3) Correlación entre capacidad de inducción de efecto citopático por LC y el cumplimiento de la firma molecular de las defensinas.

Para identificar si la proteína LC de FCV posee el motivo- γ de las defensinas (Figura 4B), se mandaron a computar tres modelos tridimensionales de la proteína con el software Quark de los laboratorios Zheng, utilizando las secuencias de la proteína silvestre y las mutaciones C40A y S29P, C40A e Y41C; resaltando la CRI de cada modelo con un color distinto. En los casos de la proteína silvestre y de S29P, C40A e Y41C vemos que la región CRI se encuentra en un asa similar a este motivo (Figura 9, colores rojo y azul rey, respectivamente), por lo que cumple la firma estructural de este grupo de péptidos antimicrobianos. Sin embargo, en el caso de la mutante C40A vemos que la región conservada se encuentra en el extremo de una α -hélice (amarillo). Estos resultados coinciden perfectamente con la capacidad de formar puentes disulfuro y de establecer el efecto citopático característico de la infección; sin embargo, deben de tomarse con precaución, porque al no poder hacer un modelo en tres dimensiones de LC, LC-C40A y LC-S29P-C40A-Y41C basándose en homología de otros modelos tridimensionales reportados, el software de QUARK hizo estas predicciones *de novo*, por lo que sus scores (de un valor de -5 a 2) son bajos.

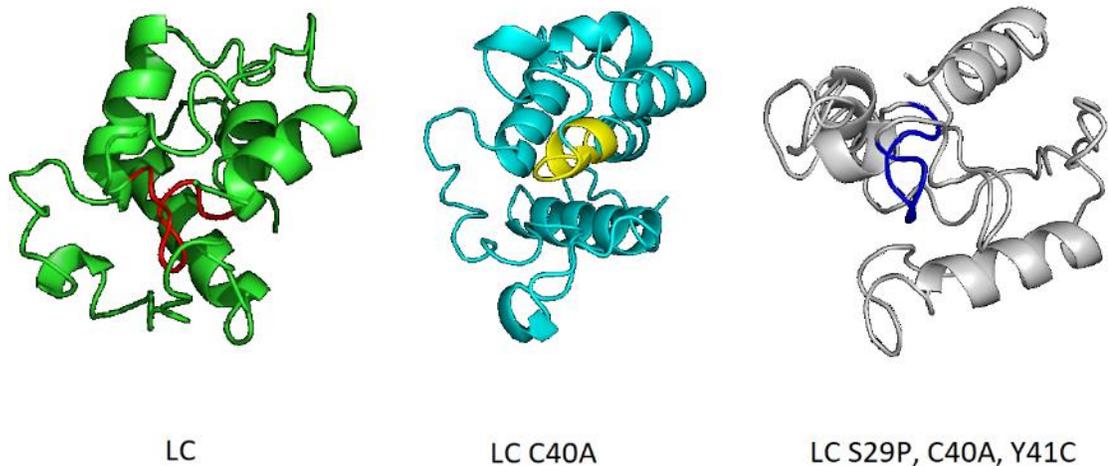


Figura 9) LC de FCV tiene la firma molecular estructural de las defensinas motivo- γ . Comparación de la distribución tridimensional de la CRI de la proteína LC de Calicivirus felino

silvestre y las mutantes C40A y S29P, C40A y Y41C con el dominio CRI de color rojo, amarillo y azul respectivamente.

En conjunto estos resultados sugieren que la proteína LC del FCV tiene un mecanismo de acción similar al de las defensinas, es decir: requiere de la formación de puentes disulfuro para su función y requiere que las cisteínas de la región CRI que ayudan a la formación de dichos puentes se encuentren en una región de asa.

Estos resultados *in silico* nos permiten resumir que la proteína LC del FCV es una proteína de localización citoplásmica que carece de los dominios polibásicos y transmembranales característicos de las vioporinas. Es probable que sea fosforilada y/o palmitoilada y que forme puentes disulfuro necesarios para su actividad. Su región conservada I cumple con la secuencia GXC(X₃₋₉)C que es posible que se encuentre distribuida en un motivo-γ en su estructura tridimensional, de manera similar a las defensinas, un grupo de proteínas pertenecientes a la familia de los péptidos antimicrobianos que regula su actividad a través de los puentes disulfuro.

8.2.1) Subclonación de LC y LC-C40A en el vector de expresión procarionte pRSETA.

Para cumplir con los ensayos de toxicidad intrínseca y oligomerización de la proteína LC y LC-C40A de FCV se requería establecer un sistema de expresión procarionte inducible que nos permitiera regular la expresión de la proteína y obtener cantidades suficientes para posteriormente purificarlas. Decidimos utilizar el sistema de expresión pRSET (Thermofisher Scientific, figura 10) que posee un promotor de la polimerasa viral del fago T7 que codifica para una etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino terminal para la detección y/o purificación de la proteína clonada, seguida por un epítipo Xpress™ que precede un sitio de clonación múltiple que contiene la secuencia de reconocimiento de las enzimas HindIII y XhoI, lo que nos permite sub clonar

las secuencias de LC y LC-C40A de los vectores de expresión eucariotes pAm-Cyan-LC y pAm-Cyan-LC-C40A, previamente clonados en el laboratorio con sitios de reconocimiento por las mismas enzimas. El sistema de expresión contiene un sitio de expresión inducible por galactosa o su análogo galactosílico IPTG que codifica para la polimerasa del bacteriófago T7, dando lugar a la expresión de la proteína clonada bajo el promotor de T7.

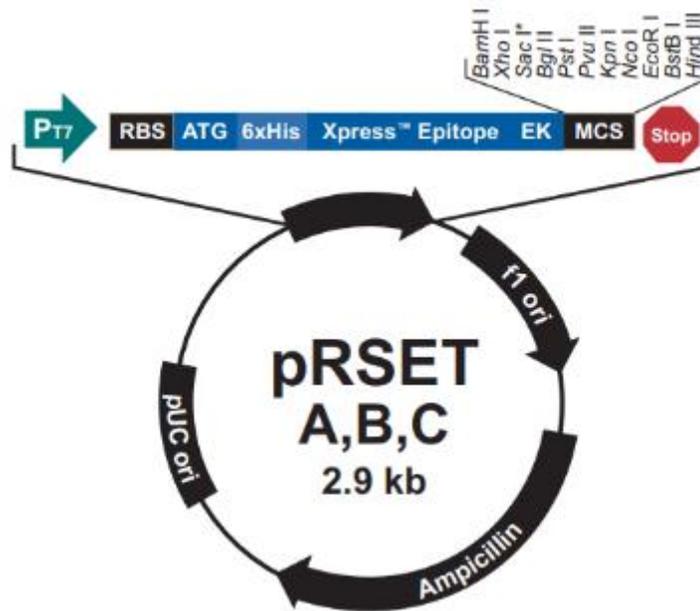


Figura 10) Sistema de expresión procarionte pRSET. Mapa del plásmido indicando el sitio de expresión inducido por P_{T7} , conteniendo la etiqueta de histidinas (6xHis), el epítipo Xpress™ y el sitio de clonación múltiple (MCS) conteniendo las secuencias de reconocimiento de XhoI y HindIII. Se muestran también el gen de resistencia a ampicilina (una β -lactamasa) y el sitio de origen de replicación pUC ori para alto número de copias.

Se llevó a cabo la digestión de pAm-Cyan-LC y pAm-Cyan-LC-C40A con las enzimas HindIII y XhoI, para la liberación del inserto de 393pb conteniendo la secuencia de LC o LC-C40A. Se analizaron los productos de reacción (4 μ g) en un gel de agarosa de 1.5% con pozos de 40mmx1mmx15mm para separar los fragmentos por electroforesis por 70 min a 90V en TBE ya sea con el kit o con el proceso de congelamiento-descongelamiento del gel. Se corrieron 3 μ l de fragmentos aislados, así como del plásmido pRSETA digerido con XhoI y HindIII en un gel de agarosa al 1% con pozos de 40mmx1mmx15mm (figura

11) para estimar sus concentraciones respectivas.

La cantidad de inserto necesaria para la reacción fue determinada con la

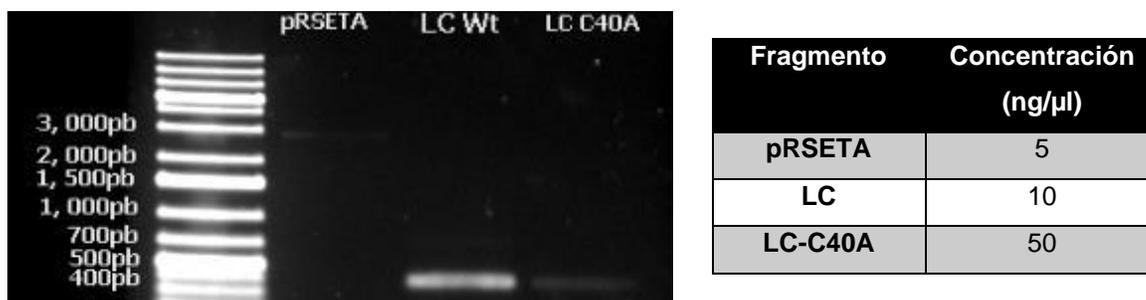


Figura 11) Fragmentos de DNA purificados corridos en un gel de agarosa para estimar sus concentraciones. La gran diferencia de concentración de LC wt comparada con LC C40A y pRSETA se debe a que se purificó con el kit descrito en materiales y métodos

relación inserto:vector base 3:1 considerando el tamaño del vector y del inserto, resultando en la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Tamaño vector } (\sim 3000\text{pb})}{\text{Tamaño inserto } (\sim 400\text{pb})} = 7.5$$

Se sustituyeron los valores correspondientes y se obtuvo la siguiente concentración de inserto necesaria para la reacción:

$$\frac{50\text{ng de vector}}{7.5} \times 3 = 20\text{ng de inserto por reacción}$$

Se realizó la reacción de ligación con las siguientes condiciones:

	LC	LC-C40A	Control -
Buffer 5X (μl)	4	4	2
pRSET-A digerido (μl)	10(50ng)	10(50ng)	5(25ng)
Inserto (μl)	4 de dilución previa 1:10	2	-
Ligasa (μl)	1	1	1
ddH ₂ O (μl)	1	3	2
Total (μl)	20	20	10

Tabla 4) Condiciones de reacción de ligación para obtener pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A

Se realizó una extracción de plásmido por medio de lisis alcalina de estos cultivos y se analizaron por electroforesis 2µl de cada reservorio de plásmido (de un volumen final de 20µl) en un gel de agarosa de 0.8% donde se pudo observar una migración ligeramente distinta en los carriles 1, 2, 8, 9, 11 y 12 (Figura 12 panel A)

Digerimos el plásmido de los carriles 1, 2, 8, 9, 11 y 12 con las enzimas XhoI y HindIII de respectivamente, con las condiciones de reacción siguientes:

:

	1 reacción	7 reacciones	Total (7.7 reacciones)
Plásmido (µl)	5	-	-
Jenna Universal Buffer 10X (µl)	3	21	23.5
Slal (XhoI) (µl)	0.5	3.5	3.85
HindIII (µl)	0.5	3.5	3.85
ddH₂O (µl)	21.5	150.5	165.55
Total (µl)	30	175	190.05

Tabla 5) Condiciones de reacción de digestión para comprobar la ligación de pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A

Se analizó la mitad del volumen final de cada una por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, donde pudimos apreciar la liberación de un inserto de aproximadamente 400pb en los plásmidos de los carriles 3 al 7, que corresponden a la mutante (Figura 12, panel B); esto nos sugiere que en estos cultivos la reacción de ligación fue exitosa.

