



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
INSTITUTO DE PARASITOLOGÍA Y BIOMEDICINA LÓPEZ-NEYRA

**Selección y caracterización de RNAs dirigidos contra el dominio genómico CRE del virus de la hepatitis C (HCV).**

Soledad Marton García

Tesis Doctoral

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Soledad Marton García  
D.L.: GR 345-2013  
ISBN: 978-84-9028-348-6



Parte de los resultados publicados en esta tesis han sido publicados en la siguiente revista:

**Marton , S., B. Berzal-Herranz, E. Garmendia, F. J. Cueto y A. Berzal-Herranz** (2012). "Anti-HCV RNA Aptamers Targeting the Genomic cis-Acting Replication Element." *Pharmaceuticals* **5**(1): 49-60.

**Marton, S., Romero-López, C., Berzal-Herranz, A.** (2012) "RNA aptamer-mediated interference of HCV replication by targeting the CRE-5BSL3.2 domain". *Journal of viral Hepatitis*. doi:10.1111/j.1365-2893.2012.01629.x



# Índice

1. Resumen. ....	11
2. Introducción. ....	13
2.1. Estructura del virión. ....	13
2.2. Ciclo del HCV. ....	14
2.3. Variabilidad genética del HCV. ....	18
2.4. Dominios genómicos funcionales. ....	22
2.5. Dominio genómico CRE. ....	24
2.6. Replicación. ....	28
2.7. Fases de la hepatitis C. ....	32
2.8. Tratamiento de la hepatitis C. ....	33
2.9. Genoma del HCV como blanco de acción de inhibidores basados en ácidos nucleicos. ...	35
2.9.1 Oligonucleótidos <i>antisense</i> . ....	36
2.9.2.           Herramientas moleculares basadas en el RNA. ....	39
2.9.2.1. RNAs de interferencia. ....	40
2.9.2.2. RNAs <i>decoys</i> . ....	43
2.9.2.3. Ribozimas. ....	44
2.9.2.4. Aptámeros. ....	49
3. Objetivos. ....	55
4. Materiales y métodos. ....	56
4.1. Materiales. ....	56
4.1.1. Productos químicos. ....	56
4.1.2 Enzimas de restricción y modificadores de DNA y de RNA. ....	56
4.1.3 Isótopos radiactivos. ....	56
4.1.4 Películas autorradiograficas. ....	56
4.1.5 Medios de cultivo. ....	56

4.1.6 Tampones .....	57
4.1.7 Construcciones de DNA y síntesis de RNA.....	61
4.1.7.1 HCV-CRE <sub>194</sub> .....	61
4.1.7.2. 3'HCV-9181 .....	61
4.1.7.3. pET-NS5BΔ21.....	62
4.1.7.4. pGT-Pn.....	62
4.1.7.5. pUC19-aptámero.....	62
4.1.7.6. RNA <sub>80</sub> .....	63
4.1.8 Cepas Bacterianas.....	63
4.1.9. Marcadores de masa molecular.....	63
4.1.9.1. Para DNA.....	63
4.1.9.2. Para RNA.....	63
4.1.10. Programas informáticos.....	64
4.2. Métodos.....	65
4.2.1. Cultivo de células procariotas.....	65
4.2.2. Cultivos de células eucariotas.....	65
4.2.3. Crioconservación de células procariotas.....	66
4.2.4. Crioconservación de células eucariotas.....	66
4.2.5. Transformación de <i>E. coli</i> con DNA plasmídico.....	66
4.2.5.1 Transformación por choque térmico.....	66
4.2.5.2. Transformación por electroporación.....	67
4.2.6 Selección de colonias recombinantes de <i>E. coli</i> .....	67
4.2.7. Transfección de las células eucariotas.....	68
4.2.8. Síntesis de ácidos nucleicos .....	68
4.2.10. Reacción en cadena de la polimerasa .....	68
4.2.11. Transcripción <i>in vitro</i> .....	69

4.2.11.1. Transcripción <i>in vitro</i> a pequeña escala .....	69
4.2.11.2. Transcripción <i>in vitro</i> a gran escala .....	70
4.2.12. RT-PCR cuantitativa .....	70
4.2.12.1. Retrotranscripción .....	71
4.2.12.2. PCR cuantitativa.....	71
4.2.13 Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	72
4.2.13.1. Pequeña escala.....	72
4.2.13.2. Gran escala .....	72
4.2.14. Electroforesis .....	72
4.2.14.1. De ácidos nucleicos .....	72
4.2.14.1.1. En geles de agarosa.....	72
4.2.14.1.2. En geles desnaturalizantes de poliacrilamida.....	73
4.2.14.1.2. En geles nativos de poliacrilamida.....	73
4.2.14.2. Electroforesis de proteínas.....	73
4.2.15. Purificación de ácidos nucleicos .....	74
4.2.15.1. Extracción fenólica y precipitación .....	74
4.2.15.2. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa .....	74
4.2.15.2.1. Método de congelación con fenol .....	75
4.2.15.2.2 Método “ <i>Wizard SV Gel Clean Up</i> ®” (Promega, Madison, USA)....	75
4.2.15.3. Purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de poliacrilamida. 75	
4.2.15.4. Cromatografía por exclusión de tamaños.....	76
4.2.15.5. Extracción de RNA a partir de células eucariotas con <i>Trizol</i> ® <i>Reagent</i> . .....	76
4.2.16. Purificación de la proteína NS5BΔ21. ....	77
4.2.17. Cuantificación de ácidos nucleicos. ....	78
4.2.17.1. Mediante espectrofotometría.....	78
4.2.17.2. Cuantificación de RNA marcado radiactivamente en solución. ....	78



4.2.17.3. Cuantificación de RNA radiactivo inmovilizado en soporte sólido. ....	78
4.2.18. Secuenciación automática de DNA. ....	79
4.2.19. Digestión de ácidos nucleicos. ....	79
4.2.19.1. DNA. ....	79
4.2.19.1.1. Enzimas de restricción. ....	79
4.2.19.1.2. RQ1 DNasa. ....	79
4.2.19.2. RNA. ....	80
4.2.19.2.1. RNasa T1. ....	80
4.2.19.2.2. Degradación con Pb <sup>2+</sup> del RNA. ....	80
4.2.19.2.3. Hidrólisis alcalina de RNA. ....	81
4.2.20. Ligación del DNA. ....	81
4.2.21. Desfosforilación de ácidos nucleicos. ....	82
4.2.21.1. Desfosforilación de DNA. ....	82
4.2.21.2. Desfosforilación de RNA. ....	82
4.2.22. Técnicas de marcaje de ácidos nucleicos. ....	82
4.2.22.1. Marcaje radiactivo de RNA. ....	82
4.2.22.1.1. Marcaje radiactivo en el extremo 5'. ....	82
4.2.22.1.2. Marcaje radiactivo en el extremo 3'. ....	83
4.2.22.1.3. Marcaje radiactivo interno. ....	83
4.2.22.2. Marcaje interno con biotina de RNA. ....	83
4.2.23. Reacciones de asociación. ....	84
4.2.24. Método de selección molecular <i>in vitro</i> . ....	85
4.2.24.1. Obtención de una población de partida. ....	85
4.2.24.2. Selección de las moléculas que se unen al HCV-CRE <sub>194</sub> . ....	86
4.2.24.3. Amplificación. ....	87
4.2.25. Ensayos de competición de la unión de la proteína NS5BΔ21 al extremo 3' del HCV. ....	88

4.2.26. Inmovilización de los complejos ribonucleoproteicos en un soporte sólido (Dot-Blot).....	88
5. Resultados.....	90
5.1. Selección molecular <i>in vitro</i> .....	90
5.1.2 Análisis de los aptámeros seleccionados.....	94
5.1.2.1. Análisis de la estructura primaria de los aptámeros de las poblaciones P6-P9.....	94
5.1.2.2. Análisis de las dianas teóricas de unión en el HCV-CRE <sub>194</sub> .....	97
5.2. Identificación experimental de las dianas de unión en el HCV-CRE <sub>194</sub> .....	99
5.2.1. Dianas de los aptámeros del grupo 1.....	103
Aptámero P6-61.....	103
Aptámero P7-54.....	106
5.2.2. Dianas de los aptámeros del grupo 2.....	107
Aptámero P7-78.....	108
Aptámero P8-58.....	109
5.2.3. Dianas de los aptámeros del grupo 3.....	112
Aptámero P7-14.....	112
Aptámero P8-71.....	113
5.2.4. Dianas de los aptámeros del grupo 4.....	115
Aptámero P9-15.....	116
5.2.5. Dianas de los aptámeros del grupo 5.....	117
Aptámero P9-8.....	117
5.3. Estudio de la estructura de los aptámeros dirigidos frente al subdominio 5BSL3.2.....	119
5.4. Competición de la unión de la RNA polimerasa viral al extremo 3' del HCV.....	123
5.5. Estudio de la asociación de los aptámeros del grupo 2 al HCV-CRE <sub>194</sub> .....	125
5.6. Efecto de los aptámeros en la replicación del HCV.....	126
6. Discusión.....	129

6. 1. Selección aptámeros de RNA contra HCV-CRE <sub>194</sub> .....	129
6.2. Sitio de unión de los aptámeros en el HCV-CRE <sub>194</sub> .....	132
6.3. Estudios funcionales de los aptámeros.....	137
7. Conclusiones .....	143
8. Bibliografía.....	145

## 1. Resumen.

El virus de la hepatitis C tiene un genoma de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 9600 nucleótidos. Durante la replicación se genera una alta variabilidad genómica debido a la falta de actividad correctora de errores de la RNA polimerasa viral (NS5B). La gran variabilidad le posibilita al virus adaptarse rápidamente a cambios de su entorno, permitiendo la aparición de variantes resistentes a los tratamientos específicos que tienen como blanco las proteínas virales. A pesar de la alta variabilidad genética, el genoma del HCV presenta dominios genómicos conservados tanto en secuencia como en estructura que en sí mismos cumplen funciones esenciales en procesos claves del ciclo viral. La acción directa de inhibidores contra estas regiones es una estrategia muy prometedora para el abordaje de una terapia antiviral. En la región 3' codificante de la proteína NS5B se encuentra un elemento genómico que es esencial para la replicación, llamado CRE (del inglés *cis* acting replication element). El CRE se pliega en una estructura cruciforme compuesta por tres motivos tallo lazo, 5BSL3.1, 5BSL3.2 y 5BSL3.3. En el presente trabajo se aplicó un método de selección molecular *in vitro* (SELEX) con el fin de seleccionar moléculas que se unan específicamente (aptámeros) al CRE y puedan tener un efecto sobre su función en la replicación viral. El análisis de las secuencias obtenidas después de nueve rondas de selección permitió identificar cinco motivos de secuencias presentes en las variantes seleccionadas de las poblaciones P6 a P9. Los motivos eran complementarios a cinco regiones del CRE pudiéndose identificar cinco potenciales dianas para la unión. Mediante ensayos de protección frente a la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> se identificaron experimentalmente cuatro de ellas. Aptámeros con distintas dianas de unión en el CRE se utilizaron para transfectar líneas celulares Huh-7 portadoras de replicones sub-genómicos del virus de la hepatitis C y se vio que eran capaces de inhibir hasta un 80% la replicación viral. El dominio CRE como blanco de acción para una terapia anti-HCV no ha sido caracterizado hasta la fecha. Los resultados aportados en este trabajo describen al dominio genómico CRE como una buena diana terapéutica y muestran el uso de aptámeros para el estudio de los procesos claves en la biología del HCV como lo es la replicación.



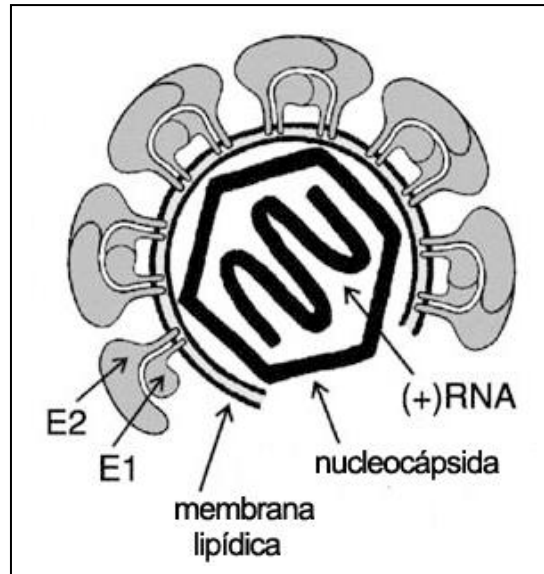
## 2. Introducción.

Más de 170 millones de personas están infectadas crónicamente por el virus de la hepatitis C (HCV) en el mundo (datos de la WHO del 2002). Aproximadamente el 30% de las personas infectadas desarrollan cirrosis y carcinoma hepatocelular (Hoofnagle, 1997) siendo esta la principal causa de enfermedad hepática a nivel mundial (Poynard *et al.*, 2003). Actualmente no se cuenta con una vacuna contra el virus y no existe una terapia eficaz. En el caso de infecciones con el virus del genotipo 1, el más frecuente en España, la terapia disponible es efectiva solo en el 30-50% de los pacientes tratados. A causa de su gran importancia clínica, el HCV es objeto de una intensa investigación.

La hepatitis C fue descubierta en 1975 en pacientes que habían recibido transfusiones sanguíneas y fue denominada hepatitis no A y no B (Feinstone *et al.*, 1975). Debido en gran parte a su incapacidad para propagarse eficientemente en cultivos celulares se tardó más de una década hasta que en 1989 el grupo de Michael Houghton clonó y caracterizó el agente etiológico: Un virus de la familia *Flaviviridae* perteneciente al género *Hepacivirus* (Choo *et al.*, 1989). La familia *Flaviviridae* incluye tres géneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus* y *Pestivirus*. Todos los virus de la familia *Flaviviridae* son virus con envuelta y su material genético es RNA simple cadena de polaridad positiva. Sin embargo, cada género es serológicamente distinto y presenta diferencias importantes a nivel de su organización genómica.

### 2.1. Estructura del virión.

La partícula del virus de la hepatitis C tiene un tamaño de entre 40-70 nm de diámetro (Kaito *et al.*, 1994). Está formada por una envoltura lipídica (cuyo origen es de la célula hospedadora) a la que se anclan las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2, de 33-35 kDa y de 70-72 kDa, que se encuentran formando heterodímeros mediante la interacción de sus dominios transmembrana C terminales (Lambot *et al.*, 2002). La envoltura lipoproteica envuelve a la nucleocápsida viral que está compuesta por múltiples copias de la proteína de la cápsida (ver figura I. 1). La proteína de la cápsida de 21 kDa tiene un dominio hidrofóbico N-terminal y un dominio C-terminal, con una gran cantidad de residuos aminoacídicos básicos, mediante el cual se une al RNA y forma homooligómeros. En el interior de la nucleocápsida existe una molécula del genoma viral.



**Figura I. 1: Esquema de la estructura del virión de la hepatitis C.** Se señalan las proteínas de la envuelta, E1 y E2, la membrana lipídica, la nucleocápsida y el genoma de RNA. Tomado de (Bartenschlager *et al.*, 2004).

El RNA genómico es monocatenario, de polaridad positiva y tiene un tamaño de aproximadamente 9600 nucleótidos. Contiene un solo marco de lectura abierto flanqueado por dos regiones no traducibles (UTR del inglés, *untranslated region*) 5' y 3'. Codifica para una poliproteína de aproximadamente 3111 aa que se procesa en 10 proteínas virales: tres proteínas estructurales, (la proteína de la cápsida y las proteínas de la envoltura lipídica E1 y E2) y las proteínas no estructurales que incluyen: el canal iónico p7, las proteínas NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B que se comentarán más adelante.

## 2.2. Ciclo del HCV.

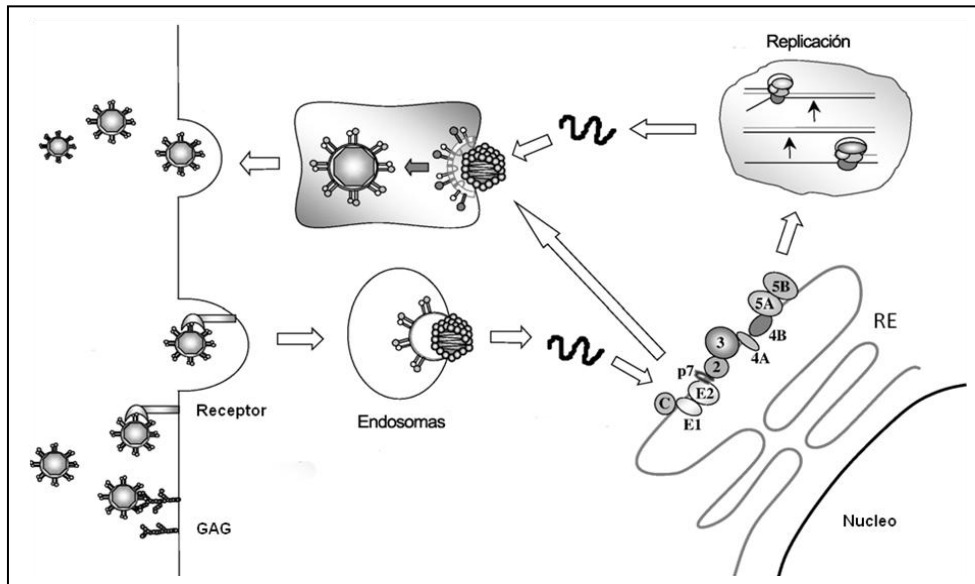
El HCV circula en varias formas en el hospedador infectado, puede estar asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL), unido a inmunoglobulinas o como viriones libres (André *et al.*, 2005). La forma asociada a las lipoproteínas es la más infecciosa. El HCV solamente infecta a humanos y chimpancés y su principal blanco son las células hepáticas. El ciclo viral comprende la entrada del virus a la célula, la liberación del genoma viral en el citoplasma seguido de la traducción y la replicación del RNA, el ensamblaje de nuevas partículas y el egreso (revisado por (Moradpour *et al.*, 2007), ver figura I. 2).

La entrada del virus a la célula es un proceso de múltiples pasos en el que están implicados muchos factores celulares. En una primera etapa, las partículas virales son atraídas a la superficie celular mediante la unión de las lipoproteínas al receptor LDL de la superficie celular

(LDLR), y/o por la unión de la glicoproteína E2 al heparán sulfato. Posteriormente, es necesaria la interacción de la proteína E2 con el receptor CD81 y el receptor SR-BI (del inglés *Scavenger receptor class B member 1*), Claudina-1 y ocludina de la superficie celular. La internalización ocurre mediante endocitosis dependiente de clatrina; posteriormente el genoma viral es liberado desde los endosomas tempranos al citoplasma mediante un proceso de fusión dependiente de pH, revisado por (Moradpour *et al.*, 2007).

El primer paso tras de la entrada del virus al citoplasma es la traducción de la poliproteína. Este proceso es iniciado a través de un mecanismo independiente de 5' cap, mediante un sitio de inicio interno de la traducción llamado IRES (del inglés: *Internal Ribosome Entry Site*). El IRES se localiza mayoritariamente en la región 5' no traducible y se extiende hasta los primeros 40 nucleótidos de la región codificante para la proteína de la cápsida (Wang *et al.*, 1993; Reynolds *et al.*, 1995). La traducción del HCV comienza con la formación de un complejo binario entre el IRES y la subunidad ribosomal 40S (Otto y Puglisi, 2004). Posteriormente ocurre el ensamblaje de un complejo similar al 48S, con la asociación del factor de inicio de la traducción eIF3 y el complejo ternario eIF2•Met-tRNA•GTP (Otto y Puglisi, 2004). Finalmente, el paso limitante es la asociación dependiente de GTP de la subunidad 60S para formar el complejo 80S (Otto y Puglisi, 2004). La traducción del marco de lectura abierto genera un polipéptido que es procesado co y post traduccionalmente para dar origen a las proteínas virales, revisado por (Moradpour *et al.*, 2007).





**Figura I. 2: Esquema del ciclo del HCV.** El ciclo del virus comienza con la adhesión del virus a la membrana plasmática de la célula, la internalización mediante un mecanismo dependiente de clatrina, la liberación del genoma viral, seguido de la traducción, el procesamiento de las proteínas virales y la formación de los complejos de replicación. Posteriormente ocurre la replicación del genoma viral en los complejos de replicación derivados de membranas del retículo endoplásmico (RE), el ensamblaje de las nuevas partículas virales y el egreso. Tomado de (Suzuki *et al.*, 2007).

Una señal interna localizada entre la proteína de la cápsida y E1 direccionan el polipéptido naciente a la membrana del retículo endoplásmico (McLauchlan *et al.*, 2002). En el lumen del retículo endoplásmico ocurre el procesamiento de las proteínas del HCV. Las proteínas estructurales y el canal iónico p7 son procesados por una peptidasa celular, mientras que las proteínas no estructurales son procesadas por las proteasas NS2-3 y NS3-4A. La primera proteína codificada por el marco de lectura abierto es la proteína de la cápsida seguida por E1 y E2, revisado por (Moradpour *et al.*, 2004). Las funciones de ellas fueron detalladas anteriormente. Luego se sintetiza el canal iónico p7. Su función no está del todo clara y aunque no es esencial para la replicación del RNA *in vitro*, p7 es esencial para producir infección *in vivo* (Sakai *et al.*, 2003). La proteasa NS2-3 tiene su actividad catalítica en la mitad C terminal de NS2 y en el tercio N terminal de NS3 (Grakoui *et al.*, 1993; Hijikata *et al.*, 1993). El complejo proteico NS3-4A, posee actividad serin proteasa en el tercio N-terminal de NS3 y actividad RNA helicasa/NTPase en los dos tercios C-terminales. El polipéptido NS4A funciona como co-factor para la actividad serin proteasa de NS3 (Wolk *et al.*, 2000). NS4B tiene 27 kDa y una de sus funciones es inducir la formación de la red membranosa que sirve de esqueleto para el complejo de replicación del HCV (Egger *et al.*, 2002; Gosert *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2003). NS5A es una fosfoproteína que se puede encontrar tanto en la forma basalmente fosforilada (56 kDa) como

hiperfosforilada (58 kDa). El estado de fosforilación de NS5A parece modular la eficiencia en la replicación de HCV, ya que las mutaciones adaptativas en cultivos celulares son aquellas que implican a las serinas requeridas para la hiperfosforilación (Neddermann *et al.*, 2004). Análisis de la estructura cristalográfica de NS5A demuestran que tiene una estructura dimérica, una hélice alfa mediante la que se ancla a la membrana del RE y propiedades de superficie bien definidas capaces de interactuar con proteínas virales, celulares y con el RNA (Tellinghuisen *et al.*, 2005). Múltiples dímeros de NS5A sostendrían el RNA viral dentro de las membranas celulares y coordinarían las diferentes etapas durante la replicación del HCV. NS5A parece tener además, otras funciones alguna de ellas asociadas a los mecanismos de evasión e inactivación de la respuesta inmune celular (ver más adelante). NS5B es la RNA polimerasa dependiente de RNA. NS5B se ancla a la membrana mediante 21 residuos aminoácidos c-terminales que son dispensables para la actividad polimerasa, pero sí son imprescindibles para la replicación viral dentro de las células (Moradpour *et al.*, 2004). Esta enzima está extensamente caracterizada y es el principal blanco terapéutico para el diseño de inhibidores del virus.

ARFP/F, (*Alternative Reading Frame Protein o frameshift proteín*), de aproximadamente 160 aa, fue identificada en la región de la cápsida, como resultado de un desplazamiento en el marco de lectura de -2 o +1 nucleótidos en el genotipo 1A. (Branch *et al.*, 2005). Por otro lado, no se conoce la función de ARFP en el ciclo viral. Además, se ha observado una alta variabilidad entre los genotipos tanto del sitio de corrimiento del marco de lectura, como del tamaño potencial de la proteína. Ello contrasta con la naturaleza evolutivamente conservada en muchos aspectos de la replicación del HCV, donde todos los genotipos presentan un complemento idéntico de genes de similar o idéntico tamaño. Estos hechos han llevado a que algunos investigadores propongan que tal vez el gen identificado sea un artefacto computacional. Ello ocurriría como consecuencia de las restricciones impuestas en la estructura del RNA que afectan a la tercera posición del codón en el gen codificante para la proteína de la cápsida (ver más adelante, (Tuplin *et al.*, 2004)).

Posteriormente a la síntesis y procesamiento de las proteínas virales, ocurre la replicación del genoma viral. Para ello es necesaria la formación de los complejos de replicación asociados a membrana compuesto por proteínas virales, RNA replicativo y membranas celulares alteradas. La formación de estas estructuras para la replicación es una característica de los virus RNA. En el caso del HCV, los complejos de replicación se forman en membranas resistentes a la acción de los detergentes, contienen balsas lipídicas ricas en colesterol y que se originan a partir del

retículo endoplásmico (Shi *et al.*, 2003; Aizaki *et al.*, 2004). La replicación ocurre mediante la síntesis de una cadena complementaria de RNA (de polaridad negativa) utilizando como molde el RNA genómico. A continuación utilizando como molde la cadena de RNA de polaridad negativa, se sintetizan las cadenas de RNA con polaridad positiva que constituirán el genoma de los nuevos viriones.

Se conoce muy poco acerca de los últimos pasos del ciclo viral. La proteína NS2 y posiblemente otras proteínas no estructurales están implicadas en empaquetamiento viral. Los viriones presumiblemente se forman mediante gemación del retículo endoplásmico o de un compartimento derivado del retículo endoplásmico y salen de la célula mediante la vía secretoria, revisado por (Moradpour *et al.*, 2007).

### **2.3. Variabilidad genética del HCV.**

El HCV presenta gran variabilidad genética, lo que ha llevado a clasificarlo en seis genotipos o clados y en más de 200 subtipos o cepas diferentes. Los genomas de los distintos genotipos presentan una diferencia promedio de entre un 30% a un 35% en la secuencia nucleotídica (Simmonds *et al.*, 1993). Los subtipos o cepas presentan entre un 20-25% de diferencia (Simmonds *et al.*, 1993). Finalmente, el HCV se diversifica aún más dentro de un individuo infectado a lo largo del tiempo formando una estructura poblacional en cuasiespecies (Martell *et al.*, 1992).

Los diferentes genotipos frecuentemente muestran diferentes distribuciones geográficas en la población humana y se pueden asociar con factores particulares de riesgo de infección (revisado por (Simmonds, 2004)). En los países de occidente los genotipos 1a y 1b son los predominantes, seguidos de los genotipos 2 y 3a. Los otros subtipos son mayoritarios en otras áreas, como por ejemplo en el Oeste de África la infección predominante es la del genotipo 2 y en África central son los genotipos 1 y 4 (principalmente en república del Congo y Gabón). El genotipo 5, en Sudáfrica y el genotipo 6, en el Sudeste Asiático.

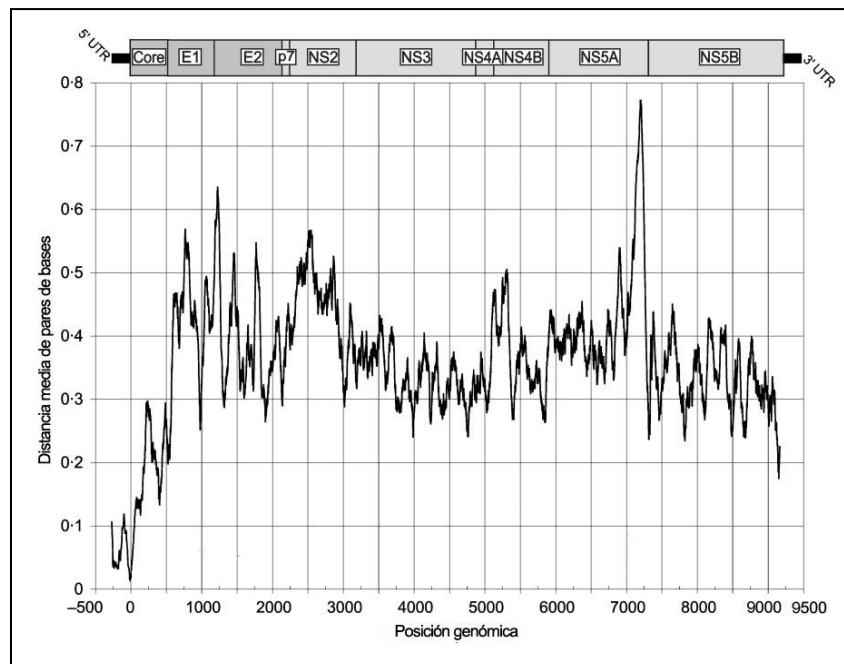
Actualmente se propone que el HCV ha sido endémico por un tiempo considerable en la zona del sur del Sahara en África y en el Sud-Este de Asia. La ocurrencia de infección en occidente y en otros países no tropicales es un hecho relativamente reciente (Simmonds, 2001; Ndjomou *et al.*, 2003). Ello sucedió en el siglo XX y como resultado de la exposición parenteral, las transfusiones de sangre iniciadas en 1940, el uso médico frecuente de agujas no esterilizadas para las inyecciones y vacunaciones y el uso de drogas inyectables.

Existen evidencias en las secuencias nucleotídicas que indican que la alta tasa de divergencia observada a nivel genotípico se debe a una evolución tanto Darwiniana (o selectiva) como “neutral” (Simmonds, 2004). En este sentido, la mayoría de la diversidad genética se debe a un proceso de deriva genética neutral. Ello se pone de manifiesto en el hecho de que los diferentes genotipos en los que se clasifica el HCV tienen una distribución geográfica o epidemiológica diferente. Por otra parte, a pesar de las diferencias observadas entre los diferentes genotipos, todos tienen un ciclo replicativo similar en el hombre, comparten los altos títulos infectivos en la sangre, y causan una lenta, progresiva y larga infección asintomática, factores que aseguran la transmisión. La ausencia de innovación a nivel fenotípico a lo largo de un período de tiempo largo, donde actuó la evolución divergente, demuestra que la evolución del HCV está moldeada y restringida por su precisa adaptación al nicho ecológico en el que habita, el hígado humano.

La diversidad de secuencias es generada continuamente durante la replicación del virus. Ello se debe a que la falta de actividad correctora de la RNA polimerasa genera una alta tasa de errores cuando copia el RNA (entre 1 pb en 10000 y 1 en 100000) (Domingo *et al.*, 1996; Drake *et al.*, 1998). Este hecho, combinado con una gran producción de viriones por día (del orden de  $10^{12}$ , (Neumann *et al.*, 1998)), tiene como resultado la generación de una población de variantes de moléculas de estructura en cuasiespecies (Eigen y Schuster, 1977; Domingo *et al.*, 1978; Martell *et al.*, 1992). A pesar de esta variabilidad, la secuencia consenso es muy cercana a la más apta en un momento dado, y la existencia de una población diversa permite una rápida respuesta adaptativa frente a los cambios del entorno. No todas las moléculas teóricamente posibles están presentes ni igualmente representadas en una cuasiespecie. Algunas mutaciones son perjudiciales para la replicación viral y por lo tanto dichas variantes serán eliminadas. Las mutaciones silenciosas o ventajosas permanecerán en la población.

Por otro lado, al observar las secuencias de los distintos genotipos virales se detecta que no todas las regiones del genoma presentan la misma variabilidad (Simmonds *et al.*, 2004). Hay regiones que están evolutivamente más conservadas, y otras, en las que ha sido necesaria una evolución más rápida. Las regiones del genoma que presentan mayor variabilidad de secuencia se localizan en las regiones codificantes para E1, E2 y NS5A, mientras que la que presenta menor variabilidad se localiza en la región 5' UTR (donde se encuentran secuencias necesarias para la traducción y replicación), es seguida de una secuencia en la región 3' UTR, y por las secuencias que codifican para la proteína de la cápsida y de la proteína NS5B (ver figura I. 3). El

hecho de que existan regiones que presenten una variabilidad de secuencia muy distinta a la mayoría del genoma, es indicativo de la acción de una presión selectiva en esas regiones.



**Figura I. 3: Variabilidad de secuencia en el genoma del HCV.** En el margen superior se muestra la representación del genoma del HCV mostrando las posiciones de las proteínas. En el margen inferior se observa la diversidad de secuencia entre los diferentes genotipos del HCV, (ventanas de 150 pb del genoma). Este análisis reveló la existencia de regiones altamente conservadas en los extremos 3' y 5' no traducibles del HCV, en la proteína de la cápsida y NS5B y a su vez la presencia de regiones altamente divergentes en los genes de E1, E2 y NS5A. Tomado de (Simmonds *et al.*, 2004).

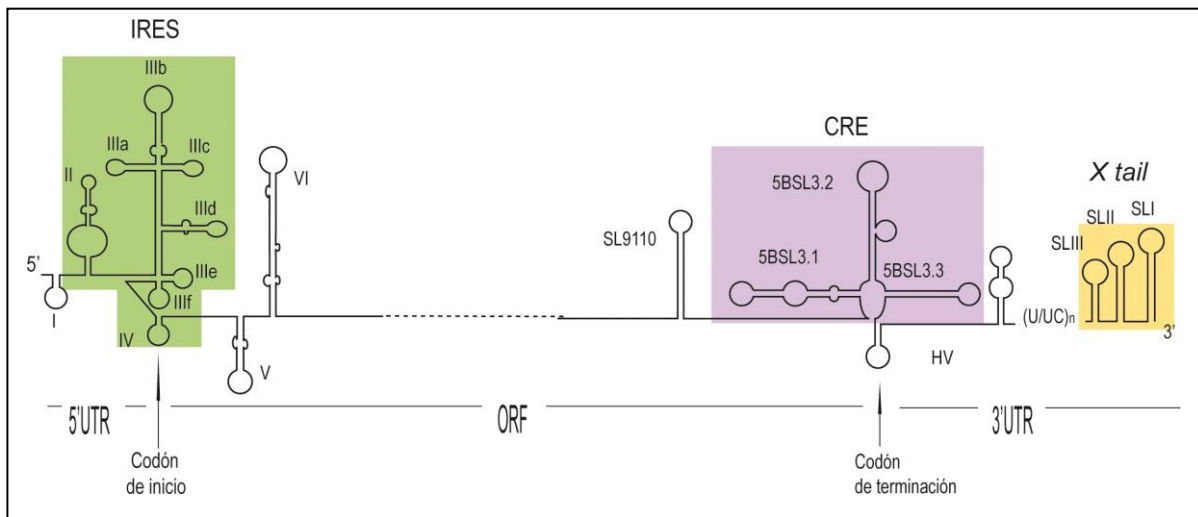
En la evolución de las regiones codificantes, los cambios ocurren predominantemente en los sitios sinónimos, posiciones de los codones donde la mutación en una base da origen a un codón que codifica para el mismo aminoácido, estos sitios se localizan en la tercera posición de algunos codones. Posiblemente, en los sitios sinónimos la acumulación de cambios sea fenotípicamente neutral. Se ha propuesto que la mayor variabilidad observada en las secuencias codificantes para E1, E2 y NS5A se debe a mecanismos selectivos específicos asociados al escape de la respuesta inmune (Simmonds, 2004). No está del todo claro cuál es el mecanismo selectivo que opera en cada caso y se han propuesto varias hipótesis. Dentro de los mecanismos propuestos, hay evidencias que sugieren que mediante un cambio continuo de secuencia, las proteínas de la envuelta E1 y E2 podrían escapar de la acción de los anticuerpos neutralizantes del hospedador. También es posible que muchos polimorfismos de aminoácidos observados en E1, E2 y NS5A sean impulsados por los complejos principal de histocompatibilidad (MHC) I y II con los que se encuentran en su pasaje en la población humana

(Weiner *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1993; Taniguchi *et al.*, 1993; Farci *et al.*, 2000; Kantzanou *et al.*, 2003). Mediante la variación de la secuencia aminoacídica que es reconocida por los MHC, estas proteínas evadirían la respuesta inmune mediada por células T citotóxicas. Por otro lado, la proteína NS5A se une a la proteína quinasa PKR (Gale *et al.*, 1997). La proteína PKR se activa en respuesta al IFN (ver más adelante), tiene dentro de sus múltiples funciones la inactivación de la traducción mediante la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$ , y también es capaz de activar la respuesta de apoptosis a señales de estrés. Un grupo de aminoácidos de NS5A cambia en respuesta al IFN y esa región colocaliza con la parte de NS5A que interacciona con PKR, se ha sugerido que la evasión del reconocimiento de PKR puede ser un determinante en la persistencia del HCV (Enomoto *et al.*, 1995).

La menor variabilidad genética observada en las regiones 5' y 3' UTR y en las regiones codificantes para las proteínas de la cápsida y NS5B ha sido asociada con la necesidad de conservar dominios genómicos funcionales presentes en estas regiones del RNA genómico viral (Simmonds *et al.*, 2004). Los dominios genómicos funcionales son elementos altamente conservados en estructura y secuencia, que en sí mismos cumplen funciones esenciales en procesos claves del ciclo viral, tales como la replicación, traducción e infectividad viral (Simmonds *et al.*, 2004). Aunque en ciertos casos la presencia de una secuencia determinada es esencial en la función del dominio, la necesidad de preservar la estructura supone una restricción para el proceso evolutivo neutral.

## 2.4. Dominios genómicos funcionales.

A lo largo del genoma del HCV existen distintos dominios genómicos funcionales. Los más destacados son los que están presentes en las regiones 5', 3' UTR y los dominios que se localizan en el gen codificante para la proteína de la cápsida y la RNA polimerasa NS5B (ver figura I. 4, (Simmonds *et al.*, 2004)).



**Figura I. 4: Representación esquemática de la estructura secundaria de los dominios genómicos del HCV.** En la figura se representan los dominios de la región 5' UTR (delimitada con una línea debajo) que presenta los dominios I y parte del IRES (con los tallos lazos II, III y IV, señalado en verde), los dominios genómicos funcionales que se localizan en la región codificante (señalado con una línea debajo, ORF): V y IV, SL9110 y el CRE (en violeta) y los dominios que se localizan en la región 3' UTR (delimitada debajo con una línea), la región hipervariable (HV), el poly(U/UC) y el X tail (en naranja, con sus tres tallos lazos, SLIII, SLII y SLI). Con flechas se señalan los codones de inicio y terminación de la traducción.

La región 5' UTR tiene 341 nucleótidos y hay más de 90% de identidad de secuencia a lo largo de los distintos genotipos del HCV con algunos segmentos casi idénticos entre los diferentes subtipos (Bukh *et al.*, 1992). La estructura secundaria de esta región, también está muy conservada y mediante análisis computacionales, filogenéticos y mutacionales se identificaron cuatro dominios estructurales, I-IV ver figura I. 4 (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993). Los primeros 40 nucleótidos de la región 5' UTR constituyen el dominio I que es requerido para la replicación del HCV (Friebe *et al.*, 2001) y también ha sido implicado en la modulación de la actividad del IRES (Simoes y Sarnow, 1991; Rijnbrand *et al.*, 1995; Reynolds *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000). Desde los dominios II al IV de la región 5' UTR y la región que comprende los primeros 40 nucleótidos del gen codificante para la proteína de la cápsida constituyen el IRES (Wang *et al.*, 1993; Reynolds *et al.*, 1995). La estructura del IRES ha sido extensamente estudiada mediante técnicas de microscopía electrónica (Beales *et al.*, 2001; Spahn *et al.*, 2001),

NMR (Lukavsky *et al.*, 2000) y cristalografía (Berry *et al.*, 2011). Los dominios II y III son más complejos que el dominio IV y contienen múltiples tallos lazos. La base del dominio III forma un pseudonudo altamente conservado que es esencial para la actividad del IRES (Wang *et al.*, 1995). El pseudonudo es parte del sitio de unión a la subunidad del ribosoma 40S (Kolupaeva *et al.*, 2000). El dominio II también está implicado en la unión del ribosoma (Lyons *et al.*, 2001). El dominio IV es un pequeño tallo lazo en el que se localiza el codón de inicio de la traducción de la poliproteína, AUG (Honda *et al.*, 1996).

La región 3' UTR posee un tamaño entre 200 a 235 nucleótidos tiene una organización estructural conservada y consiste de tres regiones distintas (figura 1.4). En dirección 5' a 3', posee una región hipervariable HV, una región rica en U/UC de tamaño variable y una región de 98 nucleótidos altamente conservada, el elemento *X tail*. La región hipervariable se localiza inmediatamente a continuación del codón de terminación de la traducción de la poliproteína. Su tamaño (desde 27 a 70 nucleótidos) y composición varía en los distintos genotipos, sin embargo, está altamente conservada dentro de un mismo genotipo (Kolykhalov *et al.*, 1996). Mediante análisis computacionales se identificaron dos posibles tallos lazos. El primero se extiende hacia el extremo 3' de la región codificante para NS5B y el segundo se localiza en la región 3' UTR (Han y Houghton, 1992; Kolykhalov *et al.*, 1996). La región rica en U/UC (polyU/UC) consiste en una secuencia de poly U seguida de una secuencia de  $[U(C)_n]_m$  [también llamada región transicional, n es el número de veces que se repite la C, y m, el número de veces que se repite la secuencia U(C)<sub>n</sub>] que varía en tamaño y ligeramente en secuencia en los diferentes aislados virales (Tanaka *et al.*, 1996). La región transicional de los genotipos 2a ,3a y 3b tiene varios residuos de A conservados que no están presentes en los genotipos 1b y 2b y esta región afecta la eficacia de la replicación (Tanaka *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1996; Yanagi *et al.*, 1999). El tamaño de esta región se ha correlacionado con la capacidad replicativa del RNA del HCV (Kolykhalov *et al.*, 1997; Yanagi *et al.*, 1999; Friebe y Bartenschlager, 2002; Yi y Lemon, 2003). El *X tail* se compone por tres tallos lazos (SLIII, SLII y SLI) que están altamente conservados en los distintos genotipos (Tanaka *et al.*, 1996; Blight y Rice, 1997; Ito y Lai, 1997). Un estudio reciente de la estructura del *X tail* mediante ensayos de protección con agentes químicos y enzimas, confirmaron la presencia de SLI y SLIII. Sin embargo, proponen que la región entre ambos se pliega formando dos tallos lazos en lugar de uno y podría formar un pseudonudo (Dutkiewicz y Ciesiolka, 2005). Con respecto a sus funciones se ha visto que está implicada en la replicación del HCV (Kolykhalov *et al.*, 2000; Friebe y Bartenschlager, 2002; Yi y Lemon, 2003; Yi y Lemon, 2003), infectividad (Yanagi *et al.*, 1999) y parece aumentar la traducción



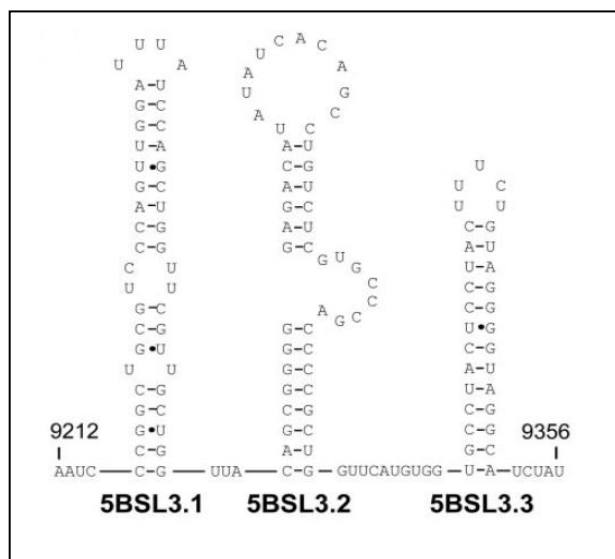
dependiente de IRES (McCaffrey *et al.*, 2002; Bradrick *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006; Lourenco *et al.*, 2008). El HCV no tiene un Poly A y en el extremo 3' del RNA genómico finaliza con el tallo lazo SLI del *X tail*. Es posible que además de las otras funciones mencionadas, el *X tail* estabilice al RNA viral (Tanaka *et al.*, 1996).

Entre los nucleótidos 47 y 167 de la región codificante para la proteína de la cápsida hay otros dominios que están conservados entre los seis genotipos virales, llamados V y VI (Smith y Simmonds, 1997). Esta región parece interactuar con la región 5' UTR lo que lleva a la reducción de la traducción mediada por el IRES (Smith y Simmonds, 1997; Hofacker *et al.*, 1998; Rijnbrand *et al.*, 2001; Tuplin *et al.*, 2004; Beguiristain *et al.*, 2005). Además, estos dominios han sido identificados como estructuras necesarias para la preservación del plegamiento del IRES (Wang *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Beguiristain *et al.*, 2005; McMullan *et al.*, 2007; Vassilaki *et al.*, 2008).

En la región 3' del gen codificante para la proteína NS5B se localiza un elemento esencial para la replicación (*cis* acting replication element CRE, (Lee *et al.*, 2004; You *et al.*, 2004) debido a que este elemento estructural es de especial importancia en el desarrollo del trabajo que se describe en la presente memoria se dedicará un capítulo para su descripción.

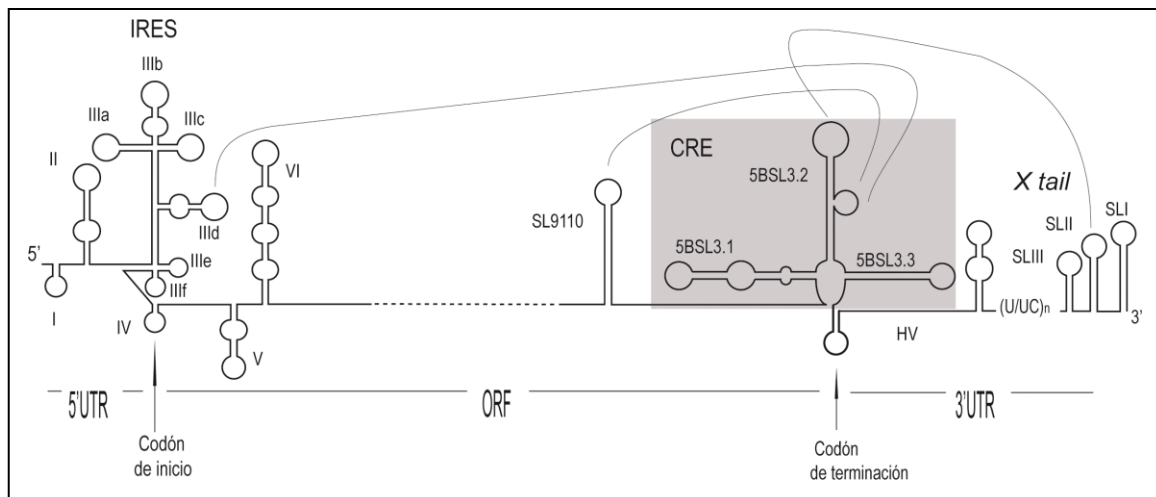
## **2.5. Dominio genómico CRE.**

En la región 3' del gen codificante para la proteína RNA polimerasa dependiente de RNA, NS5B, se localiza un elemento esencial para la replicación (*cis* acting replication element, CRE) (Lee *et al.*, 2004; You *et al.*, 2004). El CRE se pliega en una estructura cruciforme compuesta por tres motivos tallo lazo 5BSL3.1, 5BSL3.2 y 5BSL3.3 (You *et al.*, 2004). Mediante deleciones y análisis mutacionales se ha demostrado que los motivos tallo lazo 5BSL3.1 y 5BSL3.2 son esenciales para la replicación (Lee *et al.*, 2004; You *et al.*, 2004; Friebe *et al.*, 2005; You y Rice, 2008) mientras que el tallo lazo 5BSL3.3 solamente tiene un efecto menor en la replicación (Lee *et al.*, 2004). Recientemente se ha descrito que el dominio 5BSL3.2 cumple un rol importante en la regulación de la traducción (Romero-López y Berzal-Herranz).