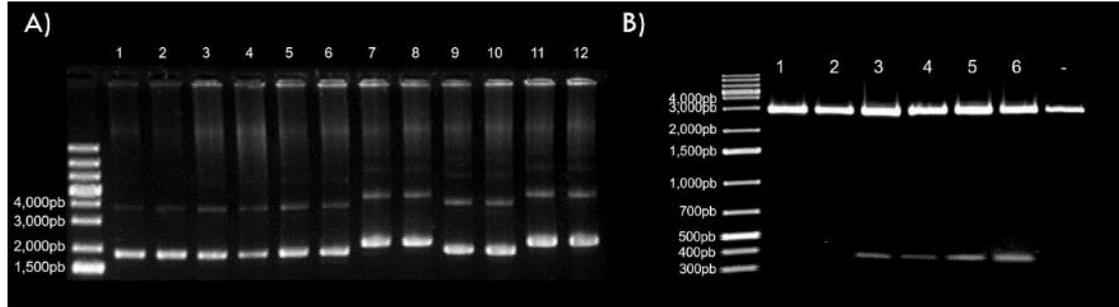


Figura 12). A) Extracción de plásmido pRSETA, pRSETA-LC, pRSETA-LC-C40A por lisis alcalina. Carriles 1-6: pRSETA-LC, carriles 7-12; pRSETA-LC-C40A. B) Liberación del inserto de LC (3, 4) o LC-C40A (5, 6) por digestión con XhoI y HindIII.

Se seleccionaron dos cultivos de cada condición para realizar una obtención de DNA plasmídico con el kit de Bio Rad siguiendo las instrucciones del fabricante para su posterior secuenciación. Los cuatro plásmidos fueron corridos en un gel de agarosa al 0.8% para estimar su concentración (resultados no mostrados) a la vez que se utilizó el espectrofotómetro BioRad Smart Spec Plus para determinar la concentración del plásmido y corroborar lo observado en el gel, con los siguientes resultados

Plásmido	Concentración (ng/μl)
LC1	69
LC2	50
LC-C40A1	90
LC-C40A2	86

Tabla 6) Concentración de plásmidos a secuenciar.

Se digirieron 100ng de cada plásmido con la enzima XhoI usando las condiciones previamente descritas y se analizó mediante electroforesis la

mitad de cada una en un gel de agarosa al 0.8% para determinar que los plásmidos son del tamaño esperado (foto no mostrada). Posteriormente los plásmidos fueron enviados para su secuenciación en la Unidad de Secuenciación y Síntesis (Ibt-UNAM) siguiendo las indicaciones para secuenciar plásmido con el oligo del promotor de T7.

Los electroferogramas fueron alineados con el software T-Coffee y se buscaron marcos de lectura abiertos en el servidor ORF Finder del NCBI para determinar que nuestro gen clonado se encuentra en el marco de lectura correcto.

```

LC      AGTGATCAATCCTAACAAATTCTTGCCATAGGTTTCTGTGATAATCCACTTATGTCCTG TATCCTGAATTGCT
LC1    AGTGATCAATCCTAACAAATTCTTGCCATAGGTTTCTGTGATAATCCACTTATGTCCTG TATCCTGAATTGCT
LC2    AGTGATCAATCCTAACAAATTCTTGCCATAGGTTTCTGTGATAATCCACTTATGTCCTG TATCCTGAATTGCT
C40A2  AGTGATCAATCCTAACAAATTCTTGCCATAGGTTTCTGTGATAATCCACTTATGTCCTG CGC TATCCTGAATTGCT
C40A1  AGTGATCAATCCTAACAAATTCTTGCCATAGGTTTCTGTGATAATCCACTTATGTCCTG CGC TATCCTGAATTGCT
cons   *****

```

Figura 13) Alineamiento de electroferogramas. El alineamiento de electroferogramas por T-Coffee demuestra que solo tenemos la mutación puntual en el aminoácido 40, cambiando CTG por CGC (recuadro azul).

Como podemos ver, las secuencias de la proteína LC silvestre y la mutante C40A se encuentran presentes y en el correcto marco de lectura en el plásmido pRSETA.

8.2.2) Expresión y purificación de las proteínas recombinantes Histag-LC y Histag-LC-C40A

Bacterias *E. coli* cepa BI-21 fueron transformadas con los plásmidos pRSETA, pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A y la expresión de ambas proteínas se indujo con IPTG a concentración final 1mM y se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie (figura 14).

Tiempo (min)	pRSETA	pRSETA-LC	pRSETA-LC-C40A
15	0.150	0.137	0.176
25	0.172	0.133	0.182
45	0.196	0.305	0.243
60	0.221	0.302	0.256
80	0.307	0.356	0.329
105	0.414	0.454	0.484

Tabla 7) DO de *E. coli* transformadas con pRSETA, pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A

Pudimos observar la presencia de una banda de 18kDa, el peso molecular esperado de LC fusionado con Histag, que se encuentra exclusivamente en las células transformadas con los plásmidos que expresan Histag-LC y Histag-LC-C40A desde el tiempo 0 post inducción con IPTG, que se enriquece hasta las 3h post inducción. Las bacterias *E. coli* BI-21(DE3)-pLysS transformadas con pRSETA no expresaron esta banda de 18kDa, por lo que se considera que la banda corresponde a las proteínas Histag-LC y Histag-LC-C40As.

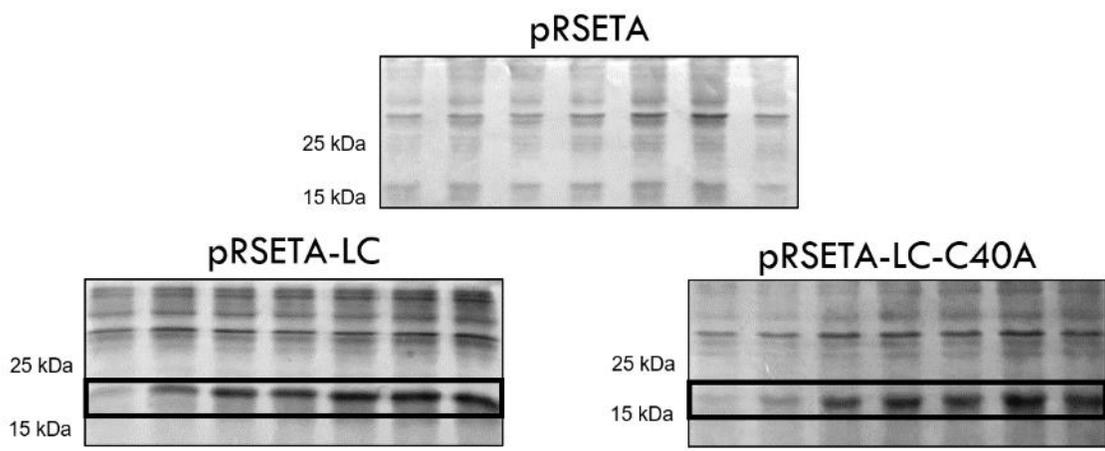


Figura 14) Cinética de inducción de Histag-LC y Histag-LC-C40A por IPTG. Vemos el crecimiento de una banda de aproximadamente 18kDa (rectángulo negro) en bacterias transformadas con pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A.

La expresión de proteínas heterólogas o tóxicas en bacterias comúnmente resulta en la aglomeración de las proteínas en cuerpos de inclusión, por lo que se realizó un fraccionamiento celular con enriquecimiento de los mismos en bacterias transformadas con pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A; donde se pudo apreciar la banda de 18kDa enriquecida en la fracción de cuerpos de inclusión (figura 15 panel A), de manera que las proteínas Histag-LC y Histag-LC-C40A se concentran en esa región.

Para determinar si la proteína expresada de 18kDa era reconocida por los anticuerpos contra la etiqueta de histidina, se realizó un ensayo de western blot en extractos de proteínas de bacterias transformadas con pRSETA-LC a las 0 y 3hrs post inducción, así como las fracciones de cuerpos de inclusión (figura 15). La expresión de ambas proteínas en las diferentes fracciones se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie (Figura 15 A) y un gel duplicado se transfirió a membranas de nitrocelulosa para determinar la reactividad de los anticuerpos con esta proteína (figura 15B). Los anticuerpos anti Histag detectaron a las proteínas

Histag-LC y Histag-LC-C40A de 18 kDa.

Se decidió intentar la purificación por electroelución ya que la proteína se va a cuerpos de inclusión, por lo que realizamos una electroelución de la fracción de cuerpos de inclusión de bacterias BI2(DE3)pLysS transformadas con pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A 4hrs post inducción partiendo de un gel de acrilamida al 15% y electroeluyendo a 90volts por 60'. Del volumen fina de 200µl, 10µl fueron tomados para realizar un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie y un western blot con anticuerpos contra Histag (figura 15 panel C), pudimos observar una banda de aproximadamente 18kDA al teñir el gel de acrilamida con azul de Coomassie y esa banda fue reconocida por el anticuerpo anti Histag, estos resultados indican que las proteínas recombinantes Histag-LC y Histag-LC-C40A pueden ser purificadas exitosamente por medio de electroelución.

Estos resultados nos permitieron demostrar que se clonaron exitosamente las secuencias codificantes de LC y LC-C40A de FCV en el vector de expresión procarionte pRSETA. Se comprobó esta ligación por digestión con enzimas de restricción y secuenciación. Células BI21(DE3)pLysS fueron transformadas con los vectores conteniendo las secuencias de LC y LC-C40A, así como el vector vacío y se optimizaron las condiciones de inducción de la proteína. Se determinó que la proteína expresada se va a cuerpos de inclusión y se estandarizó el método de electroelución como una manera eficiente para purificarla, siendo identificada por por SDS-PAGE y western blot con anticuerpos anti Histag.