**Figura I. 5.: Estructura secundaria del *cis acting replication element*.** Secuencia y estructura secundaria de los subdominios 5BSL3.1, 5BSL3.2 y 5BSL3.3. Las posiciones corresponden a las posiciones de los nucleótidos en el genoma del aislado Con1 del genotipo 1b del HCV (Lohmann *et al.*, 1999). Figura tomada de (Friebe *et al.*, 2001).

El subdominio 5BSL3.2 ejerce su función reguladora de la replicación mediante la interacción con proteínas, como la RNA polimerasa NS5B (Zhang *et al.*, 2005), así como con regiones del genoma distantes en su localización (Friebe *et al.*, 2005); (Diviney *et al.*, 2008); (Tuplin *et al.*, 2012). 5BSL3.2 tiene 48 nucleótidos de largo, y que se pliegan en una estructura tipo tallo lazo formada por una hélice de 14 pares de bases, con un lazo interno de 8 nucleótidos y un lazo apical de 12 nucleótidos (Lee *et al.*, 2004; You *et al.*, 2004). Mediante su lazo apical, interacciona con el lazo del subdominio SLII del *X tail* formando un complejo *kissing loop* que es requerido para la replicación (Friebe *et al.*, 2005). Mediante su lazo interno, 5BSL3.2 interacciona con el dominio IIIId dentro de la región del IRES dando como resultado una disminución el efecto potenciador de la traducción ejercido por la región 3'UTR (Romero-López y Berzal-Herranz, 2009; Romero-López y Berzal-Herranz, 2011). Mediante el lazo interno, 5BSL3.2 es capaz de interaccionar además, con una región en la secuencia 200 nucleótidos 5' que está centrada en el nucleótido 9110 (Diviney *et al.*, 2008). Se ha propuesto que esta interacción tiene un rol en controlar la replicación del HCV (Diviney *et al.*, 2008).



**Figura I.6.: Representación esquemática de las interacciones en las que participa el subdominio 5BSL3.2.** Se representan igual que en la figura I.4., los dominios funcionales genómicos del HCV. En la región 5'UTR parte del IRES (con los tallos lazos II, III y IV), en la región codificante, los dominios V y VI, SL9110 y el CRE (señalado en gris). En la región 3'UTR la región hipervariable (HV), el poly(U/UC) y el *X tail*. Debajo del esquema se delimita el marco de lectura abierto ORF y se señalan con flechas los codones de inicio y terminación de la traducción. Tomado de (Marton *et al.*, 2012).

La importancia del subdominio 5BSL3.2 para la unión de la RNA polimerasa, NS5B, al RNA viral fue observada *in vitro* mediante ensayos de asociación resueltos en geles de retardo (Lee *et al.*, 2004); (Zhang *et al.*, 2005). Paul y colaboradores demostraron que la proteína NS5B se unía al dominio CRE compuesto por las tres estructuras 5BSL3.1, 5BSL3.2 y 5BSL3.3. Sin embargo, al eliminar el subdominio 5BSL3.2 del RNA del CRE, la proteína ya no era capaz de unirse de forma tan eficiente. Posteriormente Shimotohno y colaboradores realizaron ensayos de competición de la unión de la RNA polimerasa marcada al RNA viral (utilizando un fragmento que incluye los nucleótidos 9067 al 9374) utilizando como competidor, el subdominio 5BSL3.2 del HCV. Como resultado observaron que el dominio 5BSL3.2 es capaz de competir la unión de la RNA polimerasa al RNA codificante para la NS5B. Estos resultados ponen de manifiesto el rol esencial de este subdominio en la unión de la RNA polimerasa a su RNA ligando. En este caso, células portadoras de sistemas replicones transfectadas con *decoys* de 5BSL3.2 eran capaces de inhibir significativamente los niveles de replicación del HCV.

Otros grupos, han estudiado las funciones del subdominio 5BSL3.2 y observaron que la secuencia del lazo apical del subdominio 5BSL3.2 es complementaria a una secuencia localizada en el lazo del subdominio SLII del *X tail*. Mutaciones introducidas en estas secuencias que afectan la complementariedad entre los lazos inhiben la replicación del HCV en sistemas replicones, mientras que al realizarse mutaciones compensatorias se restaura parcialmente la

replicación (Friebe y Bartenschlager, 2002). Estos estudios llevaron a proponer una interacción *kissing loop* entre el lazo apical de 5BSL3.2 y su secuencia complementaria en el lazo apical del subdominio SLII del *X tail* (Friebe *et al.*, 2005). Trabajos posteriores realizados refirieron la existencia de dicha interacción así como su rol funcional (Friebe y Bartenschlager, 2002); (You y Rice, 2008); (Tuplin *et al.*, 2012).

La interacción entre el lazo interno del subdominio 5BSL3.2 y el tallo lazo centrado en el nucleótido 9110 (figura 1.6), fue observada inicialmente mediante un análisis *in silico* de interacciones a larga distancia utilizando secuencias de distintos genotipos del HCV. En el mismo trabajo dicha interacción fue corroborada experimentalmente (Diviney *et al.*, 2008). La interacción fue posteriormente mapeada por SHAPE y se ha visto que tiene una función importante en la replicación (Tuplin *et al.*, 2012). En sistemas replicones, se observa que mutaciones en distintas regiones del lazo interno del subdominio 5BSL3.2 o en la secuencia centrada en los nucleótidos 9110 que impiden la interacción entre ambas estructuras, provocaban la inhibición de la replicación casi completamente (Diviney *et al.*, 2008). El efecto sobre la replicación puede ser rescatado mediante la realización de mutaciones compensatorias que restauren la interacción entre el lazo interno del dominio 5BSL3.2 y el tallo lazo centrado en el nucleótido 9110 (Diviney *et al.*, 2008); (Tuplin *et al.*, 2012).

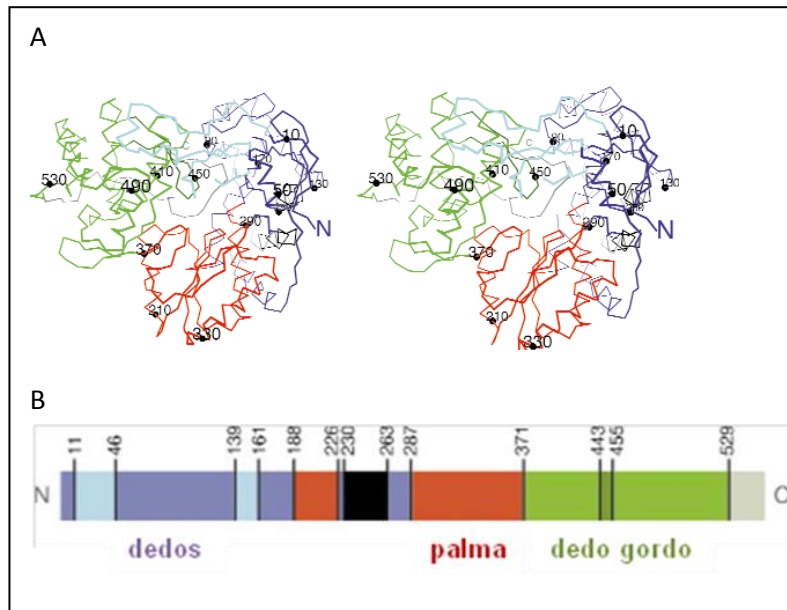
Al estudiar la interacción entre el lazo interno 5BSL3.2 y la secuencia centrada en el nucleótido 9110 en el genotipo 2a JFH-1, se obtienen resultados diferentes a los obtenidos del estudio realizado con el genotipo 1. En el genotipo 2, no se observa un efecto evidente sobre la replicación al destruir la interacción entre el lazo interno 5BSL3.2 y la secuencia centrada en el nucleótido 9110 (Tuplin *et al.*, 2012). No está claro a qué pueden deberse las diferencias observadas. Se ha especulado que tal vez en el genotipo 1b, la interacción sea importante para que el subdominio 5BSL3.2 adquiera una conformación adecuada para formar la estructura *kissing loop* con el subdominio SLII del *X tail*, que es indispensable para la replicación (Tuplin *et al.*, 2012). El mapeo por SHAPE de la región 3' del genoma del virus del HCV mostró que la interacción *kissing loop* entre el lazo apical de 5BSL3.2 y el lazo del subdominio SLII, y la interacción entre el lazo interno del subdominio 5BSL3.2 y la región centrada en el nucleótido 9110, pueden ocurrir simultáneamente (Tuplin *et al.*, 2012). Los autores proponen que el subdominio 5BSL3.2 sería el corazón de un pseudonudo extendido que se forma en el extremo 3' del genoma del HCV.

Mediante ensayos de asociación resueltos en geles de retardo de la movilidad electroforética, se pudo identificar una interacción entre el subdominio 5BSL3.2 del CRE y el dominio IIIId del IRES (Romero-López y Berzal-Herranz, 2009). En el estudio con RNA mutantes de 5BSL3.2 y del dominio IIIId, se observó que el subdominio 5BSL3.2 se une al IIIId mediante una interacción en la que están implicados los nucleótidos del lazo interno del 5BSL3.2 y los nucleótidos del lazo apical del IIIId (Romero-López y Berzal-Herranz, 2009). Ensayos funcionales, *ex vivo* de la traducción IRES dependiente, mostraron que el efecto potenciador de la traducción mediado por la región 3' UTR se ve disminuido en presencia del subdominio 5BSL3.2 (Romero-López y Berzal-Herranz, 2011). Además mutantes del dominio 5BSL3.2 en el lazo interno muestran niveles de traducción similares a los mostrados en ausencia del subdominio 5BSL3.2. Estos estudios indican que el subdominio 5BSL3.2, mediante su interacción con el dominio IIIId del IRES, 5BSL3.2 ejerce una función moduladora de la traducción del HCV.

Todos estos trabajos ponen de manifiesto la importancia del dominio CRE en la biología del HCV. Además de ser un elemento esencial para la replicación del genómica, participa en la regulación de otros procesos tales como la traducción. Es por tanto una potencial diana terapéutica para la acción de una terapia antiviral.

## **2.6. Replicación.**

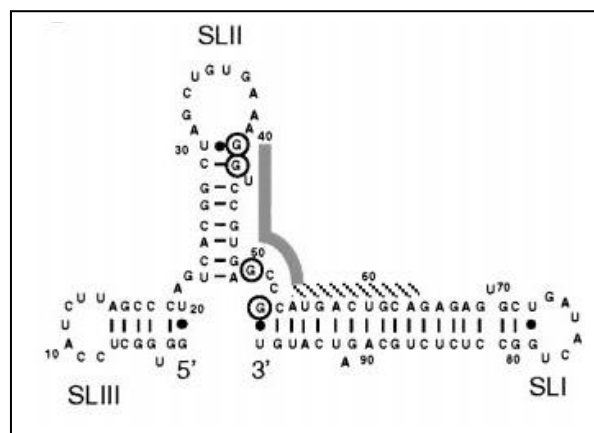
Se ha visto en sistemas replicones que todas las proteínas no estructurales excepto NS2 son requeridas para la replicación. La NS5B es la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) que copia el genoma del HCV. La proteína NS5B tiene un tamaño de 591 aa y un peso molecular de 66 KDa. Su estructura cristalográfica ha sido determinada por varios grupos (ver figura I. 7) (Ago *et al.*, 1999; Bressanelli *et al.*, 1999; Lesburg *et al.*, 1999; Bressanelli *et al.*, 2002). Como en otras polimerasas, la NS5B tiene una estructura semejante a la mano derecha con tres subdominios: los dedos, el dedo gordo y la palma de la mano (Ago *et al.*, 1999; Lesburg *et al.*, 1999). La NS5B tiene además una región C terminal de 21 aa, altamente hidrofóbica que es el sitio de anclaje a la membrana del retículo endoplásmico quedando la proteína con localización citosólica (Ivashkina *et al.*, 2002) y que es esencial para la replicación *in vivo* del virus del HCV (Moradpour *et al.*, 2004).



**Figura I. 7: RNA polimerasa del HCV.** A: Estructura cristalográfica de la RNA polimerasa del HCV. B: Representación esquemática de los dominios de la proteína. En azul se señalan los dominios de los dedos, en rojo el de la palma de la mano y en verde el dedo gordo. En la parte superior se señalan las posiciones de los residuos aminoacídicos, N y C, extremos amino y carboxilo respectivamente. Figura obtenida de (Bressanelli *et al.*, 1999).

El dominio de la palma es el dominio catalítico. Su estructura está altamente conservada a lo largo de la familia de RdRps y otras enzimas que utilizan nucleótidos como la adenilato ciclasa (Ago *et al.*, 1999; Lesburg *et al.*, 1999). El mecanismo mediante el cual NS5B reconoce las secuencias terminales del RNA genómico del HCV para la iniciación específica de la síntesis del genoma no está del todo dilucidado. *In vitro* NS5B se une débilmente pero específicamente a el *X tail* y al polyU-U/C (Oh *et al.*, 2000). El sitio de unión de la NS5B fue mapeado en el tallo de SLII y la región entre los tallos de SLI y SLII del *X tail* (Oh *et al.*, 2000). El *X tail* es necesaria para la actividad polimerasa. Las secuencias 5' que incluyen la región variable y el poly(U/UC) aumentan tanto la unión de la RNA polimerasa así como la eficiencia de la replicación. Cuando se utiliza un fragmento de RNA correspondiente al *X tail* de 98 nucleótidos como molde para la síntesis de RNA por parte de la RNA polimerasa, el producto mayoritario de síntesis tiene 78 nucleótidos. Es decir que la síntesis de RNA no comienza en el extremo 3' en doble cadena del tallo del subdominio SLI, sino que en la primera base 3' en simple cadena en el lazo de SLI y que se corresponde con la U 78 (ver figura I.8, (Oh *et al.*, 2000). La adición de nucleótidos simple cadena en el extremo 3' permite la síntesis de RNA a partir exactamente del extremo 3' y proceder a través del SLI (Oh *et al.*, 2000). Todos los resultados indican que la NS5B polimerasa necesita un molde de RNA simple cadena para empezar a sintetizar el RNA genómico. *In vivo* debe existir algún mecanismo que permita que la NS5B copie el RNA viral sin pérdida de

información. Alguno de ellos pueden ser: 1) Que las proteínas totales pueden afectar el mecanismo de iniciación (por ejemplo que la NS3 helicasa desenrolle el SLI permitiendo que la NS5B comience en el extremo 3'), (Oh *et al.*, 2000) 2) que otras proteínas alteren la conformación de la polimerasa o de las secuencias esenciales para la replicación (Oh *et al.*, 2000). 3) que el extremo 3' sea extendido con nucleótidos de simple cadena mediante transferasas celulares y después usado como molde para la iniciación a partir del extremo 3' (Oh *et al.*, 2000). 4) otra posibilidad es que la polimerasa pueda reparar el extremo 3' perdido durante la síntesis por ejemplo mediante un mecanismo de copia hacia atrás a partir de la cadena menor (Oh *et al.*, 2000).



**Figura I.8: Estructura secundaria y secuencia del X tail.** Se señalan los dominios SLIII, SLII y SLI. En gris y con líneas la región que se une a la RNA polimerasa NS5B. La secuencia obtenida proviene del aislado con1 del genotipo 1b. Tomado de (Oh *et al.*, 2000).

Además de unirse al X tail, NS5B es capaz de unirse a la polyU-U/C y a la región codificante para NS5B (Cheng *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002). Inicialmente se vio mediante ensayos de asociación del RNA genómico con la NS5B que múltiples moléculas de NS5B se asocian de forma secuencial a la región 3' codificante de NS5B (Kim *et al.*, 2002). Estudios posteriores, mediante ensayos de movilidad en geles de retardo confirmaron que la RNA polimerasa, NS5B es capaz de unirse al subdominio 5BSL3.2 en la región codificante para la proteína NS5B (Lee *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005).

Diferentes regiones del genoma del HCV son esenciales para la replicación. Estas regiones han sido mapeadas en los extremos 5' y 3' no traducibles y en el extremo 3' de la región codificante para la proteína NS5B. El rol en la replicación de la región 5' UTR fue demostrado en sistemas replicones. En estos sistemas se vio que los primeros 125 nucleótidos de la región 5' UTR que

corresponden a los tallos lazos I y II, son esenciales para la replicación (Friebe *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; Reusken *et al.*, 2003). Además se vio que es la estructura del tallo lazo I, y no tanto su secuencia, esencial en la replicación (Luo *et al.*, 2003). El hecho que el tallo lazo II forme parte del IRES podría significar un solapamiento en las señales de replicación y traducción (Bartenschlager *et al.*, 2004). A pesar de que los tallos lazos I y II son indispensables para la replicación, los niveles de RNA en los sistemas replicones que contienen solamente estas regiones son muy bajos. Este efecto es compensado cuando se adiciona el tallo lazo III y el pseudonudo (Friebe *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). La importancia de la región 3' UTR en la replicación e infectividad del HCV se vio por primera vez en experimentos *in vivo* con chimpancés a los que se les inoculaban genomas del HCV con varias mutaciones en la región 3' UTR. En estos experimentos se vio que la eliminación de la región variable no afecta la infectividad viral, mientras que la eliminación del poly U/UC o el *X tail* completa o parte de esta destruyen la infectividad (Yanagi *et al.*, 1999; Kolykhalov *et al.*, 2000). Estas observaciones fueron confirmadas y extendidas a estudios análogos en sistemas replicones (Friebe y Bartenschlager, 2002; Yi y Lemon, 2003; Yi y Lemon, 2003). Varias eliminaciones o sustituciones en el *X tail* reducen o bloquean completamente la replicación del HCV. Finalmente pequeñas eliminaciones en la región Poly U/UC también son toleradas pero es indispensable un tamaño mínimo de 26 uridinas para la replicación eficiente del RNA (Friebe y Bartenschlager, 2002). Estos resultados sugieren que para la correcta replicación del HCV se requiere de una mínima región de Poly U/UC y el *X tail* completa. En relación con estos resultados se vio que la estructura en horquilla SLI del *X tail* es esencial para la replicación (Yi y Lemon, 2003). Además de las secuencias localizadas en las regiones 5' y 3' UTR, en sistemas replicones, se vio que estructuras que se encuentran en la región 3' codificante para la proteína NS5B, son esenciales para la replicación del HCV. La eliminación de los tallos lazos 5BSL3.1 y 5BSL3.2 bloquea completamente la replicación (Lee *et al.*, 2004; You *et al.*, 2004; Friebe *et al.*, 2005; You y Rice, 2008) mientras que el tallo lazo 5BSL3.3 solamente tiene un efecto menor en la replicación (Lee *et al.*, 2004). Mutaciones que alteran la estructura del tallo del subdominio 5BSL3.2 disminuyen drásticamente la replicación del HCV mientras que mutaciones en un solo nucleótido en el lazo apical o interno, la boquean. Además la replicación de algunos de estos mutantes puede ser rescatada al insertar el subdominio 5BSL3.2 en la región 3' UTR (Friebe *et al.*, 2005). Tanto las regiones poly U/UC, el *X tail* y el subdominio 5BSL3.2 son capaces de interactuar con proteínas u otras regiones del genoma. Posiblemente mediante estas interacciones ejerzan su rol en la regulación de la replicación.



## 2.7. Fases de la hepatitis C.

La hepatitis C no es la consecuencia de la destrucción directa de las células por el virus. Sino que es el resultado de una respuesta inmune intermedia que es lo suficientemente fuerte como para inducir la fibrosis y destrucción de las células hepáticas pero no lo suficiente como para erradicar el virus de sus reservorios (revisado en (Poynard *et al.*, 2003)).

La enfermedad puede dividirse en tres etapas: 1) La fase de incubación donde el virus atenúa la respuesta inmune innata. 2) La fase aguda en la que las células T intentan eliminar el virus. 3) La fase crónica de la infección en la que las células T específicas del HCV están cansadas (Rehermann, 2009).

- 1) Fase de incubación-atenuación de la respuesta innata. El inicio de la infección es asintomático. Por ello la mayoría de lo que se conoce acerca de las primeras fases de la infección provienen del modelo de chimpancé. Inicialmente, los títulos virales tienen un tiempo de duplicación promedio de 0,5 días (Dahari *et al.*, 2005). Cuando se induce el IFN de tipo I intrahepático (Bigger *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2002) el tiempo de duplicación promedio aumenta a 7,5 días y los títulos virales alcanzan un plateau (Dahari *et al.*, 2005). El virus utiliza múltiples mecanismos para atenuar la respuesta innata mediada por IFN de tipo I.
- 2) Fase aguda- Intento de las células T por eliminar el virus. Generalmente las células T son detectadas a las 5-9 semanas *post* infección (Thimme *et al.*, 2001; Thimme *et al.*, 2002). Los anticuerpos específicos son detectados en la semana 8-20 (Logvinoff *et al.*, 2004). El virus de la hepatitis C puede ser eliminado de los pacientes en un proceso que no requiere respuesta humoral (Semmo *et al.*, 2006). Sin embargo el nivel de anticuerpos neutralizantes aumenta con la infección y aunque no son capaces de eliminar al virus contribuyen a la presión selectiva de variantes virales y a la evolución de las secuencias de las proteínas de la envoltura (Farci *et al.*, 2000; von Hahn *et al.*, 2007). A diferencia de los anticuerpos, las células T son esenciales para eliminar el virus (Lechner *et al.*, 2000; Thimme *et al.*, 2001). El disminución de los títulos virales coinciden con la aparición de las células T y la expresión del IFN- $\gamma$  en el hígado (Shin *et al.*, 2006). En aquellos pacientes que logran eliminar el virus se detecta un aumento de las células T CD4+ (*Helper*, (Diepolder *et al.*, 1995; Missale *et al.*, 1996)) con el aumento concomitante de IL-2 e IFN $\gamma$  (Urbani *et al.*, 2006; Kaplan *et al.*, 2007). Los pacientes que

carecen o tienen una baja respuesta CD4+ son aquellos que luego desarrollan una infección crónica (Gerlach *et al.*, 1999).

- 3) Infección Crónica- La infección crónica está asociada a una activación continua pero afectada y menos amplia de las células T (Wedemeyer *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 2005). El virus mediante diversos mecanismos causa la inhibición de la activación y la función de las células T (Rehermann, 2009).

La eliminación del virus está asociada a una vigorosa respuesta inmune adaptativa celular de múltiples pasos y una respuesta neutralizante. La respuesta citotóxica CD4+ y CD8+ es menor en la fase crónica que en la aguda. Los pacientes con peor respuesta inmune en la fase aguda son frecuentemente asintomáticos y son más propensos a convertirse en portadores crónicos que los que tienen una fuerte respuesta en la fase aguda. (Revisado en (Poynard *et al.*, 2003)). La sintomatología de la enfermedad no tiene relación con el genotipo del virus.

## **2.8. Tratamiento de la hepatitis C.**

Hasta hace poco el tratamiento existente (aprobado en el 2002) consistía en un tratamiento conjunto de IFN-pegilado con ribavirina (Alberti *et al.*, 2002; McHutchison y Fried, 2003; Poynard *et al.*, 2003). La respuesta al tratamiento conjunto con IFN $\alpha$ -pegilado y ribavirina, no es del todo efectiva y depende del genotipo del HCV con el que esté infectado el paciente. Si bien el aproximadamente 88% de los pacientes infectados con los genotipos 2 y 3 responden efectivamente al tratamiento, solamente el ~45% de los pacientes infectados con los genotipos 1, 4, 5 y 6 desarrollan una respuesta al tratamiento (Revisado en (Poynard *et al.*, 2003)).

El tratamiento con IFN $\alpha$ , no es un tratamiento específico y el mecanismo de acción consiste en activar la respuesta inmune propia del organismo para la erradicación del virus (Bartenschlager *et al.*, 2004). El IFN $\alpha$ -pegilado, es un IFN modificado con polietilenglicol. La adición del polietilenglicol al IFN, lo protege de la degradación proteolítica y aumenta su vida media. La ribavirina es un análogo nucleotídico de la guanosina que potencia la acción del IFN. En la monoterapia con ribavirina no se observan cambios en los títulos virales (Crotty *et al.*, 2002). Por lo que no está del todo claro cuál es su mecanismo de acción (Bartenschlager *et al.*, 2004).

Por otro lado, el tratamiento con IFN-pegilado y ribavirina tiene efectos secundarios (revisado en (Poynard *et al.*, 2003)). El efecto secundario más severo asociado al IFN es la depresión, ideas de suicidio e hipotiroidismo. Sin embargo los efectos secundarios más comunes son síntomas

similares a los de un resfriado y alopecia. El efecto secundario más severo de la ribavirina es la anemia y efectos teratogénicos. Sin embargo, los más frecuentes son la anemia. Como contraindicación absoluta al tratamiento con ribavirina es el embarazo (Poynard *et al.*, 2003).

Debido a la ineficacia del tratamiento con PEG-IFN y ribavirina y a los efectos secundarios que produce, es necesario desarrollar terapias efectivas contra el HCV. Se han realizado numerosos esfuerzos por desarrollar nuevos inhibidores del HCV, donde se han estudiado como blanco las proteínas virales (ver tabla I. 1, adaptación de (Buhler y Bartenschlager, 2012)) y factores celulares requeridos para la replicación viral (como el miR-122, la proteína Cyclophilina y PI4KIII). En el caso de los inhibidores dirigidos contra las proteínas virales el principal problema es la rápida aparición de variantes del HCV resistentes (revisado en (Halfon y Locarnini, 2011)). En el caso de las terapias dirigidas contra proteínas celulares existe el problema de los efectos no deseados que podría causar el estar afectando funciones necesarias para la célula.

El 13 de Mayo de 2011 la FDA aprobó el inhibidor boceprevir (Malcolm *et al.*, 2006) y diez días después, fue aprobado el inhibidor telaprevir (Jacobson *et al.*, 2011). Ambos son inhibidores de la NS3 proteasa que usados en combinación con el PEG-IFN y la ribavirina aumentan la respuesta antiviral a un 75% en los pacientes infectados con genotipo 1 (Malcolm *et al.*, 2006; Jacobson *et al.*, 2011). Sin embargo, esta terapia también causa efectos secundarios como erupciones en la piel y anemia (Malcolm *et al.*, 2006; Jacobson *et al.*, 2011). Además como se dijo anteriormente tienen cómo problema principal la aparición de resistencia (Halfon y Locarnini, 2011).

<b>Proteínas del virus de la hepatitis C como blancos antivirales</b>		
<b>PROTEÍNA</b>	<b>FUNCIÓN EN EL CICLO VIRAL</b>	<b>DESARROLLO DE INHIBIDOR</b>
Cápsida	Proteína de la cápsida, unión al RNA	Si. Preclínico
E1 E2	Glicoproteína de la envuelta Glicoproteína de la envuelta, unión a receptores	Si.
P7	Canal iónico, ensamblaje del virus y liberación de la célula.	Si.
NS2	Proteasa de cisteínas.	No
NS3	Serin-proteasa, helicasa	Si. Dos de ellos están aprobados.
NS4A	Co-factor de la NS3 proteasa	Si
NS4B	Inducción de los complejos membranosos para la replicación	Si
NS5A	Ensamblaje de la maquinaria de replicación.	Si
NS5B	Polimerasa dependiente de RNA	Si

**Tabla I. 1: Proteínas del virus de la hepatitis C como blancos antivirales.** En la tabla se muestran las diferentes proteínas del HCV que han sido estudiadas como blanco para la acción de una terapia anti-HCV. Adaptación de (Buhler y Bartenschlager, 2012).

En la búsqueda de una terapia anti-HCV más efectiva, es interesante el estudio de los dominios genómicos funcionales del HCV tales como el IRES, el CRE o el *X tail*, como blanco de acción de inhibidores específicos. Como se menciona en los apartados 2.4. y 2.5., los dominios genómicos funcionales son regiones del genoma del HCV que presentan una alta conservación en estructura y secuencia y que en sí mismos cumplen funciones esenciales en el ciclo viral. De forma tal, que la generación de resistencia mediante mutaciones en estos dominios podría afectar aspectos claves de la biología del HCV. En consecuencia, una terapia dirigida contra los dominios genómicos funcionales podría ser una alternativa que reduzca la aparición de variantes resistentes.

## **2.9. Genoma del HCV como blanco de acción de inhibidores basados en ácidos nucleicos.**

Las herramientas moleculares basadas en los ácidos nucleicos son capaces de actuar directamente sobre la información genética del virus.

En el estudio de una terapia anti-HCV dirigida al genoma viral como blanco de acción se han desarrollado distintas herramientas moleculares basadas en ácidos nucleicos como: oligonucleótidos *antisense*, los RNAs interferentes, Ribozimas, DNazimas, Aptámeros y *decoys*, entre otros. A continuación se hará hincapié en los oligonucleótidos *antisense* y en las herramientas moleculares basadas en el RNA debido a que estas han sido ampliamente estudiadas.

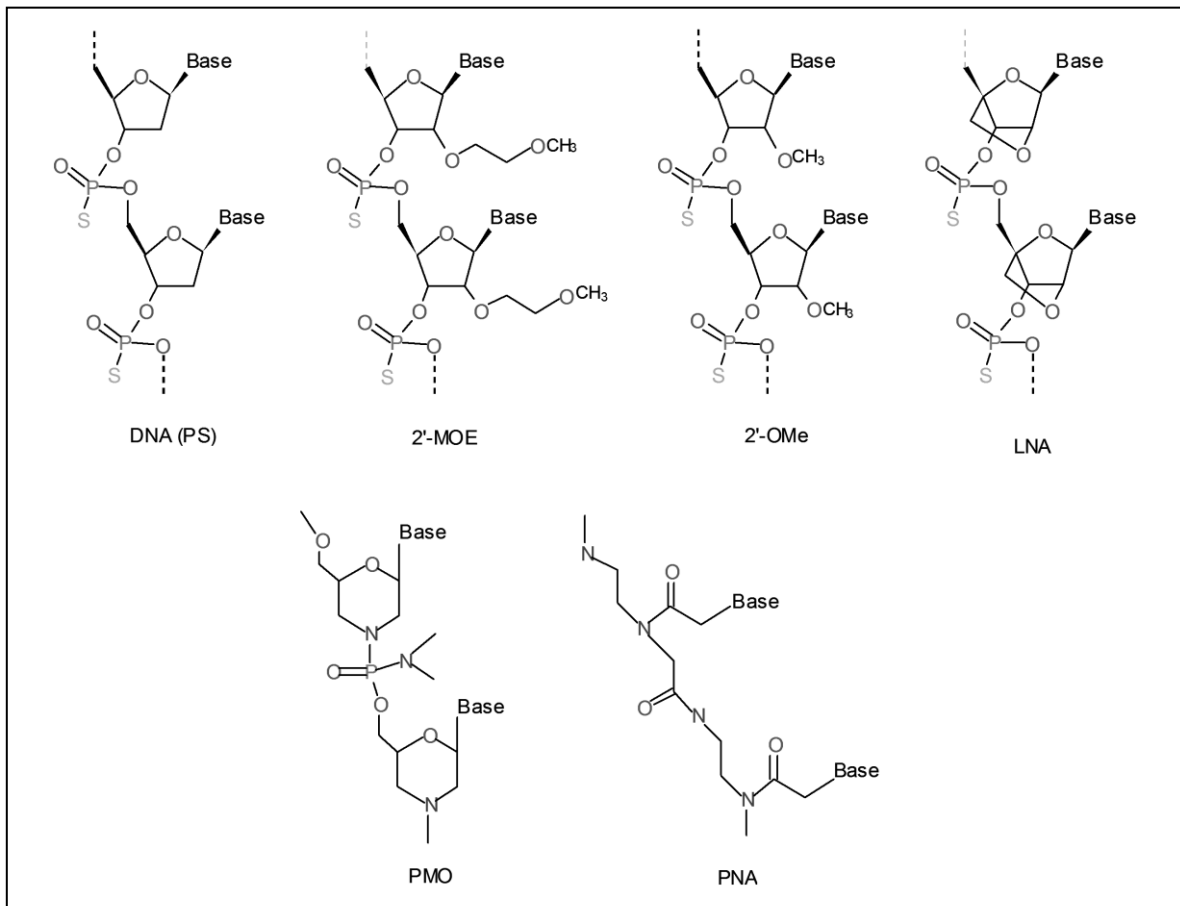
### **2.9.1 Oligonucleótidos *antisense*.**

En 1978 Zamecnik y Stephenson observaron por primera vez que un oligonucleótido *antisense* complementario a una secuencia en el RNA del virus del sarcoma de Rous era capaz de inhibir la replicación viral y la traducción proteica del virus en cultivos celulares (Zamecnik y Stephenson, 1978). A partir de ese momento se tuvo conciencia del gran potencial terapéutico de los oligonucleótidos *antisense*. Los oligonucleótidos *antisense* utilizados en biotecnología pueden ser de RNA, DNA. En la mayoría de los casos se utilizan oligonucleótidos que están modificados químicamente (como se detalla a continuación). Los oligonucleótidos *antisense* pueden unirse a diferentes blancos como: las secuencias promotoras, el codón de inicio de la traducción y las uniones entre intrón-exón. Mediante la hibridación con el RNA blanco, los oligonucleótidos *antisense* interfieren con su función. Cuando los oligonucleótidos *antisense* son de DNA complementarios a secuencias en el RNA blanco, forman un dúplex RNA-DNA que puede ser reconocido por RNasa H y degradado.

Los oligonucleótidos *antisense* por lo general constan de 18-25 nucleótidos. En el mecanismo mediado por la RNasa H típicamente los oligonucleótidos tienen un esqueleto de fosforotioatos en toda su extensión, con un azufre en los fosfatos (PS, ver figura I. 9) que aunque no los hacen completamente resistentes, les confiere una mayor estabilidad a la degradación con nucleasas. Además pueden presentar modificaciones adicionales en las secuencias nucleotídicas de cada extremo para protegerlos de las endonucleasas. Esta distribución deja una región central de oligonucleótidos de fosforotiotatos sin modificaciones adicionales que puede ser degradada por la ribonucleasa H. A este tipo de construcciones se le llama *gapmers*.

En otros casos los oligonucleótidos *antisenses* no requieren la actividad enzimática en su mecanismo acción (presente en el mecanismo de la RNasa H). Ello permite la utilización de oligonucleótidos modificados que le confieran una mayor estabilidad a las ribonucleasas y/o una mayor afinidad por el RNA diana (figura I. 9). Entre las modificaciones más utilizadas están las

sustituciones en el O de la posición 2' por un grupo metoxyetil (2'-MEO) (Kole *et al.*, 2012) y 2'-metil (2'-OMe) (Kole *et al.*, 2012). Otros tipos de modificaciones aumentan la estabilidad de la unión entre el *antisense* y el ácido nucleico blanco. Los LNA (*locked nucleic acid*) contienen una unión metileno entre el 2'-O y 4'-C del anillo de ribosa que cierra al azúcar en la conformación 3'endo y ello genera la hibridación con RNA y DNA más estable caracterizada hasta el momento (Kumar *et al.*, 1998). También se han utilizado *antisense* que tienen Los ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), los oligómeros basados en fosfordiamidatos de morfolino (PMO), donde la ribosa es remplazada por un anillo de morfolino y el fosfortioato o fosfodiéster por un grupo fosfordiamidato también han sido utilizado en el diseño de oligos *antisenses* y son resistentes a la degradación por nucleasas.



**Figura I. 9: Modificaciones químicas de los oligonucleótidos *antisense*.** PS, esqueleto de fosfortioato; 2'-MOE, 2'-O-metoxyetil; 2'-OMe, con un grupo metilo como sustituyente en la posición 2' de la ribosa; LNA, *locked nucleic acid*; PMO oligómeros de fosfordiamidato de morfolino; PNA, ácidos nucleicos peptídicos.

En la terapia contra el HCV se han desarrollado distintos tipos de moléculas dirigidas contra diferentes regiones del genoma: *gapmers*, PS, LNAs, PNAs, 2'-MOE, 2'-OMe, PMO. La mayoría de ellas se han diseñado contra la región 5' UTR y más específicamente contra el IRES. En el último caso el efecto principal es el bloqueo de la asociación de factores esenciales para la traducción como la subunidad 40S o eIF3. Aunque algunas de ellas también pueden activar el mecanismo de acción por la RNasa H (Wakita y Wands, 1994; Alt *et al.*, 1995; Hanecak *et al.*, 1996; Wu y Wu, 1998; Alt *et al.*, 1999; Brown-Driver *et al.*, 1999; Wakita *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999; Tallet-Lopez *et al.*, 2003; Nulf y Corey, 2004; el-Awady *et al.*, 2006; McHutchison *et al.*, 2006; Alotte *et al.*, 2008; Laxton *et al.*, 2011). El blanco de acción preferido ha sido la región que implica el dominio IV del IRES que contiene el codón de inicio de la traducción AUG y en casi todos los estudios la inhibición de la traducción supera el 95%. También se han desarrollado oligonucleótidos *antisenses* conjugados a otras moléculas. Algunos son capaces de hidrolizar al RNA como el imidazol para potenciar el efecto inhibitor de los oligonucleótidos *antisense* (Guerniou *et al.*, 2007; Gamble *et al.*, 2009). En estos casos dichos oligonucleótidos se dirigían contra el dominio III del IRES y mostraron más de un 95% de inhibición de la traducción (ver tabla I.2).

De todos los oligonucleótidos *antisenses* diseñados el que más se avanzó en su estudio a nivel clínico fue el oligonucleótido llamado ISIS 14803 que llegó hasta la fase II de ensayos clínicos. ISIS 14803 es complementario a la región 354-365 del dominio IV del HCV y mostraba unos niveles de inhibición del 60% en ratones (Zhang *et al.*, 1999). Sin embargo la investigación clínica de ISIS 14803 fue finalizada en 2005 por ser inefectiva en humanos (Georgopapadakou, 2007). Solamente tres de 28 pacientes mostraron una disminución de los títulos virales en sangre de más de 10 veces (McHutchison *et al.*, 2006).

Solamente se realizó un estudio con PNAs *antisense* que van dirigidos contra los subdominios SLI, SLII y SLIII del *X tail* del genoma del HCV (Ahn *et al.*, 2011). En este trabajo se utilizaron PNAs conjugados a péptidos que mejoran la incorporación de los *antisense* en la célula (*cell penetrating peptides*), los Tat-PNAs que están conjugados al péptido Tat del HIV y los AR-PNAs que están conjugados a un péptido rico en arginina. Se transfectaron células portadoras de los sistemas replicones con los oligonucleótidos *antisense* y se observó una disminución en los niveles virales de un 40% para los PNAs y un 80% para un Tat-PNA que era dirigido contra el subdominio SLIII. Este último compite un 80% la unión de la RNA polimerasa (Ahn *et al.*, 2011).

En la tabla I. 2 se detallan los mayores niveles de inhibición observados con RNAs *antisenses* dirigidos hacia distintas regiones del HCV. La mayoría de los estudios se han realizado para evaluar la inhibición de la traducción. Para ello se han utilizado sistemas de traducción *in vitro* como los extractos de lisados de reticulocitos de conejo (RRL), o células derivadas de hepatocitos como las Huh-7 o HepG2 o ratones transfectados con adenovirus. En estos sistemas se determina la capacidad inhibidora de los oligonucleótidos *antisense*, midiendo la expresión de un gen de referencia (como la luciferasa o la GFP) que está bajo el control traduccional del IRES. Para un mismo oligonucleótido los niveles de inhibición de la traducción pueden variar en función de si se utilizó el sistema *in vitro* o *ex vivo*.

<b>Uso de RNA <i>antisense</i> como herramienta molecular contra el HCV</b>			
<b>Blanco del HCV</b>		<b>% inhibición</b>	<b>Referencias</b>
5' UTR	Región 5' al dominio I	+	(Laxton <i>et al.</i> , 2011)
	Región entre los dominios I y II	+	(Wakita y Wands, 1994) (Nulf y Corey, 2004) (Laxton <i>et al.</i> , 2011)
	Dominio II	++	(Wakita y Wands, 1994) (Hanecak <i>et al.</i> , 1996) (Wu y Wu, 1998) (Wakita <i>et al.</i> , 1999) (Nulf y Corey, 2004)
	Dominio III	+++	(Wakita y Wands, 1994) (Hanecak <i>et al.</i> , 1996) (Wu y Wu, 1998) (Wakita <i>et al.</i> , 1999) (Tallet-Lopez <i>et al.</i> , 2003) (Nulf y Corey, 2004) (el-Awady <i>et al.</i> , 2006) (Alotte <i>et al.</i> , 2008)
	Dominio IV	+++	(Wakita y Wands, 1994) (Nulf y Corey, 2004) (Alt <i>et al.</i> , 1995) (Hanecak <i>et al.</i> , 1996) (Wu y Wu, 1998) (Zhang <i>et al.</i> , 1999) (Alt <i>et al.</i> , 1999) (Brown-Driver <i>et al.</i> , 1999) (Wakita <i>et al.</i> , 1999) (McHutchison <i>et al.</i> , 2006) (Alotte <i>et al.</i> , 2008)
5' UTR entera		++	(Gonzalez-Carmona <i>et al.</i> , 2011)
Región codificante para la proteína de la cápsida		+++	(Wakita y Wands, 1994) (Alt <i>et al.</i> , 1995) (Hanecak <i>et al.</i> , 1996) (Alt <i>et al.</i> , 1997) (Wakita <i>et al.</i> , 1999) (McCaffrey <i>et al.</i> , 2003)
Secuencia codificante para la proteína NS3		+++	(Heintges <i>et al.</i> , 2001)
3' UTR	<i>X tail</i>	++	(Ahn <i>et al.</i> , 2011)

**Tabla I. 2: Uso de RNAs *antisense* como herramienta molecular contra el HCV.** En la tabla se enumeran las regiones del RNA del HCV estudiadas como diana para la acción de RNAs *antisense* y las correspondientes referencias. + menos del 30%, ++ decremento en la función del HCV de entre 30-70%, +++ inhibición mayor al 70%. Modificado de (Romero-López *et al.*, 2006).

## 2.9.2. Herramientas moleculares basadas en el RNA.

Los principales problemas de las herramientas moleculares basadas en el RNA radican en la inestabilidad del mismo dentro de la célula debido a la presencia de RNasas y la distribución del RNA en el organismo para que llegue a su órgano blanco. Actualmente se están realizando



numerosos esfuerzos por solucionar estos problemas. La estabilidad del RNA puede mejorarse gracias al empleo de modificaciones químicas en el esqueleto ribosa fosfato o de nucleótidos modificados. Dependiendo de la herramienta molecular que se trate, será posible emplear unas modificaciones u otras o el desarrollo de quimeras con nucleótidos no modificados y modificados. Con respecto a la distribución del RNA se han hecho grandes avances principalmente en el hígado (Semple *et al.*, 2010).

### **2.9.2.1. RNAs interferentes.**

El RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo de degradación secuencia específica del RNA en el citoplasma de las células eucariotas que es inducido por el RNA de doble cadena. El RNAi, fue inicialmente descrito en *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998) y *Drosophila* (Tuschl *et al.*, 1999). Posee muchas similitudes con el silenciamiento génico descrito en plantas (Hamilton y Baulcombe, 1999) y el proceso de *quelling* de *Neurospora crassa* (Romano y Macino, 1992). Se cree que el RNAi y los mecanismos de silenciamiento relacionados están presentes en la célula como una estrategia natural de defensa contra los virus RNA y la expresión de elementos transponibles. Además de estas funciones hay evidencias que sugieren que este mecanismo cumple un rol importante en la regulación de la expresión génica (revisado en (Gagnon y Corey, 2012)).

Brevemente, el mecanismo de interferencia de RNA es iniciado por el RNA doble cadena que en el citoplasma es reconocido por la RNasa III Dicer (y sus cofactores) que corta el RNA doble cadena largo en pequeños RNAs doble cadena. Estos RNAs tienen un tamaño de aproximadamente 21 pares de bases y 2 nucleótidos protuberantes en simple cadena en ambos extremos 3'. Los pequeños RNAs interferentes son reconocidos por el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, del inglés: *RNA Induced Silencing Complex*). Este complejo desenrolla las dos cadenas nucleotídicas del pequeño RNA y retiene una de ellas para que dirija la unión al RNA blanco. La unión con el RNA diana sucede mediante la hibridación de la secuencia del pequeño RNA que es complementaria con la del RNA blanco. Posteriormente el complejo RISC procesa al RNA blanco mediante la acción de la proteína Argonata. Los fragmentos resultantes del RNA blanco son degradados mediante los mecanismos endógenos celulares de degradación del RNA (revisado en (Meister y Tuschl, 2004)).

A partir de su descubrimiento, los RNAs de interferencia han sido muy utilizados como herramientas moleculares. En investigación se ha implementado para estudiar la función de

diversos factores celulares y ha sido estudiado como inhibidor en el tratamiento de numerosas enfermedades. Para ello las células son transfectadas con RNAs doble cadena que tienen la secuencia específica de los mRNA que codifican para las proteínas de estudio. En el caso del virus de la hepatitis C se ha demostrado la potente actividad antiviral de los RNAs interferentes en sistemas de replicones subgenómicos y de partículas infectivas del HCV. Se han desarrollado RNAs interferentes direccionados contra la región 5' UTR y casi todas las proteínas virales (la proteína de la cápsida, E1, E2, NS2, NS3, NS4B, NS5A y NS5B, ver tabla I. 3, modificada de (Romero-López *et al.*, 2006)). En estos sistemas los RNAs interferentes pueden llegar a provocar una disminución de entre un 80%-90% de los niveles del RNA viral (Kapadia *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003; Kronke *et al.*, 2004; Takigawa *et al.*, 2004; Prabhu *et al.*, 2005; Wilson y Richardson, 2005).

El surgimiento de variantes resistentes ha sido estudiado en el caso de la proteína NS5B. Ello se produce debido a modificaciones en la región de unión al RNA interferente. El tratamiento conjunto con RNAs interferentes dirigidos a diferentes secuencias blanco reduce notablemente la aparición de resistencia a los RNAs interferentes (Wilson y Richardson, 2005). En esta línea de investigación otro grupo ensayó el efecto de esiRNAs (*endorribonuclease prepared siRNA*) en la inhibición del HCV (Kronke *et al.*, 2004). Los esiRNAs son una mezcla de RNAs interferentes generada a partir de la digestión previa de un ORF con una endorribonucleasa III (como la RNasa III de *E. coli* o la enzima Dicer). De esta forma se genera una mezcla de RNAs doble cadena que tienen diferentes regiones de unión en el ORF en estudio. En este sentido se diseñaron esiRNAs a partir de un RNA doble cadena que abarca las regiones codificantes para las proteínas NS4, NS5A y NS5B. Los esiRNAs dirigidos a las regiones NS4, NS4A y NS5B son capaces de inhibir significativamente los niveles de RNA virales en sistemas replicones en células Huh-7. En este trabajo proponen que es bastante poco probable que un virus acumule las suficientes mutaciones como para escapar a la acción de los esiRNAs. Los esiRNAs diseñados a partir de ORFs del genotipo 1b no son igualmente efectivos en inhibir a los genotipos 1a y 2a (Kronke *et al.*, 2004). En la misma línea de investigación con el fin de reducir la posibilidad de la aparición de variantes resistentes se diseñaron RNAs interferentes dirigidos contra regiones conservadas del HCV, como el IRES y la región 3' codificante para la proteína de la cápsida. Los inhibidores con secuencias complementarias a los dominios III, IV y la región codificante para la proteína de la cápsida eran capaces de inhibir hasta 10 veces los niveles de la luciferasa en los sistemas replicones (Kronke *et al.*, 2004). Se ha visto que RNAs interferentes que tienen como blanco el IRES son efectivos inhibiendo distintos genotipos del HCV. Ello se debe a que, como se ha dicho

en el apartado 2.5., el IRES es una región del genoma que presenta una gran conservación de secuencia en los distintos genotipos. (Chevalier *et al.*, 2007).

RNAs interferentes como inhibidores del HCV			
Blanco en el RNA del HCV	Eficiencia	Referencia	
5' UTR	Dominio I	+	(Yokota <i>et al.</i> , 2003) (Vlassov <i>et al.</i> , 2007)
	Dominio II	+	(Kronke <i>et al.</i> , 2004) (Yokota <i>et al.</i> , 2003)
		++	(Korf <i>et al.</i> , 2005)
	Dominio III	+	(Kronke <i>et al.</i> , 2004) (Takigawa <i>et al.</i> , 2004) (Yokota <i>et al.</i> , 2003)
++		(Yokota <i>et al.</i> , 2003) (Korf <i>et al.</i> , 2005)	
+++		(Kronke <i>et al.</i> , 2004) (Yokota <i>et al.</i> , 2003) (Henry <i>et al.</i> , 2006) (Chevalier <i>et al.</i> , 2007) (Hamazaki <i>et al.</i> , 2006) (Vlassov <i>et al.</i> , 2007)	
Dominio IV	+++	(Kronke <i>et al.</i> , 2004) (Yokota <i>et al.</i> , 2003) (Wang <i>et al.</i> , 2005) (Hamazaki <i>et al.</i> , 2006) (Vlassov <i>et al.</i> , 2007)	
Región codificante para la proteína de la cápsida	++	(Takigawa <i>et al.</i> , 2004)	
	+++	(Kronke <i>et al.</i> , 2004) (Randall <i>et al.</i> , 2003) (Ansar <i>et al.</i> , 2011) (Khaliq <i>et al.</i> , 2010)	
Región codificante para la proteína E1	++	(Khaliq <i>et al.</i> , 2011)	
	+++	(Ansar <i>et al.</i> , 2011)	
Región codificante para la proteína E2	++	(Khaliq <i>et al.</i> , 2011)	
	+++	(Prabhu <i>et al.</i> , 2005) (Shin <i>et al.</i> , 2009) (Ansar <i>et al.</i> , 2011) (Khaliq <i>et al.</i> , 2011)	
Región codificante para la proteína NS2	+	(Ali Ashfaq <i>et al.</i> , 2011)	
Región codificante para la proteína NS3	+	(Wilson <i>et al.</i> , 2003)	
	++	(Kapadia <i>et al.</i> , 2003) (Ali Ashfaq <i>et al.</i> , 2011)	
	+++	(Takigawa <i>et al.</i> , 2004) (Prabhu <i>et al.</i> , 2005) (Shin <i>et al.</i> , 2009) (Ali Ashfaq <i>et al.</i> , 2011)	
Región codificante para la proteína NS4B	+	(Kapadia <i>et al.</i> , 2003)	
	+++	(Kronke <i>et al.</i> , 2004) (Ali Ashfaq <i>et al.</i> , 2011)	
Región codificante para la proteína NS5A	+	(Kapadia <i>et al.</i> , 2003)	
	++	(Sen <i>et al.</i> , 2003)	
	+++	(Kronke <i>et al.</i> , 2004)	
Región codificante para la proteína NS5B	++	(Kapadia <i>et al.</i> , 2003)	
	+++	(Wilson <i>et al.</i> , 2003) (Kronke <i>et al.</i> , 2004) (Takigawa <i>et al.</i> , 2004) (Prabhu <i>et al.</i> , 2005) (Wilson y Richardson, 2005) (Trejo-Avila <i>et al.</i> , 2007) (Henry <i>et al.</i> , 2006) (Ali Ashfaq <i>et al.</i> , 2011)	
3' UTR	<i>X tail</i>	++	(Korf <i>et al.</i> , 2005)

**Tabla I. 3: RNAs interferentes como inhibidores del HCV.** Se detallan las diferentes regiones del HCV para las cuales se han diseñado RNAs interferentes, el efecto inhibitor observado y las referencias correspondientes. +, ++, +++ igual que en la tabla I. 2.. Modificado de (Romero-López *et al.*, 2006).

Para aumentar la estabilidad del RNA se pueden diseñar oligonucleótidos que poseen modificaciones químicas que le brinden resistencia a la acción de las RNAsas. En el caso del RNA interferente, solamente unas pocas modificaciones pueden ser introducidas para que puedan ser reconocidos por el complejo RISC y sean activos. En la cadena *antisense* son

toleradas las uniones entre los fosforotioatos en el extremo 3' y las sustituciones 2'-O-metilo (2'-OMe) en uno o dos nucleótidos internos que aumentan la estabilidad. En la cadena sentido, muchos de los nucleótidos internos pueden tener la modificación 2'-OMe (revisado en (Kole *et al.*, 2012)).

### **2.9.2.2. RNAs decoys.**

Una herramienta molecular capaz de interferir con la información genética es el uso de RNAs que imitan a RNAs reguladores celulares o virales y se unen a sus ligandos naturales. Mediante la unión a sus ligandos, los RNAs miméticos, interfieren con la función de los RNAs reguladores. A estas moléculas de RNA se les llama RNAs decoys. En el desarrollo de una estrategia antiviral efectiva se han utilizado pequeños elementos de RNA genómicos virales que unen factores esenciales para el ciclo infectivo. Estos elementos de RNA actúan secuestrando a factores indispensables para el ciclo viral e impidiendo que estos cumplan con su función. El uso de RNAs decoys puede ser una estrategia antiviral efectiva. Los decoys con fines terapéuticos necesitan mostrar alta especificidad y estabilidad. La principal ventaja de los decoys es el aparente escape a la generación de resistencia (revisado por (Romero-López *et al.*, 2006)).

En el estudio del HCV se han desarrollado decoys de los dominios II y III del IRES, de la región 3' UTR en su totalidad, de los subdominios 5BSL3.1, 5BSL3.2 y 5BSL3.3 y del *X tail* (Ver tabla I. 4). De los decoys específicos del IRES, los del dominio III, más específicamente los de los subdominios IIIe y IIIf son los que presentan una mayor inhibición de la traducción así como de la unión de la proteína S5 (importante para la síntesis proteica) en sistemas replicones (Ray y Das, 2004). Los decoys que corresponden a los subdominios 5BSL3.1 y 5BSL3.2 del CRE son los que presentan mayores niveles en la inhibición de la traducción y replicación en los sistemas replicones. Así mismo, se observa que los decoys 5BSL3.2 son capaces de unir a la polimerasa NS5B. Decoys de 5BSL3.2 con mutaciones que afectan la unión a la polimerasa no son efectivos en inhibir los niveles de traducción y replicación virales (Zhang *et al.*, 2005). Los decoys dirigidos contra el *X tail* son capaces de inhibir la replicación del HCV un 50% en sistemas replicones (Smolic *et al.*, 2010). La inhibición de la replicación podría deberse a una competición de los decoys por la unión de factores esenciales para la replicación. Se ha observado que el *X tail* es capaz de unirse a la NS5B polimerasa así como también es capaz de interactuar con otras regiones del genoma del HCV. Estas interacciones son esenciales para la replicación viral.

Uso de RNA decoys como inhibidores del HCV			
Región del HCV		Eficiencia	Referencia
5' UTR	Dominio II	+	(Ray y Das, 2004)
	Dominio III	+++	(Ray y Das, 2004)
Región CRE	5BSL3.1	+++	(Zhang <i>et al.</i> , 2005) (Smolic <i>et al.</i> , 2010)
	5BSL3.2	+++	(Zhang <i>et al.</i> , 2005) (Smolic <i>et al.</i> , 2010)
	5BSL3.3	+	(Zhang <i>et al.</i> , 2005)
3' UTR	<i>X tail</i>	++	(Smolic <i>et al.</i> ) (Zhang <i>et al.</i> , 2005)
3' UTR		+	(Zhang <i>et al.</i> , 2005)

**Tabla I. 4: Uso de RNA decoys como inhibidores del HCV.** Se detallan los distintos elementos genómicos que se han utilizado como decoys, el efecto inhibitor observado y las respectivas referencias. +, ++ y +++ igual que en la tabla I. 2. Modificado de (Romero-López *et al.*, 2006).

Aunque en los decoys desarrollados contra el HCV no incluyen nucleótidos modificados se han desarrollado decoys que contienen nucleótidos  $\alpha$ - $\beta$ -anoméricos (Tanaka *et al.*, 1994), dúplex con metilfosfonatos y fosforotioatos (Bielinska *et al.*, 1990), LNAs (Crinelli *et al.*, 2004), híbridos de PNA/DNA (Mischiati *et al.*, 1999; Mischiati *et al.*, 2002; Borgatti *et al.*, 2003) y *circular dumbbell double-stranded oligodeoxynucleotides* (Hosoya *et al.*, 1999). Estos últimos son segmentos cortos estables de DNA con lazos nucleotídicos cerrados en cada extremo que les confieren resistencia a las nucleasas y una mejor incorporación a las células.

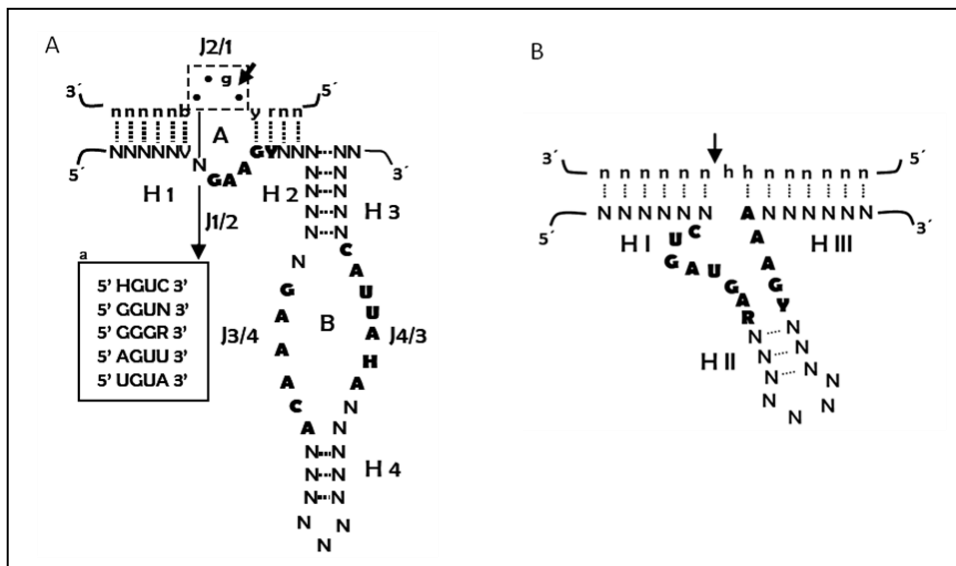
### 2.9.2.3. Ribozimas

Las ribozimas son moléculas de RNA que presentan actividad catalítica. Fueron descubiertas a principios de los años 80 por los grupos de Thomas Cech y de Sidney Altman (Kruger *et al.*, 1982; Guerrier-Takada *et al.*, 1983).

Desde su descubrimiento se planteó el potencial de las ribozimas *hairpin* y *hammerhead* como herramientas moleculares para la inactivación génica (ver figura I. 10). La ribozima *hairpin* fue descubierta en la cadena negativa del RNA satélite asociado al virus que causa las manchas en anillo de tabaco ([-]sTRSV, *tobacco ringspot virus*, (Feldstein *et al.*, 1989; Hampel y Tritz, 1989)). La ribozima procesa los productos multiméricos que son generados como consecuencia de la replicación del RNA satélite por el mecanismo de círculo rodante (Prody *et al.*, 1986). Los monómeros generados son circularizados mediante la actividad ligasa que presenta la ribozima (Buzayan *et al.*, 1986; Buzayan *et al.*, 1986). La ribozima *hammerhead* fue identificada en RNAs patógenos de plantas (Buzayan *et al.*, 1986; Hutchins *et al.*, 1986; Prody *et al.*, 1986). La función

*in vivo* es similar a la de la ribozima hairpin aunque no se conocen los detalles de la reacción de ligación.

El estudio de las ribozimas hammerhead y hairpin permitió determinar el tamaño de los dominios mínimos con actividad catalítica. Además se ha determinado cuales son los requerimientos de secuencia y estructurales para que mantengan su función (Zaug y Cech, 1986; Uhlenbeck, 1987; Hampel *et al.*, 1990; Branch y Robertson, 1991). Ello ha permitido el desarrollo de ribozimas capaces de procesar a sus sustratos en *trans*. Estas moléculas se asemejan a las enzimas proteicas que no se consumen ni se modifican durante la catálisis. El dominio de reconocimiento del sustrato es distinto al dominio catalítico y mediante el cambio de la secuencia del dominio de reconocimiento del sustrato es posible cambiar la especificidad de la ribozima (ver figura I. 10).



**Figura I. 10: Secuencia y estructura secundaria de los motivos mínimos de las ribozimas *hairpin* (A) y *hammerhead* (B).** A: Motivo mínimo de la ribozima hairpin capaz de unir y procesar efectivamente su RNA sustrato. Las secuencias de la región J2/1 que son óptimamente procesadas por la ribozima hairpin se muestran en la caja "a". A y B representan los dos dominios definidos del complejo enzima sustrato y J1/2-J4/3 son regiones de cadena sencilla. B: Motivo mínimo de la ribozima hammerhead que presenta actividad catalítica de sustratos en *trans*. Tanto en A como en B el RNA sustrato se muestra en minúscula, mientras que el motivo mínimo de la ribozima en mayúscula. Con una flecha se indica el sitio de corte. N: cualquier nucleótido, Y: C ó U; R: A ó G; V: A, C ó G; H: A, C ó U, B: C, G ó U. Los nucleótidos destacados en negrita son indispensables para la actividad catalítica. Tomado de (Romero-López *et al.*, 2006).

Al igual que otras herramientas moleculares, también se ha estudiado el uso de ribozimas como inhibidores en el desarrollo de una terapia anti HCV. La mayoría de los trabajos emplearon ribozimas tipo hammerhead. Sin embargo, también se han utilizado la ribozima tipo hairpin y una ribozima basada en la ribozima del virus de la hepatitis delta (ver tabla I. 5).

En el primer estudio de diseño de ribozimas capaces de cortar el genoma del HCV, se aisló el RNA total del hígado de pacientes infectados con el genotipo 1b y se incubó con una población de ribozimas tipo hammerhead sintetizadas *in vitro* que poseían secuencias aleatorias en el motivo de unión con el RNA (Lieber *et al.*, 1996). Se identificaron trece productos de corte. Se seleccionaron seis sitios de corte para su estudio teniendo en cuenta la proximidad con el codón de inicio de la traducción y la localización en zonas conservadas y en regiones de simple cadena del HCV. Los sitios de corte fueron retrotranscritos, amplificados y secuenciados. Ello permitió inferir la secuencia de la región aleatoria de las ribozimas que realizaban el corte (empleando la secuencia complementaria al sitio de corte identificado). De las seis ribozimas estudiadas: cuatro cortaban en la cadena de RNA de polaridad positiva, tres en regiones próximas al sitio de inicio de la traducción, en las posiciones 325 del dominio III del IRES, en la posición 363 y 369 de la región codificante para la proteína de la cápsida y una en una posición más alejada del codón de inicio, también en la región codificante de la proteína de la cápsida (posición 707). Dos ribozimas cortaban en la cadena de RNA de polaridad negativa, (concretamente en las posiciones 342 y 401). Las ribozimas fueron clonadas en vectores adenovirales y su capacidad inhibitoria fue probada de manera independiente en células CHO que contenían la cadena negativa y positiva del RNA del HCV y en aislados de hepatocitos de pacientes infectados con el HCV. Tras un tiempo de incubación se obtuvieron niveles de inhibición que van desde un 40% a un 100% según el ribozima. Al tratar los hepatocitos de pacientes infectados con una mezcla de las tres ribozimas, tras tres días del tratamiento, los niveles de RNA eran indetectables mientras que en los controles permanecían sin cambios (Lieber *et al.*, 1996). En el mismo año 1996 se describieron cuatro ribozimas hammerhead dos de ellas tienen como blanco de acción el dominio III del IRES y dos de ellas, regiones codificantes para la proteína de la cápsida. Dos ribozimas presentaban unos niveles de inhibición de la traducción IRES dependiente de la luciferasa de entre un 50% a un 73% en células Huh-7 (Sakamoto *et al.*, 1996).

Uso de ribozimas como herramienta molecular anti-HCV				
Región blanco en el HCV	Eficiencia	Referencias		
5' UTR	Dominio II	+ ++	(Macejak <i>et al.</i> , 2000) (Macejak <i>et al.</i> , 2000) (Welch <i>et al.</i> , 1996)	
	Dominio III	+ ++ +++	(Macejak <i>et al.</i> , 2000) (Sakamoto <i>et al.</i> , 1996) (Macejak <i>et al.</i> , 2000) (Welch <i>et al.</i> , 1996) (Lieber <i>et al.</i> , 1996) (Macejak <i>et al.</i> , 2000) (Lee <i>et al.</i> , 2000) (Macejak <i>et al.</i> , 2001)	
		Dominio IV	+++	(Gonzalez-Carmona <i>et al.</i> , 2006)
		Región codificante para la proteína de la cápsida	++ +++	(Sakamoto <i>et al.</i> , 1996) (Welch <i>et al.</i> , 1996) (Lieber <i>et al.</i> , 1996)

**Tabla I. 5: Uso de ribozimas como herramienta molecular anti-HCV.** Se muestran las distintas regiones del genoma para las cuales se han diseñado ribozimas, el efecto inhibitor que según el trabajo ha sido medido a nivel de la traducción, bien de la replicación, o ambos y las referencias correspondientes. ++ y +++ igual que en la tabla I. 2. Modificado de (Romero-López *et al.*, 2006).

Se han realizado grandes avances en el diseño de las ribozimas hammerhead habiéndose identificado las posiciones de la ribozima que pueden ser modificadas químicamente aumentando la estabilidad de la ribozima pero sin comprometer su actividad. (revisado por (Goodchild, 2000)). En el tratamiento del HCV se diseñaron 15 ribozimas con modificaciones del tipo 2'-O-Me y 2' deoxi-C-alil-uridine y enlaces de fosforotioato en algunas posiciones. El tratamiento de células con las ribozimas mostró una reducción del 40% al 80% en la traducción del sistema HCV-5'-UTR-luciferasa y de >90% en la replicación de una quimera del HCV-poliovirus. La enzima que corta en la posición 195 del HCV, en el dominio IIIb era la que presentaba los mayores niveles de inhibición (Macejak *et al.*, 2000). Los efectos observados para dicha ribozima eran potenciados cuando se administraba junto con el IFN- $\alpha$ , hasta mostrar >98% de inhibición de la replicación de la quimera HCV-PV (Macejak *et al.*, 2001). También se analizaron los efectos farmacocinéticos de la ribozima en ratones, donde tanto la administración subcutánea como intravenosa de 10 mg/kg y 30 mg/kg muestran un pico en el hígado lo suficientemente alto como para inhibir la replicación del HCV. La ribozima es detectada en el hígado a los 15 min y hasta 48 hrs después de la administración (Lee *et al.*, 2000). Debido a estos resultados tan prometedores se realizaron ensayos preclínicos y clínicos con la ribozima que se le denominó Hepazyma™, no hay documentación disponible que expliquen los motivos pero los ensayos fueron suspendidos.

También se han realizado esfuerzos por mejorar la asociación de las ribozimas por sus sitios de acción en el RNA del HCV. Para ello se diseñó una población de moléculas basada en la ribozima hammerhead que corta en la posición 363 (Lieber *et al.*, 1996) y se le adicionó en el



extremo 3' una secuencia aleatoria de 25 nucleótidos a través de la cual se esperaba la unión a los dominios específicos en el RNA sustrato. Se realizó un método de selección *in vitro* de dos pasos (ver más adelante). En una primera etapa se seleccionaron las variantes capaces de unirse al IRES a través de la región variable, mientras que en un segundo paso se rescataban las moléculas que conservan actividad catalítica y que en el extremo 3' que conservan la capacidad de unirse al sustrato. Mediante este proceso se obtuvieron RNAs quiméricos compuestos por la ribozima y un aptámero (Romero-López *et al.*, 2005). Los RNAs quiméricos mapeaban en los dominios II, III y IV del IRES (Romero-López *et al.*, 2005). En trabajos posteriores se caracterizaron los RNA quiméricos HH363-10 cuyo dominio aptámero se une al subdominio III<sub>f</sub> (Romero-López *et al.*, 2007), el HH363-50 que se une al dominio IV (Romero-López *et al.*, 2009) y el HH363-24 que se une al subdominio III<sub>d</sub> del IRES (Romero-López *et al.*, 2012). Estas moléculas, además de presentar actividad catalítica eran capaces de inhibir la formación del complejo de la traducción 80S y algunas el 48S en el IRES. HH363-10 y HH363-50 inhiben la traducción IRES dependiente de la luciferasa de *firefly* y HH363-24 inhibe un 65% la traducción en estos sistemas. HH363-24 fue probada además en células portadoras de sistemas replicones donde se pudo observar una inhibición de hasta un 70% en la replicación del RNA viral (Romero-López *et al.*, 2012).

Las ribozimas tipo hairpin también se han estudiado para el tratamiento del HCV. Se generaron ribozimas cuyos puntos de corte se localizan en las regiones 5' UTR y en la región codificante de la proteína de la cápsida. Los resultados obtenidos en la inhibición de la traducción IRES dependiente de un gen de referencia, muestra resultados similares a los obtenidos con las ribozimas tipo hammerhead (Welch *et al.*, 1996).

Recientemente se realizó un trabajo en el que se utilizó una ribozima del tipo HDV (ribozima del Virus de la Hepatitis Delta, (Levesque *et al.*, 2010)). La ribozima del HDV fue la primera en identificarse en las células humanas infectadas con virus. Debido a que es una ribozima que está bien adaptada al ambiente de las células humanas, es una candidata interesante para investigar su potencial como inactivador de la expresión génica. En el dicho trabajo, la ribozima del tipo HDV fue además modificada con un *riboswitch* que le permitía pasar de un estado activo a inactivo y ser regulada por la presencia del RNA blanco. Al *riboswitch* se le llamó modulo SOFA y a la ribozima SOFA-HDV. La capacidad de inhibir la replicación del HCV de diferentes ribozimas SOFA-HDV que cortan *in vitro* distintas regiones del IRES, fue examinada en sistemas

replicones. Las ribozimas no mostraron más del 40% de inhibición de la replicación (Levesque *et al.*, 2010).

#### 2.9.2.4. Aptámeros

Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que se unen específicamente a su molécula blanco. La metodología para la selección de aptámeros, SELEX (del inglés: *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) se definió por primera vez por Tuerk y Gold en 1990 (Tuerk y Gold, 1990).

Previamente a la descripción del método SELEX, la evolución molecular *in vitro* fue observada por el grupo de Spiegelman en 1967 (Mills *et al.*, 1967). Ellos estudiaban la evolución *in vitro* del RNA genómico del bacteriófago Q $\beta$ , con el fin de identificar las secuencias mínimas para poder replicarse más rápidamente. La replicación del genoma es llevada a cabo por la RNA polimerasa dependiente de RNA codificada por el propio genoma. El ambiente *in vitro* posibilita la ausencia de los requerimientos necesarios para completar el ciclo viral dentro de la célula (Mills *et al.*, 1967).

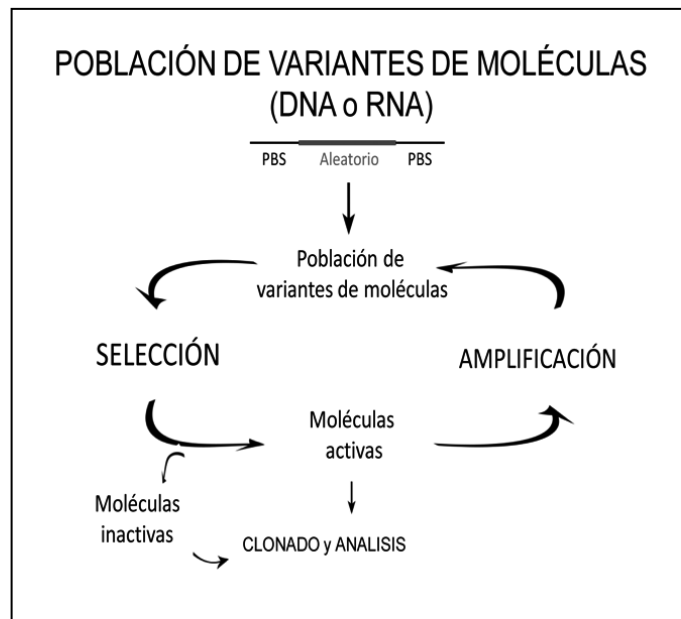
En 1990 cuatro grupos de manera independiente diseñaron y desarrollaron métodos de selección (Ellington y Szostak, 1990; Green *et al.*, 1990; Tuerk y Gold, 1990) o de evolución molecular *in vitro* (Robertson y Joyce, 1990). A partir de ese momento se tuvo conciencia del gran potencial de estas metodologías para el desarrollo de ácidos nucleicos con actividades catalíticas nuevas o más eficientes, o para el desarrollo de aptámeros.

A partir de su descubrimiento, el diseño de aptámeros ha sido ampliamente extendido. Ello se debe a que sus propiedades de reconocimiento se asemejan a las de los anticuerpos pero con la ventaja de que pueden ser diseñados completamente, sintetizados químicamente, poseen mejores condiciones de almacenamiento y provocan muy poca o inexistente inmunogenicidad. (2002). El reconocimiento de la molécula diana por parte de los aptámeros de naturaleza nucleotídica es posible gracias a la estructura tridimensional que adquiere el aptámero así como de la secuencia nucleotídica (Patel *et al.*, 1997; Patel y Suri, 2000).

Posteriormente, a la obtención de aptámeros seleccionados *in vitro*, en el 2002 se identificó la presencia de aptámeros en la naturaleza. Se observaron aptámeros formando parte de los *riboswitches* en mRNAs de varias especies lo que constituye un mecanismo bastante extendido

de control de la expresión génica (Mironov *et al.*, 2002; Nahvi *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002).

Los métodos de selección molecular *in vitro* por enriquecimiento exponencial siguen un esquema general de tres pasos (ver figura I. 11): 1) Síntesis de la población de partida. Generalmente se diseña una población de ácidos nucleicos compuesta por una región central de secuencia mutagenizada al azar, flanqueada por regiones de secuencia constante. Las secuencias flanqueantes son necesarias para la unión de los cebadores necesarios para el paso de amplificación por PCR. 2) Selección: la población de moléculas es incubada con el ligando. Posteriormente se recuperan las moléculas con capacidad para unirse con el ligando. Existen dos estrategias para lograr este objetivo: El ligando es inmovilizado en un soporte sólido y el aptámero es recuperado mediante la ruptura de las fuerzas que dirigen la interacción (como por ejemplo por calor). El aptámero es recuperado con el ligando y posteriormente es aislado gracias a la presencia de una característica particular (como un dominio o una estructura determinada). 3) Amplificación: Se amplifican las moléculas seleccionadas para asegurar su enriquecimiento, su persistencia en la población y su pase en la siguiente ronda del método de selección molecular. En la selección de aptámeros de RNA tanto la población de partida como cada población de moléculas que entra en una nueva ronda de selección es obtenida mediante transcripción *in vitro* a partir de moléculas de DNA intermediarias que poseen en su extremo 5' el promotor para la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Al finalizar cada etapa de selección se sintetizan DNAs intermediarios mediante retrotranscripción necesarios para el paso de amplificación por PCR. Mediante la ejecución iterativa del proceso de selección y amplificación la complejidad de la población de partida es reducida y se enriquece en las moléculas de interés. Durante este proceso se puede aumentar la presión selectiva mediante condiciones de selección más exigentes, por ejemplo disminuyendo el tiempo de incubación con el ligando, aumentando la temperatura o disminuyendo la fuerza iónica.



**Figura I. 11: Diagrama de un método de selección molecular *in vitro*.** En el cuadrante superior se muestra la estructura de la población de partida que entra al proceso de selección. Posteriormente las moléculas se someten al paso de selección, donde se descartan las moléculas inactivas para la unión. Se recuperan las moléculas capaces de unirse al sustrato que son amplificadas. A continuación la población de moléculas activas entra a una siguiente ronda del método de selección. Tomado de (Marton *et al.*, 2010).

Para mejorar la estabilidad de los aptámeros dentro de la célula o su incorporación se pueden realizar modificaciones químicas. Dichas modificaciones deben realizarse tras del método de selección en las moléculas más efectivas para la unión. En este sentido, al oligonucleótido se le puede conjugar un grupo peptídico, carbohidrato o lipídico, revisado por (Marton *et al.*, 2010). También se pueden realizar modificaciones en la posición 2' de la ribosa o en el esqueleto azúcar fosfato (Marton *et al.*, 2010). En estos casos, cuando las modificaciones son realizadas posteriormente a su selección de los aptámeros, es necesario verificar que no se haya alterado la afinidad por la molécula diana, ni la capacidad inhibitoria. La capacidad de algunas RNA polimerasas para incorporar nucleótidos modificados a la cadena creciente ha hecho posible el uso de métodos de selección con poblaciones de oligonucleótidos químicamente modificados (Proske *et al.*, 2002; White *et al.*, 2008). Las modificaciones químicas utilizadas en estos trabajos implican la modificación 2' fluoro de la ribosa lo que le confiere una mayor estabilidad al oligonucleótido. Recientemente se ha visto que los LNA pueden ser incorporados enzimáticamente tanto al DNA como al RNA, ello permitirá la incorporación de LNAs en los ciclos de selección (Veedu *et al.*, 2007; Veedu *et al.*, 2008; Veedu *et al.*, 2009).

Se han seleccionado aptámeros contra cualquier tipo de molécula pequeña, proteínas, ácidos nucleicos o incluso células. Generalmente la selección de aptámeros con fines terapéuticos se ha centrado en el desarrollo de aptámeros contra proteínas (revisado por (Marton *et al.*, 2010)). Sin embargo la obtención de aptámeros con capacidades de unión a ácidos nucleicos, especialmente el RNA, también ha sido estudiada.

Con la finalidad de encontrar inhibidores dirigidos a los dominios genómicos funcionales del HCV se han diseñado aptámeros con la capacidad de unirse a los dominios II, III y IV del IRES y a el *X tail* (ver tabla I. 6). En todos estos casos se trata de regiones del genoma que en sí mismas tienen una función en la biología del HCV. Mediante el bloqueo de dichas regiones es posible afectar el ciclo viral infeccioso. El primer intento por desarrollar aptámeros contra el genoma del HCV se realizaron dos métodos de selección utilizando como dianas de unión en un caso subdominio genómico SLI del *X tail* y en el otro caso el dominio IV del IRES (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002). En el diseño experimental que utilizó como diana el dominio SLI del *X tail*, se obtuvo una población de aptámeros que contenían un motivo de secuencia complementario al lazo apical (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002). Se realizó un plegamiento teórico de los aptámeros y se vio que el motivo complementario a la secuencia del lazo apical de SLI se localizaban tanto en un lazo apical, en un lazo interno del aptámero o bien en otras regiones simple cadena. Uno de los aptámeros seleccionados, el 5-39 tenía una afinidad de unión al SLI con un  $K_d$  de  $66,8 \pm 3,7$  nM. El mapeo de la interacción del aptámero con SLI mostró que el aptámero se unía al subdominio SLI mediante una interacción que implica a los residuos del lazo apical del SLI y del lazo interno del aptámero, interacción ALIL (*Apical Loop- Internal Loop*). Los aptámeros seleccionados contra el dominio IV presentaban un motivo consenso complementario al lazo apical del dominio IV. El 60% de los aptámeros mostraban una estructura secundaria teórica donde el motivo consenso se localizaba en un lazo interno del aptámero. El mapeo de los residuos que participaban en la interacción del dominio IV con uno de los aptámeros (IV-55 que presentaba una  $K_d$  de 20nM) mostró que la interacción es del tipo ALIL (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002). Aunque estos trabajos caracterizaron la interacción de los aptámeros con el RNA diana y fueron pioneros en el estudio de aptámeros dirigidos a RNA, no determinaban el efecto inhibitorio sobre el ciclo viral de los aptámeros seleccionados. Dos grupos seleccionaron aptámeros contra el dominio II del IRES (Kikuchi *et al.*, 2003; Da Rocha Gomes *et al.*, 2004). Uno de los trabajos caracteriza al aptámero Ila-14 que se une mediante una interacción del tipo ALIL con el lazo apical del dominio II, con una  $K_d$  de 35 nM. (Da Rocha Gomes *et al.*, 2004). En este caso la unión del aptámero está bien

caracterizada pero al igual que en los trabajos anteriores no estudiaban el efecto inhibitor del aptámero. En el otro trabajo se aislaron aptámeros con un motivo consenso complementario al dominio II del IRES: Los aptámeros presentaban una  $K_d$  de 11 nM y el mapeo mediante ensayos de protección con RNAsas reveló que el tipo de interacción implicaba a los nucleótidos del lazo apical del aptámero con los del lazo apical del dominio II. Un tipo de interacción semejante a un *complejo kissing*. El efecto inhibitor de la traducción de los aptámeros fue probado *in vitro*, donde se observó que eran capaces de inhibir un 40% la traducción dependiente de IRES de la luciferasa (Kikuchi *et al.*, 2003). El mismo grupo seleccionó aptámeros dirigidos contra el dominio III del IRES: Tras cuatro rondas de selección se obtuvieron secuencias que se podían dividir en tres grupos de moléculas que presentaban motivos de secuencia complementarios al lazo apical del dominio III, a la región simple cadena del extremo 3' del dominio IV y un solo clon con un motivo complementario al lazo apical del dominio IIIb. Los autores se centraron en el estudio de los aptámeros con motivos complementarios al lazo III. Uno de los aptámeros, el 3-07 presentaba una  $K_d$  de  $9,6 \pm 4$  e inhibía la traducción IRES dependiente de la luciferasa hasta un 90% *in vitro* y hasta un 60% en células HeLa. El mapeo de la región de interacción reveló que los nucleótidos que interaccionan se localizan en un lazo interno del aptámero (Kikuchi *et al.*, 2005).

Aptámeros como inhibidores del HCV			
Región blanco del RNA del HCV		Eficiencia	Referencias
5' UTR	Dominio II	++	(Da Rocha Gomes <i>et al.</i> , 2004) (Kikuchi <i>et al.</i> , 2003)
	Dominio III	++ +++	(Kikuchi <i>et al.</i> , 2005) (Kikuchi <i>et al.</i> , 2005)
	Dominio IV	Nd	(Aldaz-Carroll <i>et al.</i> , 2002)
3' UTR	SLI	Nd	(Aldaz-Carroll <i>et al.</i> , 2002)
	<i>X tail</i>	Nd	(Fukuda <i>et al.</i> , 2008)

**Tabla I. 6: Aptámeros como inhibidores del HCV.** En la tabla se muestran los distintos dominios del genoma del HCV para los cuales se han diseñado aptámeros, la eficiencia del efecto inhibitor y las referencias correspondientes. Nd señala los aptámeros a los que no se determinó la eficiencia inhibitor. +, ++ y +++ igual que en la tabla I. 2. Adaptada de (Romero-López *et al.*, 2006).

Como se mencionó en el apartado 2.9.2.3. de Ribozimas, en el diseño de herramientas moleculares contra el HCV con mejores propiedades inhibitoras se desarrollaron RNAs quiméricos con un dominio aptámero y el dominio ribozima HH363 que corta en el RNA del IRES del virus (Romero-López *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos de este estudio permitieron obtener conclusiones importantes acerca del rol de la estructura de los aptámeros para su función de unión al ligando. (Romero-López *et al.*, 2005). Mediante éste método se seleccionaron inhibidores con dominios aptámeros que tenían como blanco distintas regiones del IRES y se observó que el efecto inhibitor de la traducción del HCV *in vitro* que presentaba la molécula completa es mayor que el de cada una de sus actividades en *trans* por separado (Romero-López *et al.*, 2005). Estas observaciones sugieren que la molécula quimérica se completa se comporta como un aptámero.

### **3. Objetivos.**

Debido a la ineficacia de los tratamientos actuales de la hepatitis C, en el presente trabajo nos propusimos estudiar el potencial uso del dominio genómico CRE como diana de una terapia anti HCV. Para el desarrollo del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Selección de aptámeros frente a un fragmento de RNA que contiene el dominio genómico CRE
- 2) Identificación experimental de las dianas de unión de los aptámeros en el dominio CRE.
- 3) Caracterización funcional de los aptámeros seleccionados.



## **4. Materiales y métodos.**

### **4.1. Materiales**

#### **4.1.1. Productos químicos.**

En general se utilizaron reactivos de las casas Sigma (Saint Louis, USA), Fluka (Seelze, Alemania), Roche (Mannheim, Alemania), Panreac (Barcelona, España), Serva (Heidelberg, Alemania) y Amresco (Solon, USA).

#### **4.1.2 Enzimas de restricción y modificadores de DNA y de RNA.**

Las enzimas utilizadas como herramientas moleculares se obtuvieron de las firmas New England Biolabs (NEB, Ipswich, USA), Invitrogen (California, USA), Promega (Madison, USA), Roche (Mannheim, Alemania) y MBI Fermentas (Vilnius, Lituania), salvo excepciones que se indican en su caso.

#### **4.1.3 Isótopos radiactivos**

El marcaje radiactivo se ha realizado utilizando el isótopo  $^{32}\text{P}$  en forma de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$  o  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  o  $\text{pC}^{32}\text{P}$  con actividades específicas de entre 3000 a 5000 Ci/mmol.

En todos los casos los isótopos fueron suministrados por Perkin Elmer (Wellesley, USA).

#### **4.1.4 Películas autorradiográficas.**

Las películas autorradiográficas fueron de las casas Kodak (X-OMAT AR 5) y AGFA (Curix RP2).

#### **4.1.5 Medios de cultivo**

Medio LB líquido: Bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 5 g/l, pH=7.

Medio LB –agar: Medio LB líquido y agar 15%.

Medio de congelación para células procariotas. Medio LB con glicerol a una concentración final de 25%.

Medio de Eagle modificado por Dubblecco (DMEM de GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA), suplementado con 20% de suero bovino fetal (SBF) (Whittaker, USA). El SBF utilizado para

suplementar el medio es previamente inactivado por calor mediante incubación de 30 min a 55°C.

Medio DMEM para el crecimiento de las células Huh-7 portadoras de replicones. Es el medio DMEM suplementado con 20% de SBF que contiene además 0.5 mg/ml del antibiótico G-418.

Medio de congelación para células eucariotas es medio DMEM, 20% SBF y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%.

Para preformar los complejos lipídicos-RNA se utilizó el medio Opti-MEM (GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA).

#### **4.1.6 Tampones**

##### **Tampón de electroforesis Tris-Acetato EDTA (TAE, 1X)**

Tris-Acetato.....40 mM

EDTA.....1 mM

pH ~ 8,5

##### **Tampón de electroforesis Tris-Borato EDTA (TBE, 1X)**

Tris Base.....89 mM

Ácido Bórico.....89 mM

EDTA.....2,5 mM

pH ~ 8,3

##### **Tampón de electroforesis para geles de poliacrilamida no desnaturalizantes (TB, 1X)**

Tris-HCl pH = 8,3.....100 mM

Ácido bórico.....86 mM

##### **Tampón de electroforesis L (1X)**

Tris Base.....350 mM

SDS.....0,1%

pH = 8,8

### **Tampón de electroforesis M (1X)**

Tris Base.....150 mM

SDS.....0,1%

pH = 6,8

### **Tampón de electroforesis para proteínas “Running” (1X)**

Tris Base .....25 mM

Glicina.....192 mM

SDS.....0,1 % (p/v)

pH ~ 8,5

### **Tampón no desnaturizante para carga en geles de agarosa (10X)**

Glicerol.....50% (v/v) en agua

Xilencianol.....0,4% (p/v) en agua

Azul de bromofenol.....0,4% (p/v) en agua

### **Tampón no desnaturizante para carga en geles de poliacrilamida (2X)**

Glicerol.....30% (v/v) en agua

TMN 5X.....20% (v/v) en agua

tRNA.....4% (p/v) en agua

Xilencianol.....0,4% (p/v) en agua

Azul de bromofenol.....0,4% (p/v) en agua

### **Tampón desnaturizante para carga en geles de poliacrilamida (2X)**

Formamida desionizada.....94% (v/v)

Xilencianol.....0,025% (p/v)

Azul de bromofenol.....0,025% (p/v)

EDTA.....17 mM

### **Tampón desnaturizante para carga en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (1X)**

Tris-HCl, pH 6,8.....10 mM

SDS.....2% (p/v)

EDTA.....2 mM

Glicerol.....5% (p/v)  
 $\beta$ -mercaptoetanol.....1% (v/v)  
Azul de bromofenol.....0,1 mg/ml

#### **Tampón de elución de ácidos nucleicos a partir de geles de poliacrilamida**

NH<sub>4</sub>Ac.....500 mM  
SDS.....0,1% (p/v)  
EDTA , pH = 8.....1 mM

#### **Tampón de unión biotina-estreptavidina**

Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.....20 mM  
NaCl.....150 mM  
pH = 7,5

#### **Tampón fosfato salino (PBS, 10X).**

NaCl.....137 mM  
KCl.....2,7 mM  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....4,3 mM  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....1,4 mM  
pH = 7,4.

#### **Tampón I (de lisis de bacterias).**

Tris-HCl, pH = 8..... 20 mM  
NaCl..... 0,5 M  
Glicerol..... 10%  
Triton X-100..... 1%  
 $\beta$ -mercaptoetanol..... 1 mM  
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) ..... 1 mM  
DNasa I..... 1 g/l  
Lisozima.....1 mg/ml

### **Tampón II.**

Tris-HCl pH = 7,0.....20 mM  
NaCl.....1 M  
Glicerol.....10%  
Tritón X-100..... 1%  
 $\beta$ -mercaptoetanol.....1 mM

### **Tampón de unión 1X**

Cacodilato de sodio, pH = 7,5.....50 mM  
KCl.....300 mM

### **Tampón de unión de la NS5B $\Delta$ 21 al RNA, 3'HCV-9181 (2x)**

HEPES, pH = 7,9.....5 mM  
MgCl<sub>2</sub>.....2 mM  
KCl.....25 mM

### **Tampón para la degradación con la RNasa T1 en condiciones desnaturizantes (2x)**

Citrato sódico, pH = 4,5.....20 mM  
EDTA.....1 mM  
Urea.....7 M  
Azul de bromofenol.....1% (p/v)  
Xilencianol.....1% (p/v)

### **Solución para la hidrólisis alcalina de RNA (10X)**

Carbonato sódico.....100 mM  
Bicarbonato sódico.....100 mM  
pH = 9,5

## 4.1.7 Construcciones de DNA y síntesis de RNA.

### 4.1.7.1 HCV-CRE<sub>194</sub>

Para la síntesis del RNA del HCV-CRE<sub>194</sub> se construyó un plásmido a partir del plásmido pUC18 (Fermentas, Vilnius, Lituania) al cual se le integró la secuencia del HCV que se extiende desde los nucleótidos 9181-9371 del aislado Con1 del genotipo 1b. El fragmento 9181-9371 fue obtenido mediante una reacción de amplificación utilizando como molde el plásmido pU3'HCV-9181 (Romero-López y Berzal-Herranz, 2009). Se diseñaron dos oligodesoxirribonucleótidos (ODNs) cebadores. El primero, T7pHCV-9181: 5' TATGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGCAGTAAGGACCAAGTCCAA 3', que hibrida en el extremo 5' del genoma del aislado Con1 del HCV y permite la incorporación de la secuencia para el promotor de la enzima RNA polimerasa del fago T7 (subrayada) y de un sitio de restricción para la enzima *EcoR1* (en cursiva). El segundo, asHCV-9371*Sall*: 5' GTGGTCTGACTCGGTTGGGGAGTAGATAGAT 3', aparece en la posición 9371 del genoma viral y contiene un sitio de corte para la enzima *Sall* (en cursiva). La reacción de amplificación se llevó a cabo según se describe en el apartado 4.2.10. El producto de amplificación fue seguidamente purificado por gel de agarosa (4.2.15.2.) y clonado en el plásmido pGEMT® Easy (Promega, Madison, USA, 4.2.21.). A continuación, el plásmido con el inserto fue incorporado en las bacterias *E. Coli* mediante transformación por choque térmico (4.2.5.1) y aislado mediante miniprep (4.2.13.1). Posteriormente, el inserto de DNA del HCV fue subclonado en el vector pUC18. Para ello, el plásmido pGEMT® Easy con el inserto así como el plásmido pUC18, fueron digeridos en forma paralela con las enzimas *EcoRI* y *Sall* (4.2.20.1.1.). El producto de digestión correspondiente al fragmento de DNA del HCV fue purificado por gel de agarosa (4.2.15.2.) y el fragmento resultante fue ligado a través de sus extremos *EcoRI* y *Sall* con el vector pU18.