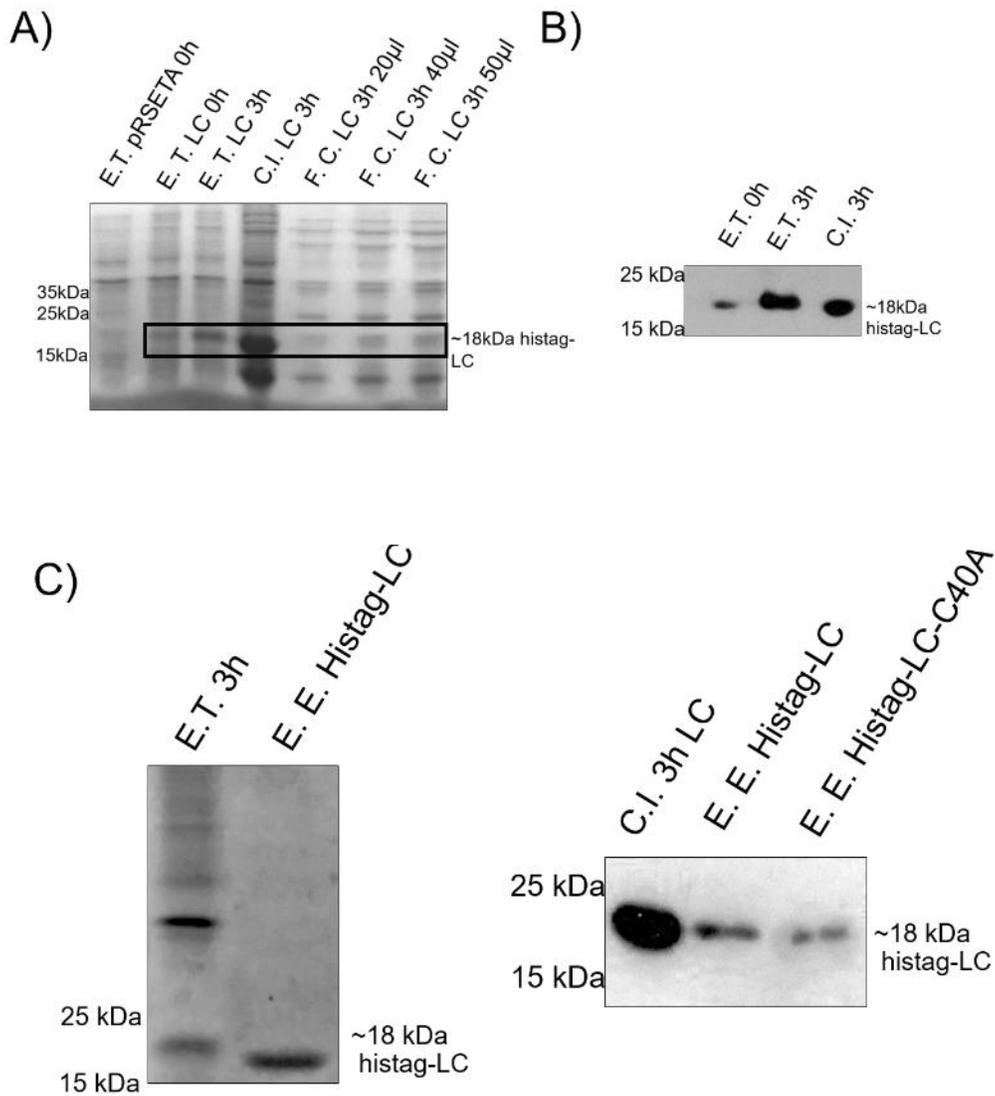


Figura 15) Localización y purificación de Histag-LC y Histag-LC-C40A. A) Fraccionamiento de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. (izquierda) en el recuadro negro se resalta la banda de Histag-LC. B) Western blot detectando Histag en extractos totales o cuerpos de inclusión. C) validación de la purificación por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (izquierda) y western blot (derecha). E.T.= extractos totales. C.I.= cuerpos de inclusión. F.C.= fracción citosólica. E.E.= electroelución.

8.3.1) La proteína LC de FCV oligomeriza en condiciones no astringentes.

Para determinar si la proteína recombinante LC tenía la capacidad de oligomerizar en condiciones no astringentes, cantidades crecientes de las proteínas Histag-LC y Histag-LC-C40A de FCV fueron incubadas con buffer

Laemmli 2X y se analizaron por SDS-PAGE en condiciones astringentes y no astringentes (sin aplicar calor a las muestras y en ausencia de β -mercaptoetanol) en geles al 12%. Se encontró que en condiciones no astringentes ambas proteínas oligomerizan, pues se detectaron posibles dímeros y trímeros tanto en Histag-LC y Histag-LC-C40A tanto en las muestras a las que se les aplicó calor o no. (Figura 16 panel A)

8.3.2) La oligomerización de la proteína LC de FCV depende de la formación de puentes disulfuro.

Dado que en los ensayos de western blot anteriores observamos la formación de una banda de peso molecular de aproximadamente 54kDa, que podría corresponder a un trímero de las proteínas Histag-LC y Histag-LC-C40A aun adicionando calor (figura 16, panel A, carriles 1 y 5), se optó por determinar si el agregar un agente reductor que impida la formación de puentes disulfuro en proteínas determina la oligomerización de las proteínas.

Para ello, 4 μ g de proteína electroeluída fue incubada 10min a 0%, 0.1% y 1% de β -mercaptoetanol en buffer Laemmli 2X a temperatura ambiente y la posible formación de oligómeros se determinó mediante ensayos tipo western blot. Se encontró que tanto la proteína Histag-LC como Histag-LC-C40A reducen sus estados de oligomerización al ser incubados con concentraciones crecientes de β -mercaptoetanol (figura 16, panel B), sugiriendo que los puentes disulfuro son de importancia para su asociación consigo misma.

Con estos resultados podemos resumir que las proteínas Histag-LC y Histag-LC-C40A son capaces de formar oligómeros, una característica de las viroporinas. Esta oligomerización presenta como su estado más abundante un trímero, aunque también se detectaron proteínas en pesos moleculares que corresponden a dímeros, pentámeros y hexámeros. La capacidad de Histag-LC y Histag-LC-C40A de oligomerizar es dependiente de puentes disulfuro

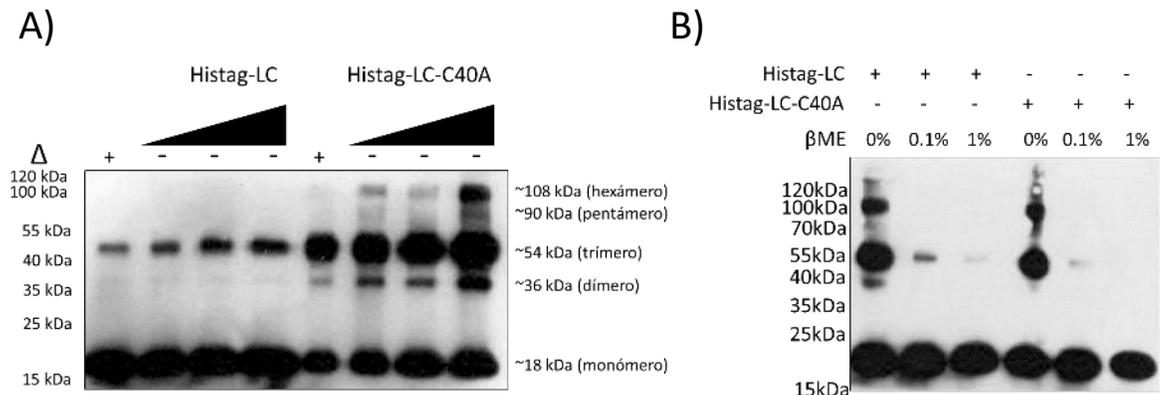


Figura 16) LC y LC-C40A forman oligómeros. A) Western blot detectando oligómeros en concentraciones crecientes de Histag-LC y Histag-LC-C40A calentadas o no calentadas a 95°C durante 5'. B) Western blot de muestras de Histag-LC y Histag-LC-C40A previamente incubadas con β -mercaptoetanol (β ME).

8.4.1) Las proteínas Histag-LC y Histag-LC-C40A son tóxicas para las bacterias.

Para determinar si la expresión de las proteínas Histag-LC y Histag-LC-C40A era tóxica para las bacterias *E. coli* BI-21(DE3)-pLysS, estas se transformaron con los plásmidos de pRSETA, pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A, se crecieron en medio LB con ampicilina y cloranfenicol, y se realizaron diluciones 1:100, 000 se sembraron en cajas de LB + Agar con o sin IPTG 1mM para determinar la diferencia en la UFC de bacterias expresando o no Histag-LC y Histag-LC-C40A,. Como se puede apreciar en la figura 17, la proteína Histag-LC reduce la cantidad de UFC en cerca de 95% cuando es expresada en bacterias, mientras que la expresión de la proteína Histag-LC-C40A causó una reducción de cerca del 50%. Las bacterias transformadas con pRSETA no muestran un cambio significativo en UFC cuando son sembradas en placas con IPTG (Figura 17). Estos resultados sugieren que las proteínas LC y LC-C40A son tóxicas para las bacterias que las expresan, una característica funcional de las viroporinas.

8.4.2) La inducción de la expresión de las proteínas Histag-LC y Histag-LC-C40A no cambia la densidad óptica del cultivo de bacterias.

Dado que las viroporinas forman poros o canales, se utilizó el sistema de la salida de lisozima de bacteriófago T7 por el cual es posible determinar si al inducirse la expresión de las proteínas Histag-LC y Histag-LC-C40A, estas son capaces de formar un poro que permite el paso de moléculas de al menos 17kDa en la membrana externa de la bacteria, ocasionando la lisis de bacterias aledañas al perder su pared celular y no ser capaces de mantener su estructura, reduciendo la turbidez de un cultivo de bacterias determinada por la densidad óptica al incidir un láser de longitud de onda de 600nm (DO600). Si la lisis es muy grande, superará la tasa de crecimiento de las bacterias y se apreciará una caída en la DO600 post inducción

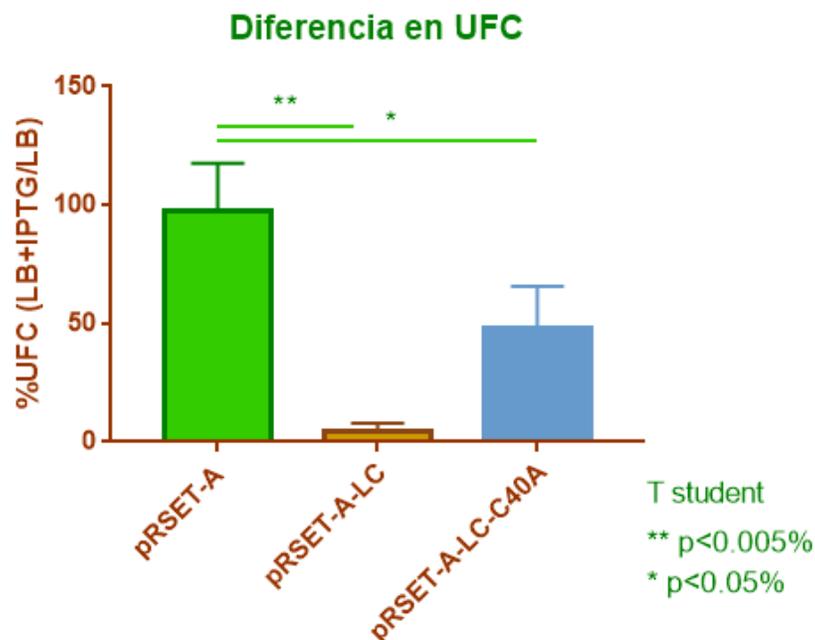


Figura 17) La proteína LC es intrínsecamente tóxica. Comparación en la reducción de unidades formadoras de colonia en bacterias expresando a las proteínas Histag-LC o Histag-LC-C40A.