Para la síntesis del RNA se linealizó el plásmido pUC18 que contenía el inserto HCV-CRE<sub>194</sub> mediante la digestión con *Sall* y se realizó la transcripción *in vitro* del fragmento como se indica en 4.2.11.1.

### 4.1.7.2. 3'HCV-9181

El fragmento de RNA, 3'HCV-9181 que contiene al CRE y a la región 3'UTR del HCV, fue obtenido por transcripción *in vitro* del plásmido pU3'HCV-9181 (Romero-López y Berzal-Herranz, 2009) linearizado con la enzima *HindIII*.

#### 4.1.7.3. pET-NS5BΔ21.

Proviene del plásmido pET-24a (Novagen, Darmstadt, Alemania) y contiene la secuencia codificante de la proteína NS5B pero que le falta la región C terminal de 21 nucleótidos necesaria para el anclaje de la proteína en las membranas derivadas del retículo endoplásmico. El fragmento de DNA clonado corresponde a los nucleótidos 7999 al 9308 del RNA del HCV.

Para la obtención del fragmento de DNA, primeramente se aisló el RNA genómico de las células Huh-7 portadoras de los replicones subgenómicos con el reactivo Trizol® (4.2.15.5). El RNA fue retrotranscrito a cDNA (4.2.12.1) y el cDNA fue amplificado con los ODNs cebadores HCV-7999\_*NheI* 5'-CATATGGCTAGCTCGATGTCCTACACATGGACA-3' and asHCV-9308\_*XhoI* 5'-GTGGTGCTCGAGGCGGGGTCGGGCACGAGACAGG CT-3' (4.2.10). Los sitios de restricción se muestran en cursiva. Se forma independiente y simultánea se digirieron el amplicón y el plásmido pET-24a con las enzimas de restricción *NheI* y *XhoI* y se purificaron por gel (4.2.15.2.). A continuación se ligó el fragmento de DNA al plásmido pET24a.

#### 4.1.7.4. pGT-Pn

Una fracción de las moléculas rescatadas durante las diferentes rondas de selección (P1 a P9) fue clonada en el vector pGEMT®-Easy (Promega, Madison, USA, (4.2.21) para generar las construcciones pGT-Pn (pGT-P1 a pGT-P9).

#### 4.1.7.5. pUC19-aptámero

Las variantes clonadas en el vector pGEMT®-Easy se subclonaron en el vector pUC19. Para el subclonado en el vector pUC19 se incorporó el sitio de restricción para el corte con la enzima *Sall* mediante una PCR con los cebadores 3'aptamer-CRE CGACTGTGACTACTCTTTAATTCGCTACCT y 5'PCR-CRE GCTATGAAATCTAATACGACTCACTATAGGGATATTATAGTACATAAA utilizando como molde el DNA de los plásmidos pGT-Pn. A continuación el DNA amplificado fue extraído por el método de fenol-cloroformo y precipitación (4.2.15.1), resuspendido en 30 µl de agua estéril y digerido con las enzimas *EcoRI* y *Sall* (4.2.20.1.1). Simultáneamente se realizó la digestión del vector pUC19 y se purificaron los fragmentos de DNA por gel de agarosa (4.2.15.2.). A continuación se llevó a cabo la reacción de ligación con el aptámero pUC19. Los productos de ligación fueron incorporados por choque térmico (4.2.3.1) en *E. coli* y el DNA plasmídico se mandó a secuenciar.

#### 4.1.7.6. RNA<sub>80</sub>

El RNA<sub>80</sub> utilizado como control para numerosos ensayos fue obtenido a partir de la transcripción *in vitro* del plásmido pBSSK (Stratagen, La Jolla, USA) linearizado con la enzima *Bam*HI (Romero-López *et al.*, 2007).

#### 4.1.8 Cepas Bacterianas

Las cepas bacterianas empleadas fueron:

*E. coli*. DH5 $\alpha$ F' (Raleigh et al 1989, Woodcock et al 1989) F'/*endA1 hsdR17*(r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *supE44 thi-1 recA1 gyrA*(Nal<sup>r</sup>) *relA1* $\Delta$  (*LacZYA-argF*)U169 *deoR*( $\phi$ 80*dlac* $\Delta$ (*lacZ*)M15)

*E. coli*. TOP10 (Invitrogen, Camarillo, USA): F- *mcrAA*(*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*.*

BL21 (DE3) pLysS Rosetta cells (Novagen, Darmstadt, Alemania): F- *ompT hsdS<sub>B</sub>* (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cam<sup>R</sup>)

#### 4.1.9. Marcadores de masa molecular.

##### 4.1.9.1. Para DNA.

-DNA del plásmido pUC19 digerido con *Msp*I. Fragmentos (longitud en pb):509, 404, 331, 242,190, 147, 110, 111, 67, 46.

-DNA del fago Lambda gtl 1 (c1857, ind1, Sam7) digerido con *Sfi*I. Fragmentos (longitud en pb): 7743, 6223, 3472, 2690, 1882, 1489, 925, 421, 74.

-DNA del plásmido pUC18 digerido con *Sau*3AI. Fragmentos (longitud en pb): 943, 585, 258, 153, 105, 78, 46, 36, 18, 12, 8.

##### 4.1.9.2. Para RNA.

Se utilizó el marcador ssRNA "low range" de New England Biolabs (NEB, Ipswich, USA) que contiene RNAs de seis tamaños moleculares: de 1000, 500, 300, 150, 80 y 50 nucleótidos.



Se utilizó el marcador de RNA Century™ marker (Ambion, Austin, USA). Consiste en cinco plásmidos linearizados listos para ser usados en la transcripción *in vitro* para sintetizar RNAs de 500, 400, 300, 200 y 100 nucleótidos. Este marcador se utilizó marcado radiactivamente.

#### **4.1.10. Programas informáticos.**

A continuación se relacionan los programas informáticos más frecuentemente utilizados durante el desarrollo de la presente tesis.

- Microsoft Office Word: version 2007. Microsoft Inc.
- Microsoft Office PowerPoint: Version 2007. Microsoft Inc.
- Microsoft Office Excel: Version 2007. Microsoft Inc.
- SigmaPlot: version 8.0: SPSS Inc.
- Internet Explorer: Microsoft Inc
- Mozilla Firefox
- Adobe Illustrator CS3
- Adobe Photoshop CS3
- SeqEd: Perkin Elmer Corp.
- DNASIS Max: MiraiBio
- ImageQuant: Molecular Dynamics. IQ Solutions
- MC-Fold.
- GraphPad
- EndNoteX. NilesSoftware Inc.

## **4.2. Métodos.**

### **4.2.1. Cultivo de células procariotas.**

Las cepas de *E. coli* utilizadas a lo largo del estudio se cultivaron en medio líquido (LB, medio Luria-Bertani) a partir, en cada caso, de un clon aislado crecido en medio sólido (LB-agar), asegurando de esta manera poblaciones homogéneas. Los medios fueron suplementados con ampicilina, X-gal y/o IPTG, en caso necesario. Los cultivos se incubaron a 37°C.

El crecimiento en medio líquido se llevó a cabo en agitación hasta saturación, para la extracción de DNA plasmídico, o bien hasta una fase de crecimiento exponencial para la preparación de células competentes o la congelación del cultivo.

### **4.2.2. Cultivos de células eucariotas.**

Las células Huh-7 portadoras de los sistemas replicones se crecieron en medio DMEM (GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA) suplementado con suero bovino fetal (SBF, Invitrogen, Camarillo, USA) al 20% y 0,5 mg/ml G-418. Fueron incubadas a 37°C en una atmósfera enriquecida con un 5% de CO<sub>2</sub>. Las monocapas celulares fueron regularmente tripsinizadas en estado de semi-confluencia. Previamente a la adición de tripsina se quitó el medio de cultivo y se lavó la monocapa con PBS 1X para eliminar los factores del suero que inactivan la tripsina. Posteriormente se trataron con tripsina 0,25% p/v, EDTA 0,2% durante 30 s a 1 min a temperatura ambiente. La tripsina se neutralizó mediante el agregado de un volumen de medio DMEM con un 20% de SBF, tras lo cual la suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm a 25°C durante 5 min. Las células sedimentadas se resuspendieron en medio DMEM con un 20% SBF y se repartieron en frascos de cultivos a una concentración aproximada de  $2,5 \times 10^5$  células/ml de medio. Los pases se realizaron por lo general cada 3 o 4 días.

Para los ensayos de transfección se recolectaron las células y sedimentaron de la misma forma que en el párrafo anterior. Una vez sedimentadas las células se resuspendieron en medio DMEM sin antibiótico y se cultivaron en una placa de 24 pocillos a una concentración de 80000 células/pocillo. Cada pocillo llevaba un volumen de medio de 500 µl.

### **4.2.3. Crioconservación de células procariotas.**

Para la crioconservación de bacterias, se partió de un cultivo bacteriano en LB crecido durante toda la noche. El cultivo bacteriano se rejuveneció mediante una dilución 1:1000 en medio LB y se incubó en agitación a 37°C hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial ( $DO_{600}$  aprox 0,4-0,6). A continuación, las células se diluyeron con glicerol a una concentración final del 25%, se repartieron en tubos de 1,5 ml y se congelaron directamente a -80°C. Las bacterias se conservaron a esta temperatura.

### **4.2.4. Crioconservación de células eucariotas.**

Las células se recogieron mediante tripsinización y centrifugación y se resuspendieron en medio de congelación a una concentración  $1 \times 10^6$  células/ml. Se alicuotaron en criotubos de 2 ml y fueron congeladas de forma progresiva mediante incubaciones sucesivas en hielo y -80°C para ser finalmente conservadas en vapor de Nitrógeno.

### **4.2.5. Transformación de *E. coli* con DNA plasmídico.**

#### **4.2.5.1 Transformación por choque térmico.**

##### **Preparación de células competentes**

Para la transformación química por choque térmico es necesario preparar primero las bacterias con  $CaCl_2$  para permeabilizar las paredes celulares para que las moléculas de DNA puedan penetrar al interior de las células (Lederberg y Cohen, 1974; Hanahan y Meselson, 1983). Para ello, las células pertenecientes a la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* fueron crecidas hasta una  $DO_{600}$  de 0,4-0,6. Se recogieron por centrifugación en frío durante 7 min a 6000 xg. Se resuspendieron en 0,5 volúmenes de  $CaCl_2$  50 mM frío y se incubaron en hielo durante 30 min. Tras este período se recogieron de nuevo por centrifugación como se ha descrito y se resuspendieron finalmente con  $CaCl_2$  50 mM en 1/20 del volumen original.

##### **Transformación**

La transformación de las bacterias competentes se realizó por choque térmico (Lederberg y Cohen, 1974; Hanahan y Meselson, 1983). Se mezclaron 200  $\mu$ l de células competentes con 10-100 ng de DNA y se mantuvieron en hielo. En este método, la entrada del DNA adherido a la superficie celular se facilita mediante un incremento en la temperatura hasta alcanzar los 42°C

durante 90s. Las células se recuperaron 5 min en hielo y se añadió 1 ml de medio LB precalentado sin antibiótico y las células se incubaron en agitación suave durante una hora a 37°C. A continuación, se sembraron en placas de medio sólido (aproximadamente 200 µl/placa) en presencia del antibiótico adecuado y se crecieron toda la noche a 37°C. La eficiencia de transformación obtenida mediante este protocolo suele ser de 10<sup>6</sup> células/µg de DNA plasmídico utilizado.

#### **4.2.5.2. Transformación por electroporación**

En la transformación por electroporación las bacterias son sometidas a un campo eléctrico que desestabiliza las estructuras de pared y membrana. Durante este proceso se inducen poros por los que ingresa el DNA en las bacterias.

Se mezclaron 10-100 ng de DNA (disuelto un volumen de 1-5 µl) con 40 µl de células electrocompetentes "One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli*" de Invitrogen (California, USA) en suspensión. La mezcla se mantuvo en hielo durante 1 minuto y seguidamente se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm fría en hielo. La electroporación se realizó en el electroporador MicroPulser de Bio-Rad (California, USA) con un voltaje de 2,5 kV (programa EC2) un tiempo aproximado de 5 mseg. A continuación se le adicionó 960 µl de medio LB sin antibiótico a 37°C. La suspensión se transfirió a un tubo de de 15 ml y se incubó a 37°C durante 1 hr con agitación a 225 rpm. Se sembró 160 µl en placas de medio sólido con el antibiótico apropiado y se crecieron toda la noche a 37°C. La eficiencia de transformación suele ser de 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> células/µg de DNA.

#### **4.2.6 Selección de colonias recombinantes de *E. coli***

La incorporación del plásmido en las bacterias permitió la selección por la adquisición de nuevas funciones. Por un lado, las células transformadas se seleccionaron por la resistencia al antibiótico conferida por el plásmido. Por otra parte, la clonación del inserto en el marco de lectura del péptido α permitió seleccionar las bacterias recombinantes. Las colonias recombinantes se identificaron por la actividad de la β-galactosidasa. Las cepas bacterianas utilizadas (DH5α y TOP10, 4.1.8.) son defectivas para la síntesis esta enzima debido a la eliminación del gen que codifica para uno de sus péptidos (el péptido α). Los plásmidos que portan este gen restauran la síntesis de la enzima en las células transformadas mediante un fenómeno de complementación genética. Así, en presencia de un sustrato cromogénico

denominado X-gal (5-Br-4-Cl-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) y el inductor IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) las células transformadas adquieren coloración azul. El sitio de clonación en este tipo de plásmidos se sitúa dentro del marco abierto de lectura del gen del péptido  $\alpha$  por lo que en los plásmidos recombinantes que contienen un inserto se altera la pauta para la lectura del gen y las colonias son de coloración blanca.

Para este tipo de selección las células se sembraron en medio LB sólido conteniendo ampicilina 50  $\mu$ g/ml, X-gal 40  $\mu$ g/ml e IPTG 150  $\mu$ g/ml.

Las bacterias transformadas con los plásmidos pGT-Pn y pUC19-aptámero que se utilizaron en el método de selección molecular. Las colonias positivas fueron chequeadas por PCR (4.2.10.)

#### **4.2.7. Transfección de las células eucariotas.**

Para cada transfección se utilizó un cultivo de células Huh-7 NS3 19, preparado 20 hr antes de las transfecciones como se indica en el apartado 4.2.2. La transfección de las células eucariotas con los RNAs de los aptámeros se realizó mediante la utilización del reactivo lipídico catiónico TransFectin (Bio-Rad, California, USA) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se mezclaron 50  $\mu$ l de opti-MEM junto con 3  $\mu$ l de TransFectin y por otro lado 50  $\mu$ l de opti-MEM con 3  $\mu$ g de RNA. A continuación se juntan ambas mezclas y se deja incubar 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adiciona gota a gota al cultivo celular.

#### **4.2.8. Síntesis de ácidos nucleicos**

Los oligodesoxirribonucleótidos (ODN) sintéticos utilizados durante el desarrollo de este trabajo experimental, fueron obtenidos del servicio de Síntesis del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". La síntesis se llevó a cabo en un sintetizador de DNA 3400 DNA Synthesizer (Applied Biosystems, Wellesley, USA).

#### **4.2.10. Reacción en cadena de la polimerasa**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación exponencial y específica de una molécula de DNA. Es llevada a cabo mediante una reacción enzimática que requiere una DNA polimerasa termoestable. Se basa en sucesivos ciclos de tres pasos: desnaturalización de la doble hebra, hibridación de los cebadores específicos y extensión por síntesis de DNA.

Las reacciones de amplificación mediante PCR se realizaron en los termocicladores: Perkin Elmer Gene Amp PCR 2400 (Wellesley, USA) o Thermo Electron Corporation Px2 Gradient PCR Block (Thermo, Massachusetts, USA). La mezcla de reacción contenía dNTPs 200  $\mu$ M cada uno,  $MgCl_2$  2 mM, DNA molde 1 ng/ $\mu$ l, *Taq* DNA polimerasa (Biotools, Madrid, España) 0,015 U/ $\mu$ l, tampón de reacción suministrado por la casa comercial 1x y cada uno de los ODNs a una concentración final de 0,5  $\mu$ M. Se utilizaron distintos protocolos de amplificación. Generalmente se realizaron entre 25 y 35 ciclos de amplificación que consistían en 30 s de desnaturalización a 95°C, 30 s de hibridación a la temperatura adecuada para cada ODN y 30 s de extensión a 72°C. Antes del comienzo del primer ciclo se realizó un paso de desnaturalización inicial de 2 min a 95°C y al finalizar la serie de ciclos se realizó una etapa de elongación de 7 min a 72°C.

Las PCRs utilizadas para la selección de colonias portadoras de los plásmidos recombinantes se realizaron a partir de una colonia con el *kit* 2x ReddyMix™ PCR Master Mix (Thermo, Massachusetts, USA). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ l. Para ello, 4  $\mu$ l de agua fueron resuspendidas con sus respectivas colonias y los ODN correspondientes a una concentración final de reacción de 1  $\mu$ M.

#### **4.2.11. Transcripción *in vitro*.**

##### **4.2.11.1. Transcripción *in vitro* a pequeña escala.**

Las moléculas de RNA se obtuvieron mediante la transcripción *in vitro* catalizada por la enzima RNA polimerasa dependiente de DNA, del bacteriófago T7.

Los DNAs molde utilizados fueron plásmidos previamente linearizados con enzimas de restricción o fragmentos de DNA de doble cadena obtenidos por PCR. Previamente a su utilización en la transcripción *in vitro*, los DNAs fueron purificados por gel de agarosa o por extracción fenólica y posterior precipitación (4.2.15.1.).

Las reacciones de transcripción se llevaron a cabo en un volumen total de 50  $\mu$ l en presencia de 2  $\mu$ g de DNA molde, tampón de reacción (Tris-HCl 40 mM pH = 7,9,  $MgCl_2$  6 mM, espermidina 2 mM, NaCl 10 mM, DTT 10 mM), 0,01% de Tritón X-100, NTPs 1 mM de cada uno, 0,5 U/ $\mu$ l de inhibidor de RNasa y T7 RNA polimerasa (purificada y calibrada en el laboratorio). La reacción fue incubada durante 2 horas a 37°C. A continuación el DNA molde fue eliminado por digestión con RQ1 DNasa (4.2.20.1.2.).

La síntesis de RNA marcado internamente se realizó de manera similar a la descrita pero con las concentraciones de nucleótidos modificados según se describe en el apartado (4.2.23.1.3.).

Una vez sintetizados, todos los RNAs se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y se purificaron a partir del gel (4.2.15.3).

#### **4.2.11.2. Transcripción *in vitro* a gran escala.**

Para la transcripción *in vitro* de RNAs a gran escala utilizados para la realización del método de selección molecular *in vitro* así como en las transfecciones de las células Huh-7 portadoras de los replicones subgenómicos del HCV, se utilizó el *Kit* de transcripción *in vitro* Ribomax™ (Promega, Madison, USA). Este *Kit* permite la producción de grandes cantidades de RNA. Se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron entre 5-10 µg de DNA con, el tampón suministrado por el fabricante (80 mM HEPES pH = 7,5, 24 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de espermidina, 40 mM DTT), los rNTPs a una concentración final de 25 µM cada uno y una mezcla de enzimas suministrada por el fabricante. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 3 hr. Al finalizar la reacción el DNA molde se degradó con la reacción catalizada por la RQ1 DNasa (4.2.20.1.2.).

Los RNAs obtenidos se purificaron mediante el método de extracción fenólica (4.2.15.1) y cromatografía de exclusión molecular por tamaño (4.2.15.4) y posterior precipitación con EtOH (4.2.15.1).

#### **4.2.12. RT-PCR cuantitativa.**

La técnica de RT-PCR cuantitativa combina las reacciones de transcripción reversa y PCR cuantitativa a tiempo real. Con esta técnica una molécula molde de RNA es retrotranscrita a cDNA y posteriormente amplificada mediante una reacción de PCR en donde se cuantifica el producto resultante al finalizar cada ciclo de amplificación. La detección puede realizarse de distintas formas, el sistema que utilizamos en el presente trabajo, consiste en el empleo de una sonda TaqMan. La sonda TaqMan consiste en un ODN que hibrida con el DNA molde, la sonda tiene unidos de forma covalente en su extremo 5' un fluoróforo (en este caso la 6-carboxyfluoresceína, FAM) y en el extremo 3', un *quencher* (el utilizado en este trabajo fue el tetrametildrodamina, TAMRA). Primeramente, la sonda TaqMan que tiene el fluoróforo y el *quencher* ligados, hibrida con el DNA molde. En esta situación el *quencher* está próximo al fluoróforo y absorbe la fluorescencia emitida por el mismo. Cuando la *Taq* DNA polimerasa

amplifica la hebra molde la actividad 3'-5' exonucleasa causa la degradación de la sonda y entonces el *quencher* y el fluoróforo se liberan. De forma tal, que ahora el fluoróforo es capaz de emitir su fluorescencia que es detectada por el lector incorporado en el termociclador.

#### **4.2.12.1. Retrotranscripción.**

Brevemente, 20 ng de RNA total fue hibridado con un exceso molar de cebadores hexámeros de secuencia aleatoria en un volumen de 10 µl mediante incubación durante 2 min a 95°C y enfriamiento lento hasta 16°C. Posteriormente, se adicionó 10 µl de una mezcla de reacción que contenía dNTPs, tampón de reacción, inhibidor de RNasas y RT MultiScribe™ proporcionados por el fabricante y a las concentraciones finales de reacción tal y como lo especifica el fabricante (4 mM de dNTPs, 1x de tampón de reacción, 1U/µl de inhibidor de RNasas y 0,5 U/µl de MultiScribe™, Applied Biosystems, Wellesley, USA). La síntesis del DNA se realizó en dos pasos en una primera etapa se realizó un paso de extensión a baja temperatura, (16°C durante 30 min) seguido de un paso de extensión a alta temperatura (42°C durante 30 min). La enzima se inactivó mediante choque térmico incubando la reacción durante 5 min a 85°C.

#### **4.2.12.2. PCR cuantitativa.**

La PCR cuantitativa se llevó a cabo utilizando 3 µl de la mezcla de DNA copia obtenida en el paso previo. Se diluyó en la mezcla "*Master Mix 2x*" (Applied Biosystems, Wellesley, USA) junto con los cebadores C-149 y C-342 (a una concentración final de 0,6 pmol/µl, (Martell *et al.*, 1999)) y la sonda TaqMan FT-275 (a una concentración final de 150 nM (Martell *et al.*, 1999)). La reacción se realizó en un volumen final de 15 µl y la amplificación mediante 40 ciclos (de 15 segundos a 95°C y extensión durante 1 minuto a 60°C).

Como normalizador se utilizó la cuantificación del gen endógeno humano que codifica para la enzima Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, GAPDH. La cuantificación del gen de GAPDH, se realizó a partir de 3 µl de la mezcla de DNA copia y se utilizó el *kit "Human GAPD (GAPDH) Endogenous Control kit" 20X* de Applied Biosystems y la mezcla "*Master Mix 2x*". Las reacciones se realizaron según las especificaciones del fabricante, en un volumen final de 15 µl y la amplificación se llevó a cabo utilizando el mismo protocolo de 40 ciclos empleado en la amplificación del RNA del HCV y de forma simultánea.



## **4.2.13 Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli***

### **4.2.13.1. Pequeña escala**

Para el aislamiento a pequeña escala destinado a la obtención de DNA plasmídico para las reacciones de secuenciación automática o para el subclonaje se utilizó el *kit* comercial "*Plasmid Mini Extraction Kit*" de AccuPrep® (Texas, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica se basa en la lisis celular con una solución que contiene 200 mM de NaOH y 1% p/v SDS proporcionada por el fabricante, la retención del DNA plasmídico en una resina lo que permite su lavado y a continuación la elución del DNA plasmídico de la misma.

### **4.2.13.2. Gran escala**

Para el aislamiento de DNA plasmídico a escala preparativa se empleó el *Kit* comercial "*Plasmid Purification Plasmid Maxi kit*" de QIAGEN® (Düsseldorf, Alemania). De la misma forma que en la extracción a pequeña escala, la extracción se basa en la lisis alcalina de las células y la retención del DNA plasmídico en una resina, de la que será eluido en una solución de baja fuerza iónica. El protocolo seguido es básicamente el mismo descrito para el método anterior aunque existen pasos adicionales de purificación de DNA mediante precipitaciones con isopropanol y etanol absoluto. Se parte de 500 ml de cultivo bacteriano crecido hasta saturación en agitación a 37°C durante toda la noche. El DNA obtenido mediante este protocolo fue principalmente utilizado para la preparación de marcadores de masa molecular para DNA, como vectores plasmídicos en proceso de clonación y como DNAs molde en reacciones de transcripción *in vitro*.

## **4.2.14. Electroforesis.**

### **4.2.14.1. De ácidos nucleicos.**

#### **4.2.14.1.1. En geles de agarosa.**

Los geles de agarosa se prepararon al 0,8-2% (p/v) en tampón TAE 1X con 100 pg/ml de bromuro de etidio (BrEt). Como tampón de carga se utilizó la solución de alta densidad que se describe en el apartado 4.1.6. Durante la electroforesis se utilizó el tampón TAE y se realizó a 10 ó 20 V/cm. El DNA fue visualizado por trans-iluminación con luz ultravioleta a 312 nm.

#### **4.2.14.1.2. En geles desnaturalizantes de poliacrilamida.**

Para la electroforesis de poliacrilamida se utilizó una solución de acrilamida:bisacrilamida en una proporción 19:1. Los geles se prepararon al 4-20% de poliacrilamida (p/v) y 7 M de urea en TBE 1X. Como catalizadores de la reacción de polimerización se utilizaron APS (0,0625% p/v) y TEMED (0,0625 % v/v). Los geles se sometieron a una pre electroforesis de aproximadamente 30 min con una intensidad de corriente continua de 36 mA. Las muestras se prepararon en tampón de carga desnaturalizante de formamida 1X (4.1.6), se desnaturalizaron mediante incubación a 95°C durante 2 min y se conservaron en hielo hasta el momento de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó a la misma intensidad de corriente que el paso previo y durante un tiempo variable dependiendo del tamaño de las moléculas y de la capacidad resolutive del gel. Para la purificación de oligonucleótidos y moléculas de RNA, se utilizaron geles preparativos de 1,5 mm de grosor, por el contrario los geles de naturaleza analítica se prepararon con un grosor de 0,8 mm o de 0,4 mm. Los geles analíticos con una concentración máxima de acrilamida de 10% fueron secados por vacío a una temperatura de 80°C.

#### **4.2.14.1.2. En geles nativos de poliacrilamida.**

Para las electroforesis en condiciones no desnaturalizantes se utilizaron geles nativos de poliacrilamida preparados con la misma solución de acrilamida:bisacrilamida que para las condiciones desnaturalizantes con tampón de electroforesis TB y no se añadió urea. El porcentaje de poliacrilamida utilizado fue del 5% (p/v). Como catalizadores de polimerización se utilizaron APS y TEMED, tal y como se ha descrito en el apartado 4.2.14.1.1. Previo a la electroforesis se realizó una pre-electroforesis de aproximadamente 20 min con una intensidad de corriente de 10 mA. Las muestras se prepararon por la adición de tampón de carga no desnaturalizante (4.1.6) y se conservaron en hielo hasta su carga en el gel. La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente a una intensidad de 10 mA durante 8-10 hr. Todos los geles se prepararon con un grosor de 0,8 mm y se secaron a vacío antes de su exposición.

#### **4.2.14.2. Electroforesis de proteínas.**

La electroforesis de proteínas se realizó en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida con SDS. Las dimensiones del gel fueron de 10 cm x 10 cm x 0,75 mm. Los geles se prepararon al 10% a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida al 30% (29,2:0,8) con tampón L, 4.1.6. Como catalizadores de la reacción de polimerización se usaron APS (0,025%,

p/v) y TEMED (0,004 % v/v). Para una mejor resolución de las proteínas la fracción superior del gel se encontraba menos concentrada (al 5%) y a diferente pH (tampón de electroforesis M, 4.1.6.). Las muestras se prepararon en tampón de carga para proteínas y se desnaturalizaron durante 2 min a 95°C. La electroforesis se desarrolló en una cubeta Hoefer™ SE 260 (GE Healthcare, Little Chalfon, Reino Unido) con tampón *Running* (4.1.6.) a una intensidad constante de 40 mA.

## **4.2.15. Purificación de ácidos nucleicos**

### **4.2.15.1. Extracción fenólica y precipitación**

La extracción fenólica es una técnica que permite la eliminación de proteínas presentes en las mezclas de reacción y el cambio de tampón. La muestra se llevó a un volumen final de 100 µl con agua miliQ estéril. Se añadió un volumen igual de fenol equilibrado a pH = 8,0. Las dos fases se mezclaron por agitación y fueron separadas por centrifugación a 13000 rpm durante 2 min. La fase acuosa se rescató y se pasó a otro tubo. A continuación, se añadió un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se repitió el proceso descrito. La fase acuosa resultante se precipitó mediante la adición de 3 volúmenes de etanol absoluto, 0,1 volumen acetato sódico 3 M y opcionalmente se agregó glicógeno (10-20 µg por precipitación). La mezcla se incubó 30 min a -80°C y se centrifugó en frío otros 30 min a 13000 rpm. Los ácidos nucleicos precipitados se lavaron con 250 µl de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente de forma breve, se decantó el sobrenadante y el precipitado se secó por centrifugación a vacío durante 4 min. El sedimento se resuspendió en un volumen apropiado de agua estéril.

### **4.2.15.2. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.**

Para la purificación de un fragmento de DNA a partir de un gel de agarosa primeramente, las moléculas de DNA de interés se separaron en función de su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa en presencia de BrEt. Posteriormente, las moléculas se localizaron en el gel por trans-iluminación con luz ultravioleta y se escindió con una cuchilla el fragmento de gel que contenía las moléculas del tamaño de interés. A continuación el fragmento de DNA se eluyó de la agarosa mediante distintos métodos:

#### **4.2.15.2.1. Método de congelación con fenol.**

Se trituró la pieza de agarosa y se mezcló con un volumen igual de fenol. La muestra se congeló a -80°C durante 10 min e inmediatamente después, y sin dejar que se descongelara, se centrifugó a temperatura ambiente a 13000 rpm durante 15 min. La fase acuosa resultante se recuperó y se extrajo el DNA una vez con fenol saturado en Tris Base, una segunda vez con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una última vez solamente con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El volumen recuperado se precipitó con etanol absoluto y acetato sódico y el DNA fue finalmente resuspendido en agua.

#### **4.2.15.2.2 Método “Wizard SV Gel Clean Up®” (Promega, Madison, USA).**

En este método el DNA queda retenido en una resina para posteriormente lavarlo y eluirlo con agua. El fragmento de agarosa se sumergió en un volumen adecuado de una solución de unión a la resina y se incubó a 65°C hasta que la agarosa se disolvió completamente. La solución se pasó por la resina a la cual se unieron los ácidos nucleicos. A continuación la resina se lavó para eliminar las impurezas unidas junto al DNA. Por último el DNA se eluyó con agua estéril libre de RNasas y DNasas.

#### **4.2.15.3. Purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de poliacrilamida.**

Tras la electroforesis, las moléculas de interés se localizaron en el gel por “*UV shadowing*”. Para ello el gel se colocó sobre una placa de sílica-gel 60 F254 y fue irradiado con epiluminiscencia UV a 254 nm. El fundamento de esta técnica consiste en que la luz ultravioleta excita al fluorocromo de la placa que emite energía en forma de fluorescencia. La región del gel en la que se encuentran las moléculas de ácido nucleico absorbe parcialmente la luz ultravioleta. Entonces, el apantallamiento por parte de los ácidos nucleicos hace que la placa no emita fluorescencia en esa zona y se vea sombreada.

En el caso de purificación de ácidos nucleicos marcados radiactivamente, éstos se localizaron en el gel mediante exposición en película autorradiográfica durante unos minutos y posterior revelado de la misma. La superposición de la película con el gel permitió identificar la región del gel que contiene los ácidos nucleicos. La zona identificada se escindió y se fragmentó en piezas menores con una cuchilla estéril. Se le añadieron entre 200 y 300 µl de tampón de elución (4.1.6) y se incubó durante toda la noche a 37°C, si se trataba de DNA, o a 4°C si era RNA.

Finalmente se recuperó el ácido nucleico del tampón de elución mediante extracción fenólica y precipitación con etanol y acetato sódico (4.2.15.1).

La mayoría de los oligonucleótidos sintéticos, así como las moléculas de RNA, fueron purificados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes de forma previa a su utilización.

#### **4.2.15.4. Cromatografía por exclusión de tamaños.**

Esta técnica ha sido extensamente utilizada para la eliminación de nucleótidos libres. Primeramente, se prepararon columnas de Sephadex-G25, con un lecho aproximado de 0,9 ml empaquetado por centrifugación a 2000 rpm durante 4 min. La columna se equilibró con 0,1 ml del disolvente de la muestra. A continuación se agregó la muestra, que fue llevada a un volumen final de 0,1 ml y se filtró por centrifugación en idénticas condiciones.

#### **4.2.15.5. Extracción de RNA a partir de células eucariotas con Trizol® Reagent.**

La extracción del RNA a partir de células eucariotas se realizó con el reactivo Trizol® de la casa comercial Invitrogen (California, USA). El reactivo Trizol® es una mejora del método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi, 1987) y consiste en una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Una vez que se homogeneiza la muestra (que puede ser de células en cultivo o de tejidos) con el reactivo Trizol®, se le adiciona cloroformo lo que permite la separación de tres fracciones: una superior que contiene al RNA, una interfase y una fase inferior que contiene al DNA y proteínas.

La extracción de RNA a partir de las células Huh-7 con el reactivo Trizol® se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción de RNA con la finalidad de cuantificar el RNA viral de las células transfectadas con los aptámeros se realizó a partir de un cultivo de células Huh-7 portadoras de los replicones subgenómicos que había sido transfectado 20 hr antes a la extracción (4.2.15.5). Primeramente, se lavaron las células con PBS 1X. Se utilizaron 200 µl de Trizol por pocillo. Para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos se homogenizaron las muestras con pipeta y se incubó 5 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 40 µl de cloroformo, se agitaron las muestras mediante el uso de un vortex durante 15 segundos para permitir que el cloroformo se mezcle completamente y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifugaron las muestras a 12000 xg durante 15 min a 4 °C, lo que permitió la separación de las tres fases. Posteriormente se

transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se eliminó el DNA genómico mediante el tratamiento con 2 U de RQ1 DNasa (4.2.20.1.2). A continuación, el RNA se purificó mediante tres extracciones fenólicas (4.2.15.1) consecutivas, seguidas de purificación por cromatografía de exclusión molecular por tamaño (4.2.15.4.) y posterior precipitación.

#### **4.2.16. Purificación de la proteína NS5B $\Delta$ 21.**

La proteína recombinante NS5B $\Delta$ 21 fue obtenida de un cultivo de bacterias las bacterias *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Rosetta cells (Novagen, Darmstadt, Alemania) portadoras del plásmido pET-NS5B $\Delta$ 21, según el protocolo descrito por Mas *et. al.* (Bellon-Echeverria *et al.*, 2010). Brevemente, las bacterias se inocularon en 30 ml de medio LB/kanamicina y se crecieron durante toda la noche a 37°C. Posteriormente se rejuvenecieron los cultivos bacterianos mediante adición de 1,25 ml de cultivo crecido para cada 500 ml de medio con antibiótico. Se crecieron los cultivos en agitación a 37°C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 1. Una vez alcanzada la DO correspondiente se incubaron los cultivos en hielo y se le añadieron 10 ml de etanol absoluto y 50  $\mu$ l de IPTG 1 M que es el inductor del gen que codifica la proteína. Se incubaron 2 hrs a 4°C y a continuación se indujo la expresión del gen de NS5B $\Delta$ 21 mediante la incubación en agitación a 17°C durante 17-18 hrs. Posteriormente se centrifugaron las bacterias a 5000 xg durante 10 min a 4°C y se lavó con PBS 1x, (60 ml para 4000 ml de cultivo bacteriano). El pellet se resuspendió en 40 ml de tampón de lisis (4.1.6.) y se le agregó media tableta de *mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche, Mannheim, Alemania). Para lisar las células se sonicaron en hielo, 12 ciclos de 10 segundos/10 segundos. A continuación se centrifugó el lisado durante 45 min a 25000 rpm a 4°C y se eliminaron los restos de paredes bacterianas y de células no lisadas mediante el filtrado utilizando una membrana con un poro 0,22  $\mu$ m. El extracto celular se pasó por una columna de níquel "*Ni-NTA agarose affinity column*" (Invitrogen, Camarillo, USA) previamente equilibrada con 30 ml de tampón I (4.1.6) suplementado con 20 mM de imidazol. Se realizaron lavados con 20 ml de tampón II suplementado con 20 mM de imidazol y con 80 ml de tampón de lavado (4.1.6.) suplementado con 50 ml de imidazol. La elución se realizó mediante la adición de 12 ml de tampón II suplementado con 250 ml de imidazol y se tomaron fracciones de 1,5 ml. Todo el proceso de purificación fue seguido mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con azul de coomassie.

## **4.2.17. Cuantificación de ácidos nucleicos.**

### **4.2.17.1. Mediante espectrofotometría.**

Debido a que los anillos aromáticos de las bases nucleotídicas son capaces de absorber la luz a 260 nm, es posible determinar la concentración de los ácidos nucleicos en solución espectrofotométricamente. Como coeficientes de extinción molar se tomaron  $0,020 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el DNA (donde una  $A_{260}$  de 1 equivale a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ ),  $0,025 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el RNA ( $A_{260} = 1$  corresponde a 40  $\mu\text{g/ml}$ ) y  $0,027 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$  para oligonucleótidos de cadena sencilla ( $A_{260} = 1$  corresponde a 37  $\mu\text{g/ml}$ ). La concentración se calculó por determinación de la  $A_{260}$  de la muestra problema.

La absorbancia a 280 nm permite determinar la contaminación de la muestra con proteínas. La relación  $A_{260}/A_{280}$  debe estar comprendida entre 1,8-2,0 para considerar la muestra pura.

### **4.2.17.2. Cuantificación de RNA marcado radiactivamente en solución.**

El cálculo de la concentración de RNA en solución marcado internamente con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  UTP se hizo a partir de la medida de las dpm (desintegraciones por minuto) de la muestra una vez purificada por gel. En primer lugar es necesario determinar la actividad específica de la molécula en función de: i) la cantidad de isótopo utilizado durante síntesis, ii) la cantidad del correspondiente nucleótido frío, iii) y el número de posibles incorporaciones del nucleótido marcado en la molécula (número de uridinas en la secuencia). La actividad específica ( $\mu\text{Ci/molécula}$ ), en combinación con el valor de dpm final de la muestra, permite el cálculo del número de moléculas según la relación  $1 \mu\text{Ci} = 2,2 \times 10^6$  dpm. Las medidas de radiación  $\beta$  se realizaron generalmente sobre 10  $\mu\text{l}$  de la muestra en el contador de radioisótopos "Quick Count" (Bioscan, Washington, USA).

### **4.2.17.3. Cuantificación de RNA radiactivo inmovilizado en soporte sólido.**

Para la cuantificación de ácidos nucleicos inmovilizados en geles de poliacrilamida o en membranas de nitrocelulosa se utilizó el escáner Storm 820, (GE Healthcare, Little Chalfon, Reino Unido). El soporte sólido con la muestra radiactiva se expuso en una pantalla que contiene un elemento susceptible a ser excitado, Europio. El escáner tiene un laser que irradia al Europio y este pasa a un estado excitado inferior, permitiendo la liberación de energía en forma de fluorescencia que puede ser cuantificada por el programa ImageQuant©.

#### **4.2.18. Secuenciación automática de DNA.**

Las reacciones fueron realizadas por el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra". Las muestras fueron preparadas con 1 µg del DNA problema y 6,4 pmol del cebador adecuado en un volumen de 12 µl. El DNA se secuenció mediante un sistema basado en el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), por mediación de una reacción de PCR utilizando el "Big dye kit 3.1" de Applied Biosystems (Wellesley, USA). Este *kit* emplea terminadores de cadena marcados con fluorescencia y la AmplyTaq FS DNA polimerasa. Las reacciones fueron sometidas a electroforesis capilar y analizadas (3130 Geneic Analyzer, Applied Biosystems, Wellesley, USA).

#### **4.2.19. Digestión de ácidos nucleicos.**

##### **4.2.19.1. DNA**

###### **4.2.19.1.1. Enzimas de restricción.**

El DNA fue digerido con enzimas de digestión según las condiciones de reacción especificadas por el fabricante (tampón de reacción y temperatura). Por lo general se utilizaron entre 2-5 U de enzima por cada µg de DNA y el tiempo de incubación fue muy variable (de 1 hr a toda la noche). Las digestiones dobles se realizaron simultáneamente cuando las condiciones de reacción lo permitieron. Se realizaron digestiones control, independientes para comprobar la eficiencia de la reacción de cada enzima por separado. Las digestiones dobles con tampones de reacción incompatibles se realizaron de forma secuencial. Tras la primera digestión el DNA fue purificado mediante extracción fenólica y precipitación con etanol (4.2.15.1.) y posteriormente se realizó la segunda digestión.

La digestión de DNA mediante enzimas de restricción fue visualizada mediante electroforesis de una alícuota de reacción en geles de agarosa teñidos con EtBr.

###### **4.2.19.1.2. RQ1 DNasa.**

La RQ1 DNasa (Promega, Madison, USA) es una DNA endonucleasa libre de ribonucleasas, utilizada para la degradación del DNA molde empleado en las reacciones de transcripción *in vitro*. Una vez finalizada la síntesis de RNA, se añadieron a la mezcla 0,5 U de enzima por cada µg de DNA presente y la reacción se incubó durante 15 min a 37°C.



## **4.2.19.2. RNA.**

### **4.2.19.2.1. RNasa T1.**

La digestión con RNasa T1 se utilizó para determinar la accesibilidad en moléculas de RNA así como para la generación de marcadores de peso molecular.

En la determinación del perfil de accesibilidad de una molécula de RNA, se utilizaron trazas (0,02-0,05 pmol, 300-500 CPM) de RNA marcado radiactivamente en su extremo 5' (4.2.23.1.1) ó 3' (4.2.23.2.) y se utilizaron 0,01 U de RNasa T1 (Ambion, Austin, USA) en tampón de unión (4.1.6.) durante 2 min para los aptámeros o 10 min para el RNA del HCV-CRE<sub>194</sub> a temperatura ambiente. Para evitar la degradación excesiva del RNA sustrato las reacciones se hicieron en presencia de 2,8 µg de tRNA. La reacción finalizó mediante la extracción de la RNasa T1 con un volumen de fenol (4.2.15.1.). El RNA se resuspendió en tampón desnaturante para carga en geles de poliacrilamida (4.1.6) y los productos de degradación se resolvieron en geles desnaturantes de poliacrilamida de alta resolución al 6 ó al 10 %, 7M de urea. Las dimensiones de los geles eran de 0,4 x 450 x 350 mm. La potencia se mantuvo constante a 30 W durante un tiempo que osciló entre 90 min a 5 hr. Los geles se secaron a vacío y se visualizaron en un escáner de fluorescencia (Storm 820, GE Healthcare, Little Chalfon, Reino Unido).

Como marcador de peso molecular se realizaron las reacciones de degradación parcial con la RNasa T1 en condiciones desnaturantes, sobre las moléculas de RNA de longitud y secuencia conocida marcadas radiactivamente con <sup>32</sup>P en el extremo 3' en el caso del HCV-CRE<sub>194</sub> y 5' en el caso de los aptámeros. Ello permite el procesamiento de todos los nucleótidos de guanina independientemente de su conformación. Para ello se incubaron trazas de RNA a degradar en presencia de tampón de corte desnaturante (4.1.6.) y 0,01 U de RNasa T1 durante 3 min a 55°C. Los productos de degradación se resolvieron en geles de poliacrilamida de alta resolución como se detalla en el párrafo anterior.

### **4.2.19.2.2. Degradación con Pb<sup>2+</sup> del RNA.**

La hidrólisis parcial con plomo de una molécula de RNA ocurre en los nucleótidos que se encuentran en simple cadena. De esta forma, mediante el análisis de los productos de corte es posible inferir aspectos de la estructura secundaria de la molécula.

Las reacciones de degradación se realizaron sobre moléculas de RNA marcadas radiactivamente con <sup>32</sup>P en uno de sus extremos. Se utilizaron 0,02-0,05 pmol de RNA con una

actividad específica de 300-500 CPM en presencia de 2,8 µg de tRNA en tampón de unión (4.1.6.) y se trató con una solución de acetato de Pb<sup>2+</sup> 15 mM durante 20 min en el caso del HCV-CRE<sub>194</sub> ó 4 min para los aptámeros a 4°C. Las reacciones se pararon mediante la adición de 100 mM de EDTA y se extrajeron los ácidos nucleicos según el método descrito en 4.2.15.1. Los productos de degradación se resolvieron en geles de poliacrilamida de alta resolución de igual manera que en el apartado 4.2.20.2.1.

#### **4.2.19.2.3. Hidrólisis alcalina de RNA.**

La hidrólisis alcalina del RNA se realizó con una solución de carbonato-bicarbonato sódico 0,1 M, pH 9,5. Se trataron 0,02-0,05 pmol de RNA marcado radiactivamente en su extremo 5' con <sup>32</sup>P con 0,5 µl de la solución de carbonato-bicarbonato y 1,5 µg de tRNA. La mezcla de reacción se incubó durante 90s a 95°C y la reacción se paró por la adición del tampón de carga desnaturalizante (4.1.6.). Los productos de degradación se resolvieron en condiciones de electroforesis de alta resolución de la misma forma que en los apartados anteriores, (4.2.20.2.1. y 4.2.20.2.2.).

#### **4.2.20. Ligación del DNA.**

La ligación del DNA es llevada a cabo mediante la reacción catalizada con la DNA ligasa del bacteriófago T4 que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un extremo 5' fosfato y uno 3' OH. Ésta se llevó a cabo en presencia de 2,5% de polietilen glicol (PEG), 0,1 U/µl de T4 DNA ligasa y tampón de reacción 1X (40 mM Tris-HCl pH 7,8; 10 mM, MgCl<sub>2</sub>; 10 mM, DTT y 5 mM, ATP). Se ha descrito que la reacción de ligación es más eficiente en presencia de ATP, por lo cual se suplementó con 1 mM de ATP. La reacción se incubó toda la noche a 15°C. Para la construcción de plásmidos recombinantes por inclusión de un fragmento de DNA, el vector y el inserto se utilizaron como norma general a una relación de concentraciones de 1:3 (vector:inserto).