Se observó que las bacterias *E. coli* BI21(DE3)pLysS que expresan a las proteínas Histag-LC o Histag-LC-C40A no ven reducida su DO600 comparadas con el plásmido pRSETA. En los tres casos, podemos ver una

tasa de crecimiento mayor en las bacterias sin inducción comparadas con las inducidas, pero al contrastar cada tiempo en bacterias inducidas y sin inducir, los cambios no son significativos entre bacterias transformadas con los distintos plásmidos (figura 18).

Estos resultados sugieren que al expresarse las proteínas Histag-LC y Histag-LC-C40A, no son capaces de formar poros de al menos 17kDa en la

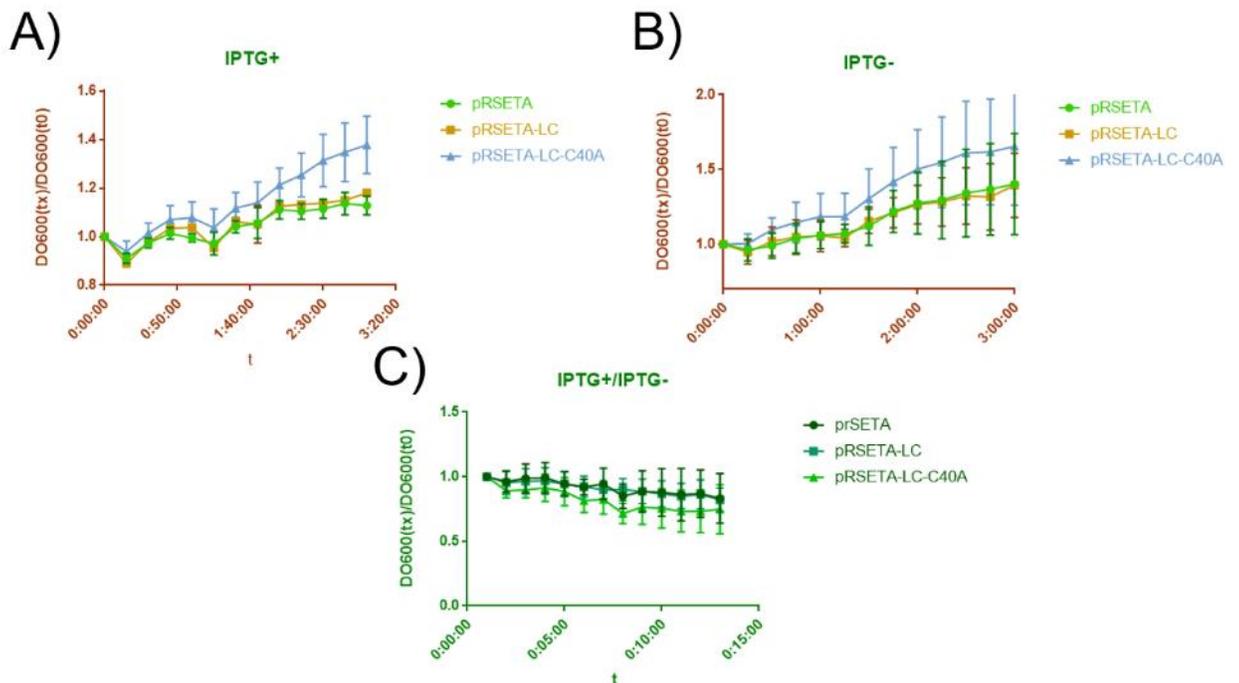


Figura 18) LC y LC-C40A no son capaces de formar un poro de 17kDa en células B121(DE3)PlysS. A) Cambios en la DO600 de cultivos de células transformadas con pRSETA, pRSETA-LC o pRSETA-LC-C40A tras ser inducidos con IPTG1mM. B) Cambios en DO600 en bacterias sin inducir. C) Comparación a t(x) del crecimiento de bacterias inducidas o no inducidas con IPTG.

membrana externa de bacterias *E. coli*, de manera que la lisozima no es capaz de ser liberada al medio de cultivo y lisar bacterias.

8.4.3) La proteína LC de FCV parece causar un estrés osmótico.

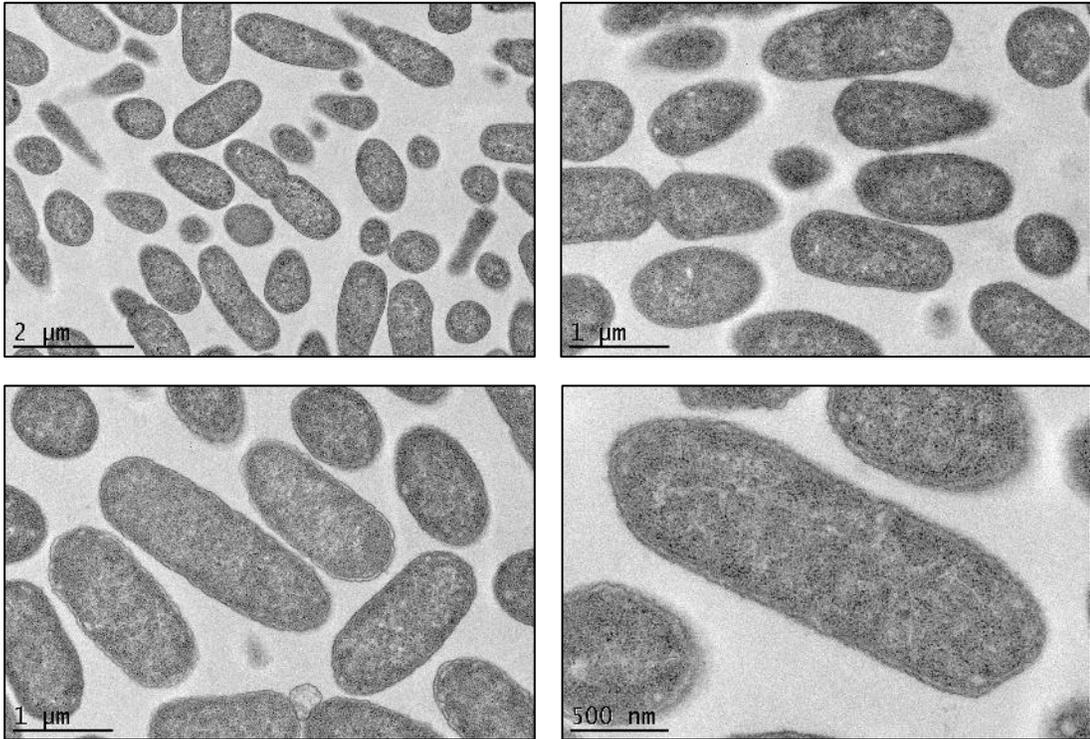
Dado que las viroporinas clásicas o no clásicas no siempre forman canales o poros mayores a 17kDa, exploramos la posibilidad de que la proteína Histag-LC se interna en las membranas interna o externa de la bacteria, por lo que realizamos ensayos de microscopía electrónica de transmisión (MET) con un inmunomarcaje de oro de la etiqueta Histag en bacterias sin transformar o

transformadas con los plásmidos pRSETA, pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A a las 3h post inducción de la expresión de las proteínas recombinantes por IPTG (Figura 19).

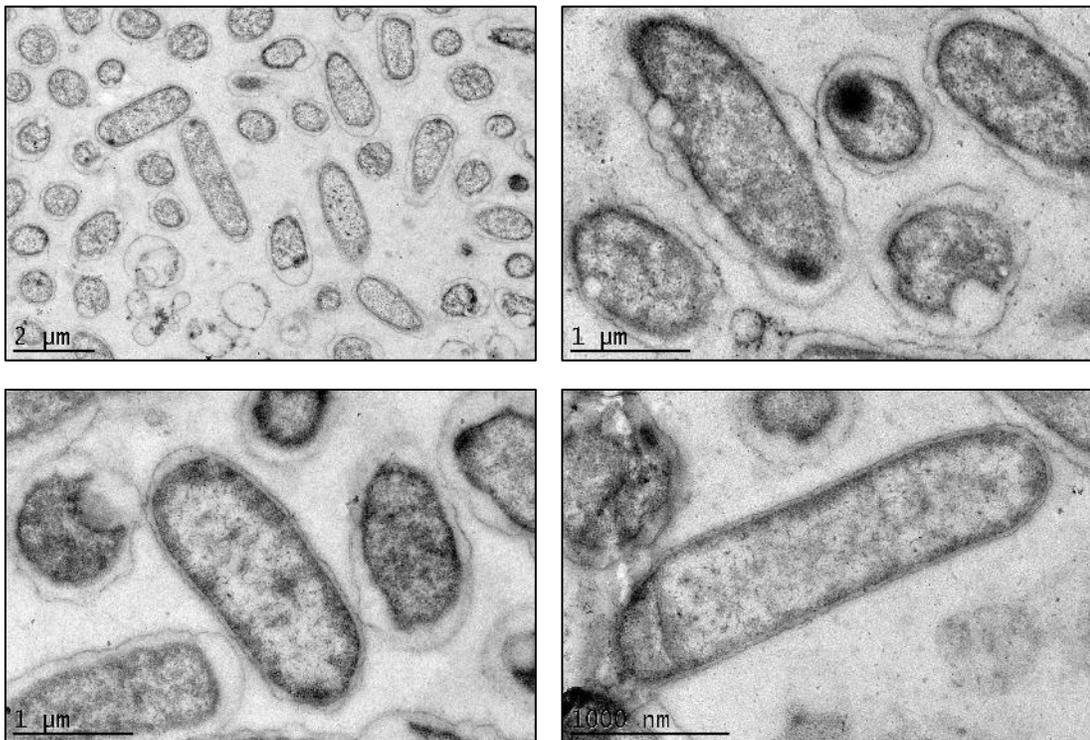
Las bacterias transformadas con el vector pRSETA presentaron cierto grado de marca de oro en su membranal externa e interna, por lo que en cuatro micrografías se realizó el conteo de bacterias con marca de oro en membranas interna y externa para determinar la tendencia de la localización de Histag, Histag-LC o Histag-LC-C40A. Se encontró que no hay una diferencia significativa en el número de bacterias con señal de Histag en membranas (figura 20 A). Sin embargo, se detectó más de una partícula de oro únicamente en las membranas de bacterias transformadas con pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A (figura 19). Es necesario realizar otros estudios para determinar de manera más precisa la localización de Histag-LC y Histag-LC-C40A.