Para la reacción de ligación en el vector pGEM®-T Easy, el DNA procedente de una reacción de PCR fue purificado en gel de agarosa (4.2.15.2). La reacción de ligación se realizó según las especificaciones del fabricante. Se incubaron 50 ng de vector con un exceso de DNA y 0,3 U/µl de T4 DNA ligasa, en el tampón de reacción proporcionado por el fabricante (Tris-HCl 30 mM, pH= 7,8; MgCl<sub>2</sub>, 10 mM; DTT, 10 mM; ATP, 1 mM y PEG al 5%). La reacción se incubó durante toda la noche a 4°C.

## **4.2.21. Desfosforilación de ácidos nucleicos.**

### **4.2.21.1. Desfosforilación de DNA.**

Para evitar la religación de plásmidos que serán utilizados como vectores de ligación, se elimina el grupo fosfato del extremo 5'. Ello se realizó mediante la incubación del DNA (5-10 µg) en presencia de 1 U de la fosfatasa alcalina (Promega, Madison, USA) y del tampón 1X distribuido por la casa comercial durante 1 hr a 37°C. A continuación se inactivó la enzima mediante la incubación a 70°C durante 10 min y eliminada mediante extracción con fenol y precipitación (4.2.15.1).

### **4.2.21.2. Desfosforilación de RNA.**

El marcaje radiactivo con  $^{32}\text{P}$  de los RNAs en 5' requiere la eliminación previa del grupo fosfato en el extremo 5'. Para ello, se añaden 3 U de fosfatasa alcalina (Promega, Madison, USA) para 100 pmoles de RNA y se incuba en el tampón comercial, durante 1 hr a 37°C. La reacción se realizó sobre el RNA purificado mediante electroforesis en gel de acrilamida tras la síntesis *in vitro*.

## **4.2.22. Técnicas de marcaje de ácidos nucleicos.**

### **4.2.22.1. Marcaje radiactivo de RNA.**

#### **4.2.22.1.1. Marcaje radiactivo en el extremo 5'.**

El marcaje radiactivo de moléculas de RNA en el extremo 5' se llevó a cabo mediante la fosforilación en el extremo 5' desfosforilado del RNA. Para la reacción de fosforilación se utilizó la enzima T4 polinucleótido quinasa, que cataliza transferencia del grupo fosfato situado en posición  $\gamma$  del ATP a extremos 5'OH del DNA y RNA de cadena sencilla o doble. En este caso se empleó como donador de grupos fosfato el nucleótido marcado radiactivamente [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP, con una actividad específica de 5000 Ci/mmol. Se utilizaron 7 µl de isótopo (70 µCi totales) por reacción para un volumen final de 10 µl, aproximadamente 15 pmoles de RNA previamente desfosforilado para el marcaje. La eliminación del nucleótido no incorporado tras la reacción se realizó mediante electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida y purificación del RNA marcado de tamaño adecuado. Seguidamente se eluyó, fenolizó y precipitó con etanol absoluto. Fue resuspendido en agua estéril.

#### 4.2.22.1.2. Marcaje radiactivo en el extremo 3'.

Para el marcaje en el extremo 3' se utilizó la enzima T4 RNA ligasa (Promega, Madison, USA), que es capaz de catalizar la adición de un nucleósido [5'-<sup>32</sup>P] 3'-5' bifosfato al extremo 3' OH de un RNA simple cadena. Previamente al marcaje se desnaturalizó el RNA mediante incubación durante 2 min a 90°C y posteriormente se enfrió en hielo. Se mezclaron 1 a 2 µg de RNA con 3 µl (30 µCi totales por reacción) y 1 U/µl de T4 RNA ligasa en un volumen final de 10 µl. La reacción se llevó a cabo en presencia de tampón de ligación proporcionado por el fabricante, BSA, 0,01%; PEG, 1%, inhibidor de RNasas, 2 U/µl a 4 °C toda la noche. El RNA obtenido fue purificado por gel de poliacrilamida desnaturalizante a 6%.

#### 4.2.22.1.3. Marcaje radiactivo interno.

Durante la reacción de transcripción *in vitro* (4.2.11.1) se disminuyó la concentración de UTP de 1 a 0,4 mM. Las reacciones fueron suplementadas con 20 µCi de [α-<sup>32</sup>P] UTP.

#### 4.2.22.2. Marcaje interno con biotina de RNA.

El marcaje interno con biotina se realizó durante la transcripción *in vitro* del RNA de forma similar a como se describe en el apartado 4.2.11.1, con la salvedad que se varió la concentración de UTP y se suplementó con una cantidad variable de 16-bio-UTP. La cantidad de 16-bio-UTP depende del número de posiciones disponibles en la molécula y del número de sitios biotinilados que se deseen. En el protocolo descrito por Theissen *et al* (Theissen *et al.*, 1989) es posible conseguir una molécula de RNA biotinilada en una sola posición siguiendo los siguientes cálculos:

$$\text{Bio}_{av} = n [(d/r) - d + 1]^{-1}$$

Donde n es el número de posiciones disponibles para el nucleótido biotinilado (en este caso, número de posiciones con nucleótidos de uridina), d es el grado de discriminación de la enzima T7 RNA polimerasa (estimado entre 3 y 4) y r:

$$r = 16\text{-bio-UTP} / (16\text{-bio-UTP} + \text{UTP})$$

donde 16-bio-UTP y UTP hacen referencia a la concentración de UTP biotinilado y UTP en la reacción respectivamente.

De esta manera se puede calcular la concentración de 16-bio-UTP necesaria en la reacción de transcripción *in vitro* para conseguir moléculas de RNA biotiniladas en una sola posición.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el RNA se purificó por extracción fenólica y cromatografía de exclusión molecular por tamaño. Finalmente se concentró mediante precipitación con etanol. Se resuspendió en agua estéril.

#### **4.2.23. Reacciones de asociación.**

Los ensayos de asociación entre los aptámeros y el HCV-CRE<sub>194</sub> se llevaron a cabo utilizando los aptámeros marcados radiactivamente internamente con <sup>32</sup>P (4.2.23.2). Primeramente se desnaturalizaron y renaturalizaron los RNAs en tampón cacodilato mediante calentamiento 3 min a 95°C y renaturalización 10 min a 37°C. Se inició la reacción al mezclar 5 nM de aptámeros con 120 µM de HCV-CRE<sub>194</sub> en un volumen final de 10 µl incubarlas 30 min a 37°C. La reacción se detuvo con la adición de un volumen de tampón de carga no desnaturalizante para geles de poliacrilamida nativos (4.1.6.). La formación del complejo se apreció como un cambio en la movilidad electroforética de las moléculas en geles de poliacrilamida nativos (4.2.14.1.2.). Los geles se secaron antes de la visualización en un escáner de fluorescencia (Storm 820, GE Healthcare, Little Chalfon, Reino Unido).

Para la determinación de los  $K_d$  se realizaron ensayos de asociación de igual forma a la descrita en el párrafo anterior con la diferencia de que se incubaron 5 pmoles aptámero marcado con concentraciones crecientes de HCV-CRE<sub>194</sub> que iban desde (0 a 1250nM). Los datos obtenidos se ajustaron a curvas exponenciales que permitían calcular las constantes de disociación  $K_d$ , con el programa SigmaPlot 4.0.

Para el mapeo del sitio de unión entre los aptámeros y el fragmento de RNA del HCV que contenía el CRE se realizaron ensayos de asociación previamente a la digestión con RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup>. Por un lado se realizaron ensayos de asociación con el RNA del aptámero marcado en 5' y el RNA HCV-CRE<sub>194</sub> en frío. Por otro lado, las reacciones de asociación se llevaron a cabo utilizando el fragmento de RNA del HCV marcado en 3' y la molécula de aptámero sin marcar, de esta forma se identificaron los nucleótidos del HCV-CRE<sub>194</sub> que participan en la interacción. Primeramente, las moléculas en tampón de unión se desnaturalizaron mediante calentamiento a 95°C, 2 min o a 65°C durante 7 min (para los aptámeros y el RNA del HCV, respectivamente). A continuación, se renaturalizaron los RNAs mediante incubación durante 10 min a 37°C.

Seguidamente, se realizaron los ensayos de asociación mezclando ambas moléculas, 0,05 pmol del RNA (300-500 cpm) marcado radiactivamente en su extremo 5' ó 3' con  $^{32}\text{P}$  y 10 pmol de RNA sustrato y se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente se detuvo la reacción mediante la incubación en hielo y se procedió con la degradación con RNasa T1 o  $\text{Pb}^{2+}$ .

#### **4.2.24. Método de selección molecular *in vitro*.**

Debido a que el método de selección molecular *in vitro* es de especial relevancia en el trabajo que se describe en la presente memoria, se dedicará un capítulo para su descripción a pesar de que algunas técnicas estén referenciadas en este apartado.

##### **4.2.24.1. Obtención de una población de partida.**

La construcción de la población inicial de moléculas utilizadas en el método de selección se realizó a partir de un DNA molde. Este se obtuvo mediante la hibridación de 3 nmol de cada ODN (5'aptamerCRE, 5' GCTATGAA**TTCTAATACGACTCACTATAGGGATATTATAGTACATAA** AN<sub>30</sub>AGGTAGCGAATTAAAGAGTAGTC 3' (en cursiva se señala el sitio de restricción para el corte con la enzima *EcoRI* y subrayado el promotor de la T7 RNA polimerasa) y 3'PCR-CRE, 5' TCGACTACTCTTTAATTCGCTACCT 3'). Previamente se desnaturalizaron las moléculas por calentamiento a 95°C durante 2 min y se renaturalizaron mediante disminución lenta de la temperatura hasta alcanzar la temperatura ambiente. Seguidamente se llevó a cabo una reacción de extensión utilizando 2,5 U de fragmento Klenow (MBI Fermentas, Vilnius, Lituania), con el tampón de reacción suministrado por el fabricante, 0,25 mM de cada dNTPs en un volumen final de 150  $\mu\text{l}$  de agua. La reacción transcurrió a 37 °C durante 1 hr.

Los DNAs obtenidos mediante hibridación y extensión fueron purificados mediante cromatografía de exclusión por tamaño (4.2.15.4), extracción fenólica y precipitación con etanol absoluto (4.2.15.1). Las muestras se secaron mediante centrifugación a vacío y se resuspendieron en agua.

A continuación, se sintetizó por transcripción *in vitro* una población de RNA utilizando el *Kit* de transcripción *in vitro* Ribomax™ (Promega, Madison, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó el DNA copia con el tampón suministrado por el fabricante (80 mM HEPES pH = 7,5, 24 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM de espermidina, 40 mM DTT) los rNTPs a una concentración final de 25  $\mu\text{M}$  cada uno y una mezcla de enzimas suministrada por el fabricante. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 3 hr. Al finalizar la reacción el DNA molde se degradó con la

reacción catalizada por la RQ1 DNasa (4.2.20.1.2.). El RNA resultante se purificó por extracción fenólica (4.2.15.1) y posterior precipitación con EtOH (4.2.15.1). Para la producción del RNA de la población de partida del método de selección molecular *in vitro* se realizaron cuatro reacciones con el *kit* de Ribomax™ a un volumen final de 100 µl.

Antes de la primera ronda de selección 6,4 nmol de las moléculas de RNA ( $3,8 \times 10^{15}$  moléculas) fueron adicionados a la columna de sefarosa-estreptavidina e incubados durante 30 min a 25°C con la finalidad de descartar el RNA que se une inespecíficamente a la columna. El RNA eluído que constituía la población de RNA de partida, fue concentrado con Centricon YM-10 (Millipore, Bedford, USA; 4.2.17.) y posterior precipitación y resuspensión en 1 ml de tampón de unión.

#### **4.2.24.2. Selección de las moléculas que se unen al HCV-CRE<sub>194</sub>.**

Para seleccionar aquellas moléculas capaces de unirse a la molécula sustrato, HCV-CRE<sub>194</sub> se realizaron ensayos de asociación con la molécula de RNA sustrato inmovilizado en una columna de sefarosa-estreptavidina.

El RNA sustrato se inmovilizó utilizando como soporte sólido una columna de sefarosa-estreptavidina (*HiTrap™ Streptavidin HP*, GE Healthcare, Little Chalfon, Reino Unido). La estreptavidina es una proteína que se obtiene de la bacteria *Streptomyces avidinii*, y que es capaz de unirse con alta afinidad a la biotina. La unión estreptavidina-biotina es muy fuerte y estable.

Primeramente la columna fue equilibrada con un tampón que permite el establecimiento de las uniones estreptavidina-biotina (4.1.6.). Para ello se procedió según las instrucciones del fabricante y se aplicaron 10 volúmenes del tampón de unión a un flujo de 1 ml/min. El RNA biotinilado internamente (4.2.23.1.3.) fue desnaturalizado durante 7 min a 65°C y posteriormente renaturalizado a 37°C durante 10 min. A continuación se incorporaron a la columna 22,5 nmol de dicho RNA a un flujo de 0,1-0,5 ml/min. Las moléculas no unidas se eliminaron mediante la adición de 10 volúmenes de tampón de unión (4.1.6) a un flujo de 1 ml/min. Mediante estos pasos de lavado la columna queda equilibrada con el tampón necesario para el paso de selección.

A continuación le adicionaron 4,5 nmoles de la población de partida resuspendidos en 1 ml de tampón de unión y se incubó en presencia del HCV-CRE<sub>194</sub> durante 30 min a una temperatura que varió según la ronda del método de selección (25°C en las tres primeras rondas y 37°C en

los ciclos cuarto a noveno). Las moléculas no unidas se descartaron mediante lavados sucesivos con tampón de unión a temperatura ambiente. Las variantes unidas al sustrato fueron rescatadas por la adición de tampón de unión calentado a 95°C.

El volumen de los ácidos nucleicos obtenidos al final de cada ronda del método de selección molecular *in vitro* fue disminuido utilizando el sistema Microcon® (Millipore, Bedford, USA). La concentración se produce por el paso de la solución mediante centrifugación a través de una membrana de celulosa de tamaño de poro variable, en función de las moléculas a concentrar. En el presente trabajo, se utilizó la variedad YM-10 y se siguieron las instrucciones del fabricante para conseguir reducir el volumen de 4 ml a 100 µl.

Después de reducido el volumen se precipitó el RNA con etanol absoluto y acetato sódico. De la ronda cuarta a la novena además de aumentar la temperatura de incubación se disminuyó la relación entre la molécula sustrato HCV-CRE<sub>194</sub> y el número de moléculas de la población de partida de 5:1 a 1:2 y de la ronda seis a la nueve, se disminuyó la fuerza iónica desde 10 mM de MgCl<sub>2</sub> a 2 mM de MgCl<sub>2</sub>.

#### **4.2.24.3. Amplificación.**

Las moléculas de RNA obtenidas al finalizar el paso de selección fueron amplificadas mediante RT-PCR. La retrotranscripción se realizó utilizando la enzima retrotranscriptasa SuperScript™ II (Invitrogen, Camarillo, USA), mientras que la PCR se llevó a cabo con la *Taq* polimerasa Certamp (Biotools B&M Labs, Madrid, España). Las reacciones se realizaron según las especificaciones de los fabricantes con cambios menores. Brevemente, se incubó el RNA con 10 pmol de cebadores 3'PCR-CRE y 0,5 mM de cada dNTP en un volumen final de 12 µl. Se incubó 5 min a 95°C y se incubó en hielo. A continuación se agregaron 10 µl de una mezcla que contenía el tampón de reacción, DTT a una concentración 20 mM y 40 U de anti RNasa. Se incubó a 55°C durante 2 min. Se agregaron 1µl de SuperScript II (200 U) y se incubó durante 50 min a 55°C. La enzima se inactivó mediante la incubación durante 15 min a 70°C. Se reservaron 10 µl y los otros 10 µl restantes se utilizaron para la amplificación por PCR.

La PCR se realizó con el *kit* de Certamp (MBI Fermentas, Vinus, Lituania) para amplificaciones complejas que es especial para fragmentos ricos en GC o con estructuras secundarias difíciles de amplificar. Este *kit* utiliza una mezcla de enzimas con actividad 3'-5' correctora de pruebas y polimerasas convencionales sin esta actividad. La reacción se realizó según las especificaciones



del fabricante escaladas a 100 µl final de reacción. El DNA resultante se dividió en tres partes una para la síntesis de RNA, otra para el clonado en pGEM®-T easy para el posterior análisis de secuencias y otras se reservó. La construcción de las poblaciones (P1-P8) de RNA que entrarán en una nueva ronda de selección se sintetizaron utilizando el *kit* de Ribomax. El DNA copia se incubó con el tampón suministrado por el fabricante (80 mM HEPES pH = 7,5, 24 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de espermidina, 40 mM DTT), los rNTPs a una concentración final de 25 µM cada uno y una mezcla que contiene las enzimas T7 RNA polimerasa y la pirofosfatasa, por el fabricante. Las reacciones se desarrollaron a 37°C durante 3 hr. Al finalizar la reacción el DNA molde se degradó con la reacción catalizada por la RQ1 DNasa (4.2.20.1.2.). El RNA resultante se purificó por extracción fenólica (4.2.15.1) y posterior precipitación con EtOH (4.2.15.1).

#### **4.2.25. Ensayos de competición de la unión de la proteína NS5BΔ21 al extremo 3' del HCV.**

Los ensayos de competición de la unión de la RNA polimerasa NS5BΔ21 al extremo 3' del HCV se realizaron utilizando el fragmento de RNA, 3'HCV-9181 marcado internamente con <sup>32</sup>P (4.2.23.1.3.). Previamente a la realización de los ensayos se desnaturizó el RNA por calentamiento a 95°C durante 1 min y enfriamiento hasta los 4°C. Se mezclaron 0,013 fmol del RNA 3'HCV-9181 con 5 nM de la proteína recombinante NS5BΔ21 en tampón de unión para la NS5BΔ21 (4.1.6.) y en ausencia o presencia de aptámeros a una concentración de 2500 nM. Como control se utilizó el RNA<sub>80</sub> (2.1.7.). Las reacciones se desarrollaron durante 30 min a 37°C y a continuación se incubaron durante 5 min en hielo. Las mezclas se diluyeron en 100 µl del tampón de unión.

Las curvas de competición de los aptámeros se realizaron incubando la proteína y el RNA del HCV en presencia de concentraciones crecientes de 15-2500 nM de aptámeros o del RNA no relacionado de 80 nucleótidos.

#### **4.2.26. Inmovilización de los complejos ribonucleoproteicos en un soporte sólido (Dot-Blot).**

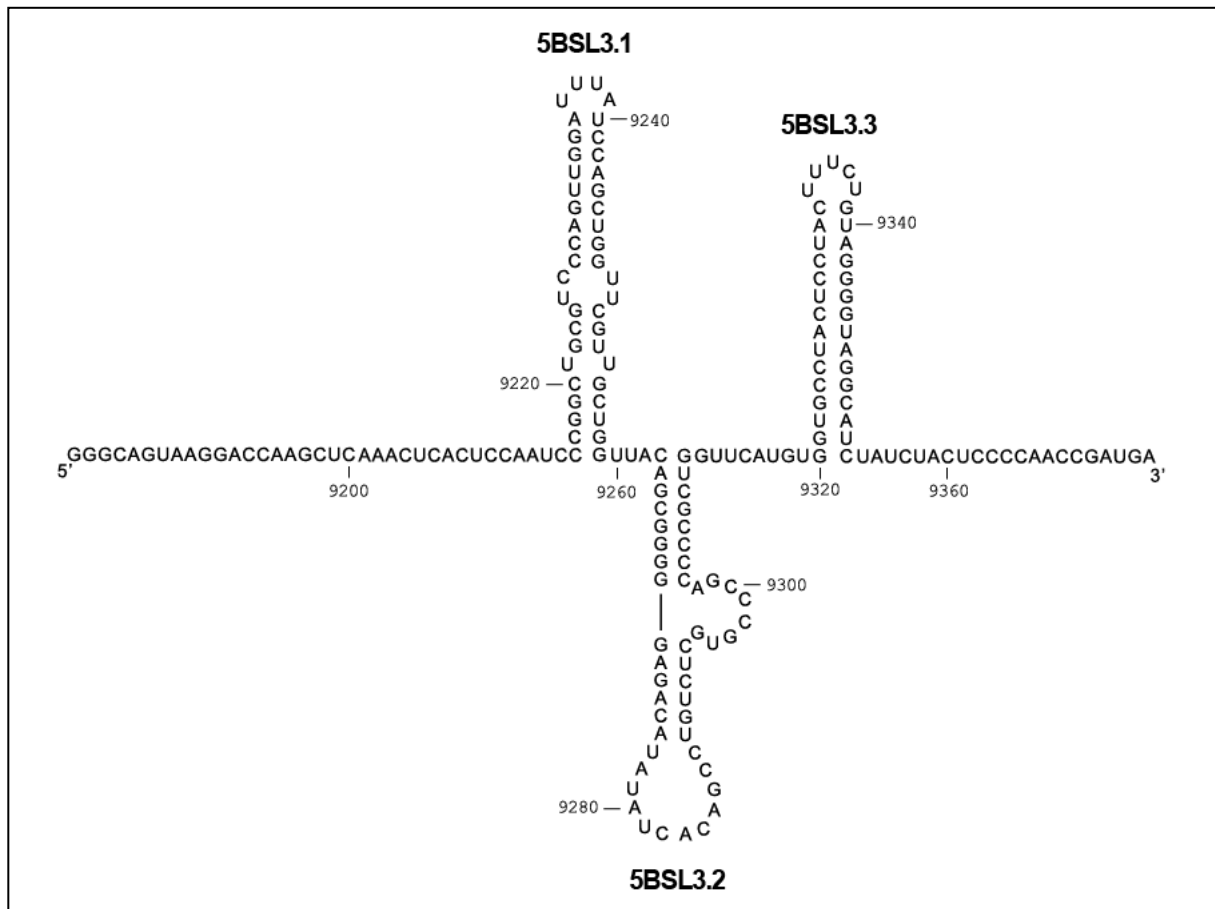
La técnica de Dot-Blot es utilizada para detectar proteínas. En el presente trabajo se utilizó para detectar los complejos ribonucleoproteicos formados al incubar el RNA 3'HCV-9181 unido a la proteína NS5BΔ21. Se empleó una membrana de nitrocelulosa de (GE Healthcare, Little Chalfon, Reino Unido) con un tamaño del poro de 0,45 µm, previamente humedecida con el

mismo tampón que las reacciones de unión. Se monta el dispositivo de Dot-Blot y se aplican las reacciones de competición de la unión de la NS5BΔ21 a 3'HCV-9181 directamente como una gota sobre la membrana. Seguidamente, se aplica vacío. A continuación se lavan las membranas dos veces con tampón de unión durante 2 min. Mediante este procedimiento, los complejos ribonucleoproteicos quedan retenidos en la membrana, y los ácidos nucleicos que no están unidos a ellas son descartados con los lavados. Se secan las membranas y se cuantifica la cantidad de RNA marcado que queda unido al filtro (4.2.18.3.) y el programa ImageQuant© (Molecular Dynamics, Uppsala, Suecia). Los valores de IC<sub>50</sub> fueron calculados con el programa SigmaPlot 8,02© utilizando la ecuación  $y = y_{\max} / (1 + 10^{(\text{Log}IC_{50} - X)})$ , donde  $y_{\max}$  es el porcentaje máximo de RNA 3'HCV-9181 unido a la proteína, IC<sub>50</sub> la concentración del aptámero que produce el 50% de la competición máxima y X es la concentración de aptámero.

## 5. Resultados

### 5.1. Selección molecular *in vitro*.

Con el objetivo de identificar moléculas de RNA que se unan específicamente y puedan afectar a la actividad del elemento de activación de la replicación CRE del HCV (Lee *et al.*, 2004), hemos realizado un método de selección molecular *in vitro*. Las estrategias de selección *in vitro* pueden utilizarse para seleccionar ácidos nucleicos con una gran variedad de propiedades. Una de las aplicaciones de los métodos de selección molecular *in vitro* es la identificación de moléculas que se unen específicamente a una molécula blanco. A estas moléculas se les llama aptámeros y al método de selección se le denomina SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) (Tuerk y Gold, 1990). El reconocimiento de la molécula diana por parte de los aptámeros es posible gracias a la estructura tridimensional del aptámero así como de su secuencia. En el presente trabajo se utilizó como molécula diana en el método de selección, un fragmento de RNA de 194 nucleótidos que corresponde a la región que mapea desde los nucleótidos 9181 al 9371 en el genotipo 1b del HCV (Lohmann *et al.*, 1999) y que incluye al dominio genómico CRE. El dominio CRE se localiza en el extremo 3' de la región codificante para la RNA polimerasa del HCV y posee una estructura bien definida de tres tallos lazos que se llaman 5BSL3.1, 5BSL3.2 y 5BSL3.3 (figura R.1). En el transcurso de esta memoria nos referiremos al RNA diana como HCV-CRE<sub>194</sub>.



**Figura R.1. Secuencia y estructura secundaria del HCV-CRE<sub>194</sub>.** Se señalan los subdominios genómicos 5BSL3.1, 5BSL3.2 y 5BSL3.3. Las coordenadas corresponden a las posiciones de los nucleótidos en el genoma del aislado Con1 del genotipo 1b del HCV (Lohmann *et al.*, 1999).

Para el desarrollo del método de selección se diseñó una población de moléculas de RNA con un tamaño de 75 nucleótidos, que posee una región central de 30 nucleótidos mutagenizados al azar, flanqueada por dos regiones de secuencia fijas necesarias para los pasos de amplificación llamadas PBS (siglas obtenidas del inglés, que significan sitios de unión de oligonucleótidos). Debido al tamaño de la región central, para que todas las moléculas estén representadas, la población tenía un tamaño teórico de  $1,15 \times 10^{18}$  variantes de secuencia. Sin embargo, las condiciones experimentales limitaron la heterogeneidad a un máximo de  $10^{15}$  variantes. Para la obtención de la población de partida, tal y como se describe en materiales y métodos (4.2.24.1) primeramente se sintetizó una población de DNA doble cadena (dsDNA) mediante la hibridación y extensión de los oligonucleótidos sintetizados químicamente 5'aptamerCRE y 3'PCR-CRE (ver tabla R.1). El oligonucleótido 5'aptamerCRE contiene la secuencia del promotor de la RNA

polimerasa del bacteriófago T7 (a la que se referirá como T7 RNA polimerasa) y la región de secuencia variable de 30 residuos mutagenizados al azar. Dicha región se obtuvo a partir del empleo de una mezcla equimolar de los cuatro nucleótidos básicos (A, C, G, T).

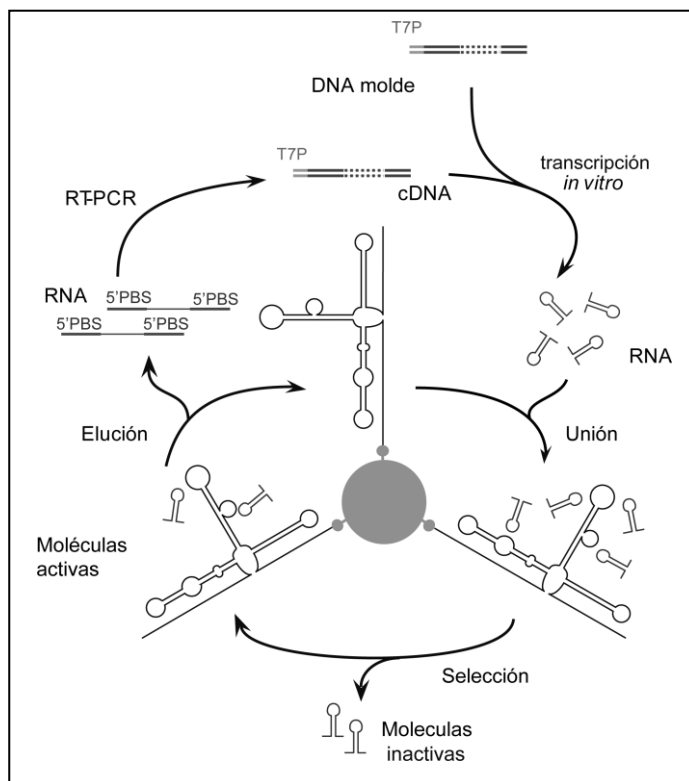
Nombre	Secuencia del oligonucleótido*
5'aptamerCRE	GCTATGAATTC <b>TAATACGACTCACTATA</b> GGGATATTATAGTACATAAAN <sub>30</sub> AGGTAGCGAATTAAGAGTAGTC
3' PCR-CRE	TCGACTACTCTTTAATTCGCTACCT
5' PCR-CRE	GCTATGAATTC <b>TAATACGACTCACTATA</b> GGGATATTATAGTACATAAA

**Tabla R.1: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el método de selección molecular.** \*Subrayado se señalan los sitios de restricción para *EcoRI* y *Sall*. En negrita y cursiva la secuencia del promotor de la T7 RNA polimerasa, en gris la secuencia de los PBS a ambos lados de la región central de 30 nucleótidos mutagenizados al azar (N<sub>30</sub>).

Posteriormente, el dsDNA fue sometido a un proceso de amplificación por PCR de siete ciclos con los oligonucleótidos 3'PCR-CRE y 5'PCR-CRE (Tabla R. 1.). Los productos resultantes se utilizaron como molde para una transcripción *in vitro* mediante la cual se obtuvo una población de RNA. El RNA obtenido se adicionó a una columna de sefarosa-estreptavidina y se incubó durante 30 min, el RNA no unido constituye la población de partida P0 con la que se inició el método de selección molecular *in vitro*. Este paso se realizó para descartar las moléculas de RNA capaces de unirse a la columna de sefarosa-estreptavidina.

El RNA sustrato, HCV-CRE<sub>194</sub>, fue sintetizado mediante transcripción *in vitro* en presencia de biotin-16-UTP a una concentración en la mezcla de reacción en la que sólo se incorpora teóricamente una molécula de nucleótido biotinilado por molécula de RNA sintetizado (Theissen *et al.*, 1989). La presencia de un grupo del tamaño y características químicas de la biotina podrían afectar la estructura del HCV-CRE<sub>194</sub>. Debido a ello, es necesaria la incorporación de un solo grupo de biotina por molécula de HCV-CRE<sub>194</sub>. A continuación, se inmovilizó el sustrato, HCV-CRE<sub>194</sub>, a una columna de sefarosa-estreptavidina mediante la unión biotina-estreptavidina (ver materiales y métodos). La presencia de varias biotinas podría hacer que una molécula de HCV-CRE<sub>194</sub> se fijara a la columna de sefarosa-estreptavidina por varios sitios imposibilitando el correcto plegamiento de la molécula diana, HCV-CRE<sub>194</sub>. Una vez fijado el sustrato, se equilibró la columna con tampón de unión (ver materiales y métodos 4.1.6.) y a continuación se adicionó la población P0 (en el mismo tampón). Se dejó transcurrir la reacción de unión durante 30 min a 25 °C y se procedió a lavar la columna con tampón de unión con la finalidad de descartar las moléculas no unidas. Las moléculas que permanecen unidas al HCV-CRE<sub>194</sub> inmovilizado a la columna, fueron eluidas mediante lavados con tampón de unión calentado a 95°C. Posteriormente, se concentraron las moléculas con capacidad de unirse al HCV-CRE<sub>194</sub>, fueron

retrotranscritas a cDNA y amplificadas por PCR. El DNA resultante se utilizó como molde en una transcripción *in vitro* para dar lugar a la población P1 que se sometió a una nueva ronda del método de selección. En total se realizaron nueve ciclos (ver figura R.2). En las últimos ciclos del proceso se aumentó la presión selectiva mediante la disminución de la proporción entre la concentración de la molécula blanco, HCV-CRE<sub>194</sub>, inmovilizada en la columna y la población de RNA, desde 5:1 a 2:1 y aumentando la temperatura de incubación de la molécula blanco con la población desde 25°C a 37°C en la ronda cuatro, cambiando entonces la temperatura de unión y disminuyendo la fuerza iónica desde 10 mM de MgCl<sub>2</sub> a 2 mM de MgCl<sub>2</sub> en las rondas siete a la nueve.



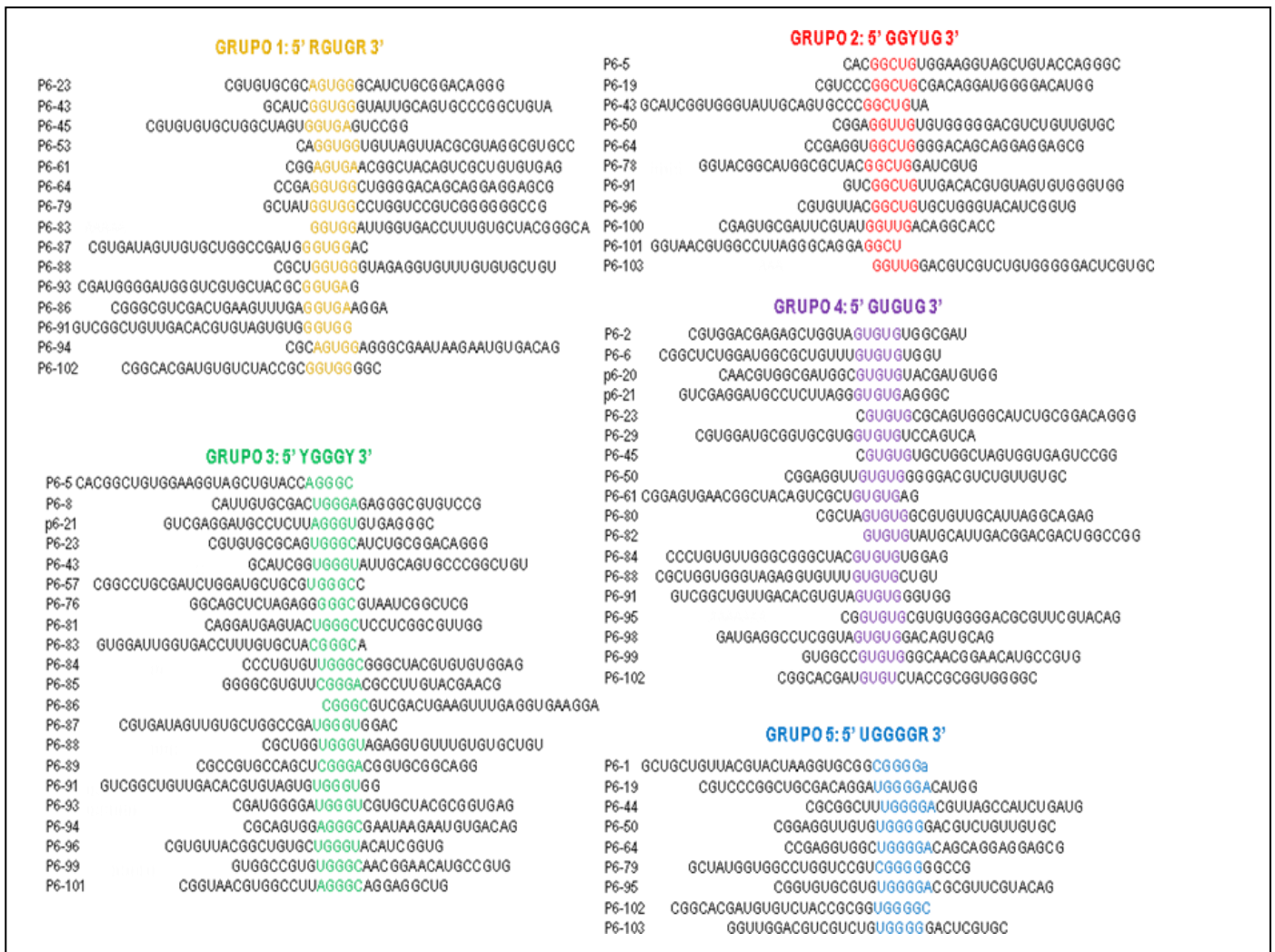
**Figura R.2: Esquema del proceso de selección molecular *in vitro*.** En el DNA molde para la transcripción *in vitro* se representa como una línea discontinua la región aleatoria de 30 nucleótidos, flanqueada por las secuencias constantes que funcionan como lugar de unión de oligonucleótidos que se esquematizan como una línea continua y en gris el promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7, T7P. Mediante la transcripción *in vitro* se sintetiza la población de partida que entra en el paso de selección para la unión con el HCV-CRE<sub>194</sub> (fijado a la columna de sefarosa). Mediante lavados se descartan las moléculas inactivas para la unión y a continuación se eluyen por calentamiento a 95°C las moléculas capaces de unirse al HCV-CRE<sub>194</sub> (moléculas activas). El RNA eluido es retrotranscrito a cDNA para ser amplificado por PCR (RT-PCR). Una vez amplificado se utiliza como molde para la síntesis de una población de RNA que entrará en una nueva ronda de selección.

## **5.1.2 Análisis de los aptámeros seleccionados.**

Para proceder con el análisis de los aptámeros obtenidos en el proceso de selección molecular se clonaron las moléculas de las poblaciones P6 a P9 en el vector pGEM®-T. Posteriormente las cepas DH5α de *Esterichia coli* fueron transformadas con el producto de ligación mediante el método de transformación por choque térmico o electroporación (ver materiales y métodos). A continuación, los DNAs plasmídicos de las colonias fueron extraídos y secuenciados automáticamente para su posterior análisis.

### **5.1.2.1. Análisis de la estructura primaria de los aptámeros de las poblaciones P6-P9.**

Para realizar el análisis de las moléculas obtenidas se clonaron y secuenciaron las moléculas de las rondas P6, P7, P8 y P9 y se analizaron un total de 93 variantes (42, 19, 17 y 15 respectivamente). Por otro lado se clonó y secuenció la población P0 para utilizarla a modo de control. En el análisis de la P0, se observa que la región de la secuencia central de 30 nucleótidos mutagenizados al azar muestra un patrón completamente aleatorio. Sin embargo, el análisis de la población seis permitió la clasificación de las variantes en cinco grupos definidos por un motivo de secuencia común a todos sus componentes, con excepciones puntuales que permiten definir un motivo consenso característico de cada grupo. En algunos de los representantes se pudieron identificar dos o incluso tres motivos consenso. La figura R.3 muestra las distintas variantes de la población P6 clasificadas en grupos según la secuencia seleccionada.



**Figura R.3.: Secuencia de la región central de 30 nucleótidos de los aptámeros de la población P6 seleccionados para unirse al HCV-CRE<sup>194</sup>.** Las secuencias están alineadas según la secuencia del motivo compartido por todas ellas que se muestra en colores. En la parte superior se escribe la secuencia del motivo consenso. Y pirimidina (C o U), R purina (A o G). En minúscula se señalan los nucleótidos que forman parte de la secuencia fija correspondiente al sitio de unión de oligonucleótido.

El análisis de secuencias P7, P8 y P9 no reveló cambios significativos en las conclusiones obtenidas a partir del análisis de P6 (figura R.4). De igual forma que en P6, en las otras poblaciones las secuencias se pueden agrupar en cinco grupos definidos por motivos consenso que contenían la misma secuencia nucleotídica que definía a los motivos consenso identificados en la población 6. Sin embargo, este análisis brindó información adicional que permitió la definición de un consenso extendido en uno o dos nucleótidos para cuatro de los cinco motivos consensos en la población ocho y nueve. De esta forma la secuencia del motivo consenso del grupo 1, 5' RGUGR 3', (donde R significa purina, G o A) evolucionó para dar lugar a la secuencia un nucleótido más extensa 5' RGUGRR 3'. De forma análoga, la secuencia del motivo



consenso del grupo 2, 5' GGYUG 3' (donde Y significa pirimidina, C o U) dio lugar a la secuencia 5' GGYUGUG 3', que es dos nucleótidos más extensa. Así mismo, el motivo consenso del grupo 3, 5' YGGGYR 3' se extendió una purina en posición 3', 5' YGGGYR 3'. El motivo consenso del grupo 4, es más extenso, pasó de ser 5' GUGUG 3' a 5' YGUGUG 3'. Finalmente, en el motivo consenso del grupo 5, 5' UGGGGR 3', no se observaron cambios.

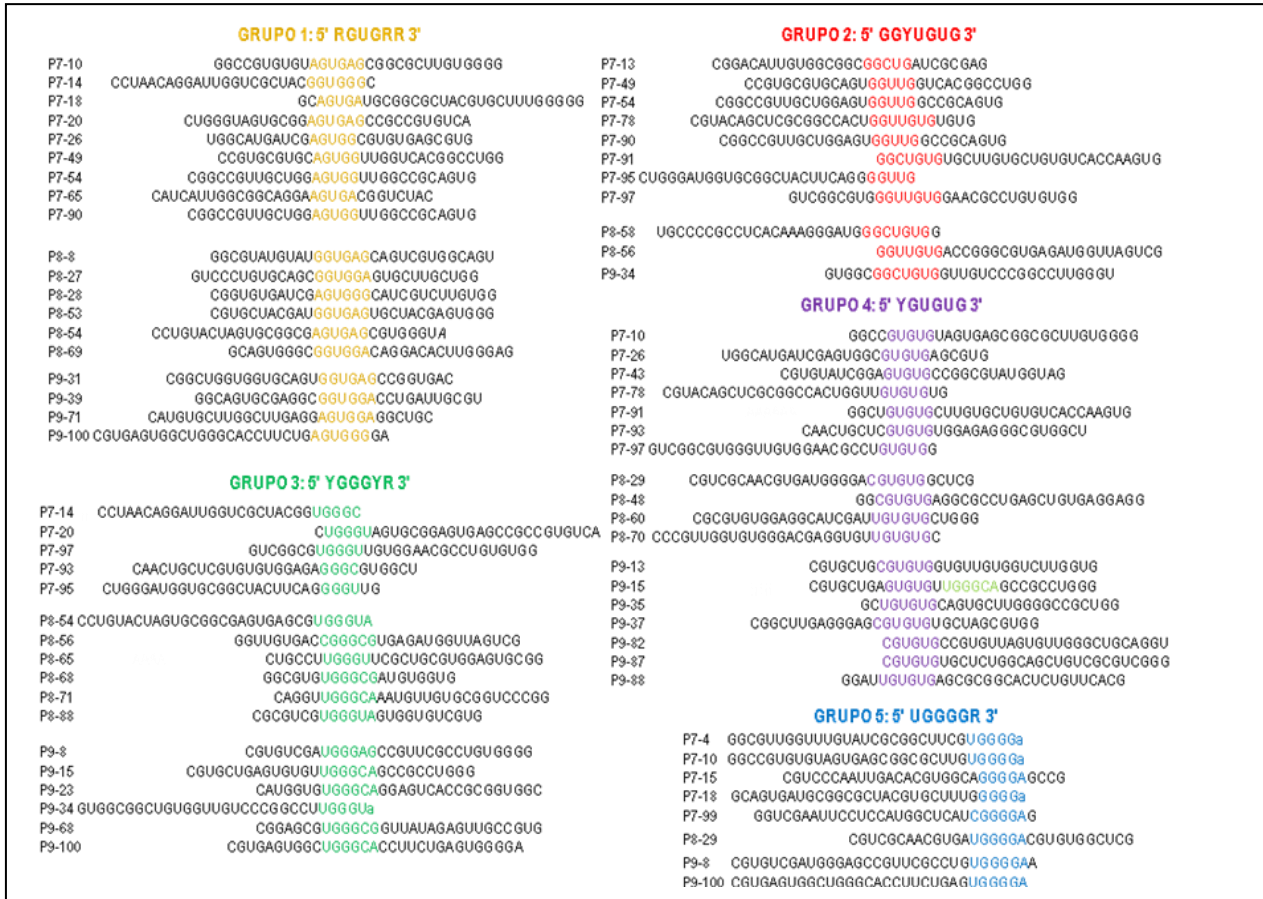
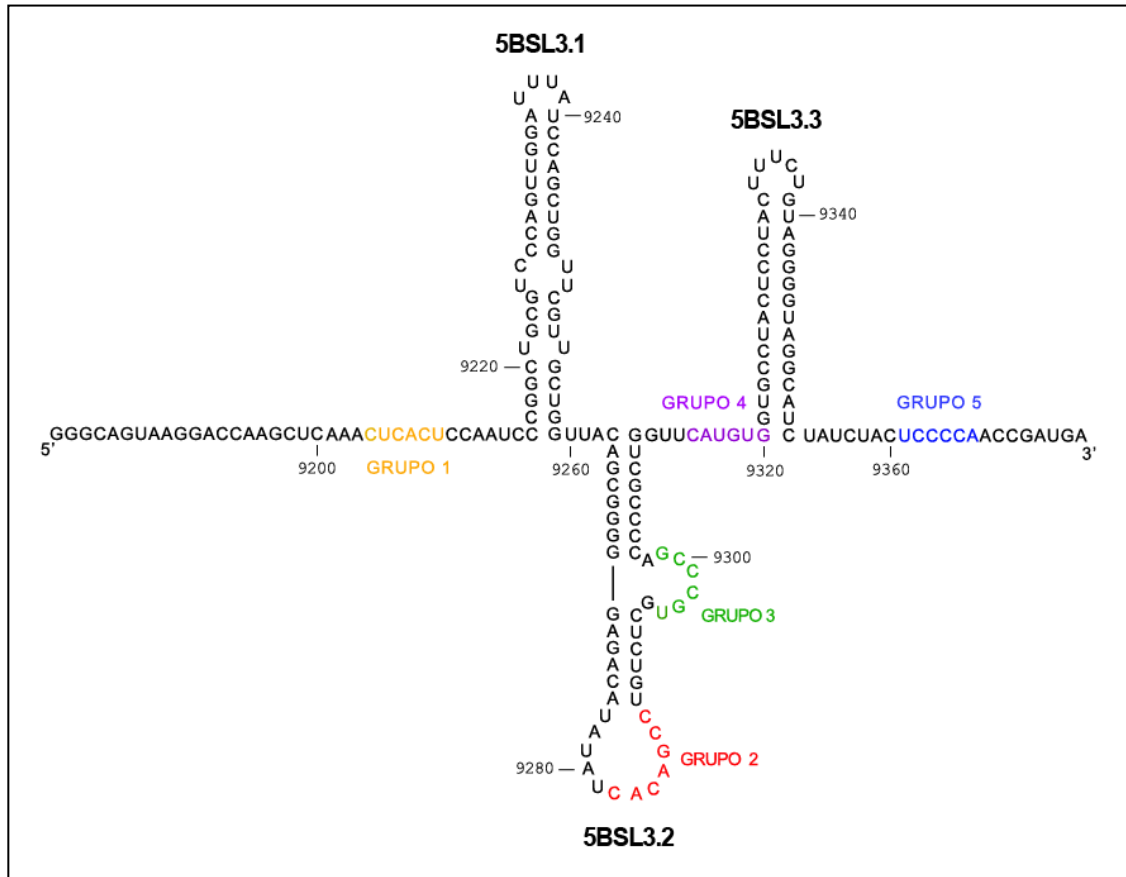


Figura R.4: Región central de 30 nucleótidos de los aptámeros de la población P7 a la P9 seleccionados para unirse al HCV-CRE<sub>194</sub>. Se alinearon las secuencias según el motivo consenso y en la parte superior a cada grupo de secuencia se muestra el motivo consenso observado en las últimas poblaciones. Y pirimidina (C o U), R purina (A o G). En minúscula se señalan los nucleótidos que forman parte del sitio de unión de primer.

### 5.1.2.2. Análisis de las dianas teóricas de unión en el HCV-CRE<sub>194</sub>.

El análisis de complementariedad en el HCV-CRE<sub>194</sub> reveló que cada motivo consenso es complementario a una secuencia en el RNA diana. Estos resultados sugieren que cada motivo seleccionado podría estar implicado en la unión al HCV-CRE<sub>194</sub>, y que el sitio más probable para su unión en el HCV-CRE<sub>194</sub> sea la secuencia complementaria del motivo consenso (ver figura R.5).



**Figura R.5. Secuencias complementarias a los motivos consenso en el HCV-CRE<sub>194</sub>.** En la figura se señalan con un código de colores las secuencias complementarias en el HCV-CRE<sub>194</sub> a los motivos de secuencia seleccionados en la población 6. Debajo de cada secuencia identificada en el HCV-CRE<sub>194</sub> se señala el grupo en el que se clasificaron las variantes de moléculas que compartían el motivo consenso complementario (en amarillo para las variantes del grupo 1, en rojo para las variantes del grupo 2, en verde para las del grupo 3, en violeta para las del grupo 4 y en azul para las del grupo 5).

Las variantes pertenecientes al grupo 1 están definidas por la secuencia consenso 5' RGUGRR 3', poseen una secuencia complementaria en el HCV-CRE<sub>194</sub>, C<sub>9204</sub>UCACU<sub>9209</sub> en la región 5' del tallo lazo 5BSL3.1 que tiene una estructura en simple cadena en el HCV-CRE<sub>194</sub> (Lee *et al.*, 2004).

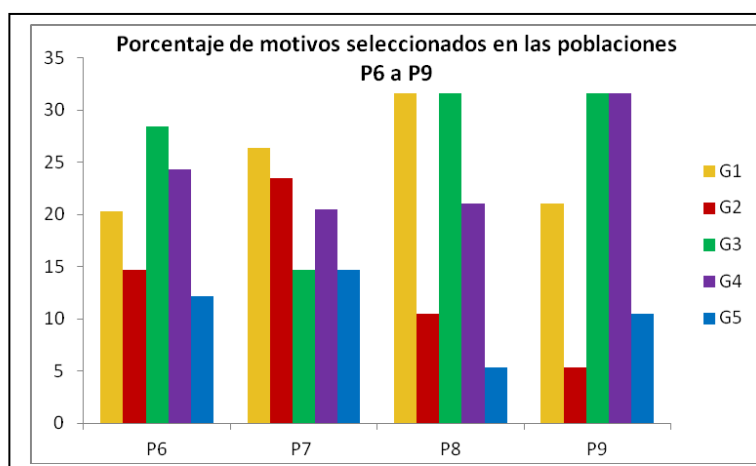
La secuencia complementaria en el HCV-CRE<sub>194</sub> de las variantes pertenecientes al grupo 2, cuyo motivo consenso es 5' GGYUGUG 3' es la secuencia C<sub>9282</sub>ACAGCC<sub>9288</sub> que se localiza en el lazo apical del subdominio 5BSL3.2 (Lee *et al.*, 2004).

Las moléculas pertenecientes al grupo 3, definidas por la secuencia 5' YGGGYR 3', tienen una secuencia complementaria en el HCV que corresponde a los nucleótidos U<sub>9296</sub>GCCCG<sub>9301</sub> y que forman parte del lazo interno del subdominio 5BSL3.2.

El grupo 4 definido por el motivo 5' YGUGUG 3', poseen su región complementaria en el HCV-CRE<sub>194</sub>, C<sub>9314</sub>AUGUG<sub>9319</sub> localizada en la región de simple cadena que une al subdominio 5BSL3.2 con el subdominio 5BSL3.3.

Por último las moléculas pertenecientes al grupo 5 cuyo motivo consenso es 5' UGGGGR 3', tienen su región complementaria, U<sub>9361</sub>CCCCA<sub>9366</sub> en la región 3' del HCV-CRE<sub>194</sub>, próxima al codón de terminación de la síntesis de la proteína NS5B.

El porcentaje de variantes de secuencias que pertenecen a cada motivo consenso fue variando en representatividad en las distintas rondas del proceso de selección molecular (ver figura R.6). En general, los motivos de secuencia que tienen un mayor número de representantes son los de las moléculas del grupo 1, 3 y 4.



**Figura R.6: Porcentaje de motivos consenso en las poblaciones P6 a P9.** En la gráfica se muestra el porcentaje de variantes de moléculas rescatadas que pertenecen a cada grupo en cada población (P6, P7, P8 y P9). Nuevamente se respetó el código de colores para señalar cada grupo de secuencias. Amarillo, grupo 1; rojo, grupo 2, verde, grupo 3; violeta, grupo 4 y azul, grupo 5.

## 5.2. Identificación experimental de las dianas de unión en el HCV-CRE<sub>194</sub>.

Para el análisis de los nucleótidos implicados en la interacción entre el aptámero y el HCV-CRE<sub>194</sub> se eligieron aptámeros pertenecientes a cada grupo (ver tabla R.2.).

Aptámeros elegidos para el análisis de las dianas de unión en el HCV-CRE <sub>194</sub> .			
Grupo	Motivo	Aptámero	Secuencia central de 30 nucleótidos
1	5' RGUGR 3'	P6-61	CGGAGUGAACGGCUACAGUCGUGUGUGA
		P7-54	CGGCCGUUGCUGGAGUGUUGGCCGAGU
2	5' GGYUGY 3'	P7-78	CGUACAGCUCGCGGCCACUGGUUGUGUGU
		P8-58	UGCCCCGCCUCACAAAGGGAUGGGCUGUG
3	5' YGGYR 3'	P7-14	CCUACAGGAUUGGUCGCUACGGUGGGC
		P8-71	CAGGUUGGGCAAUGUUGUGCGGUCCG
4	5' GUGUG 3'	P9-15	CGUGCUGAGUGUGUUGGGCAGCCGCCUGG
5	5' YGGGA 3'	P9-8	CGUGCUGAUGGGAGCCGUUCGCCUGUGGGA

Tabla R.2.: Aptámeros elegidos para el análisis de las dianas de unión en el HCV-CRE<sub>194</sub>. Se muestra el grupo al que pertenecen, el motivo consenso, el nombre del aptámero y la región central de 30 nucleótidos. En código de colores se señalan los motivos consenso.

Primeramente se evaluó si los aptámeros eran capaces de unirse al HCV-CRE<sub>194</sub> para ello se realizaron ensayos cualitativos de asociación entre los aptámeros y el HCV-CRE<sub>194</sub> que se resolvieron en geles de poliacrilamida nativos. Como control de los ensayos de asociación se utilizó el RNA<sub>80</sub>, (Romero-López *et al.*, 2007). Como se observa en la figura R. 7 cuando los aptámeros son incubados con el RNA del HCV-CRE<sub>194</sub>, se forma un complejo con menor movilidad electroforética poniendo de manifiesto la unión de los aptámeros al HCV-CRE<sub>194</sub>.

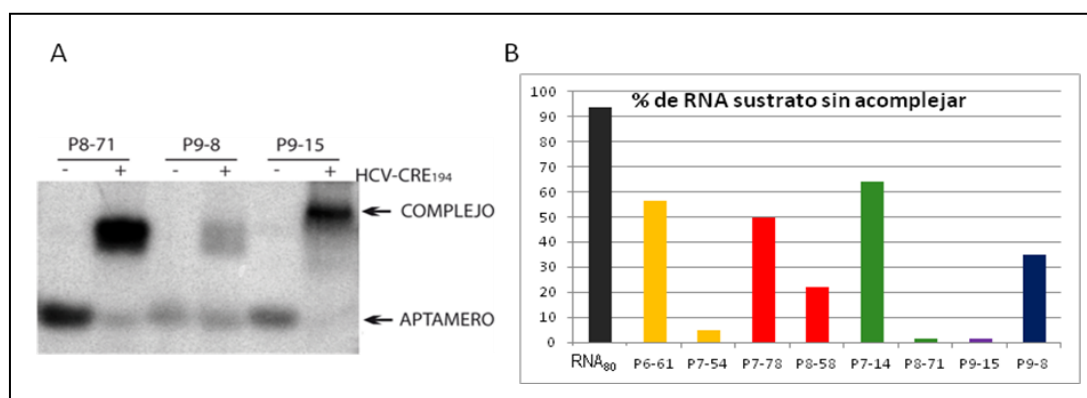
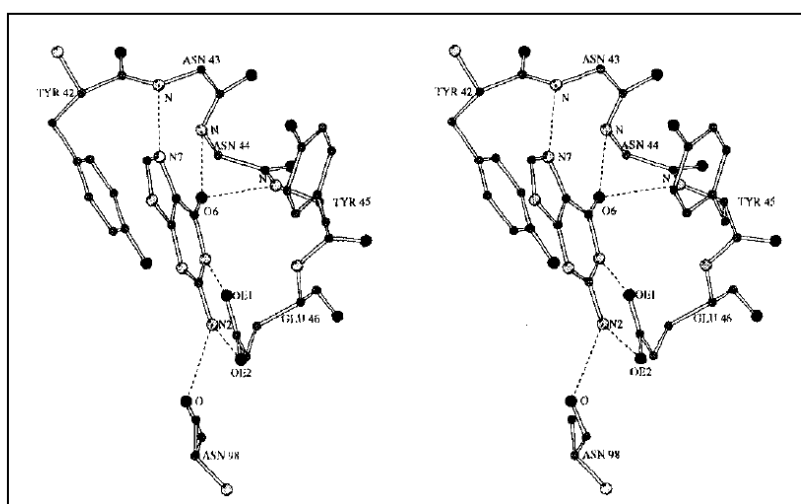


Figura R. 7.: Asociación de los aptámeros al HCV-CRE<sub>194</sub>. A: Autorradiografía de un gel de poliacrilamida en la que se muestra un ensayo representativo de la asociación entre los aptámeros y el HCV-CRE<sub>194</sub>. Como control se utilizó el RNA<sub>80</sub>. B: Representación gráfica del porcentaje de RNA sustrato que no se une al aptámero.

Para estudiar la región de interacción entre el aptámero y el HCV-CRE<sub>194</sub> se realizaron análisis de sensibilidad a la degradación parcial con nucleasas y agentes químicos específicos. Existen varios agentes químicos y biológicos con distintas especificidades. En el estudio que se describe en esta memoria se utilizaron la RNasa T1 y el Pb<sup>2+</sup>. La base de esta técnica radica en el hecho de que la estructura del RNA determina la sensibilidad a la degradación que sufren los nucleótidos que componen la molécula de RNA. De forma que si se conoce la especificidad del agente químico es posible inferir las características estructurales de la molécula.

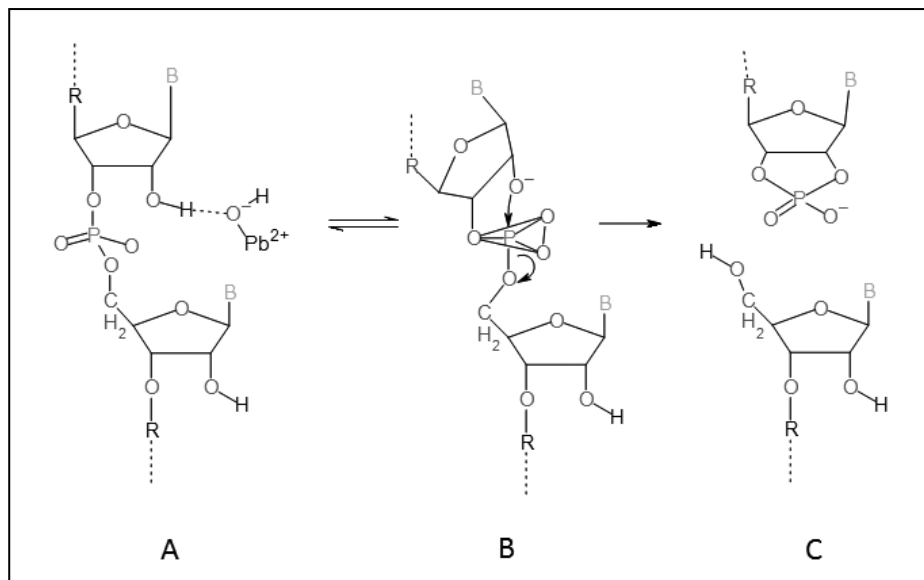
La RNasa T1 es una endorribonucleasa que corta en 3' de las guaninas desapareadas en la molécula de RNA mediante una reacción de transesterificación dejando extremos 5' OH y 3' fosfato. Fue aislada por primera vez a partir del hongo *Aspergillus oryzae*. Actualmente muchas casas comerciales venden RNasas recombinantes obtenidas a partir de cultivos de *E. coli*. El reconocimiento específico de la RNasa T1 por las guaninas en el RNA simple cadena ocurre mediante interacciones que implican los residuos Tyr42, Glu46 y Asn98 de la RNasa (figura R. 8).



**Figura R. 8.: Modelo del sitio de unión a la guanina de la RNasa T1 acompañado con 2' GMP.** En la figura se muestran la base de la guanina, los átomos del esqueleto proteico que se corresponde con los átomos Tyr42, Asn43, Asn44, Tyr45, Glu46 y Asn98 así como las cadenas laterales de la Tyr42, la Tyr45 y la Glu46. Los átomos O, N, C y H se muestran con tamaños decrecientes. Figura tomada de (Steyaert, 1997).

El ión metálico Pb<sup>2+</sup> ha sido extensamente utilizado para el análisis de la estructura del RNA. La hidrólisis del RNA por los iones metálicos generalmente ocurre mediante un mecanismo intramolecular de transesterificación entre el enlace 3', 5' diéster internucleotídico para dejar un extremo 5' OH y un extremo 2', 3' fosfato cíclico. Los enlaces fosfodiéster en el RNA simple

cadena son hidrolizados mucho más rápidamente que en el RNA doble cadena. La eficiencia en el corte de un enlace fosfodiéster en un polinucleótido de RNA está determinado por dos requisitos: 1) la localización propicia del ion metálico hidratado para facilitar la desprotonación del grupo 2' OH de la ribosa (Figura R. 9. A a B) 2) la flexibilidad de la región analizada para permitir la formación de un intermediario del estado de transición de fosforo penta-coordinado y la subsecuente ruptura del enlace fosfodiéster (Figura R. 9. B a C). De esta forma las regiones más flexibles en el RNA son las más propicias a reaccionar (Ciesiolka *et al.*, 1998). Los apilamientos de bases como en el RNA doble cadena o regiones ricas en G causan una rigidez en la cadena que impide la hidrólisis catalizada por metales. De esta forma se observan ejemplos en que en las regiones de RNA simple cadena donde existen varios residuos de guanina consecutivos son menos sensibles a la hidrólisis por  $Pb^{2+}$ .

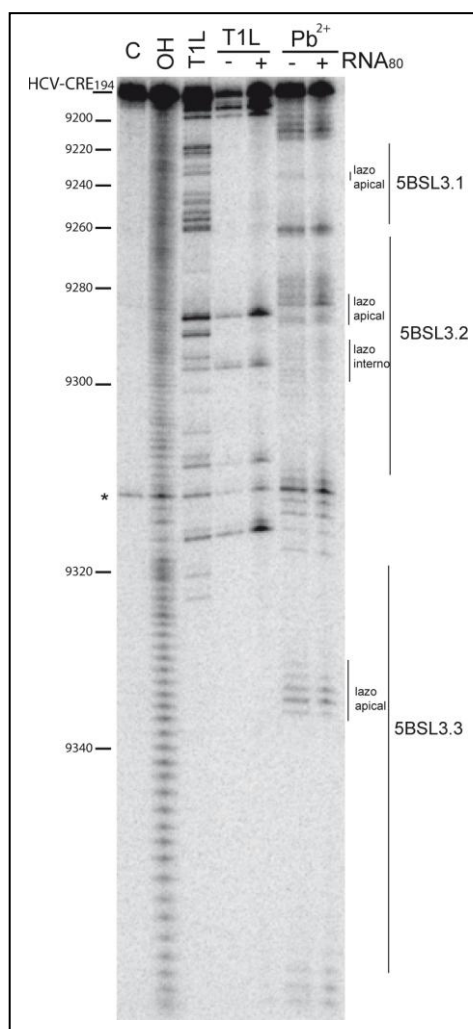


**Figura R. 9: Mecanismo de hidrólisis del RNA inducida por  $Pb^{2+}$ .**

Se realizaron ensayos de protección para identificar los residuos en el HCV-CRE<sub>194</sub> que están implicados en la interacción con el aptámero. Para ello se marcó el HCV-CRE<sub>194</sub> en el extremo 3' con  $^{32}P$ . Ello se llevó a cabo mediante la reacción catalizada por la T4 RNA ligasa. En esta reacción la citidina 3', 5' bifosfato marcada en 5' ( $pC^{32}P$ ) se une al extremo 3' OH del HCV-CRE<sub>194</sub> mediante la formación de un enlace fosfodiéster. Posteriormente se realizaron ensayos de asociación con el HCV-CRE<sub>194</sub> marcado y el aptámero sin marcar (ver materiales y métodos). Los complejos fueron digeridos parcialmente con RNasa T1 y degradados con  $Pb^{2+}$  (ver materiales y métodos, 4.2.20.2). Los productos de reacción se resolvieron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes de alta resolución al 6%, junto con los productos de los ensayos

de protección del HCV-CRE<sub>194</sub> en ausencia de aptámero. A continuación los geles se secaron y se analizaron en un escáner de fluorescencia (Storm 820, GE Healthcare).

Para descartar que las diferencias de accesibilidad observadas entre los ensayos de protección del HCV-CRE<sub>194</sub> en presencia y ausencia de los aptámeros sean debidas a una interacción inespecífica por parte del aptámero con el HCV-CRE<sub>194</sub>, se realizaron ensayos controles de degradación del HCV-CRE<sub>194</sub> en presencia del RNA<sub>80</sub>, que no presenta complementariedad con el HCV-CRE<sub>194</sub>. Como se observa en la figura R. 9, el mapeo del HCV-CRE<sub>194</sub> en presencia del RNA<sub>80</sub> no presenta cambios significativos en el patrón de degradación respecto a los ensayos realizados en ausencia del RNA<sub>80</sub>.



**Figura R. 9.: Ensayo de sensibilidad a la digestión con RNasa T1 y degradación con Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub>.** En la figura se muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6% en la que se aprecia el patrón de digestión con RNasa T1 y degradación con Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub> (marcado en 3' con <sup>32</sup>P) en ausencia (-) y presencia (+) del RNA<sub>80</sub>. El mapeo de los subdominios estructurales del CRE con los principales elementos de estructura se señala a la derecha. Las coordenadas nucleotídicas se señalan a la izquierda. Con un asterisco a la izquierda se señala un sitio lábil a la hidrólisis en la molécula, HCV-CRE<sub>194</sub>. C, HCV-CRE<sub>194</sub> incubado en tampón de unión; OH, hidrólisis alcalina del HCV-CRE<sub>194</sub>; T1L digestión con RNasa T1 del HCV-CRE<sub>194</sub> en condiciones desnaturalizantes.

De forma similar, se procedió con el mapeo de la región de interacción del HCV-CRE<sub>194</sub> en los aptámeros. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de asociación con los aptámeros marcados radiactivamente en el extremo 5'. Los aptámeros fueron incubados en presencia y ausencia del

HCV-CRE<sub>194</sub> y sometidos a degradación parcial con RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup>. Los productos de las reacciones de los ensayos de sensibilidad a la degradación en ausencia y presencia de HCV-CRE<sub>194</sub> se resolvieron, en geles desnaturalizantes de poliacrilamida de alta resolución al 10%. A partir de las diferencias de accesibilidad de los nucleótidos, entre los ensayos de protección en ausencia y presencia de HCV-CRE<sub>194</sub>, es posible determinar los nucleótidos del aptámero que están implicados en la interacción con el HCV-CRE<sub>194</sub>.

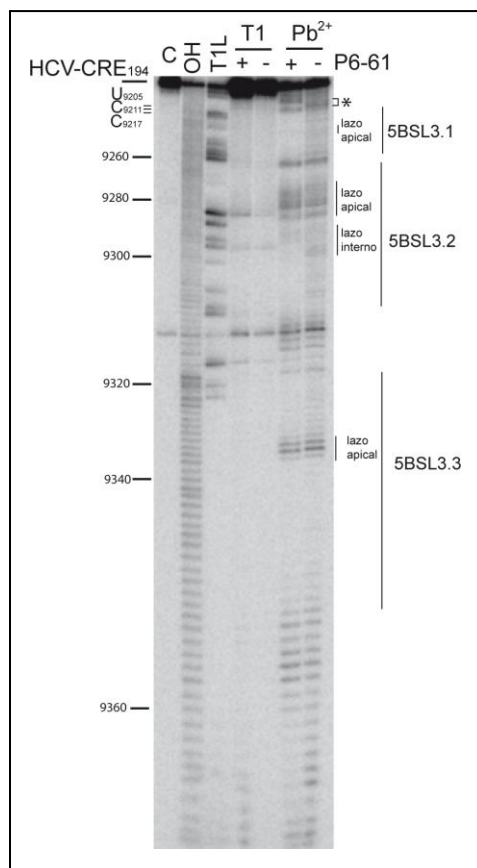
### **5.2.1. Dianas de los aptámeros del grupo 1**

Como representantes del grupo 1 se analizaron los aptámeros: P6-61, que pertenece a la población seis (figura R.11 y R.12), y P7-54, que pertenece a la población siete del método de selección (figura R.13. y R.14). El motivo consenso de los aptámeros del grupo 1, AGUGA, es complementario a la secuencia U<sub>9205</sub>CACU<sub>9209</sub> de la región que se localiza en posición 5' al tallo lazo 5BSL3.1. Por lo que la secuencia U<sub>9205</sub>CACU<sub>9209</sub> es el sitio de interacción teórico con el HCV-CRE<sub>194</sub>. Como se muestra en la figura R. 9., la región 5' al subdominio 5BSL3.1 es altamente accesible a la digestión con RNasa T1 y degradación con Pb<sup>2+</sup>.

#### **Aptámero P6-61**

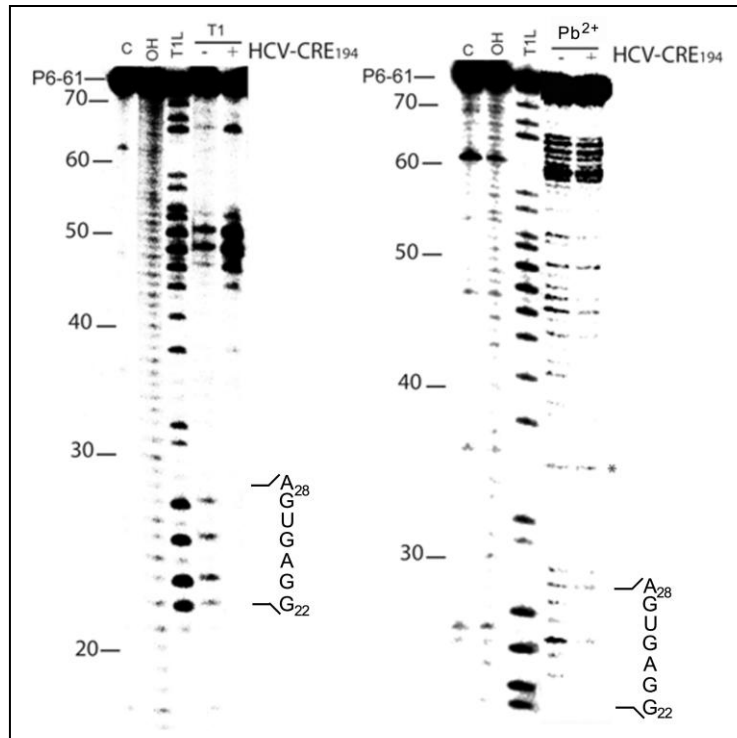
Los resultados del análisis experimental de protección frente a la digestión con RNasa T1 y degradación con Pb<sup>2+</sup> realizado para el HCV-CRE<sub>194</sub> en presencia y ausencia del aptámero P6-61 se muestran en la figura R.11. En el patrón de degradación con Pb<sup>2+</sup>, en presencia del aptámero P6-61, se observa una protección evidente en los nucleótidos U<sub>9205</sub>CACUCC<sub>9211</sub> de la región simple cadena en posición 5' al tallo lazo 5BSL3.1. También se aprecia protección en los nucleótidos C<sub>9298</sub>CC<sub>9300</sub> del lazo interno del subdominio 5BSL3.2 y en general, para toda la molécula, una menor sensibilidad a la degradación. La secuencia U<sub>9205</sub>CACUCC<sub>9211</sub> es complementaria a los nucleótidos G<sub>22</sub>GAGUGA<sub>28</sub> del aptámero, y la protección más acusada observada en esta secuencia, podría explicarse por la unión del aptámero. La menor sensibilidad observada en otras regiones, podría interpretarse como un cambio conformacional, correspondiente a un plegamiento más compacto, producido por la unión del aptámero en el extremo 5' del HCV-CRE<sub>194</sub>.





**Figura R.11: Análisis experimental de sensibilidad a la digestión con RNasa T1 y degradación con  $Pb^{2+}$  del HCV-CRE<sub>194</sub> en ausencia (-) y presencia (+) del aptámero P6-61.** Autorradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6% en la que se muestra el patrón de digestión con RNasa T1 y degradación con  $Pb^{2+}$  del HCV-CRE<sub>194</sub> marcado en 3' en ausencia (-) y presencia (+) del aptámero P6-61. Se señala, a la derecha del gel, los subdominios del CRE (con líneas) y la región correspondiente a los residuos que se protegen en presencia del aptámero (con un corchete y un asterisco). A la izquierda se señalan las coordenadas nucleotídicas y se referencian los nucleótidos de la región que experimenta cambios en presencia del aptámero. C, HCV-CRE<sub>194</sub> incubado en tampón de unión; OH, hidrólisis alcalina de HCV-CRE<sub>194</sub>; T1L digestión con RNasa T1 de HCV-CRE<sub>194</sub>.

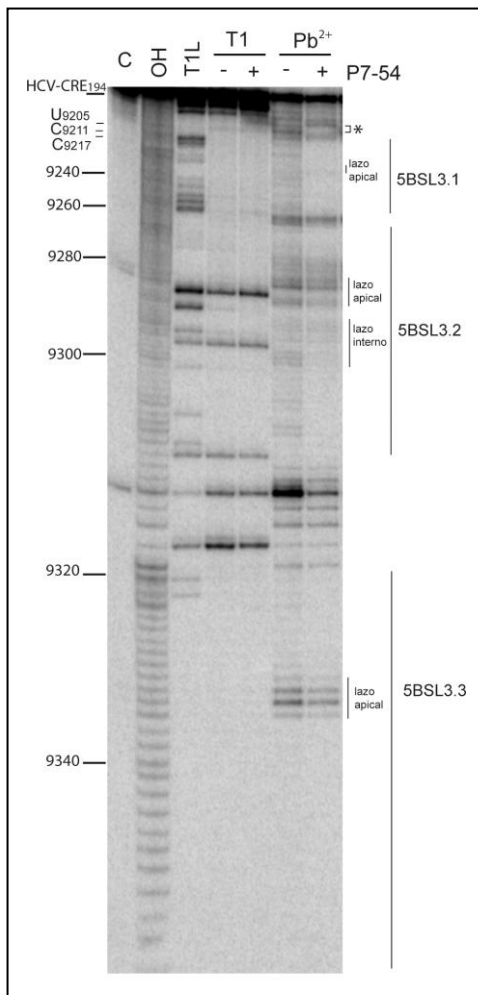
Una vez detectada la posible diana en el HCV-CRE<sub>194</sub>, se realizó el estudio de los nucleótidos del aptámero que pueden estar implicados en la interacción. El análisis experimental de protección frente a la RNasa T1 y el  $Pb^{2+}$  realizado con el aptámero P6-61 en presencia y ausencia del HCV-CRE<sub>194</sub> se muestra en la figura R.12. Los residuos G<sub>22</sub>GAGUGA<sub>28</sub> que en ausencia de HCV-CRE<sub>194</sub> son sensibles a la degradación (T1 -,  $Pb^{2+}$  -), cuando el aptámero es incubado con HCV-CRE<sub>194</sub> (T1 +,  $Pb^{2+}$  +), se protegen. Estos resultados sugieren que la secuencia G<sub>22</sub>GAGUGA<sub>28</sub> participa en la interacción de P6-61 con HCV-CRE<sub>194</sub>. Es de destacar que la secuencia del aptámero G<sub>22</sub>GAGUGA<sub>28</sub>, que se protege en presencia del HCV-CRE<sub>194</sub> incluye al motivo consenso seleccionado, AGUGA. Además, es complementaria a los nucleótidos U<sub>9205</sub>CACUCC<sub>9211</sub> de la región del HCV-CRE<sub>194</sub> que se protege en presencia del aptámero (ver figura R.10). En conjunto estos resultados sugieren que P6-61 interacciona con el HCV-CRE<sub>194</sub> mediante la secuencia G<sub>22</sub>GAGUGA<sub>28</sub>, del aptámero y la secuencia complementaria, U<sub>9205</sub>CACUCC<sub>9211</sub> del HCV-CRE<sub>194</sub>.



**Figura R.12. Ensayo experimental de sensibilidad a la RNasa T1 y  $Pb^{2+}$  del aptámero P6-61.** Autorradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% en el que se resolvieron los productos de las reacciones de protección frente a la RNasa T1 (gel de la izquierda) y  $Pb^{2+}$  (gel de la derecha) del aptámero P6-61 marcado en 5' con  $^{32}P$  en ausencia (-) y presencia (+) de HCV-CRE<sub>194</sub>. A la izquierda del gel se señalan las posiciones de los nucleótidos y a la derecha se referencia la secuencia que se protege cuando el aptámero es incubado con el HCV-CRE<sub>194</sub>. C, P6-61 incubado en tampón de unión; OH, hidrólisis alcalina del P6-61; T1L digestión con RNasa T1 del P6-61 en condiciones desnaturalizantes.

## Aptámero P7-54

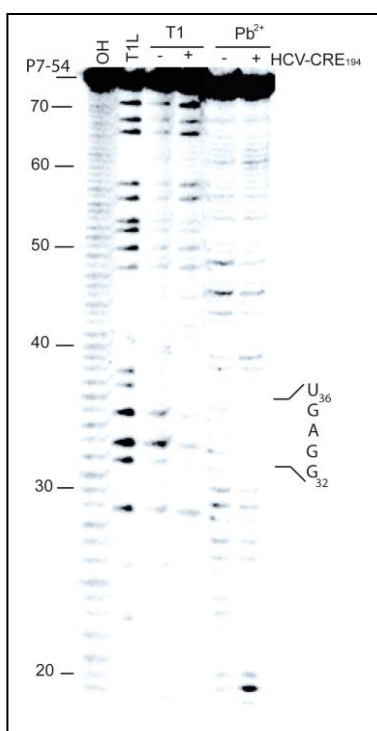
En la figura R.13 se aprecia el análisis experimental de sensibilidad a la digestión con la RNasa T1 y  $Pb^{2+}$  del HCV-CRE<sub>194</sub> en ausencia y presencia del aptámero P7-54. De manera similar a los resultados obtenidos con el aptámero P6-61, que también pertenece al grupo 1, se observa protección en la región U<sub>9205</sub>CACUCCA<sub>9212</sub>. Igualmente, se puede observar una menor exposición en los nucleótidos C<sub>9298</sub>CC<sub>9300</sub> del lazo interno del subdominio 5BSL3.2 y en general una menor sensibilidad a la degradación con  $Pb^{2+}$  en el HCV-CRE<sub>194</sub>. Los nucleótidos U<sub>9205</sub>CACU<sub>9209</sub> son complementarios a la secuencia consenso AGUGG del aptámero, por lo que la menor sensibilidad más evidente en esta región podría explicarse por la unión del aptámero. Sin embargo, los cambios observados en el resto de la molécula se podrían atribuir a un cambio conformacional en el HCV-CRE<sub>194</sub> a causa de la unión del aptámero.



**Figura R.13: Mapeo de los nucleótidos del HCV-CRE<sub>194</sub> que interactúan con el aptámero P7-54.** El HCV-CRE<sub>194</sub> marcado en 3' fue incubado en ausencia (-) y presencia (+) del aptámero P7-54 y posteriormente sometido a digestión con la RNasa T1 y degradación con  $Pb^{2+}$ . Los productos de las reacciones fueron resueltos en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6% que se muestra en la figura. A la derecha del gel se señalan los subdominios estructurales del CRE y con un corchete y un asterisco se señala la región correspondiente a los residuos que se protegen en presencia del aptámero. A la izquierda se señalan las posiciones nucleotídicas y se referencian los nucleótidos de la región que experimenta cambios en presencia del aptámero. C, HCV-CRE<sub>194</sub> incubado en tampón de unión; OH, hidrólisis alcalina de HCV-CRE<sub>194</sub>; T1L digestión con RNasa T1 de HCV-CRE<sub>194</sub> en condiciones

A continuación se realizaron ensayos de sensibilidad a la digestión con la RNasa T1 y degradación con  $Pb^{2+}$  del aptámero P7-54 en presencia y ausencia del HCV-CRE<sub>194</sub> (ver figura

R.14). En la figura R.14, se observa que los residuos  $G_{32}GAGU_{36}$  que en ausencia de HCV-CRE<sub>194</sub> (T1 -, Pb<sup>2+</sup> -) son sensibles a la degradación con RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup>, en presencia del HCV-CRE<sub>194</sub> (T1 +, Pb<sup>2+</sup> +), se protegen. Estos resultados sugieren que la secuencia  $G_{32}GAGU_{36}$  del aptámero podría interaccionar con el HCV-CRE<sub>194</sub>. En concordancia con estos resultados, la secuencia  $G_{32}GAGU_{36}$ , es complementaria a la secuencia  $A_{9207}CUCC_{9211}$  de la región 5' del HCV-CRE<sub>194</sub> que se protege en presencia del aptámero. Estos resultados sugieren que el aptámero P7-54 se une al HCV-CRE<sub>194</sub> mediante una interacción en la que participan los nucleótidos  $G_{32}GAGU_{36}$  del aptámero y  $A_{9207}CUCC_{9211}$  del HCV-CRE<sub>194</sub>.



**Figura R.14. Ensayos de protección frente a la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> del aptámero P7-54.** Se muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida (desnaturalizante al 10%) en la que se resolvieron los productos de las reacciones de protección frente a la RNasa T1 (T1) y Pb<sup>2+</sup> para el aptámero P7-54 (marcado en 5'), en ausencia (-) y presencia (+) de HCV-CRE<sub>194</sub>. A la izquierda del gel se señalan las coordenadas nucleotídicas. A la derecha del gel, se muestra la secuencia que se protege cuando el aptámero es incubado con el HCV-CRE<sub>194</sub>. C, P7-54 incubado en tampón de unión; OH, hidrólisis alcalina del P7-54; T1L digestión con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes del P7-54.

En conclusión, los ensayos de sensibilidad a la digestión con la RNasa T1 y degradación con Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub> para los aptámeros pertenecientes al grupo 1, evidencian una marcada protección en la secuencia  $U_{9205}CACUCCA_{9212}$  localizada en la región 5' de la molécula. Esta secuencia es complementaria a los nucleótidos que se protegen en los aptámeros P6-61 y P7-54, indicando que esa es la diana de unión.

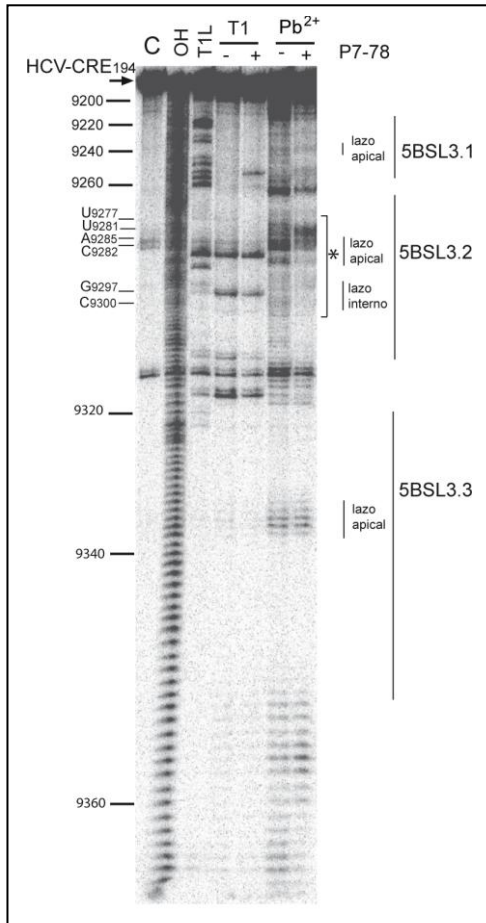
## 5.2.2. Dianas de los aptámeros del grupo 2.

A continuación se muestran los resultados obtenidos del estudio de la identificación de las dianas de unión en el HCV-CRE<sub>194</sub> de los dos aptámeros del grupo 2, P7-78 que pertenece a la séptima

ronda del método de selección molecular (figuras R.15 y R.16) y P8-58 (figuras R.17 y R.18) que pertenece a la octava ronda. Como se dijo anteriormente, los aptámeros de este grupo tienen el motivo consenso 5' GGYUG 3' que es complementario a la secuencia C<sub>9284</sub>AGCC<sub>9288</sub> del lazo apical del subdominio 5BSL3.2. Como se muestra en la figura R.9., el lazo apical es una región accesible a la degradación con la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup>.

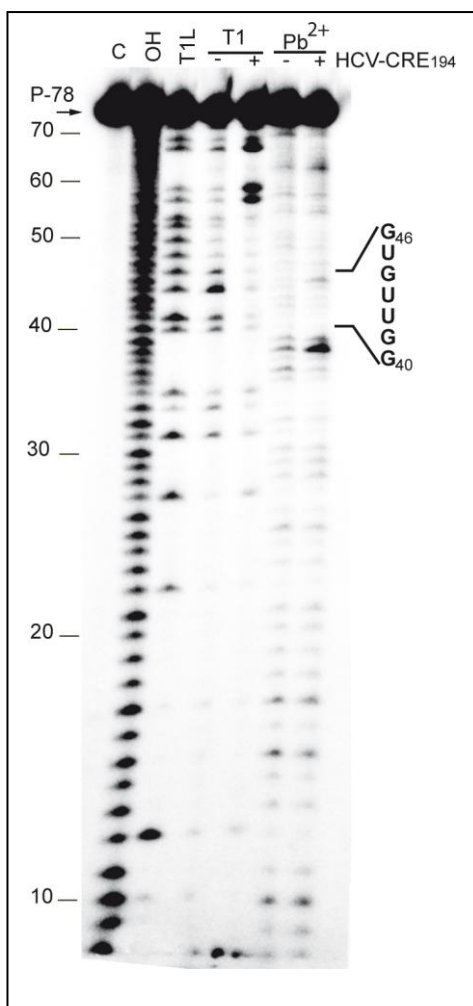
### Aptámero P7-78

Al igual que como se hizo con los aptámeros pertenecientes al grupo 1 se realizaron ensayos de sensibilidad a la degradación con la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub> marcado en 3', en presencia y ausencia del aptámero P7-78 (ver R.15). En los resultados del patrón de degradación con Pb<sup>2+</sup> en presencia de P7-78 se observa que los nucleótidos C<sub>9282</sub>ACA<sub>9285</sub> del lazo apical del subdominio 5BSL3.2 del HCV-CRE<sub>194</sub> presentan una menor sensibilidad a la degradación. Por otra parte, los nucleótidos U<sub>9277</sub> a U<sub>9281</sub> son más sensibles a la degradación con Pb<sup>2+</sup> (Figura R.15). Estos resultados dejan de manifiesto que la interacción del aptámero P7-78 con el HCV-CRE<sub>194</sub> causa una reorganización estructural en la que están implicados los residuos del lazo apical del subdominio 5BSL3.2.



**Figura R.15: Análisis experimental de los nucleótidos del HCV-CRE<sub>194</sub> que interaccionan con P7-78.** Se muestra la autorradiografía de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% en la que se resolvió el patrón de degradación frente a RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub> marcado en 3' incubado en ausencia (-) y presencia (+) del aptámero P7-78. C, HCV-CRE<sub>194</sub> incubado en tampón de unión; OH, hidrólisis alcalina de HCV-CRE<sub>194</sub>; T1L digestión con RNasa T1 de HCV-CRE<sub>194</sub> en condiciones desnaturalizantes. A la derecha del gel se señala: con líneas, los subdominios estructurales del CRE y con un corchete y un asterisco la región correspondiente a los residuos que experimentan cambios en la sensibilidad en presencia del aptámero. Las posiciones nucleotídicas y los nucleótidos de la región que se ve afectada por la presencia de P7-78 se referencian a la izquierda del gel.

Posteriormente se realizaron ensayos de protección frente a la digestión con la RNasa T1 y degradación con  $Pb^{2+}$  para el aptámero P7-78 (marcado en 5') en presencia y ausencia del HCV-CRE<sub>194</sub> (ver figura R.16). En presencia de la molécula HCV-CRE<sub>194</sub> (R.16 T1 + y  $Pb^{2+}$  +) se protegen los residuos G<sub>40</sub>GUUGUG<sub>46</sub>, sugiriendo que el aptámero P7-78 podría estar interactuando con el HCV-CRE<sub>194</sub> mediante esta secuencia. La unión con el RNA sustrato, HCV-CRE<sub>194</sub>, causa un cambio conformacional en P7-78 que causa una mayor sensibilidad en la C<sub>38</sub>. La secuencia protegida, G<sub>40</sub>GUUGUG<sub>46</sub> es complementaria a la secuencia C<sub>2982</sub>ACAGCC<sub>9289</sub> del lazo apical del subdominio 5BSL3.2 sugiriendo que esa es su diana de unión.

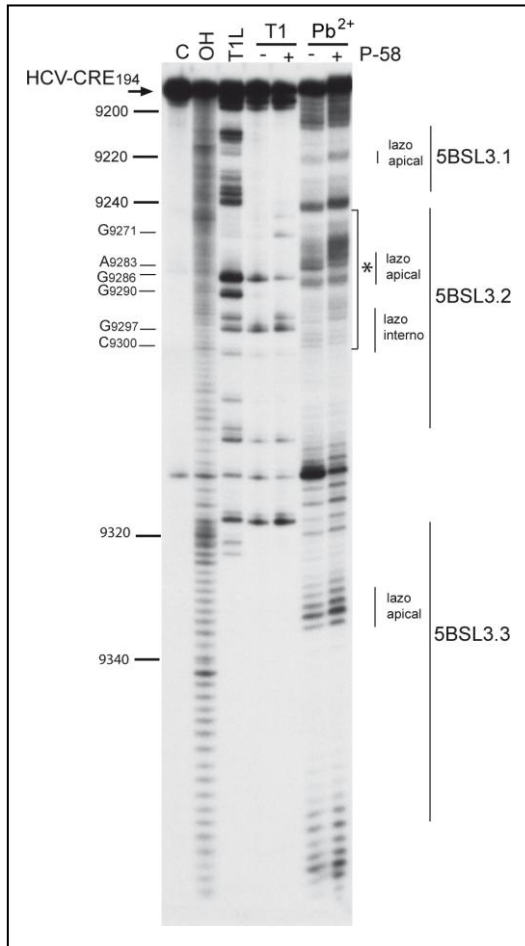


**Figura R.16. Ensayo de protección frente a la RNasa T1 y  $Pb^{2+}$  del aptámero P7-78 marcado en 5' en ausencia (-) y presencia (+) de HCV-CRE<sub>194</sub>.** En la figura se muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% en la que se resolvieron los productos de los ensayos de protección. En el margen izquierdo del gel se señalan las coordenadas nucleotídicas y en el margen derecho, la secuencia que se protege cuando el aptámero es incubado con el HCV-CRE<sub>194</sub>. C, P7-78 incubado en tampón de unión; OH, hidrólisis alcalina del P7-78; T1L digestión con RNasa T1 del P7-78 en condiciones desnaturalizantes.

### Aptámero P8-58

En la figura R.17 se observan los resultados obtenidos de los ensayos de protección frente a la RNasa T1 y  $Pb^{2+}$  para el HCV-CRE<sub>194</sub> en presencia y ausencia del aptámero P8-58. En presencia de P8-58, los nucleótidos C<sub>9282</sub>ACAG<sub>9286</sub> del lazo apical del subdominio 5BSL3.2 se vuelven parcialmente resistentes a la degradación. Mientras que los nucleótidos G<sub>9271</sub>AGACA<sub>9276</sub>

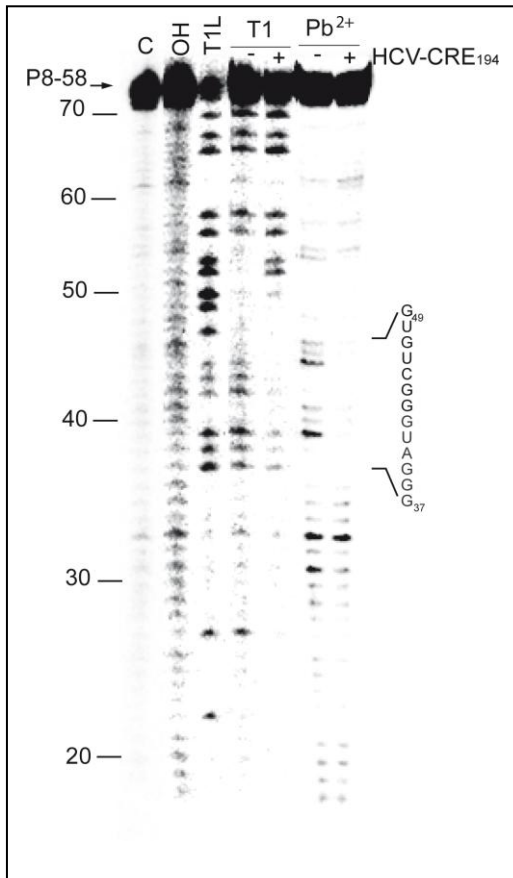
y U<sub>9293</sub>CGUG<sub>9297</sub> muestran una mayor sensibilidad a la degradación con RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> (Figura R.17). Estos resultados sugieren que el aptámero P8-58 se une a la secuencia C<sub>9282</sub>ACAG<sub>9286</sub> del HCV-CRE<sub>194</sub> que es complementaria a parte del motivo consenso del aptámero (C<sub>45</sub>UGUG<sub>49</sub>).