Tanto las bacterias transformadas con pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A presentan zonas electrodensas que sugieren ser cuerpos de inclusión conteniendo a las proteínas recombinantes (Figura 19). La distribución de estos cuerpos de inclusión es casi exclusivamente apical en pRSETA-LC, mientras que en pRSETA-LC-C40A se encuentra distribuida mayormente en la parte media del citoplasma bacteriano (Figura 19). Interesantemente, las bacterias expresando la proteína Histag-LC presentan lo que parece ser una mayor cantidad de invaginaciones periplásmicas en distintos estados de internalización, hasta formar vacuolas localizadas en su citoplasma.

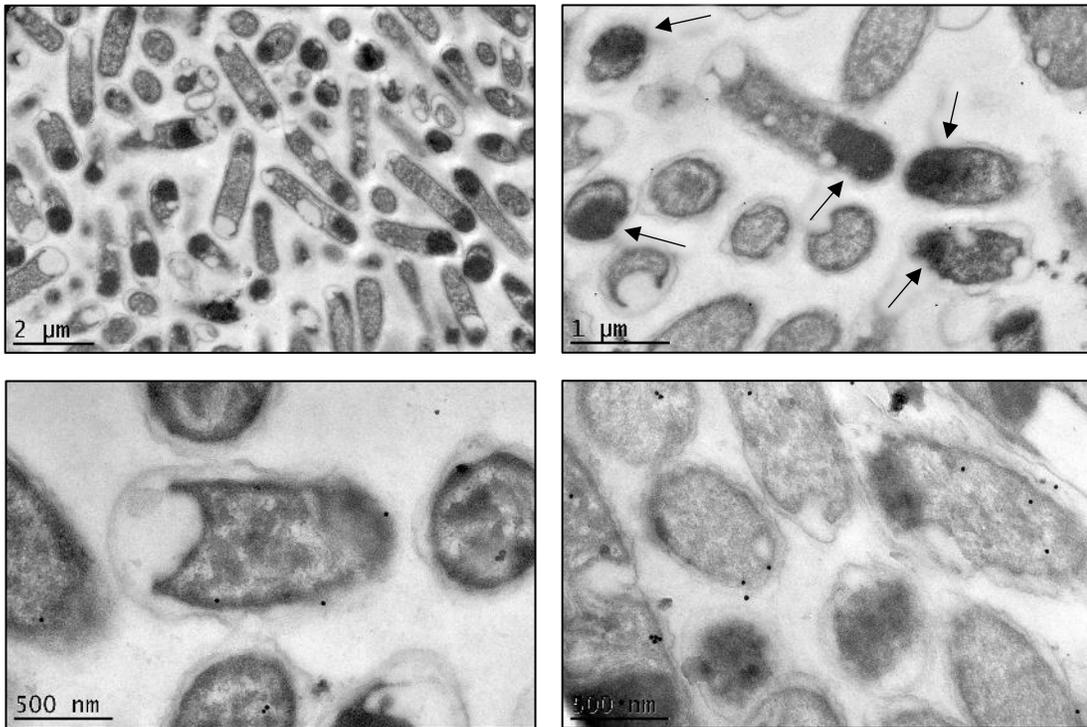
E. Coli BI21(DE3)pLysS



pRSETA



pRSETA-LC



pRSETA-LC-C40A

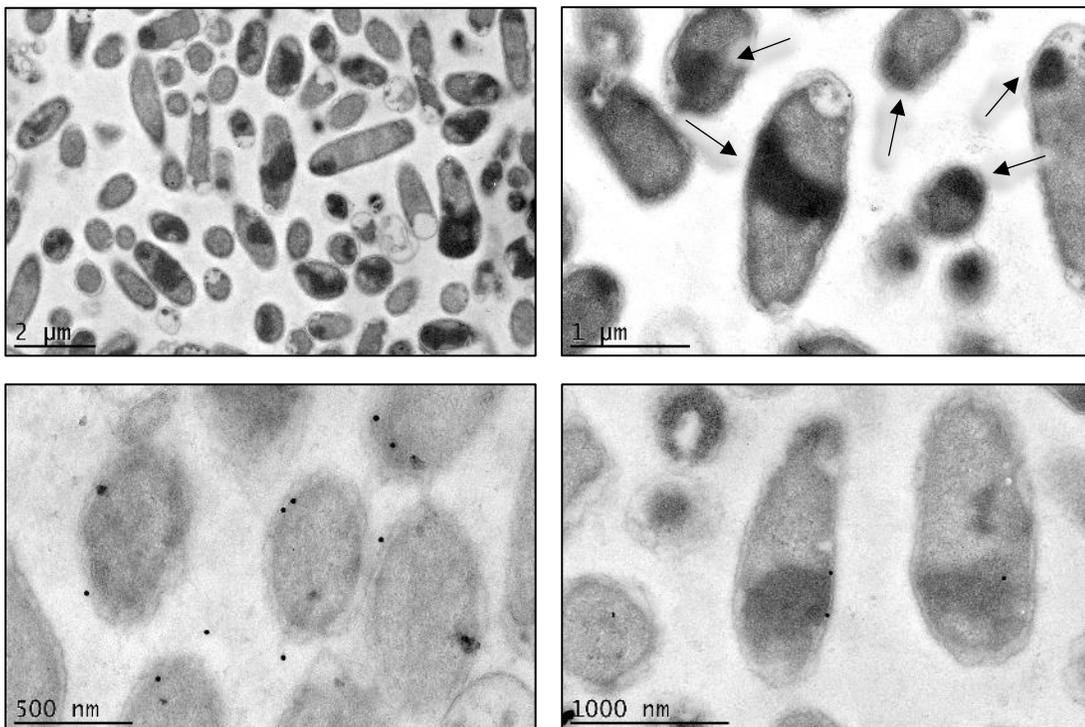


Figura 19) LC induce estrés osmótico en bacterias. Micrografías representativas de células *B121(DE3)pLysS* expresando Histag, Histag-LC o Histag-LC-C40A con Histag marcada con partículas de oro coloidal. Se puede apreciar la localización membranal de Histag-LC y Histag-LC-C40A, la formación de cuerpos de inclusión (flechas negras) y su localización diferencial, así como estrés osmótico ocasionado por Histag-LC.

Estas vacuolas son muy similares a los cuerpos plasmolíticos que forman las bacterias cuando sufren estrés osmótico por un medio hipertónico (sacarosa al 16% o un exceso de NaCl) con el objetivo de reducir el área de membrana citoplásmica que se torna excesiva para el volumen reducido de la célula, consecuencia de pérdida de agua al medio periplásmico y extracelular (Schwarz & Kocht, 1995).

Estos resultados sugieren que la proteína LC es capaz de inducir estrés osmótico en bacterias, similar al ocasionado por su crecimiento en un medio hipertónico.

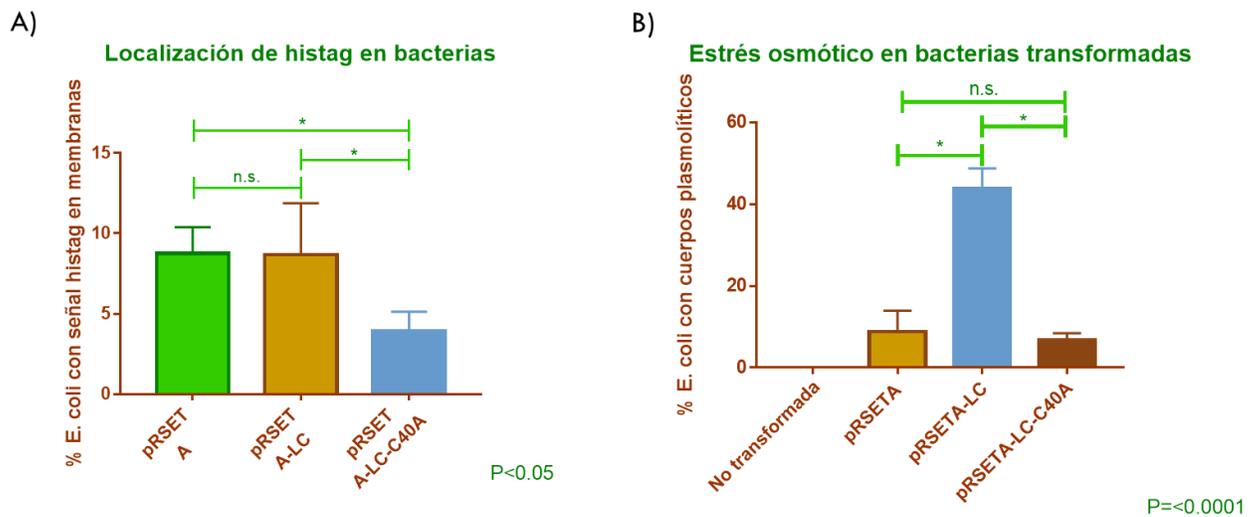


Figura 20) Análisis semicuantitativo de micrografías electrónicas. A) porcentaje de *E. coli* transformadas que presenta señal de oro coloidal en sus membrana citoplásmica o externa. B) Porcentaje de *E. coli* que presenta cuerpos plasmolíticos putativos. Prueba estadística de ANOVA comparando las condiciones problema con el control (bacterias transformadas con pRSETA) del promedio de cuatro micrografías distintas.

Para marcar una tendencia, se realizó un conteo de las bacterias que presentan cuerpos plasmolíticos putativos entre las cuatro condiciones con entre 200 y 250 bacterias (cuatro micrografías) por caso. Como se puede apreciar en la figura 20, en todas las condiciones en las que las bacterias fueron transformadas e inducidas con IPTG 1mM hay un porcentaje de *E. coli* con cuerpos plasmolíticos putativos comparadas con el control negativo, pero hay una diferencia significativa en el porcentaje de bacterias expresando

Histag-LC comparándolo con el porcentaje de bacterias transformadas con pRSETA y pRSETA-LC-C40A, lo que sugiere que hay un mayor estrés osmótico ocasionado por la proteína LC de FCV silvestre. A su vez, se realizó un conteo de las bacterias transformadas con pRSETA, pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A que presenten la señal de Histag detectada por anticuerpo acoplado a oro coloidal en la membrana interna o externa de las bacterias. A pesar de que únicamente en la condición de Histag-LC o Histag-LC-C40A encontramos bacterias presentando más de una partícula de oro en sus membranas (figura 19 A), la diferencia entre bacterias presentando al menos una partícula de oro en sus membranas no es estadísticamente significativa (figura 19 B), por lo que se necesita otra estrategia experimental para determinar la localización de Histag-LC y Histag-LC-C40A en *E. coli* BI21(DE3)pLysS

Dado que la proteína LC parece causar un desequilibrio osmótico en bacterias, se determinó si las mitocondrias (originadas por una alfa proteobacteria) de células CRFK expresando la proteína Cyan-LC presentan este tipo de estrés (swelling). Para ello, se analizó en las micrografías electrónicas de células CRFK expresando a la proteína Cyan-LC tomadas por el doctor Barrera-Vázquez con ayuda de la doctora Chávez-Munguía la presencia de mitocondrias con la morfología característica de daño por un desequilibrio iónico. Este daño consiste en la ruptura de secciones de la membrana externa mitocondrial y que resulta en una proyección membranal característica con un patrón de crestas determinado, como se ha descrito ampliamente (Marques & Higuchi, 2012). Se encontró que las mitocondrias de células CRFK transfectadas con el plásmido pAm-Cyan-LC presentan la morfología característica de hinchamiento mitocondrial (figura 21), sugiriendo que el mecanismo por el cual la proteína LC de FCV desata la vía intrínseca de la apoptosis es el estrés osmótico mitocondrial que deriva en daño a su membrana externa y la relocalización de proteínas del periplasma mitocondrial al citoplasma de la célula, derivando en el ensamblaje del apoptosoma y la muerte de la célula por la activación de caspasas efectoras.