**Figura R.17: Ensayo de sensibilidad a la digestión con RNasa T1 y degradación con Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub> en ausencia (-) y presencia (+) del aptámero P8-58.** Autorradiografía de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6%. En el gel, se observan los productos de las reacciones de protección frente a la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub> marcado en 3' en ausencia (-) y presencia (+) del aptámero P8-58. Se señala a la derecha del gel, con líneas los subdominios del CRE y con un corchete y un asterisco la región correspondiente a los residuos que presentan un cambio de sensibilidad en presencia del aptámero. En el margen izquierdo del gel se señalan las posiciones nucleotídicas y se referencian los nucleótidos que experimentan cambios en presencia de P8-58. C, HCV-CRE<sub>194</sub> incubado en tampón de unión; OH, hidrólisis alcalina de HCV-CRE<sub>194</sub>; T1L digestión con RNasa T1 de HCV-CRE<sub>194</sub>.

A continuación se realizó el estudio de los nucleótidos del aptámero que participan en la unión con el HCV-CRE<sub>194</sub>. De igual forma que en los otros aptámeros estudiados, se realizaron ensayos de protección frente a la RNasa T1 y el Pb<sup>2+</sup> con el aptámero P8-58 en presencia y ausencia del HCV-CRE<sub>194</sub> se muestran en la figura R.18. En presencia de HCV-CRE<sub>194</sub> (Figura R.18, T1 + y Pb<sup>2+</sup> +) se aprecia protección en los residuos G<sub>37</sub>GGAUGGGCUGUG<sub>49</sub>. Estos resultados sugieren que el aptámero P8-58 mediante su motivo consenso (G<sub>43</sub>GCUGUG<sub>49</sub>) se une a la secuencia C<sub>9282</sub>ACAGCC<sub>9288</sub> del HCV-CRE<sub>194</sub> (figura R.17), a pesar de que en las condiciones ensayadas en el HCV-CRE<sub>194</sub> no se observa protección en los nucleótidos C<sub>9287</sub>C<sub>9288</sub>. Posiblemente la interacción se extienda a la secuencia G<sub>39</sub>AUG<sub>42</sub> que se protege en

el aptámero (figura R.18) y que es complementaria a la secuencia U<sub>9289</sub>GUC<sub>9292</sub> del tallo 5BSL3.2. Ello provocaría una desestructuración de la doble hélice del tallo 5BSL3.2, dejando expuesta la secuencia complementaria desde la G<sub>9271</sub> a la U<sub>9281</sub> a la degradación con RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> como se observa en la figura R.17. En conjunto estos resultados sugieren que el aptámero P8-58 se une al HCV-CRE<sub>194</sub> mediante la interacción de la región G<sub>39</sub>AUGGGCUGUG<sub>49</sub> del aptámero con la secuencia C<sub>9282</sub>ACAGCCUGUC<sub>9292</sub> del HCV-CRE<sub>194</sub>



**Figura R.18.: Ensayos de protección frente a la digestión con RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> del aptámero P8-58 marcado en 5' en ausencia (-) y presencia (+) de HCV-CRE<sub>194</sub>.** En la figura se muestra la autorradiografía de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10% en la que se resolvieron los productos de las reacciones de sensibilidad a la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> de P8-58. En el margen izquierdo del gel se señalan las posiciones de los nucleótidos y en el margen derecho, se muestran los residuos que se protegen en presencia de HCV-CRE<sub>194</sub>. C, P8-58 incubado en tampón de unión; OH, hidrólisis alcalina de P8-58; T1L digestión con la RNasa T1 de P8-58 en condiciones desnaturalizantes.

Los ensayos experimentales de las dianas de unión en el HCV-CRE<sub>194</sub> para los aptámeros del grupo 2, P7-78 y P8-58, ponen de manifiesto una reorganización estructural en los nucleótidos expuestos del lazo apical del subdominio 5BSL3.2. En concordancia con estos resultados, el patrón de sensibilidad a la digestión con RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> de los aptámeros, muestra una clara protección en los nucleótidos del motivo consenso. Este motivo es complementario a la secuencia C<sub>2982</sub>ACAGCC<sub>9289</sub> del lazo apical del subdominio 5BSL3.2 indicando que esa es la diana de unión para los aptámeros del grupo 2 en el HCV-CRE<sub>194</sub>.

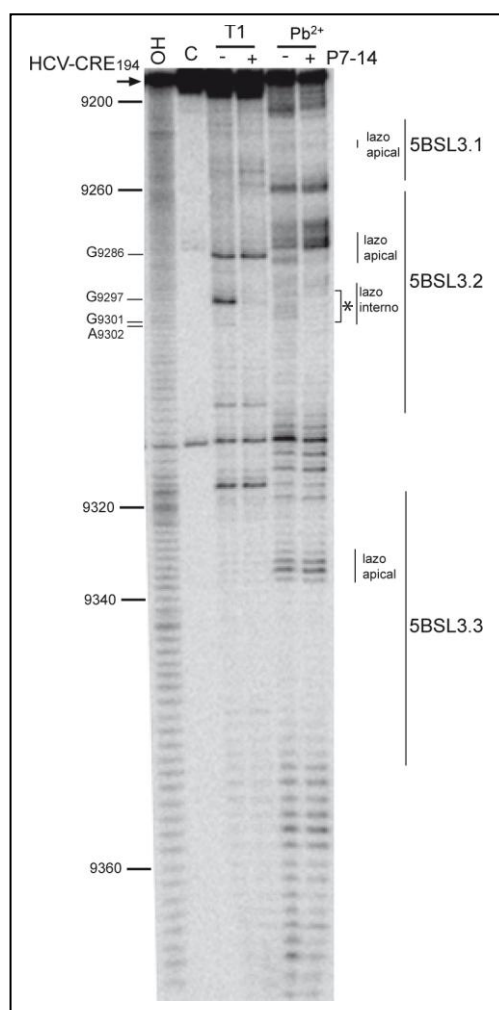


### 5.2.3. Dianas de los aptámeros del grupo 3

Los aptámeros del grupo 3 tienen el motivo consenso 5' YGGGY 3' que es complementario a la secuencia G<sub>9297</sub>CCCG<sub>9301</sub> del lazo interno del subdominio 5BSL3.2. Se eligieron los aptámeros P7-14 (figuras R.19 y R.20) y P8-71 (figuras R.21 y R.22) pertenecientes a las poblaciones siete y ocho respectivamente para la identificación experimental de las dianas de unión en el RNA HCV-CRE<sub>194</sub> de los aptámeros pertenecientes al grupo 3.

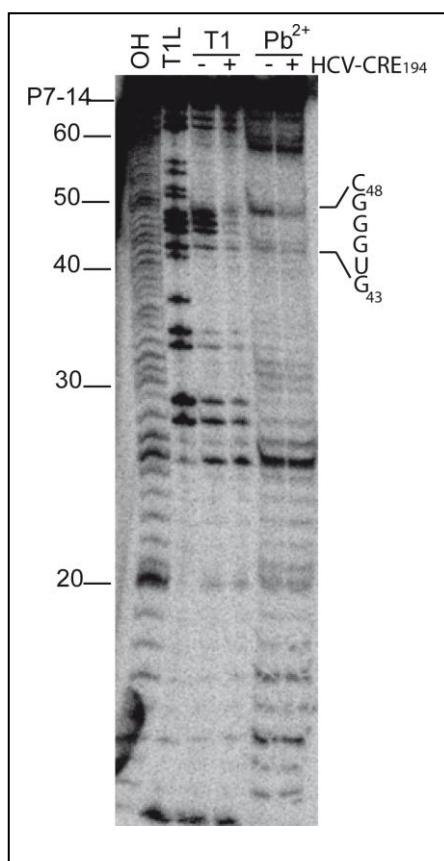
#### Aptámero P7-14

Los resultados obtenidos del ensayo de protección frente a la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub> en presencia y ausencia de P7-14 se muestran en la figura R.19. En presencia del aptámero se observa una menor sensibilidad a la degradación con Pb<sup>2+</sup>, en los residuos U<sub>9296</sub>GCCCG<sub>9301</sub> del lazo interno del subdominio 5BSL3.2. Asimismo, el patrón de digestión con la RNasa T1 muestra una clara protección en la G<sub>9297</sub>. Ello sugiere que la diana de unión para el aptámero P7-14 en el HCV-CRE<sub>194</sub> es la secuencia U<sub>9296</sub>GCCCG<sub>9301</sub> del lazo interno del subdominio 5BSL3.2.



**Figura R.19: Análisis experimental de los nucleótidos del HCV-CRE<sub>194</sub> que interaccionan con P7-14.** Autorradiografía de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% en el que se resolvieron los productos de los ensayos de protección frente a RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub> (marcado en 3') en ausencia (-) y presencia (+) del aptámero. A la derecha del gel con líneas se señalan los subdominios del CRE y con un corchete y un asterisco, la región que se protege en presencia de P7-14. A la izquierda se señalan las coordenadas nucleotídicas y se referencian los nucleótidos de la región que en presencia del aptámero, experimentan cambios en la sensibilidad frente a la RNasa T1 o Pb<sup>2+</sup>. En la parte superior del gel OH, hidrólisis alcalina de HCV-CRE<sub>194</sub>; T1L, digestión con RNasa T1 de HCV-CRE<sub>194</sub> en condiciones desnaturalizantes.

Posteriormente a la identificación de la diana de unión en el HCV-CRE<sub>194</sub> para P7-14 se estudió la secuencia de interacción en el aptámero. Los resultados obtenidos de los ensayos de protección frente a la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> realizados para el aptámero P7-14 se muestran en la figura R.20. En presencia del HCV-CRE<sub>194</sub> (Figura R.20, T1 + y Pb<sup>2+</sup> +) se aprecia protección en los residuos G<sub>43</sub>UGGGC<sub>48</sub>, esta región incluye el motivo consenso UGGGC complementario a la secuencia G<sub>9296</sub>CCCG<sub>9301</sub> del lazo interno del subdominio 5BSL3.2 del HCV-CRE<sub>194</sub>.



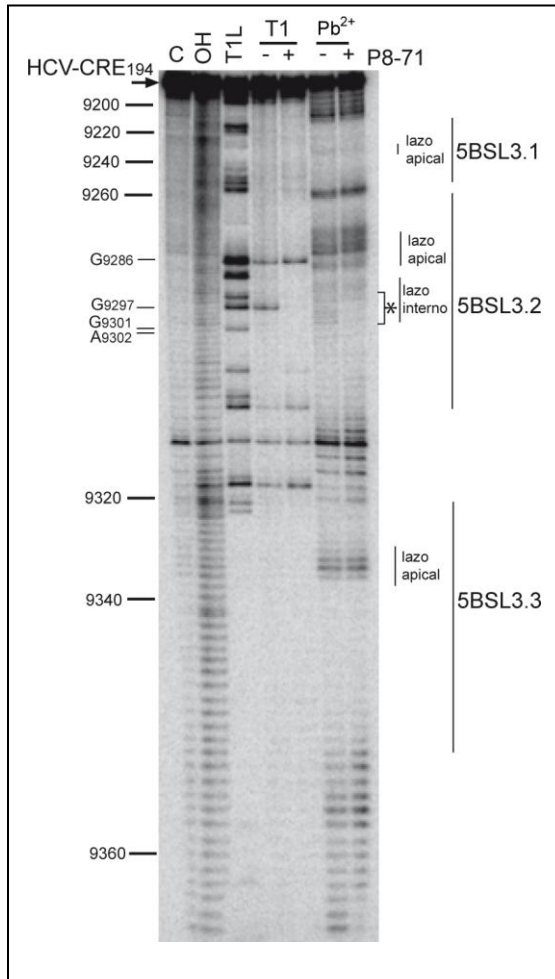
**Figura R.20: Ensayos de sensibilidad a la digestión con RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> del aptámero P7-14.** En la figura se observa la autorradiografía de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10% en el que se resolvió el patrón de degradación del aptámero P7-17 marcado en 5' en ausencia (-) y presencia (+) de HCV-CRE<sub>194</sub>. En el margen derecho del gel se muestra la secuencia que se protege en presencia de HCV-CRE<sub>194</sub>. En el margen izquierdo se señalan las coordenadas nucleotídicas del aptámero. OH, hidrólisis alcalina del P7-14; T1L digestión con RNasa T1 del P7-14 en condiciones desnaturalizantes. Las cruces a la izquierda señalan las bandas fruto de degradación inespecífica.

En conjunto, estos resultados sugieren que P7-14 se une al HCV-CRE<sub>194</sub> mediante los nucleótidos U<sub>44</sub>GGGCA<sub>49</sub>:U<sub>9296</sub>GCCCG<sub>9301</sub>. La protección en la G<sub>43</sub> del aptámero en presencia del HCV-CRE<sub>194</sub> (figura R.20) podría explicarse de dos maneras, por un impedimento estérico a la accesibilidad a la RNasa T1 debido a su proximidad con la región de interacción, o bien mediante una interacción G<sub>43</sub>U<sub>44</sub>GGGCA<sub>49</sub>:U<sub>9296</sub>GCCCGA<sub>9302</sub> donde se formaría el par de bases no canónico G-A entre la G<sub>43</sub> del aptámero y A<sub>9302</sub> del HCV-CRE<sub>194</sub>.

### **Aptámero P8-71**

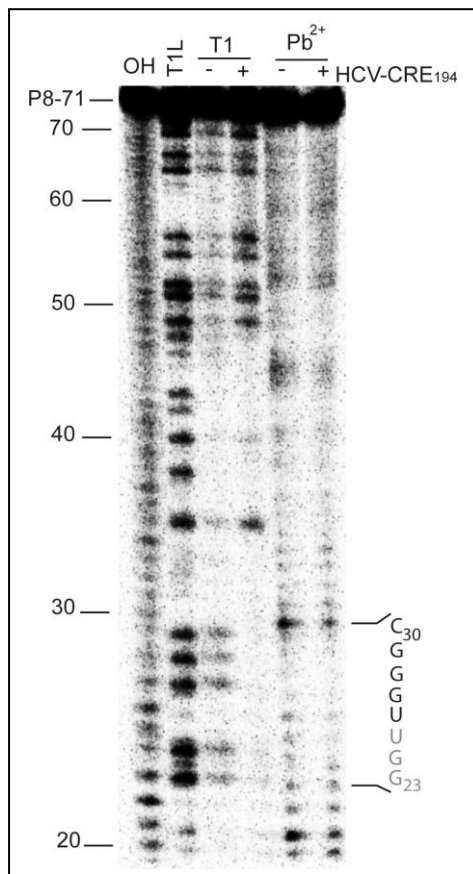
Se realizaron ensayos de sensibilidad a la digestión con la RNasa T1 y degradación con Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub> en presencia y ausencia del aptámero P8-71 (ver figura R.21). En presencia del

aptámero (T1 + y Pb<sup>2+</sup> +) se observa protección en los residuos G<sub>9297</sub>CCCG<sub>9301</sub> del lazo interno del subdominio 5BSL3.2. Este resultado sugiere que la secuencia G<sub>9297</sub>CCCG<sub>9301</sub> es la diana de unión de P8-71 al HCV-CRE<sub>194</sub>.



**Figura R.21: Ensayos de sensibilidad a la digestión con RNasa T1 y degradación con Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub> en presencia o ausencia de P8-71.** Autorradiografía de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% en la que se resolvieron los productos de los ensayos de sensibilidad frente a la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub> marcado en 3' en ausencia (-) y presencia (+) del aptámero P8-71. A la derecha del gel se señala con líneas los subdominios del CRE y con un corchete y un asterisco los residuos que se protegen en presencia de P8-71. A la izquierda del gel se muestran las posiciones de los nucleótidos y se referencian algunos nucleótidos de la región que se protege en presencia del aptámero. C, HCV-CRE<sub>194</sub> incubado en tampón de unión; OH, hidrólisis alcalina de HCV-CRE<sub>194</sub>; T1L digestión con RNasa T1 de HCV-CRE<sub>194</sub>.

A continuación, se realizó el análisis experimental de sensibilidad a la degradación con la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> para el aptámero P8-71 en presencia y ausencia del HCV-CRE<sub>194</sub> (ver figura R.22). En presencia del HCV-CRE<sub>194</sub> se observa que los nucleótidos que forman parte del motivo consenso, U<sub>26</sub>GGGC<sub>30</sub>, se protegen lo que sugiere que el aptámero P8-71 está interaccionando con el HCV-CRE<sub>194</sub> mediante estos residuos.



**Figura R.22. Ensayos de protección frente a la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> del aptámero P8-71.** En la figura se muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida (desnaturalizante al 10%) en la que se resolvieron los productos de las reacciones de protección de P8-71 marcado en 5' realizados en ausencia (-) y presencia (+) de HCV-CRE<sub>194</sub>. En el margen derecho del gel se muestra la secuencia que se protege cuando el aptámero es incubado con el HCV-CRE<sub>194</sub>. En el margen izquierdo se señalan las posiciones nucleotídicas. OH, hidrólisis alcalina del P8-71; T1L digestión con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes del P8-71.

En conjunto, los resultados obtenidos se corresponden con la unión de P8-71 al HCV-CRE<sub>194</sub>, mediante una interacción que implica los nucleótidos U<sub>26</sub>GGGC<sub>30</sub> del aptámero y la secuencia complementaria (G<sub>9297</sub>CCCG<sub>9301</sub>) del lazo interno del subdominio 5BSL3.2. Ello pone de manifiesto que P8-71 se une al lazo interno del subdominio 5BSL3.2.

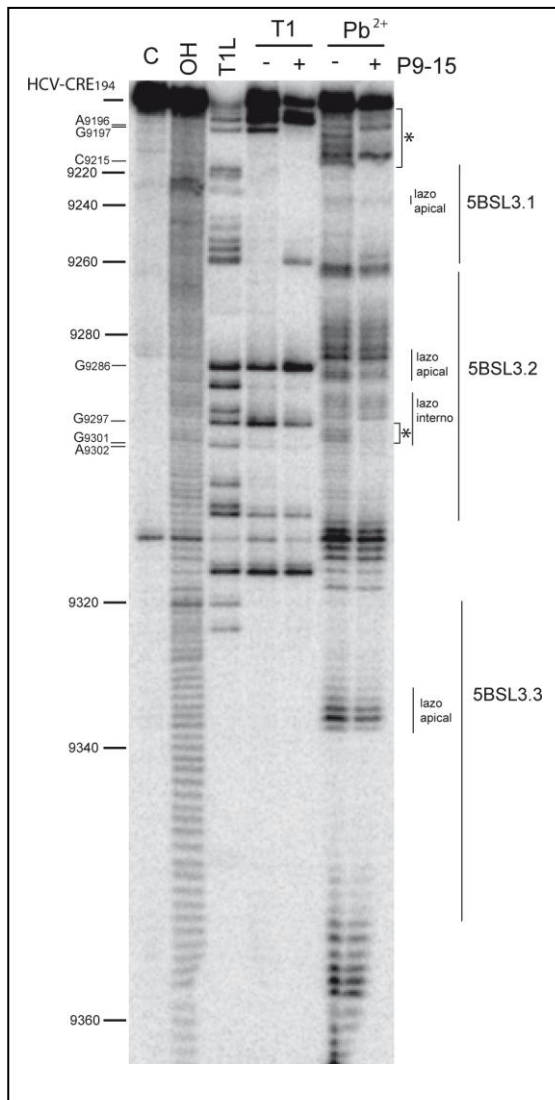
En conclusión el estudio experimental de la diana de unión en el HCV-CRE<sub>194</sub> para los aptámeros del grupo 3, indica que los aptámeros se unen al RNA sustrato mediante el motivo consenso a la secuencia G<sub>9297</sub>CCCG<sub>9301</sub>, del lazo interno del subdominio 5BSL3.2.

#### 5.2.4. Dianas de los aptámeros del grupo 4

Los aptámeros del grupo 4 tienen el motivo consenso 5' GUGUG 3' que es complementario a la secuencia que conecta al tallo lazo 5BSL3.2 con el tallo lazo 5BSL3.3 (ver figura R.9., donde se observa que la región es accesible al mapeo con la RNasa T1 y el Pb<sup>2+</sup>). Como representante del grupo 4 se estudió al aptámero P9-15.

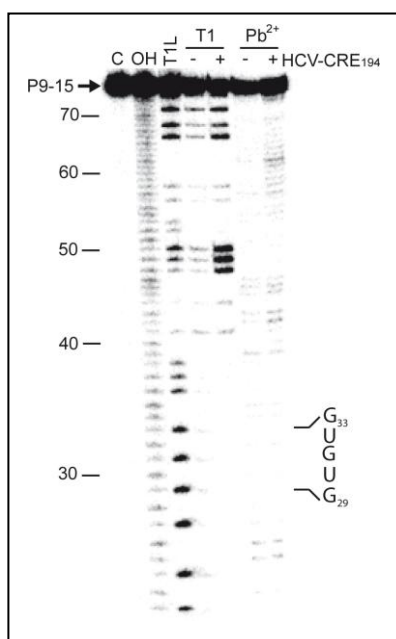
## Aptámero P9-15

Se realizó el mapeo de los nucleótidos del HCV-CRE<sub>194</sub> que interaccionan con P9-15 (figura R.23). En los resultados se observa que en presencia del aptámero P9-15 (T1 + y Pb<sup>2+</sup> +) se protegen los residuos A<sub>9196</sub>GCUCAAACUCACUC<sub>9210</sub> de la región 5' del HCV-CRE<sub>194</sub> y los residuos G<sub>9297</sub>CCCG<sub>9301</sub> del lazo interno del subdominio 5BSL3.2. Sin embargo, no se observa protección en la región complementaria al motivo consenso del grupo 4. Estos resultados indican que si bien el aptámero P9-15 interacciona con el HCV-CRE<sub>194</sub> no lo hace mediante la secuencia que conecta el tallo lazo 5BSL3.2 con el tallo lazo 5BSL3.3, C<sub>9314</sub>AUGU<sub>9318</sub>, complementaria al motivo consenso del grupo 4. La interacción con el aptámero causa un cambio conformacional en el HCV-CRE<sub>194</sub> que provoca un marcado aumento en la sensibilidad a la digestión por la RNasa T1 de las guaninas G<sub>9258</sub> y G<sub>9259</sub>.



**Figura R.23: Análisis experimental de los nucleótidos del HCV-CRE<sub>194</sub> que interaccionan con P9-15.** En la figura se muestra la autorradiografía de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% en la que se resolvieron los productos de los ensayos de protección frente a RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub> (marcado en 3') en ausencia (-) y presencia (+) del aptámero P9-15. En el margen superior del gel C es el HCV-CRE<sub>194</sub> incubado en tampón de unión; OH es la hidrólisis alcalina de HCV-CRE<sub>194</sub> y T1L es la digestión con RNasa T1 de HCV-CRE<sub>194</sub> en condiciones desnaturalizantes. A la derecha del gel con líneas se señalan los dominios estructurales del CRE y con un corchete y un asterisco, la región que se protege en presencia de P9-15. A la izquierda, se señalan las posiciones nucleotídicas y se referencian algunos nucleótidos de la región que se protege en presencia del aptámero.

En la figura R.24. se muestran los ensayos de sensibilidad a la digestión con la RNasa T1 y  $Pb^{2+}$  realizados para el aptámero P9-15 en presencia y ausencia del HCV-CRE<sub>194</sub>. En los resultados de digestión con la RNasa T1 en presencia del HCV-CRE<sub>194</sub> se aprecia una mayor sensibilidad en los residuos G<sub>48</sub>GG<sub>50</sub>, lo que pone en evidencia la ocurrencia de un cambio conformacional en el aptámero en presencia del HCV-CRE<sub>194</sub>. A pesar del cambio conformacional observado en el aptámero, los resultados obtenidos no permiten evidenciar los nucleótidos que interaccionan con el HCV-CRE<sub>194</sub>. Por otro lado, no se observan cambios en la estructura del RNA que contiene los nucleótidos del motivo consenso, G<sub>29</sub>UGUG<sub>33</sub>.



**Figura R.24: Ensayo de protección frente a la RNasa T1 y acetato de  $Pb^{2+}$  del aptámero P9-15.** Autorradiografía de un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% en el que se aprecia el patrón de digestión con RNasa T1 y degradación con  $Pb^{2+}$  del aptámero P9-15 (marcado en 5') en ausencia (-) y presencia (+) de HCV-CRE<sub>194</sub>. A la izquierda del gel se señalan las coordenadas nucleotídicas y a la derecha los nucleótidos del motivo consenso del grupo 3. En el margen superior del gel: C es P9-15 incubado con el tampón de unión; OH es la hidrólisis alcalina de P9-15 y T1L es la digestión con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes de P9-15.

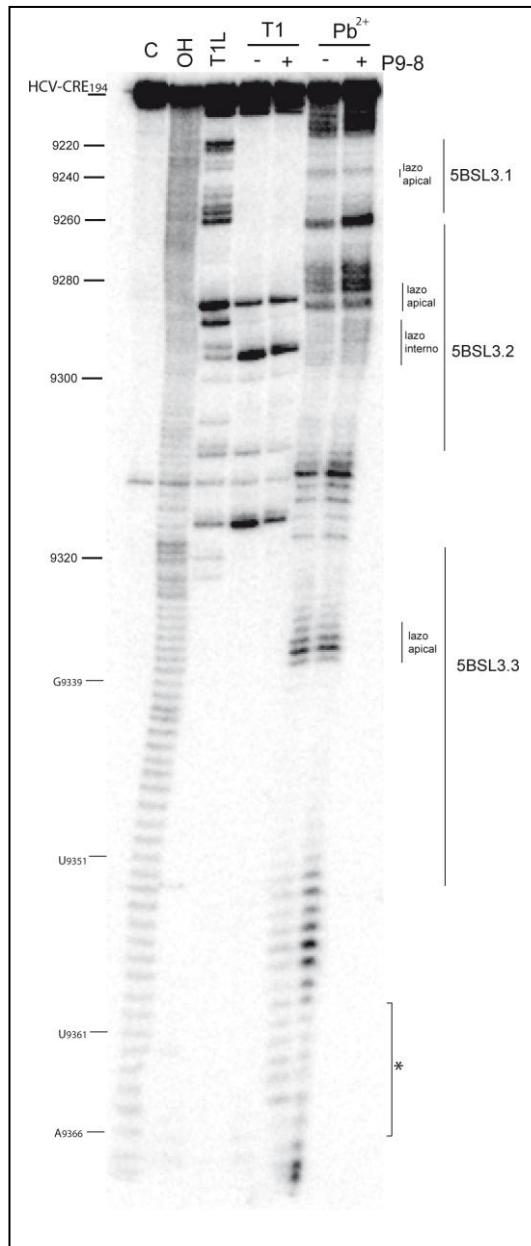
### 5.2.5. Dianas de los aptámeros del grupo 5

A continuación se muestran los resultados del análisis del aptámero P9-8 que pertenece al grupo 5 (Figuras R.25 y R.26). Los aptámeros pertenecientes al grupo 5 comparten la secuencia consenso 5' UGGGGR 3' que es complementaria a la secuencia U<sub>9361</sub>CCCCA<sub>9366</sub> que se localiza cercana al codón de terminación de la traducción.

#### Aptámero P9-8

De manera similar a la realizada anteriormente, para identificar la diana de unión en el HCV-CRE<sub>194</sub> del aptámero P9-8, se realizó el análisis experimental de protección frente a la RNasa T1 y  $Pb^{2+}$  con el HCV-CRE<sub>194</sub> en presencia y ausencia de P9-8 (figura R.25). Los resultados en presencia del aptámero (Figura 25, T1 + y  $Pb^{2+}$  +) no muestran cambios evidentes en el patrón

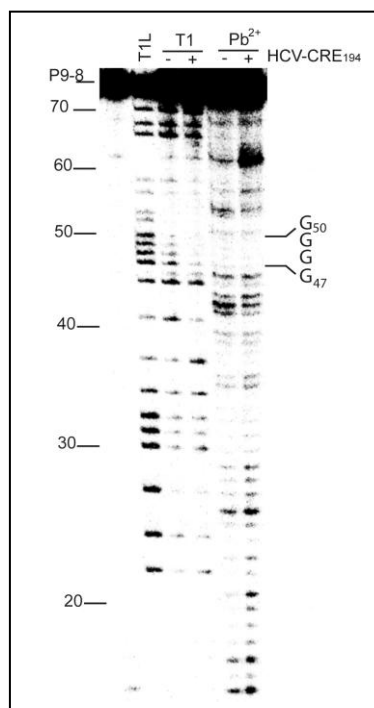
de degradación. Sin embargo en la región complementaria al motivo consenso U<sub>9361</sub>CCCCA<sub>9366</sub> podría apreciarse una menor sensibilidad a la degradación con Pb<sup>2+</sup>.



**Figura R.25: Determinación experimental de los nucleótidos del HCV-CRE<sub>194</sub> que interaccionan con P9-8.** En la figura se observa la autorradiografía de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% en la que se resolvieron los productos de los ensayos de protección frente a RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> del HCV-CRE<sub>194</sub> (marcado en 3') en ausencia (-) y presencia (+) de P9-8. A la derecha del gel con líneas se señalan los dominios estructurales del CRE y con un corchete y un asterisco, los nucleótidos complementarios al motivo consenso del grupo 5. A la izquierda están las coordenadas nucleotídicas, y se referencian algunos nucleótidos del HCV-CRE<sub>194</sub>. En la parte superior del gel C es el HCV-CRE<sub>194</sub> incubado en tampón de unión; OH es la hidrólisis alcalina de HCV-CRE<sub>194</sub> y T1L es la digestión con RNasa T1 de HCV-CRE<sub>194</sub> en condiciones desnaturalizantes.

A continuación, se realizaron ensayos de protección frente a la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> con el aptámero P9-8 en presencia y ausencia del HCV-CRE<sub>194</sub> (figura R.26). Los resultados obtenidos en presencia del RNA sustrato (figura R.26) muestran una menor sensibilidad a la digestión con la RNasa T1 en los residuos G<sub>47</sub>GGG<sub>50</sub> del motivo consenso. Ello sugiere que estos nucleótidos están participando en la interacción con la molécula diana. Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos para el HCV-CRE<sub>194</sub> sugieren que P9-8 se une a la secuencia

U<sub>9361</sub>CCCCA<sub>9366</sub>. Los datos obtenidos del patrón de degradación de P9-8 indican que efectivamente esa es la diana de unión en la molécula sustrato.



**Figura R.26: Análisis experimental de protección frente a RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> del aptámero P9-8 en ausencia (-) y presencia (+) de HCV-CRE<sub>194</sub>.** Autorradiografía de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10% donde se resolvieron los productos de las reacciones de protección. El aptámero se marcó radiactivamente en el extremo 5'. A la derecha del gel se muestran los residuos que se protegen en presencia de HCV-CRE<sub>194</sub>, a la izquierda del gel se muestran las coordenadas nucleotídicas. C, P9-8 incubado en tampón de unión; OH, hidrólisis alcalina de P9-8; T1L digestión con la RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes de P9-8.

### 5.3. Estudio de la estructura de los aptámeros dirigidos frente al subdominio 5BSL3.2.

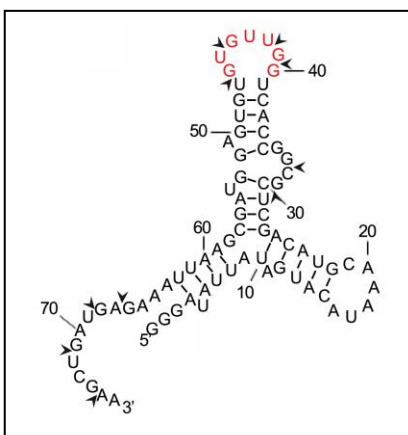
Como se detalló en el apartado 1.2, se ha descrito que el subdominio 5BSL3.2 interacciona *in vitro* con la proteína RNA polimerasa, NS5B (Lee *et al.*, 2004), (Zhang *et al.*, 2005). Además mutaciones o eliminaciones en el subdominio 5BSL3.2 inhiben la replicación del HCV en cultivos (Lee *et al.*, 2004; You *et al.*, 2004; Friebe *et al.*, 2005; You y Rice, 2008). Debido al rol esencial del subdominio 5BSL3.2 en la replicación centramos el estudio en los aptámeros pertenecientes a los grupos 2 (P7-78 y P8-58) y 3 (P7-14 y P7-71), cuyas dianas de unión al HCV-CRE<sub>194</sub> se localizan en el subdominio 5BSL3.2. En primer lugar profundizamos el análisis de la estructura secundaria.

El conocimiento de la estructura de un aptámero es importante ya que como se ha dicho anteriormente el reconocimiento de la molécula diana por parte de un aptámero es posible gracias a su estructura y secuencia nucleotídica. La estructura secundaria queda definida por los



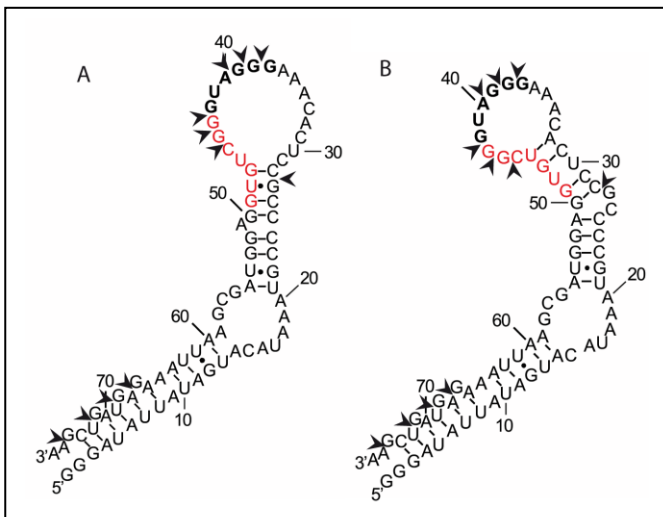
enlaces de hidrógeno entre las bases. El estudio estructural se realizó mediante ensayos de sensibilidad a la degradación con la RNasa T1 y  $Pb^{2+}$  así como también mediante el empleo de programas informáticos de predicción de estructura. Los resultados de ensayos de sensibilidad a la digestión con la RNasa T1 y degradación  $Pb^{2+}$  para los aptámeros del grupo 2 y 3 se muestran en los apartados 5.2.2 y 5.2.3. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos se impusieron como restricciones en el estudio *in silico* de la estructura secundaria del aptámero. El estudio se llevó a cabo con el algoritmo informático MC-Fold. A diferencia de los programas de modelado de estructura secundaria clásicos que consideran las interacciones de bases Watson-Crick A-U y G-C así como los pares G-U, el MC-fold tiene en cuenta todos los pares de bases no canónicos que pueden tener lugar además de los pares G-U (Parisien y Major, 2008). El MC-Fold utiliza los datos estadísticos obtenidos del Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2000).

En los ensayos de sensibilidad a la digestión con la RNasa T1 para el aptámero P7-78 en ausencia de HCV-CRE<sub>194</sub> (Figura R.16, T1 -) se aprecia una menor sensibilidad a la digestión en los residuos desde la G<sub>48</sub> a la G<sub>58</sub>. Asimismo, se observa una mayor sensibilidad a la degradación en los residuos desde la G<sub>40</sub> a la G<sub>46</sub> sugiriendo que se encuentran formando parte de una simple cadena. Con las restricciones obtenidas a partir de estos resultados se realizó un plegamiento utilizando el programa MC-Fold donde se obtuvo la estructura secundaria que se muestra en la figura R.11.C. La estructura secundaria está compuesta por tres dobles hélices (de 8, 9 y 5 pb) unidas en una misma región de forma tal que el aptámero adquiere una estructura semejante a una Y (ver figura R.27.). Dos de las hélices están formando parte de tallos lazos y los nucleótidos del motivo consenso, mediante los que interacciona con la molécula diana (5.2.2), G<sub>40</sub>GUUGUG<sub>46</sub>, se localizan en el lazo de uno de ellos.



**Figura R.27.: Modelo de la estructura secundaria del aptámero P7-78.** En la figura se muestra el modelo de estructura obtenido con el MC-Fold utilizando los datos obtenidos de los ensayos de sensibilidad a la degradación con la RNasa T1 en la figura R.16. En rojo se resaltan los residuos que forman parte del motivo consenso. Se señala con puntas de flecha negra los residuos de guanina que presentan alta sensibilidad a la degradación con RNasa T1.

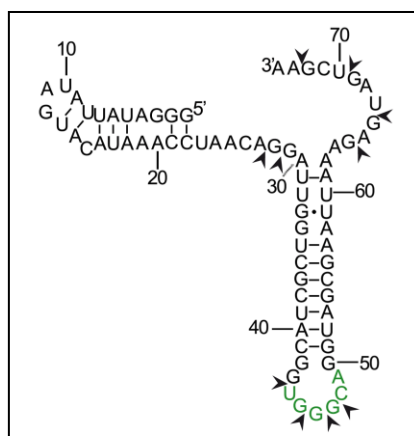
El patrón de degradación de la RNasa T1 del aptámero P8-58 en ausencia de HCV-CRE<sub>194</sub> (Figura R.18, T1 -) muestra una menor sensibilidad a la degradación en los residuos desde G<sub>47</sub> a la G<sub>53</sub> y en la G<sub>22</sub>. Por otro lado, tanto con la RNasa T1 como con Pb<sup>2+</sup>, se observa desprotección en los residuos desde la A<sub>34</sub> a la U<sub>46</sub> sugiriendo que se encuentran formando parte de una simple cadena. Con las restricciones obtenidas de los resultados del mapeo con RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> se realizó una predicción del plegamiento utilizando el programa MC-Fold, como resultado se obtuvieron una serie de estructuras secundarias subóptimas (ver figura 13 donde se muestran dos de ellas). Aunque todas las estructuras subóptimas pueden ajustarse bastante bien al patrón de degradación obtenido con la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> de P8-58, ninguna de ellas se ajusta completamente al mismo. Por ejemplo, como se muestra en la figura R.18 la G<sub>27</sub> es sensible a la digestión con la RNasa T1, ello concuerda con la estructura B de la figura R.28, y no con la estructura A en donde la G<sub>27</sub> está formando parte de una doble hélice. Sin embargo, los nucleótidos C<sub>29</sub>U<sub>31</sub> son sensibles a la degradación con plomo (figura R.18), lo que se corresponde con la estructura A en donde se localizan en el lazo (figura R.28) y no con la estructura B en la que forman parte de un tallo. Aunque ninguna de las estructuras subóptimas por si sola se corresponde con los resultados de sensibilidad a la digestión con RNasa T1 y degradación con Pb<sup>2+</sup>, observado en la figura R.18, si lo haría el conjunto de estructuras subóptimas. En todas las estructuras subóptimas obtenidas los residuos del motivo consenso (señalados en rojo en la figura R.28) se localizan en una fracción de la secuencia del lazo y en la doble hélice de un tallo lazo.



**Figura R.28.: Modelo de dos estructuras subóptimas de P8-58.** Las estructuras fueron obtenidas con el programa MC-Fold en el que se tuvo en cuenta el patrón de degradación que se muestra en R.18. En las estructuras se señalan en rojo los residuos que forman parte del motivo consenso y en negrita los que se protegen en presencia del HCV-CRE<sub>194</sub> y que no forman parte del motivo consenso. Las puntas de flecha negra señalan los residuos de guanina que son sensibles a la degradación con RNasa T1.

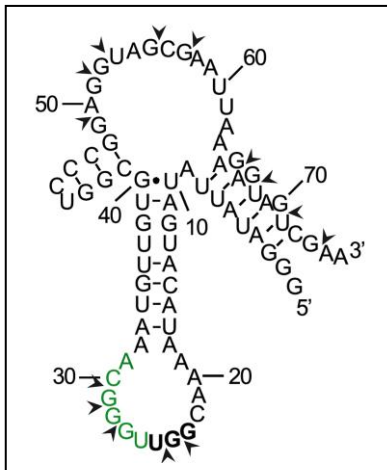
Los resultados de los ensayos de sensibilidad a la digestión con la RNasa T1 y degradación con Pb<sup>2+</sup> de P7-14 en ausencia de HCV-CRE<sub>194</sub> (Figura R.20, T1 - y Pb<sup>2+</sup> -) permiten observar una

menor accesibilidad en los residuos G<sub>33</sub> al G<sub>42</sub> y en los residuos G<sub>50</sub> a la U<sub>60</sub>. Asimismo, los residuos desde la G<sub>43</sub> a la A<sub>49</sub> son sensibles a la digestión con T1 y degradación con Pb<sup>2+</sup>. Con RNasa T1 la mayor exposición de las G<sub>45</sub>GG<sub>47</sub> es clara, sin embargo con Pb<sup>2+</sup> no se observa una mayor sensibilidad. Ello se debe a que las guaninas consecutivas en secuencia apilan los anillos de sus bases generando un impedimento en la flexibilidad de la cadena nucleotídica de esa región. Al tener una menor flexibilidad no se puede formar el intermediario del estado de transición requerido para la hidrólisis por Pb<sup>2+</sup>. Con las restricciones obtenidas con la RNasa T1 se realizó una predicción de la estructura secundaria con el programa MC-Fold (Figura R.29). En el modelo de estructura obtenido, el aptámero P7-14 se pliega en una estructura compuesta por dos tallos lazos. Uno de ellos está constituido por una doble hélice de nueve pares de bases y un lazo apical de tres nucleótidos. El otro tallo lazo, es de mayor tamaño de 13 pares de bases con un lazo apical de siete residuos, cinco de los cuales constituyen el motivo consenso U<sub>44</sub>GGGC<sub>48</sub> de los aptámeros pertenecientes al grupo 3, y que son los que interaccionan con el HCV-CRE<sub>194</sub> (apartado 5.2.3).



**Figura R.29.: Esquema de la estructura secundaria del aptámero P7-14.** La estructura fue obtenida con el programa informático MC-Fold teniendo en cuenta el patrón de degradación de la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> que se muestra en la figura R.20. En verde se señalan los residuos correspondientes al motivo consenso. Las puntas de flecha negra señalan las guaninas que son sensibles a la degradación con la RNasa T1.

En los ensayos de sensibilidad a la degradación con la RNasa T1 del aptámero P8-71 en ausencia de HCV-CRE<sub>194</sub> (figura 22, T1 -) se observa una menor accesibilidad en los residuos G<sub>38</sub> a la G<sub>49</sub>. Asimismo, los residuos G<sub>23</sub> a la G<sub>29</sub> son sensibles a la digestión con T1 sugiriendo que forman parte de una simple cadena. Las restricciones obtenidas a partir de la digestión con la RNasa T1 se utilizaron para realizar una predicción de la estructura secundaria con el programa MC-Fold (Figura R.30). El plegamiento obtenido para el aptámero P7-71 consiste en una estructura formada por tres hélices. Una de las hélices tiene nueve pares de bases y forma parte de un tallo lazo con un lazo apical de 13 nucleótidos donde se localizan los residuos U<sub>26</sub>GGGC<sub>30</sub> que constituyen el motivo consenso, y mediante los que se une al HCV-CRE<sub>194</sub> (ver apartado 5.2.3).



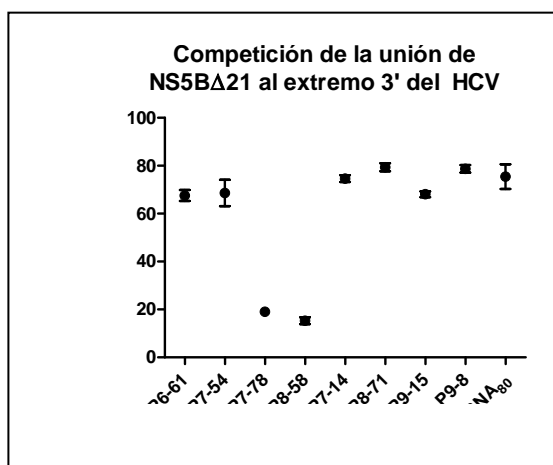
**Figura R.30: Esquema de la estructura secundaria del aptámero P8-71.** El modelo de estructura se obtuvo con el MC-Fold utilizando los resultados obtenidos del mapeo con la RNasa T1 en R.22. En verde se señalan los residuos correspondientes al motivo consenso. Se señala con una punta de flecha negra las guaninas que son sensibles a la degradación con RNasa T1.

#### 5.4. Competición de la unión de la RNA polimerasa viral al extremo 3' del HCV.

El elemento CRE y más específicamente los subdominios 5BSL3.1 y 5BSL3.2 son esenciales para la replicación del HCV (Lee *et al.*, 2004; You *et al.*, 2004; Friebe *et al.*, 2005; You y Rice, 2008). En particular se ha visto que el tallo lazo 5BSL3.2 del CRE es importante para la unión de la RNA polimerasa, NS5B a su RNA sustrato (Zhang *et al.*, 2005) (Lee *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha visto que la RNA polimerasa, *in vitro*, es capaz de unirse a el *X tail* y en menor medida al poly U/UC (Oh *et al.*, 2000). Es posible entonces que la unión de los aptámeros al CRE pueda interferir con la unión de la RNA polimerasa viral a sus regiones de unión en el genoma del HCV.

Para evaluar si la interacción de los aptámeros con el CRE afectan la unión de la RNA polimerasa al extremo 3' del genoma del HCV, se realizaron ensayos de competición de la unión de la polimerasa. Para ello se utilizó como RNA molde un fragmento de 425 nucleótidos del extremo 3' del HCV (3'HCV-9181) que incluye además del segmento del HCV-CRE<sub>194</sub>, la región 3' UTR (con la región hipervariable, la región poly U/UC y el *X tail*) del genoma del HCV. En los ensayos también se empleó, una RNA polimerasa recombinante que carece de los 21 aminoácidos C-terminales necesarios para su anclaje a las membranas y que nos referiremos a ella como NS5BΔ21 (Ferrari *et al.*, 1999). La modificación en la proteína NS5B fue realizada para aumentar su solubilidad y está descrito que no afecta su actividad (Ferrari *et al.*, 1999). Para la realización de los ensayos de competición, se incubó el extremo 3' del HCV (marcado internamente con <sup>32</sup>P) junto con los aptámeros y se le adicionó la proteína recombinante

NS5BΔ21 (ver materiales y métodos, 4.2.26.). A continuación los complejos ribonucleoproteicos fueron inmovilizados en una membrana de nitrocelulosa utilizando la técnica de Dot-Blot (4.2.27.) y posteriormente se cuantificó la fracción de RNA marcado que se encontraba unido a la proteína (4.2.18.3.).