En resumen: la expresión tanto de la proteína Histag-LC como de Histag-LC-C40A en menor grado, reduce las UFC, sugiriendo que las dos proteínas son tóxicas. Puede ser que ambas proteínas localicen en la membrana interna y externa de bacterias, pero más experimentos deben de hacerse para comprobar esta localización. Las bacterias expresando Histag-LC y Histag-LC-C40A presentan cuerpos de inclusión distribución mayormente apical en la proteína silvestre y mayormente céntrico en la mutante. Ninguna de las dos proteínas es capaz de formar un poro o canal que permita la el paso de moléculas de tamaño de 17kDa o más, pero en las bacterias expresando Histag-LC se ven estructuras vacuolares semejantes a las observadas en bacterias sometidas a estrés osmótico, pudiendo ser ese su mecanismo de toxicidad.

Células CRFK transfectadas con pAm-Cyan-LC poseen mitocondrias cuya morfología coincide con la de daño por estrés osmótico exclusivamente en este organelo, este daño posiblemente inicie la vía intrínseca de la apoptosis al relocalizar proteínas del periplasma mitocondrial al citoplasma celular.

9. DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación se comenzaron a determinar algunas de las características bioinformáticas, bioquímicas y funcionales de la proteína LC de FCV, una proteína exclusiva de los *Vesivirus* responsable del establecimiento del efecto citopático característico de la infección y de la inducción de la apoptosis en este género viral. Los hallazgos indican que la proteína LC podría ser una viroporina. Los resultados del análisis bioinformático por homología de la proteína LC de FCV concuerdan con lo reportado por Abente y colaboradores en el 2013, quienes determinaron que no posee homología con otras proteínas, dificultando la predicción de sus dominios funcionales y de su estructura tridimensional con base en su secuencia.

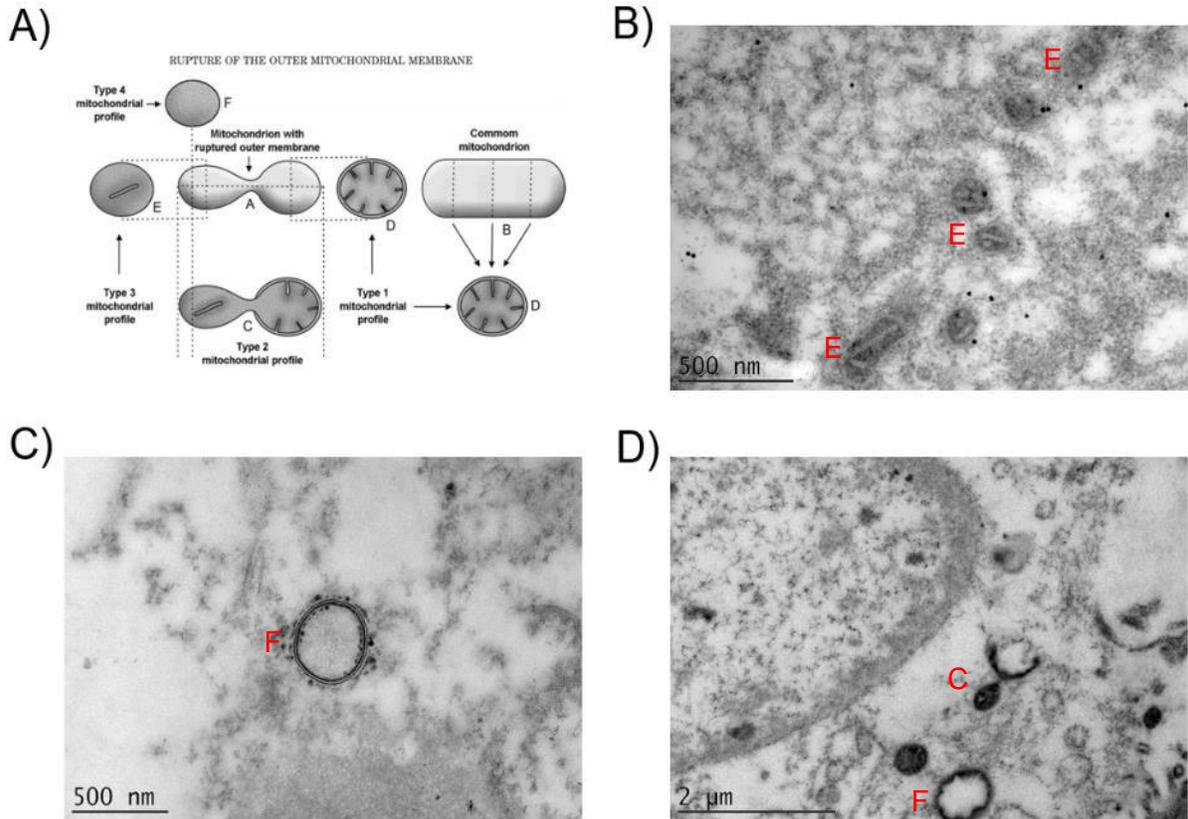


Figura 21) La expresión de Cyan-LC en células CRFK ocasiona daño a la mitocondria por desequilibrio osmótico. A) Distintas proyecciones de mitocondrias sanas (B, D) y con daño osmótico (A, C, D, E, F) (Marques & Higuchi, 2012). B) Mitocondrias de células CRFK 48hrs post transfección presentando la proyección E de daño por estrés osmótico. C) mitocondria con daño por estrés osmótico en proyección F. D) mitocondrias con daño por estrés osmótico con las proyecciones E y F. Localización en la periferia mitocondrial de Cyan-LC inmunomarcada con oro coloidal. Todas estas fotos fueron tomadas por el Dr. Óscar Barrera con la ayuda de la Dra. Bibiana Chávez Munguía.

Más aún, la proteína LC del FCV debe localizarse en el citoplasma ya que carece de las señales de localización nuclear, retículo endoplásmico o mitocondria, a pesar de que está reportado que se asocia a la membrana externa mitocondrial cuando es transfectada (Barrera-Vázquez et al., 2019).

Sin embargo, en su secuencia se encuentran sitios consenso de algunas modificaciones post traduccionales, como las posibles fosforilaciones de los aminoácidos S²⁹, T⁵⁰, S⁵⁷, Y⁶², S⁷³, S⁷⁴, T⁷⁵ e Y⁷⁶, sugiriendo que la región S⁷³-Y⁷⁶ puede ser un punto de regulación importante en la actividad de la proteína.

El estudio de esta región de posible fosforilación en la función de la proteína puede arrojar información útil para dilucidar su mecanismo de acción.

En nuestros resultados también encontramos que la proteína LC de FCV podría ser palmitoilada en las cisteínas 2, 5 y 39. La palmitoilación es un evento que interviene en la relocalización subcelular de ciertas proteínas.(Greaves, Prescott, Gorleku, & Chamberlain, 2009). Un ejemplo de ello es la proteína pro apoptótica Bax, que requiere ser palmitoilada para su relocalización en la membrana externa de la mitocondria y su posterior oligomerización contribuyendo en el establecimiento de la apoptosis intrínseca o mitocondrial (Fröhlich, Dejanovic, Kashkar, Schwarz, & Nussberger, 2014). La palmitoilación de diversas proteínas virales es importante para su relocalización a membranas de compartimentos celulares específicos (Veit, 2012), y las viroporinas M2 del virus de la influenza tipo A y E de HuCoV son palmitoiladas, aunque se desconoce cuál es el papel de esta modificación en su función (Liao et al., 2006; Veit, Serebryakova, & Kordyukova, 2013).

La falta de regiones hidrofóbicas, dominios transmembrana y el arreglo helicoidal de aminoácidos básicos característico de las viroporinas en la proteína LC de FCV nos indica que no es una viroporina clásica (Scott & Griffin, 2015). Sin embargo, el reporte reciente de que el Péptido Delta del virus Ébola conserva su capacidad de permear membranas a través de un puente disulfuro conservado a pesar de ser removidas estas dos regiones, indicando que estos dominios no son necesarios para que una proteína cumpla con las funciones de una viroporina. (Gallaher & Garry, 2015; He et al., 2017). En las viroporinas clásicas como la proteína E del HuCoV y NSP4 de HuRoV los puentes disulfuro juegan un papel en su capacidad de oligomerización, de manera que tanto viroporinas clásicas como no clásicas parecen mediar su actividad a través de esta modificación post traduccional.

La presencia de una región conservada de LC rica en cisteínas sugiere que sus puentes disulfuro tienen un papel en su mecanismo de acción, importancia que fue demostrada previamente por Abente y colaboradores en 2013 en un

contexto de infección, faltando identificarse cómo podían estar las cisteínas mediando la actividad de la LC. En este trabajo se encontró que la LC de FCV cumple con la firma molecular de la familia de las defensinas GxC(X3-9)C aunque esta firma en secuencia se conserva cuando se hacen mutaciones en cisteínas puntuales que reducen la capacidad del virus de establecer el efecto citopático (Abente et al., 2013).

Las predicciones *de novo* de la estructura tridimensional de la LC de FCV arrojó modelos con baja puntuación de confianza por su pobre homología con otras proteínas; sin embargo, la presencia o ausencia de la firma estructural de las defensinas correlaciona con la capacidad de la proteína silvestre, la mutante C40A y la triple mutante S29P, C40A e Y41C de establecer el efecto citopático en un contexto de infección. Se requiere de un análisis estructural de la proteína LC de FCV, así como de las mutantes C40A y la triple mutante S29P, C40A e Y41C para confirmar la presencia o ausencia de esta firma molecular y su correlación con capacidad de inducir daño o apoptosis.

Estas predicciones iniciales indicaron que el estudio de la mutante C40A contribuirá para dilucidar la importancia de los puentes disulfuro en la función de LC de FCV; sin embargo, es importante reconocer dos limitaciones de nuestra aproximación bioinformática:

- 1) Los programas utilizados en este trabajo no realizan predicciones de formación de puentes disulfuro en trans, y si la función de la proteína es mediada a través de puentes disulfuro en esta conformación, las predicciones bioinformáticas no correlacionarán con los resultados experimentales obtenidos.
- 2) Estos programas no toman en cuenta la dinámica y el efecto acumulado de otras modificaciones post-traduccionales (cooperativo o inhibitorio); por lo que no es posible predecir una regulación en el tiempo o un orden secuencial de estas modificaciones.

Sin tomar en cuenta estos dos factores al momento de validar las predicciones bioinformáticas de este trabajo, los resultados no serán confiables al momento

de incorporarlas a un contexto de transfección o infección.

Las predicciones bioinformáticas señalan a las cisteínas 2, 5 y 39 como candidatas tanto para formar puentes disulfuro como para ser palmitoiladas. En este trabajo se determinó que los puentes disulfuro (en conformación cis o trans) son importantes para la oligomerización de LC; sin embargo, si la proteína es mono o poli S-palmitoilada y si hay una coexistencia de estas dos modificaciones post traduccionales o una sustituye a la otra queda por ser determinado. Las modificaciones de las cisteínas de la proteína LC podría ser más compleja si se determina que su fosforilación se relaciona con la palmitoilación, efecto que se ha reportado con anterioridad en otras proteínas (Dallavilla et al., 2016).

Para determinar la toxicidad y capacidad de oligomerización de la proteína LC de FCV, se clonaron las secuencias de LC y LC-C40A en el vector de expresión procarionte pRSETA exitosamente. Los resultados de toxicidad de ambas proteínas en las bacterias, evaluado por la cuantificación de UFC resultó en una disminución de las mismas con la expresión de ambas proteínas, siendo menor el efecto cuando se expresa la proteína LC-C40A. Estos resultados correlacionan con el reporte de Barrera-Vazquez y Abente y cols., en donde la expresión de LC en células CRFK es altamente tóxica causando el efecto citopático característico de la infección y eventualmente apoptosis, mientras que LC-C40A ocasiona un fenotipo atenuado de la proteína silvestre y no es capaz de causar la activación de muerte celular programada por su vía intrínseca (Abente et al., 2013; Barrera-Vázquez et al., 2019).

Contrario a lo que esperábamos, al medir cambios en la DO600 tras la inducción de las proteínas LC y LC-C40A no vemos una caída o una reducción en la tasa de aumento de la turbidez en nuestro cultivo celular al ser comparada con bacterias transformadas con el plásmido vacío pRSETA a los mismos tiempos post inducción. Las bacterias transformadas con pRSETA-LC-C40A que expresan a la proteína LC-C40A presentan una aparente mayor

tasa de crecimiento de todas las condiciones, este aumento en la turbidez del cultivo puede deberse a una mayor biomasa de las bacterias que expresan la proteína mutante y se encuentran en una fase de replicación activa, otros experimentos deben de hacerse para determinar la causa tras el aumento en la turbidez del cultivo expresando LC-C40A. El aumento constante en la DO600 de los cultivos expresando LC o LC-C40A puede deberse a una falla en la relocalización de la lisozima T7 al medio de cultivo, resultado que puede atribuirse a dos posibles hipótesis: 1) la formación del canal o poro de la LC puede medirse por medio de S-palmitoilación u otra modificación post traduccional que no ocurre en el citoplasma bacteriano, impidiendo la maduración correcta de la proteína y por lo tanto, su mecanismo de acción o 2) que el poro/canal conformado por la proteína LC impide el paso de moléculas de tamaño igual o mayor a 17kDa, caso similar a lo observado con el péptido delta del virus Ébola, que forma un poro que solo permite paso a moléculas menores a 10kDa (He et al., 2017) y de la defensina de neutrófilos de humanos tipo 2 (HNP-2) cuyo poro permite el paso de moléculas de 0.4kDa, con retención parcial de partículas de 4.4kDa (Wimley, Selsted, & White, 1994); Demostrar esta hipótesis, permitirá determinar si la proteína LC media su acción como una defensina o viroporina no clásica, por lo que es necesario evaluar la permeabilidad de membranas celulares incubadas con LC y estimar el tamaño del poro que esta proteína puede formar.

Los análisis por western blot y (MET) demostraron que las proteínas LC y LC-C40A se localizan en las membranas interna y externa de las bacterias que las expresan. La aparición de cuerpos de inclusión y la presencia tanto a la proteína LC como a la LC-C40A en estos compartimentos era esperado debido a la toxicidad de la proteína. Sin embargo, de manera interesante observamos que la localización de estos cuerpos de inclusión es diferencial; cuando se expresa a la proteína LC los cuerpos de inclusión se localizan típicamente en la región apical de las bacterias mientras que tras la expresión de la proteína

LC C40A estos cuerpos se localizan en medio del citoplasma. Esto puede deberse que ambas proteínas tienen distintos estados de oligomerización en los cuerpos de inclusión, a una toxicidad y eficiencia diferencial para ser incluidas en estos cuerpos membranosos (Zhou et al., 2016).

Todas las bacterias transformadas tanto con el plásmido pRSETA así como con pRSETA-LC y pRSETA-LC-C40A presentan alteraciones en el periplasma de la región polar de la bacteria, que se aprecia como un ensanchamiento previamente reportado que ocurre por la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* (Zhou et al., 2016). Sin embargo, las bacterias que expresaron a la proteína LC muestran una serie de invaginaciones del periplasma hacia la región citoplásmica desde la aparición de uno o más meniscos en el cuerpo medio de la bacteria, hasta la vacuolización de regiones del periplasma en el citoplasma bacteriano. Estas vacuolas presentan un tamaño y apariencia similar a la de los cuerpos plasmolíticos, estructuras vacuolares que surgen en bacterias como respuesta al estrés osmótico causado por un medio de cultivo hipertónico (Schwarz & Kocht, 1995). El hecho de que únicamente las bacterias expresando LC sean las que presentan estos cuerpos plasmolíticos putativos sugieren que la proteína LC de FCV es capaz de alterar el equilibrio osmótico de la bacteria. Por otro lado, la ausencia de estas vacuolas en las bacterias que expresan a la proteína LC-C40A sugiere que ésta no es capaz de inducir este estrés osmótico, lo cual correlaciona con su incapacidad de inducir efecto citopático y apoptosis en células transfectadas. Estos resultados indican que el mecanismo de acción de la proteína LC de FCV podría estar relacionado con la alteración de la osmosis de su organelo blanco; y por otro lado podrían explicar la diferencia en la tasa de replicación de las bacterias expresando las proteínas recombinantes LC y LC-C40A.

Se ha reportado que la expresión de algunas proteínas heterólogas ocasiona un aumento en la tasa de crecimiento en bacterias debido a que las contienen en los cuerpos de inclusión como lo observado en las bacterias expresando LC-C40A; sin embargo, la menor tasa de replicación de bacterias expresando

LC puede deberse a alguna de las siguientes razones:

- 1) El estrés osmótico en el que se encuentran las bacterias que expresan a la proteína LC les impide tener una tasa de replicación similar a las que expresan la LC-C40A.
- 2) Sí ocurre un aumento en la tasa de replicación al comenzar la inducción de la expresión, pero éste se ve eclipsado por la presencia de menos bacterias viables debido a la mayor toxicidad de la proteína LC comparada con LC-C40A.

Tanto la proteína LC como LC-C40A tienen la capacidad de oligomerizar, formando dímeros, trímeros, pentámeros y hexámeros altamente estables detectables por western blot en condiciones no astringentes (sin calor y sin β -mercaptoetanol), siendo el más abundante entre ellos el trímero. Algunas defensinas como las subfamilias de las β y Θ defensinas oligomerizan principalmente en trímeros (Banerjee, Gohil, & Trivedi, 2015; Daly et al., 2007; Gan et al., 2019) Esta asociación es mediada por puentes disulfuro, pues su reducción resultó en la desaparición casi total de los estados oligoméricos de LC y LC-C40A. Estos resultados arrojan información acerca de la naturaleza de los puentes disulfuro formados por las proteínas LC y LC-C40A, sin embargo, si la predicción de sus puentes disulfuro fue la adecuada y su oligomerización depende de los puentes disulfuro en conformación cis, no detectaríamos oligómeros en la proteína mutante ni cambios cuando es incubada con y sin β -mercaptoetanol. Sin embargo, dado que ambas proteínas forman oligómeros semejantes, con la misma sensibilidad a la disociación de los puentes disulfuro, es posible que la formación de estos puentes ocurra de manera diferencial en donde la mutación de la cisteína 40 no podría oligomerizar en cis, pero sí podría hacerlo en trans. Reportes en proteínas virales de naturaleza oligomérica como el canal 3a de SARS-CoV demuestran que la mutación puntual de algunas cisteínas no tiene efecto en su capacidad de formar homo oligómeros (Lu et al., 2006), de manera que no todas las cisteínas parecen ser esenciales para este propósito. El hecho de

que la proteína LC-C40A sea capaz de oligomerizar y localizarse en membranas, sin inducir el estrés osmótico tener la alta toxicidad de su contraparte silvestre, indican que el mecanismo de acción de la proteína LC de FCV es dependiente de la cisteína 40 en su región conservada I, pero que esta cisteína en particular no contribuye a su oligomerización y localización sub celular. Mas pruebas son necesarias para determinar si otras cisteínas en la proteína LC son esenciales para su oligomerización, así como para determinar el papel que juega la cisteína 40 en la toxicidad o inducción de estrés osmótico de la proteína LC de FCV.

Futuros estudios deben de realizarse para determinar si la proteína LC de FCV ocasiona este tipo de estrés en la mitocondria, y si el estrés osmótico es suficiente para ocasionar la relocalización al citoplasma de SMAC/DIABLO reportada por Barrera-Vázquez y colaboradores en 2019, desencadenando la vía clásica de la apoptosis.

10. CONCLUSIONES

La proteína LC de FCV posee sitios putativos de fosforilación, palmitoilación y formación de puentes disulfuro.

La proteína LC de FCV no posee una región polibásica en arreglo helicoidal ni región transmembranal, pero sí la firma molecular de las defensinas tanto en secuencia como en estructura.

La proteína mutante LC-C40A posee la firma molecular de las defensinas en secuencia, mas no en estructura.

LC es capaz de formar oligómeros, es intrínsecamente tóxica y se localiza en la membrana interna y externa de bacterias que la expresan, causando estrés osmótico.

LC-C40A es capaz de oligomerizar y de localizarse en membranas de bacterias que la expresan, pero su toxicidad es menor comparada con la LC y no es capaz de generar estrés osmótico.

La oligomerización de LC y de LC-C40A es mediada por puentes disulfuro.

El conjunto de estos resultados sugiere que la proteína LC es una viroporina no clásica.

11. PERSPECTIVAS

Determinar la capacidad de la proteína LC de FCV de permear membranas celulares.

Determinar si la proteína de LC de FCV forma un poro o canal, así como su tamaño, tipo y especificidad.

Determinar la localización de la proteína LC-C40A en células CRFK transfectadas con el plásmido pAm-CyanLC-C40A.

Identificar el papel de la fosforilación y palmitoilación en la actividad de la proteína LC de FCV.

Determinar la localización de la proteína LC de FCV a lo largo del ciclo de replicación de FCV.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abente, E. J., Sosnovtsev, S. V., Sandoval-Jaime, C., Parra, G. I., Bok, K., & Green, K. Y. (2013). The Feline Calicivirus Leader of the Capsid Protein Is Associated with Cytopathic Effect. *Journal of Virology*, *87*(6), 3003–3017. <https://doi.org/10.1128/JVI.02480-12>
- Alhatlani, B., Vashist, S., & Goodfellow, I. (2015a). Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. *Virus Research*, *206*, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.002>
- Alhatlani, B., Vashist, S., & Goodfellow, I. (2015b). Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. *Virus Research*, *206*(February), 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.002>
- Aweya, J. J., Mak, T. M., Lim, S. G., & Tan, Y. J. (2013). The p7 protein of the hepatitis C virus induces cell death differently from the influenza A virus viroporin M2. *Virus Research*, *172*(1–2), 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.005>
- Banerjee, D., Gohil, T., & Trivedi, S. (2015). ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF OLIGOMERIC β – DEFENSIN ISOLATED FROM HEART TISSUE OF CAPRA HIRCUS. *Innovare Academic Sciences*, *7*(3), 3–7.
- Barrera-Vázquez, O. S., Cancio-Lonches, C., Hernández-González, O., Chávez-Munguía, B., Villegas-Sepúlveda, N., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2019). The feline calicivirus leader of the capsid protein causes survivin and XIAP downregulation and apoptosis. *Virology*, *527*(July 2018), 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.11.017>
- Bok, K., & Green, K. Y. (2012). Norovirus Gastroenteritis in

Immunocompromised Patients, 2126–2132.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1207742>

- Concepts, C., Glass, R. I., Parashar, U. D., Estes, M. K., & Mountain, S. (2009). Norovirus Gastroenteritis. *The New England Journal Of Medicine*, (361), 1776–1785.
- Costantini, V., Morantz, E. K., Browne, H., Ettayebi, K., Zeng, X. L., Atmar, R. L., ... Vinjé, J. (2018). Human norovirus replication in human intestinal enteroids as model to evaluate virus inactivation. *Emerging Infectious Diseases*, 24(8), 1453–1464. <https://doi.org/10.3201/eid2408.180126>
- Dallavilla, T., Abrami, L., Sandoz, P. A., Savoglidis, G., Hatzimanikatis, V., & van der Goot, F. G. (2016). Model-Driven Understanding of Palmitoylation Dynamics: Regulated Acylation of the Endoplasmic Reticulum Chaperone Calnexin. *PLoS Computational Biology*, 12(2), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004774>
- Daly, N. L., Chen, Y., Rosengren, K. J., Marx, U. C., Phillips, M. L., Waring, A. J., ... Craik, D. J. (2007). Retrocyclin-2 : Structural Analysis of a Potent Anti-HIV θ -Defensin †,‡, 1, 9920–9928.
- Fields, B. N., In Knipe, D. M., & I. H. P. M. (2013). *Fields Virology. Fields Virology*. <https://doi.org/9781451105636>
- Fröhlich, M., Dejanovic, B., Kashkar, H., Schwarz, G., & Nussberger, S. (2014). S-palmitoylation represents a novel mechanism regulating the mitochondrial targeting of BAX and initiation of apoptosis. *Cell Death and Disease*, 5(2), 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.17>
- Gallaher, W. R., & Garry, R. F. (2015). Modeling of the ebola virus delta peptide reveals a potential lytic sequence motif. *Viruses*, 7(1), 285–305. <https://doi.org/10.3390/v7010285>
- Gan, W., Schneidman, D., Zhang, N., Nussinov, R., Sciences, T., Francisco, S., ... Aviv, T. (2019). Probing Oligomerized Conformations of Defensin in the Membrane. *HHS Public Access*, 2, 353–362. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6637-0>
- Giorda, K. M., & Hebert, D. N. (2013). Viroporins Customize Host Cells for Efficient Viral Propagation. *DNA and Cell Biology*, 32(10), 557–564. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2159>
- González, M. E. (2015). Vpu protein: The viroporin encoded by HIV-1. *Viruses*, 7(8), 4352–4368. <https://doi.org/10.3390/v7082824>
- Greaves, J., Prescott, G. R., Gorleku, O. A., & Chamberlain, L. H. (2009). The fat controller: Roles of palmitoylation in intracellular protein trafficking and targeting to membrane microdomains (Review). *Molecular Membrane Biology*, 26(1–2), 67–79. <https://doi.org/10.1080/09687680802620351>
- Harwig, S. S. L. (1996). Intramolecular disulfide bonds enhance the

- antimicrobial and lytic activities of protegrins at physiological sodium chloride concentrations. *European Journal of Biochemistry*, 240(2), 352–357. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0352h.x>
- He, J., Melnik, L. I., Komin, A., Wiedman, G., Fuselier, T., Morris, C. F., ... Wimley, W. C. (2017). Ebola Virus Delta Peptide Is a Viroporin. *Journal of Virology*, 91(16), e00438-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00438-17>
- Hyser, J. M., Collinson-Pautz, M. R., Utama, B., & Estes, M. K. (2010). Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *MBio*, 1(5), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00265-10>
- Kirk, M. D., Pires, S. M., Black, R. E., Caipo, M., & Crump, J. A. (2015). World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial , Protozoal , and Viral Diseases , 2010 : A Data Synthesis, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921>
- Liao, Y., Yuan, Q., Torres, J., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2006). Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology*, 349(2), 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.01.028>
- Lu, W., Zheng, B.-J., Xu, K., Schwarz, W., Du, L., Wong, C. K. L., ... Sun, B. (2006). Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12540–12545. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605402103>
- Ma, B., Niu, C., Zhou, Y., Xue, X., Meng, J., Luo, X., & Hou, Z. (2016). The disulfide bond of the peptide thanatin is dispensible for its antimicrobial activity in vivo and in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4283–4289. <https://doi.org/10.1128/AAC.00041-16>
- Madan, V., Castelló, A., & Carrasco, L. (2008). Viroporins from RNA viruses induce caspase-dependent apoptosis. *Cellular Microbiology*, 10(2), 437–451. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01057.x>
- Marques, M. M., & Higuchi, M. L. (2012). Mitochondrial Swelling and Incipient Outer Membrane Rupture in Preapoptotic and Apoptotic Cells. *THE ANATOMICAL RECORD*, 1659(August), 1647–1659. <https://doi.org/10.1002/ar.22553>
- Martinez-Gil, L., Bano-Polo, M., Redondo, N., Sanchez-Martinez, S., Nieva, J. L., Carrasco, L., & Mingarro, I. (2011). Membrane Integration of Poliovirus 2B Viroporin. *Journal of Virology*, 85(21), 11315–11324. <https://doi.org/10.1128/JVI.05421-11>
- Martinez-Gil, Luis, & Mingarro, I. (2015). Viroporins, examples of the two-stage membrane protein folding model. *Viruses*, 7(7), 3462–3482.

<https://doi.org/10.3390/v7072781>

- Mattison, C. P., Cardemil, C. V., & Hall, A. J. (2018). Progress on Norovirus vaccine research: Public health considerations and future directions. *Expert Review of Vaccines*, 0(0), 1. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1510327>
- Natoni, A., Kass, G. E. N., Carter, M. J., & Roberts, L. O. (2006). The mitochondrial pathway of apoptosis is triggered during feline calicivirus infection. *Journal of General Virology*, 87(2), 357–361. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81399-0>
- Patil, N. A., Tailhades, J., Hughes, R. A., Separovic, F., Wade, J. D., & Hossain, M. A. (2015). Cellular disulfide bond formation in bioactive peptides and proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 1791–1805. <https://doi.org/10.3390/ijms16011791>
- Rossman, Jing, Leser, L. (2011). Influenza Virus M2 Protein Mediates ESCRT-Independent Membrane Scission. *Cell*, 142(6), 902–913. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.029>.Influenza
- Schmitt, P., Rosa, R. D., & Destoumieux-Garzón, D. (2016). An intimate link between antimicrobial peptide sequence diversity and binding to essential components of bacterial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(5), 958–970. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.011>
- Schwarz, H., & Kocht, A. L. (1995). Phase and electron microscopic observations of osmotically induced wrinkling and the role of endocytotic vesicles in the plasmolysis of the. *Microbiology*, (141), 3161–3170.
- Scott, C., & Griffin, S. (2015). Viroporins: Structure, function and potential as antiviral targets. *Journal of General Virology*, 96(8), 2000–2027. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000201>
- Shrivastava, G., García-Cordero, J., León-Juárez, M., Oza, G., Tapia-Ramírez, J., Villegas-Sepulveda, N., & Cedillo-Barrón, L. (2017). NS2A comprises a putative viroporin of Dengue virus 2. *Virulence*, 8(7), 1450–1456. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1356540>
- Sosnovtsev, S. V., Sosnovtseva, S. A., & Green, K. Y. (1998). Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *Journal of Virology*, 72(4), 3051–3059.
- Tafazoli, F., Zeng, C. Q., Estes, M. K., Magnusson, K. E., & Svensson, L. (2001). NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *Journal of Virology*, 75(3), 1540–1546. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1540-1546.2001>
- Thorne, L. G., & Goodfellow, I. G. (2014). Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology*, 95(PART 2), 278–291.

<https://doi.org/10.1099/vir.0.059634-0>

- Tohya, Y., Shinchi, H., Matsuura, Y., Maeda, K., Ishiguro, S., Mochizuki, M., & Sugimura, T. (1999). Analysis of the N-terminal polypeptide of the capsid precursor protein and the ORF3 product of feline calicivirus. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1043–1047.
- Van Dycke, J., Ny, A., Conceição-Neto, N., Maes, J., Hosmillo, M., Goodfellow, I., ... Rocha-Pereira, J. (2019). A robust human norovirus replication model in zebrafish larvae Clinical and Epidemiological Virology. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/528364>
- Vashist, S., Balley, D., Putics, A., & Goodfellow, I. (2009). Model systems for the study of human norovirus biology. *Future Virology*, 4(4), 353–367. <https://doi.org/10.2217/fvl.09.18>
- Veit, M. (2012). Palmitoylation of virus proteins. *Biology of the Cell*, 104(9), 493–515. <https://doi.org/10.1111/boc.201200006>
- Veit, M., Serebryakova, M. V., & Kordyukova, L. V. (2013). Palmitoylation of influenza virus proteins Fatty acid species bound to HA and HEF, 41, 50–55. <https://doi.org/10.1042/BST20120210>
- Wimley, W. C., Selsted, M. E., & White, S. H. (n.d.). Interactions between human defensins and lipid bilayers : Evidence for formation of multimeric pores.
- Yount, N. (2004). Multidimensional signatures in antimicrobial peptides, 101(19), 7363–7368. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401567101>
- Zhou, Y., Liu, P., Gan, Y., Sandoval, W., Katakam, A. K., Reichelt, M., ... Reilly, D. (2016). Enhancing full-length antibody production by signal peptide engineering. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0445-3>