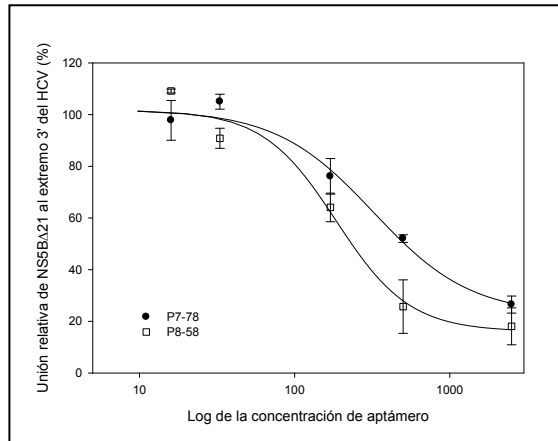
**Figura R.31: Ensayos de competición de la unión de la RNA polimerasa NS5BΔ21 al extremo 3' del HCV.** En la figura se observa la representación gráfica de la competición de la unión de NS5BΔ21 al extremo 3' del HCV de los aptámeros del grupo 1: P6-61 y P7-54, los aptámeros del grupo 2: P7-78 y P8-58, los aptámeros del grupo 3 P7-14 y P8-71, el aptámero del grupo 4: P9-15 y el aptámero del grupo 5: P9-8. Los valores son la media de tres experimentos independientes. El RNA<sub>80</sub> es un RNA que no tiene sitios de unión en el RNA diana y que fue utilizado como control.

Como se observa en la figura R.31 los aptámeros P7-78 y P8-58 son los que presentan mayores niveles de competición, pudiendo llegar a reducir hasta un 80% la unión de la RNA polimerasa, NS5BΔ21, al extremo 3' del HCV. Según los resultados de protección con la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> de todos los aptámeros analizados solamente los aptámeros P7-78 y P8-58 mostraron que su unión al HCV-CRE<sub>194</sub> causa un cambio estructural en el que se protegen parte de los residuos del lazo apical del subdominio 5BSL3.2. Con los aptámeros P7-78 y P8-58 se realizó la competición con concentraciones crecientes de aptámero (3.2.26.) con el fin de determinar el IC<sub>50</sub> (la concentración de aptámero que produce un 50% del efecto máximo observado) para cada uno de los aptámeros. Como se muestra en la Figura R.32., los aptámeros P7-78 y P8-58 son capaces de inhibir la unión de la proteína recombinante NS5BΔ21 de forma dependiente de la concentración, y con IC<sub>50</sub> de 0,188 ± 0,023 μM y 0,152 ± 0,038 μM respectivamente (R<sup>2</sup>> 0,99, figura R.24.).

El cálculo del IC<sub>50</sub> se realizó con el programa Sigma Plot v.8.02 y utilizando la ecuación:

$$Y = Y_{\max} / (1 + 10^{(\log IC_{50} - X)})$$

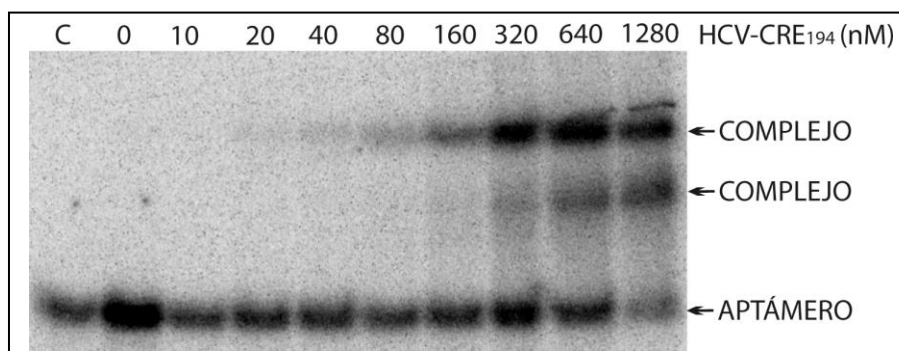
donde Y<sub>max</sub> es el porcentaje máximo de unión relativa de 3'HCV-9181 a la NS5BΔ21 y X la concentración de aptámero.



**Figura R.32: Competición de la unión de NS5BΔ21 al extremo 3'.** Representación gráfica de la competición de P7-78 y P8-58. Los datos de cada RNA están normalizados respecto a la reacción en ausencia de aptámero y calibrados respecto al control (RNA<sub>80</sub>). Cada valor es el valor medio de tres experimentos independientes,  $R^2 > 0,99$ .

## 5.5. Estudio de la asociación de los aptámeros del grupo 2 al HCV-CRE<sub>194</sub>.

La afinidad de los aptámeros P8-58 y P7-78 por su sustrato se determinó utilizando el aptámero marcado internamente con <sup>32</sup>P y se realizaron ensayos de asociación con el HCV-CRE<sub>194</sub>. Las reacciones de asociación se resolvieron en geles nativos de poliacrilamida al 6% donde la formación del complejo aptámero-HCV-CRE<sub>194</sub> es detectada por un cambio en la movilidad electroforética respecto al aptámero libre. En la figura R.33 se muestra uno de los ensayos llevado a cabo con el aptámero P8-58, y se detectan dos complejos o dos conformaciones distintas que muestran diferente movilidad electroforética. Para cada aptámero se repitió el ensayo tres veces de manera independiente (figura R.33 y R.34).

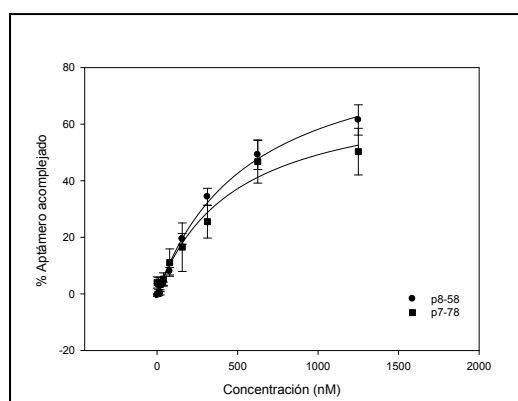


**Figura R.33.: Asociación de P8-58 al RNA del HCV-CRE<sub>194</sub>.** En la figura se muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el que se ha resuelto el complejo formado entre el aptámero y el HCV-CRE<sub>194</sub>. Se señala el aptámero P8-58 así como el complejo formado. C reacción llevada a cabo en ausencia de sustrato. Los datos fueron ajustados a una ecuación del tipo:

$$Y = (Y_0 \cdot X) / (X + K_d)$$

donde Y es el porcentaje de complejo formado,  $Y_0$  es el porcentaje inicial de complejo, X es la concentración de RNA que se utiliza en exceso y  $K_d$  la concentración de sustrato a la cual la formación de complejo es la mitad de la máxima.

Los valores de  $K_d$  obtenidos para los aptámeros P7-78 y P8-58 son de  $475,88 \pm 122,42$  nM y  $576,92 \pm 89,60$  nM, respectivamente.

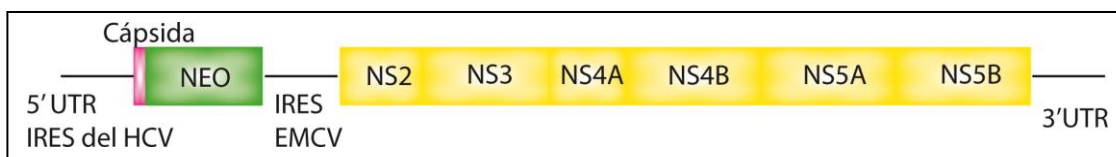


**Figura R.34: Asociación de P7-78 y P8-58 al RNA del HCV-CRE<sub>194</sub>.** Representación gráfica de la asociación de los aptámeros con el HCV-CRE<sub>194</sub>. Cada punto es el valor medio de tres experimentos independientes. Los datos se ajustan a la curva con un valor  $R^2 > 0,99$ .

## 5.6. Efecto de los aptámeros en la replicación del HCV.

Con el objetivo de evaluar el efecto de los aptámeros en la función que desempeña el dominio CRE en la síntesis del RNA genómico, se procedió a ensayar la eficiencia de replicación del HCV en presencia de los aptámeros. Para ello se utilizaron líneas celulares Huh-7 (derivadas de hepatocarcinoma celular humano) portadoras de replicones sub-genómicos bicistrónicos del HCV, llamadas Huh-7 NS3-3' (Larrea *et al.*, 2006). El replicón sub-genómico utilizado en este trabajo consta de la región 5' UTR del HCV y los primeros 16 codones de la región codificante para la proteína de la cápsida (figura R.35). El IRES junto con los 16 codones de la secuencia codificante para la proteína de la cápsida controlan la traducción del gen de resistencia a la neomicina. Seguidamente, en posición 3' al gen de resistencia a la neomicina, se localiza el IRES del virus de la encephalomyocarditis (EMCV) que controla la traducción de las proteínas no estructurales, desde la NS2 a la NS5B del HCV. En el extremo 3' posee la región 3'UTR del HCV (figura R.35). Las células Huh-7 que contenían el sistema replicón se cultivaron a una concentración de 80000 cel/pocillo (como se detalla en materiales y métodos, 4.2.2) y veinte

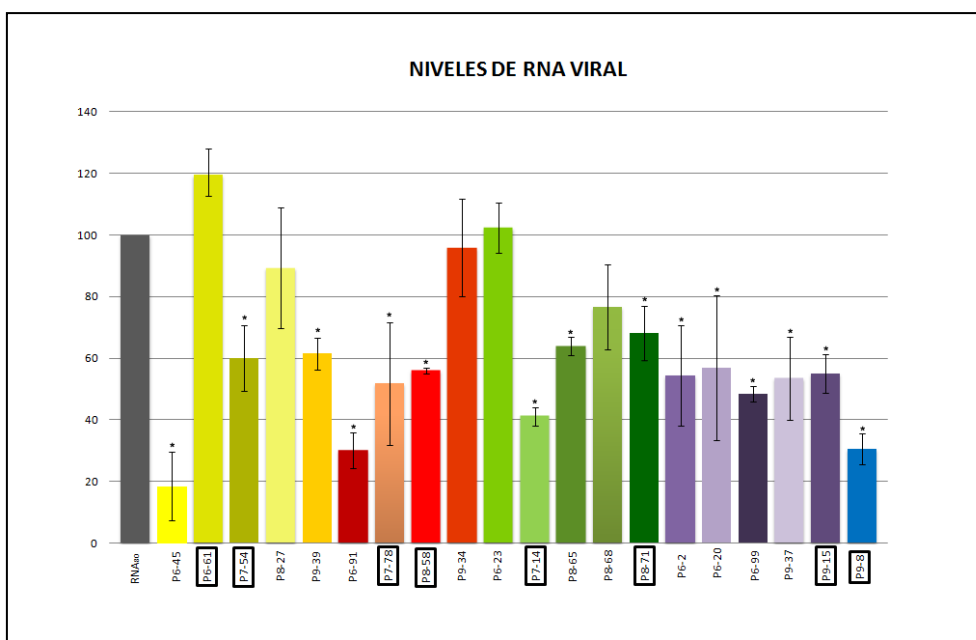
horas después, se transfectaron con los aptámeros seleccionados mediante el sistema lipídico catiónico, TransFectin (Bio-Rad, ver 4.2.7). Tras un tiempo de incubación de 20 hr se extrajo el RNA total con el método Trizol (InvitroGen, ver 4.2.15.5). Posteriormente se utilizaron 20 ng de RNA para cuantificar los niveles de RNA viral por RT-PCR cuantitativa como se detalla en materiales y métodos.



**Figura R.35: Esquema de la organización genómica del replicón utilizado en este trabajo.** Bajo el control traduccional del IRES del HCV está el gen de resistencia a la neomicina (NEO). Bajo el control traduccional del IRES del virus de la encephalomyocarditis (EMCV) están los genes de las proteínas NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B del HCV. 5'UTR y 3'UTR son las regiones 5' y 3' no traducibles del HCV, respectivamente.

Se estudió el efecto sobre la replicación del HCV de 20 aptámeros distintos, correspondientes a los diferentes grupos. Los resultados de la RT-PCR cuantitativa de las células transfectadas con aptámeros se muestran en la figura R.36. El control es el RNA total de las células transfectadas con el transcrito de 80 nucleótidos (RNA<sub>80</sub>) que no se une al CRE y no tiene efectos sobre la replicación (Romero-López *et al.*, 2009). Los resultados demuestran que los aptámeros seleccionados conducen a inhibiciones de la replicación viral que llegan a alcanzar valores del 80%, como se observa para el aptámeros P6-45. La menor cantidad relativa de HCV sugiere que estos aptámeros, mediante su unión al CRE, interfieren negativamente con procesos del ciclo viral. Solo en algunos casos no se detectaron cambios significativos en los niveles de RNA viral (P6-61, P8-27, P9-34, P6-23 y P8-68).





**Figura R.36: Estudio de la capacidad inhibidora de la replicación de aptámeros seleccionados contra el HCV-CRE<sub>194</sub>.** En la figura se observa la representación gráfica de las células Huh-7 portadoras de sistemas replicones transfectadas con aptámeros pertenecientes a los distintos grupos. Los aptámeros para los cuales se analizó su diana de unión, se señalan enmarcados en un cuadro negro. Están representados los aptámeros: del grupo I: P6-45, P6-61, P7-54, P8-27, P9-39 (señalados en tonos de amarillo), del grupo II: P6-91, P7-78, P8-58, P9-34 (señalados en tonos de rojo), del grupo III: P6-23, P7-14, P8-65, P8-68, P8-71 (señalados con tonalidades verdes) del grupo IV: P6-2, P6-20, P6-99, P9-37, P9-15 (señalados en violeta) y del grupo V P9-8 (que se señala en azul). Se normalizaron los niveles de RNA del HCV respecto al mRNA de GAPDH y se refirieron respecto al control (RNA<sub>80</sub>). Los valores son la media de tres experimentos independientes. El asterisco señala las diferencias entre los valores de las células transfectadas con control (RNA<sub>80</sub>) y de las células transfectadas con el aptámero que son estadísticamente significativos ( $p < 0,07$ ).

## 6. Discusión.

### 6. 1. Selección aptámeros de RNA para la unión al HCV-CRE<sub>194</sub>

El tratamiento actual contra la hepatitis C consiste en PEG-IFN- $\alpha$  y ribavirina. Es un tratamiento inespecífico que tiene importantes efectos secundarios y es inefectivo para la mitad de los pacientes infectados con el genotipo 1, el más frecuente en Europa. Con el objetivo de desarrollar un tratamiento más efectivo que el existente, se ha estudiado el desarrollo de terapias antivirales que tienen como blanco de acción las proteínas virales así como factores celulares necesarios para el ciclo viral (Halfon y Locarnini, 2011). El principal problema de los tratamientos que inhiben a las proteínas virales, es la generación de resistencia mientras que los que tienen como diana los factores celulares tienen el problema de los efectos no deseados que podría ocasionar el estar afectando funciones celulares. Una alternativa a estos blancos de acción para una terapia antiviral, son los dominios funcionales genómicos. Al ser regiones tan conservadas, existe una menor posibilidad de generación de resistencia ya que una alteración en la secuencia o estructuras de estas regiones podría comprometer funciones esenciales del virus. En esta línea de investigación las herramientas moleculares basadas en el RNA posibilitan actuar directamente sobre el genoma del HCV.

Se han realizado numerosos esfuerzos por inhibir dominios genómicos del HCV utilizando RNAs interferentes, RNAs *antisense*, ribozimas, *decoys* y aptámeros demostrándose una efectiva inhibición de los títulos virales (Romero-López *et al.*, 2006). El blanco de inhibición más estudiado ha sido el IRES. Sin embargo, un blanco de inhibición muy prometedor es el CRE (*cis acting replication element*) un elemento esencial para la replicación, localizado en la región 3' codificante para la proteína NS5B. El CRE se compone por tres subdominios 5BSL3.1, 5BSL3.2 y 5BSL3.3. Delecciones o mutaciones en los subdominios 5BSL3.1 y 5BSL3.2 inhiben completamente la replicación (Lee *et al.*, 2004; You *et al.*, 2004; Friebe *et al.*, 2005; You y Rice, 2008), lo que lo hace un buen candidato como diana de acción para una terapia anti-HCV. En este sentido solamente se ha realizado un estudio en el que el CRE es utilizado en la estrategia de inhibición del HCV. En este caso se estudiaba el efecto en la replicación en sistemas replicones al transfectar las células con *decoys* de los elementos 5BSL3.1, 5BSL3.2 y 5BSL3.3. Como resultado se observó que los *decoys* de los subdominios 5BSL3.1, 5BSL3.2 eran capaces de inhibir significativamente los niveles de replicación (Zhang *et al.*, 2005). En este caso es el secuestro de factores de unión al 5BSL3.2 y no la inhibición *per se* del subdominio 5BSL3.2 lo

que causa la reducción en los niveles de RNA virales. Por lo que aún queda sin explorar el potencial uso del CRE como diana para una terapia anti-HCV.

Los resultados aportados en el presente trabajo indican la utilidad del dominio CRE como posible diana terapéutica. La estrategia utilizada para el estudio de dicho dominio genómico funcional como blanco de acción de inhibidores anti HCV, se basó en la selección de aptámeros capaces de unirse al CRE. En este sentido, se han diseñado previamente aptámeros que se unen a los subdominios II, III y IV del IRES y a el *X tail* (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002; Kikuchi *et al.*, 2003; Da Rocha Gomes *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2005; Fukuda *et al.*, 2008). Además los aptámeros presentan ciertas ventajas respecto a otras herramientas moleculares como las ribozimas, los RNAs interferentes y el RNA *antisense*. Una de ellas radica en la accesibilidad a su secuencia diana. Esta característica es especialmente necesaria para el diseño de inhibidores dirigidos contra los subdominios genómicos funcionales, que son regiones sumamente estructuradas. Los métodos de selección molecular *in vitro*, pueden diseñarse para seleccionar aptámeros capaces de unirse a las regiones que estructuralmente están disponibles en el RNA diana. La accesibilidad de la secuencia diana es uno de los problemas que se ha visto con frecuencia en los RNA de interferencia, en las ribozimas y los RNA *antisense*. En el primer caso la presencia de estructuras secundarias y terciarias en el RNA puede obstruir el acceso al complejo RISC con el RNA interferente al RNA blanco (Gredell *et al.*, 2008; Tafer *et al.*, 2008; Hofacker y Tafer, 2010). En el caso de las ribozimas y los RNA *antisense* la unión del RNA conlleva los costes energéticos de desnaturalizar la estructura del RNA blanco para formar un dúplex efectivo con la ribozima o el *antisense*-RNA (Zhao y Lemke, 1998; Serikov *et al.*). Sin embargo a pesar de que los aptámeros son seleccionados contra regiones que *in vitro* están accesibles, *in vivo* esas regiones pueden estar asociadas a proteínas u otros factores con los que deben competir por su unión. Los aptámeros son altamente específicos por sus ligandos y hasta la fecha no se ha descrito efecto de inhibición inespecífica. La inhibición inespecífica (o efecto “*off target*”) es un problema en los RNAs interferentes y resulta del hecho de que los RNAs interferentes pueden interferir con el proceso endógeno de control de la expresión génica mediada por los micro-RNAs (Jackson *et al.*, 2003). El RNA interferente en su mecanismo de acción se incorpora en el complejo RISC y puede hibridar de forma imperfecta con RNA mensajeros celulares que no son su blanco de acción. De esta forma actuaría mediante un mecanismo similar a los mi-RNAs endógenos causando la inhibición de RNAs que no son sus blancos (Kole *et al.*, 2012).

Además de estas ventajas como inhibidores del HCV, mediante el uso de aptámeros podemos caracterizar efectos directos en la actividad del CRE. A diferencia del RNA de interferencia que provoca la degradación del RNA genómico, o las ribozimas que ocasionan un corte en el RNA blanco o los *decoys* que son capaces de secuestrar cualquier factor de unión al CRE como la RNA polimerasa, los aptámeros actúan mediante su asociación con el CRE. El uso de aptámeros permite evaluar el efecto provocado al afectar las funciones en distintas dianas del CRE en un sistema donde el resto de los componentes, tales como la integridad genómica así como la presencia de la RNA polimerasa que son imprescindibles para el ciclo viral están intactos.

En el presente trabajo se realizó un método de selección molecular *in vitro* contra un fragmento de RNA de 194 nucleótidos que corresponde a la región que mapea desde los nucleótidos 9181 al 9371 en el genotipo 1b del HCV y que incluye al dominio CRE, que denominamos HCV-CRE<sub>194</sub>. Se utiliza el dominio completo del CRE, lo cual permite la conservación de la estructura secundaria y las interacciones entre los distintos subdominios. El fragmento utilizado no incluye otros elementos que participan en el plegamiento terciario del CRE, como la región 200 nucleótidos 5' centrada en el nucleótido 9110, o el tallo lazo SLII de la región X. La ausencia de estos elementos podrían dejar expuestas las secuencias que interaccionan con ellos.

Por otro lado, otro aspecto importante en el diseño del método de selección es la inmovilización del sustrato. Ésta debe realizarse preservando la estructura secundaria lo más parecida posible a la estructura biológicamente activa. Se han descrito diversas alternativas para la inmovilización del sustrato como la hibridación con un oligonucleótido biotinilado en uno de los extremos (Kikuchi *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2005) o la extensión en dos pares GC en uno de los extremos de la molécula y la biotinización del mismo (Tallet-Lopez *et al.*, 2003; Watrin *et al.*, 2009). Ambas estrategias demostraron ser efectivas para la selección de aptámeros. Sin embargo, no podemos descartar que la unión de un oligonucleótido o la adición de un grupo en uno de los extremos pueda ocasionar una distorsión en el plegamiento de la molécula utilizada como diana en este trabajo. Debido a ello, se optó por una estrategia diferente previamente utilizada con éxito en el laboratorio (Romero-López *et al.*, 2005). En este caso nos basamos en un protocolo que implica la introducción de nucleótidos biotinilados durante el proceso de transcripción *in vitro*. Debido al carácter voluminoso que presenta la biotina, es necesario que su incorporación a la molécula de RNA no exceda en una o dos posiciones, para que la estructura secundaria del sustrato se vea afectada mínimamente. Además, la presencia de varias biotinas podría hacer que una molécula de HCV-CRE<sub>194</sub> se fijara a la columna de sefarosa-estreptavidina por varios

sitios imposibilitando el correcto plegamiento de la molécula diana, HCV-CRE<sub>194</sub>. Este protocolo permite la incorporación de la uridina biotinilada en diferentes regiones de la molécula de RNA evitando que de ocurrir una distorsión en el plegamiento esta suceda para todas las moléculas de la misma manera evitando un sesgo en el plegamiento de la misma. El protocolo utilizado fue descrito por Theissen *et al* (Theissen *et al.*, 1989) con el que es posible marcar las moléculas de RNA durante su síntesis teóricamente en una única posición.

Para el desarrollo del método de selección molecular se diseñó una población de partida con una región central de 30 nucleótidos mutagenizados al azar. El largo de la región central es suficiente como para permitir la formación de un gran número de variantes estructurales (de  $1,15 \times 10^{18}$  variantes) y una alta probabilidad de encontrar variantes afines al RNA sustrato, HCV-CRE<sub>194</sub>. Por otro lado, el largo de la región aleatoria no es tan grande como para dar lugar a secuencias con estructuras complejas y difíciles de estudiar. A su vez, regiones centrales de 30 nucleótidos mutagenizados ya han sido empleadas antes por otros grupos obteniendo buenos resultados (Kikuchi *et al.*, 2003, Kikuchi, 2005 #51; Kikuchi *et al.*, 2005). En total se realizaron nueve rondas de selección y se clonaron las moléculas de las poblaciones P6 a P9. A partir del análisis de las secuencias obtenidas se identificaron 5 motivos de secuencia compartidos por varias moléculas (ver tabla D.1.) y que permitieron clasificar a las variantes en 5 grupos. A diferencia de otros trabajos publicados donde existen variantes de secuencias tan frecuentes que al analizar las secuencias clonadas son detectadas más de una vez (Boiziau *et al.*, 1999; Duconge y Toulmé, 1999); en el proceso de selección aquí descrito no aparecen variantes de secuencias que se repitan. Estos resultados son coincidentes con otros procesos de selección donde la frecuencia de las variantes no es tal, como para obtener secuencias repetidas (Kikuchi *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2005).

## **6.2. Sitio de unión de los aptámeros en el HCV-CRE<sub>194</sub>**

En el análisis de complementariedad en el RNA diana se observó que cada motivo de secuencia es complementario a una región en el HCV-CRE<sub>194</sub> (ver tabla D.1). Ello sugiere que la interacción entre el aptámero y el HCV-CRE<sub>194</sub> puede suceder mediante la interacción entre esas secuencias. El análisis de las poblaciones P8 y P9 permitió apreciar una evolución en los motivos consensos obtenidos en la población 6 a motivos 1 ó 2 nucleótidos más extendidos en su secuencia. El aumento en la secuencia del motivo consenso se corresponde con un aumento en la complementariedad del RNA diana, HCV-CRE<sub>194</sub>. Estos resultados sugieren que la

selección de las secuencias consenso ya se había realizado en la ronda 6 y que los cambios realizados en las subsecuentes rondas, verdaderamente aumentan la presión selectiva resultando en la selección de una región de interacción más larga o bien estabilizando el tipo de apareamiento de bases en la hibridación entre el motivo consenso y la secuencia diana.

El análisis del porcentaje de los distintos grupos en las diferentes poblaciones no mostró que algún motivo consenso en particular, estuviera mayoritariamente representado. En general los motivos de los grupos 1, 3 y 4 tienen una alta representación, lo que sugiere que son motivos cuyas dianas de unión son sitios que presentan una mayor predisposición para interactuar. Los motivos consenso fueron fluctuando en representatividad en las distintas poblaciones y posiblemente ello se deba al bajo número de secuencias analizadas.

<b>Motivos consenso de las poblaciones P6 y P9</b>				
<b>Grupo</b>	<b>CONSENSO P6</b>	<b>REGIÓN COMPLEMENTARIA EN EL CRE</b>	<b>CONSENSO P9</b>	<b>REGIÓN COMPLEMENTARIA EN EL CRE</b>
1	5' RGUGR 3'	U <sub>9205</sub> CACU <sub>9209</sub>	5' RGUGRR 3'	U <sub>9205</sub> CACUC <sub>9210</sub>
2	5' GGYUG 3'	C <sub>9284</sub> AGCC <sub>9288</sub>	5' GGYUGUG 3'	C <sub>2982</sub> ACAGCC <sub>9289</sub>
3	5' YGGGY 3'	G <sub>9297</sub> CCCG <sub>9301</sub>	5' YGGGYR 3'	U <sub>9296</sub> GCCCG <sub>9301</sub>
4	5' GUGUG 3'	C <sub>9314</sub> AUGU <sub>9318</sub>	5' YGUGUG 3'	C <sub>9314</sub> AUGUG <sub>9319</sub>
5	5' UGGGGR 3'	U <sub>9361</sub> CCCCA <sub>9366</sub>	5' UGGGGR 3'	U <sub>9361</sub> CCCCA <sub>9366</sub>

**Tabla D.1: Motivos consenso de las poblaciones P6 y P9.** Se muestra el grupo al que pertenece el motivo de secuencia. Se describe el motivo de secuencia en la población 6 y su secuencia complementaria en el HCV-CRE<sub>194</sub> así como el motivo de secuencia en la población 9 con su secuencia complementaria en el HCV-CRE<sub>194</sub>.

Con el propósito de identificar experimentalmente las dianas de interacción en el HCV-CRE<sub>194</sub>, se estudiaron aptámeros representativos de los distintos grupos. Todos ellos eran capaces de unirse al HCV-CRE<sub>194</sub> (figura R.10). Los ensayos del mapeo con la ribonucleasa T1 y Pb<sup>2+</sup> permitieron mapear cuatro de las dianas de unión de los aptámeros en el HCV-CRE<sub>194</sub>. Para casi todos los aptámeros estudiados la región de interacción con el HCV-CRE<sub>194</sub> se corresponde con la secuencia complementaria al motivo consenso. Los resultados de los ensayos de sensibilidad a la degradación con la RNasa T1 o Pb<sup>2+</sup> del aptámero perteneciente al grupo 4, P9-15 se discute a continuación.

En los ensayos de protección realizados con el aptámero representante del grupo 4 (P9-15) no fue posible observar una menor sensibilidad a la degradación con Pb<sup>2+</sup> en la secuencia complementaria al motivo consenso de este grupo (el segmento de secuencia que conecta al subdominio 5BSL3.2 con el 5BSL3.3). Es de notar que muchas de las secuencias seleccionadas

que se clasifican en el grupo 4, tienen motivos consenso de otros grupos. El motivo consenso del grupo 4, 5' GUGUG 3', además, es complementario a una secuencia del sitio de unión de oligonucleótido 5' (5'TACATA 3'). En conjunto estas observaciones sugieren que la secuencia consenso del grupo 4, en el aptámero P9-15 y posiblemente de otros aptámeros de este grupo, cumple un rol estructural en el plegamiento del aptámero. La hibridación con la secuencia complementaria en el sitio de unión de oligonucleótido, le permitiría a la molécula de RNA adquirir una estructura adecuada para que interaccionen los nucleótidos que se unen al HCV-CRE<sub>194</sub>.

El aptámero P9-15 tiene el motivo consenso de los aptámeros pertenecientes al grupo 3. El patrón de protección del HCV-CRE<sub>194</sub> en presencia del aptámero P9-15 es similar a lo observado de forma independiente para los aptámeros del grupo 1 y 3, se protegen los residuos A<sub>9196</sub>GCUCAAACUCCACUC<sub>9210</sub> (se subraya parte del motivo consenso del grupo 1) en la región 5' del HCV-CRE<sub>194</sub> y los residuos G<sub>9297</sub>CCCG<sub>9301</sub> del lazo interno del dominio 5BSL3.2. Ambas regiones son complementarias a la secuencia G<sub>27</sub>AGUGUGUJGGC<sub>39</sub> del aptámero P9-15. El mapeo del P9-15 en presencia del HCV-CRE<sub>194</sub> no permitió observar cambios evidentes en esa región. Tanto en ausencia como en presencia del RNA ligando esas regiones son poco sensibles a la degradación con RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup>.

Por otra parte, es frecuente que en los procesos de selección que utilizan como sustrato moléculas de RNA, se rescaten aptámeros que tienen como dianas de unión regiones que por su plegamiento y secuencia están predispuestas para interaccionar (Scarabino *et al.*, 1999, Kikuchi, 2003 #413, Kikuchi, 2005 #51). Dos de las regiones de interacción de los aptámeros con el HCV-CRE<sub>194</sub>, que mapean en el subdominio 5BSL3.2, cumplen un rol esencial en el ciclo del HCV mediante la interacción con otros elementos estructurales genómicos o proteínas (Friebe *et al.*, 2005);(Diviney *et al.*, 2008; Romero-López y Berzal-Herranz, 2009; Romero-López y Berzal-Herranz, 2011; Tuplin *et al.*, 2012). Estos motivos estructurales están predispuestos para interaccionar, lo que respalda nuestros resultados de selección de aptámeros capaces de unirse a estas regiones.

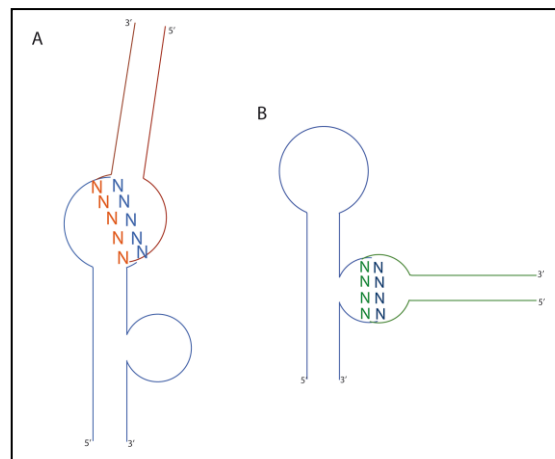
El HCV-CRE<sub>194</sub> tiene otros dos tallos lazos (5BSL3.1 y 5BSL3.3 del HCV-CRE<sub>194</sub>) para los cuales no se han seleccionado aptámeros. Hasta la fecha no se han descrito interacciones moleculares en las que estén implicados dichos tallos lazos. Por lo que es posible que tengan una conformación que no sea tan favorable para la interacción con otras moléculas de RNA y que la conservación en los distintos genotipos se deba a que cumplen un rol estructural. Otra

posibilidad es que estos subdominios hayan evolucionado para interactuar exclusivamente con proteínas. Durante el proceso de selección molecular *in vitro*, las moléculas compiten por su unión al HCV-CRE<sub>194</sub> y al final del proceso, se seleccionan las moléculas cuya unión a la molécula diana se ve favorecida. La presencia en el HCV-CRE<sub>194</sub> de regiones que tienen una predisposición natural para interactuar con otras moléculas de RNA puede explicar el hecho de que no se hayan seleccionado aptámeros capaces de unirse a los dominios 5BSL3.1 y 5BSL3.2.

Debido a la importancia del subdominio 5BSL3.2 para la replicación del HCV, centramos el estudio estructural de los aptámeros capaces de interactuar con el subdominio 5BSL3.2. El estudio de la estructura de los aptámeros se realizó mediante ensayos de sensibilidad a la degradación con la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> de los aptámeros así como utilizando métodos informáticos de predicción de estructura. Como resultado de este análisis se propuso un modelo de estructura secundaria para los aptámeros P7-78, P8-58, P7-14 y P7-71. Todos ellos presentan un tallo lazo y parte del motivo consenso o su totalidad, se localiza en un lazo apical. Las estructuras tipo tallo lazo en moléculas de RNA, frecuentemente en la naturaleza, se encuentran implicadas en el establecimiento de interacciones que permiten la regulación de un gran número de procesos biológicos (revisado en (Brunel *et al.*, 2002)). Un ejemplo de ello, son los RNA *antisense* naturales en donde la interacción inicial requiere de la formación de un complejo reversible e inestable denominado complejo *kissing* que se produce por complementariedad a través de nucleótidos expuestos de sus lazos apicales. El complejo *kissing* evoluciona por la región que flanquean los lazos apicales hacia un complejo más estable conocido como *kissing* extendido (Nordstrom y Wagner, 1994). Las interacciones *kissing* dependen en gran parte de la estructura de los lazos que deben presentar a los nucleótidos para el reconocimiento inicial en una conformación apropiada. La estructura de una interacción *kissing* entre los lazos apicales del RNA TAR de HIV (que tiene el motivo YUNR característico de interacciones de *kissing*) y un tallo lazo con una secuencia complementaria fue determinada por NMR en 1997 (Chang y Tinoco, 1997). Posteriormente se describió la formación de una unión *apical loop-apical loop* en aptámeros seleccionados contra el elemento TAR del HIV y el tRNA<sup>phe</sup> (Duconge y Toulmé, 1999; Scarabino *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta estos trabajos, nuestros resultados nos llevan a proponer un modelo para la interacción entre la variante P7-78 y del subdominio 5BSL3.2. En el modelo propuesto los aptámeros interactuarían con 5BSL3.2 mediante la unión de la secuencia del lazo apical del aptámero al lazo apical del subdominio 5BSL3.2, en una interacción *apical loop-apical loop* (ver figura D. 1. A). Las interacciones del tipo *apical loop-apical loop* no son el único modo de interacción que se ha descrito para la unión de los aptámeros. El estudio



del tipo de interacción de aptámeros dirigidos hacia los tallos lazos IV del IRES y SLI del *X tail* permitió identificar una unión diferente. En estos casos los residuos que interaccionan con los lazos apicales de los subdominios IV y SLI se localizan en un lazo interno de los aptámeros (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002). A este tipo de interacción se le llama ALIL (del inglés, *apical loop-internal loop*). Trabajos posteriores de selección de aptámeros mostraron que es un tipo de interacción frecuente para la unión de aptámeros (Ferrandon *et al.*, 1997; Da Rocha Gomes *et al.*, 2004). Interacciones entre lazos internos y apicales también se han observado en la naturaleza, un ejemplo de esto sucede en el RNA mensajero de *bicoid* donde es necesaria la formación de dos interacciones lazo apical-lazo interno para la dimerización del mensajero y correcta localización en el desarrollo embrionario de *Drosophila* (Ferrandon *et al.*, 1997). En la región 3'UTR del RNA mensajero se localiza el elemento estructural denominado dominio III que tiene una estructura tipo tallo lazo con un lazo interno y uno apical. El lazo apical del dominio III es capaz de interaccionar con el lazo interno del dominio III de otro mRNA codificante para la proteína *bicoid*. Por tanto se forman dos interacciones ALIL simultáneamente que implican los dos lazos apicales y los dos lazos internos RNA mensajeros que dimerizan. Según nuestros resultados del mapeo de los nucleótidos implicados en la interacción de los aptámeros P7-14 y P8-71 con el HCV-CRE<sub>194</sub>, estos se localizan en el lazo interno del 5BSL3.2, lo que nos lleva a proponer el modelo de unión del tipo ALIL como el que se muestra en la figura D. 1. B.



**Figura D. 1: Modelo de interacción entre el subdominio genómico 5BSL3.2 y los aptámeros.** A: Interacción ALAL (*apical loop-apical loop*). Esquema del modelo propuesto para los aptámeros que tienen como diana el lazo apical del subdominio 5BSL3.2. En rojo se señala el aptámero P-78 interaccionando mediante su lazo apical con el lazo apical del dominio 5BSL3.2 señalado en azul. B: Interacción ALIL (*lazo apical-internal loop*). Modelo propuesto para los aptámeros que tienen como diana el lazo interno. Los aptámeros señalados en verde (P7-14 o P8-71) interaccionan con el HCV-CRE<sub>194</sub> mediante su lazo apical con el lazo interno del dominio 5BSL3.2 (en azul).

### 6.3. Estudios funcionales de los aptámeros.

Para evaluar el efecto de los aptámeros en la replicación del HCV se transfectaron células Huh-7 portadoras de replicones subgenómicos del HCV con aptámeros capaces de unirse a diferentes regiones del HCV-CRE<sub>194</sub> y se cuantificaron los niveles de RNA viral.

En el caso de las células transfectadas con los aptámeros del grupo 1 observamos que aunque los resultados del mapeo de la secuencia de interacción muestran que ambos, P6-61 y P7-54, se unen a la misma región en el HCV-CRE<sub>194</sub> estos muestran un efecto diferente en la replicación del genoma del HCV. Mientras que P6-61 no inhibe de manera significativa la replicación del HCV respecto al control, el aptámero P7-54 inhibe un 40%. Ello posiblemente se deba a que si bien los aptámeros comparten la misma diana, son diferentes a nivel de su secuencia y estructura. Esa diferencia estructural puede llevar a que cada aptámero se comporte de manera diferente, presentando como características propias la unión a su molécula blanco y la constante de afinidad. Además, la unión del aptámero, en muchos casos, produce un cambio conformacional en la molécula blanco que también puede estar afectado por la estructura del aptámero en cuestión. Así un cambio conformacional distinto en la molécula blanco podría causar que aptámeros diferentes, a pesar de tener un mismo sitio de unión en la molécula diana, presenten efectos distintos a nivel de la inhibición de la replicación. Por otra parte, en el interior celular el RNA del HCV interacciona con diversos factores de distinta naturaleza y en algunos casos el aptámero debe competir con ellos por su unión. Aptámeros diferentes pueden competir de manera distinta con los factores presentes en el interior celular lo que puede corresponderse con un efecto diferente en los niveles de replicación del HCV.

Hasta la fecha no se ha descrito ningún rol funcional en el ciclo del HCV, ni interacción molecular que impliquen a las dianas de unión para los aptámeros del grupo 1 localizada en la región 5' en el RNA del HCV-CRE<sub>194</sub>. A pesar de ello no podemos descartar que estas existan. De ser así los aptámeros del grupo 1 podrían interferir con las mismas provocando el efecto observado en el caso del aptámero P7-54. Tampoco podemos descartar el hecho de que la unión de los aptámeros en la región 5' del HCV-CRE<sub>194</sub> cause un cambio conformacional en el resto de la molécula afectando a otros elementos de estructura y de esta manera comprometer aspectos de la biología del HCV. De hecho se observa, en el patrón de degradación con Pb<sup>2+</sup> para el RNA del HCV-CRE<sub>194</sub>, que en presencia de los aptámeros del grupo 1, presenta una menor sensibilidad a

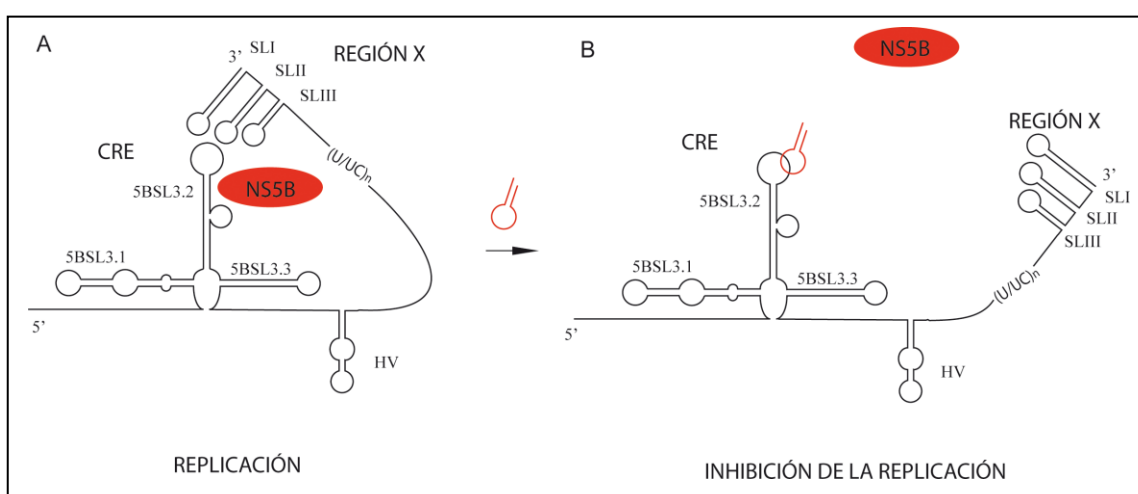
la degradación. La menor sensibilidad a la degradación con  $Pb^{2+}$  se puede correlacionar con un plegamiento más compacto del HCV-CRE<sub>194</sub> en presencia de los aptámeros del grupo 1.

5BSL3.2 interacciona con la proteína NS5B (Lee *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005) y al mismo tiempo interacciona, mediante su lazo apical con el lazo apical SLII de la región 3'UTR (Friebe *et al.*, 2005). Su lazo interno está implicado en dos interacciones funcionales una localizada en la región codificante para la proteína NS5B que está centrada en el nucleótido 9110 (Diviney *et al.*, 2008; Tuplin *et al.*, 2012), y con el subdominio IIIId del IRES (Romero-López y Berzal-Herranz, 2009; Romero-López y Berzal-Herranz, 2011). Esta red de interacciones tiene un rol importante en varios aspectos esenciales para el ciclo viral, como la replicación y traducción, sugiriendo que puede actuar como un modulador en el cambio entre un proceso y otro. Todo ello, podría explicar la gran variabilidad de inhibición observada para los aptámeros que utilizan el subdominio 5BSL3.2 como diana de unión.

Las células transfectadas con los aptámeros del grupo 2 pueden presentar una disminución en los niveles virales de hasta un 70%. Estos resultados corroboran los datos obtenidos de la competición de la RNA polimerasa recombinante, NS5B $\Delta$ 21, en donde los aptámeros P7-78 y P8-58 eran capaces de competir hasta un 80% la unión *in vitro* de la proteína al RNA viral. Ambos experimentos se han realizado en sistemas muy distintos como lo son el sistema *in vivo* e *in vitro*. *In vivo*, el RNA está inmerso en un entorno donde es capaz de unirse a otros factores, como proteínas celulares o virales que faciliten o recluten a la RNA polimerasa viral para unirse al genoma. Además estos experimentos consideran aspectos diferentes en el proceso replicativo como son la unión de la proteína al RNA viral y los niveles de RNA virales fruto de la replicación. Aunque los niveles de competición de la unión son muy buenos, los aptámeros no inhiben completamente la unión de la RNA polimerasa al RNA viral. Algunas RNA polimerasas, NS5B siguen siendo capaces de unirse al extremo 3' del HCV y la unión y actividad de unas pocas, pueden ser responsables de los niveles de replicación observados en las células transfectadas con los aptámeros del grupo 2.

Adicionalmente a la competición de la unión de la RNA polimerasa viral, la unión de los aptámeros al lazo apical del subdominio 5BSL3.2 puede interferir con la replicación mediante otro mecanismo. Friebe *et al* describieron que esta región interacciona con el lazo apical del subdominio SLII del *X tail*, formando un complejo *kissing loop* (Friebe *et al.*, 2005). Ellos demostraron mediante mutaciones en las secuencias de los lazos y rescate de función, que el complejo *kissing loop* es esencial para la replicación (Friebe *et al.*, 2005). Sin perjuicio de que la

inhibición de la unión de la RNA polimerasa por parte de los aptámeros del grupo 2 pueda afectar los niveles de replicación del RNA del HCV; no podemos descartar que la unión de los aptámeros al lazo apical podría interferir con la formación del complejo *kissing loop* entre el lazo apical y el subdominio SLII y de esta forma los aptámeros del grupo 2 podrían afectar negativamente a la replicación (ver figura D.2). En relación con esta hipótesis, el tratamiento de células portadoras de replicones subgenómicos con RNAs *antisense* que tienen como diana los subdominios SLIII, SLII y SLI del *X tail* muestran niveles similares de inhibición de la replicación (40-50%) (Ahn *et al.*, 2011) a los datos aquí aportados para algunos de los aptámeros que se unen al lazo apical.



**Figura D.2: Modelo propuesto para el mecanismo de acción de los aptámeros del grupo 2.** A: El subdominio 5BSL3.2 interacciona con la proteína NS5B y mediante su lazo apical, con el lazo SLII del *X tail*. Ambas interacciones son esenciales para la replicación del HCV. B: La unión de los aptámeros al lazo apical del subdominio 5BSL3.2 puede interferir con la unión de NS5B y/o de SLII. El bloqueo de alguna de estas interacciones puede llevar a la inhibición de la replicación viral.

Los experimentos de transfección de las células con los aptámeros del grupo 3 mostraron una disminución de un 40-60% en los niveles de RNA virales. Los resultados del mapeo mediante protección con RNasa T1 y  $Pb^{2+}$  mostraron que los aptámeros del grupo 3 son capaces de unirse al lazo interno del subdominio 5BSL3.2. El lazo interno del subdominio 5BSL3.2 ha sido descrito como uno de los sitios de interacción RNA-RNA con regiones genómicas alejadas en secuencia del HCV. El lazo interno del subdominio 5BSL3.2 interacciona con el subdominio III d de la región del IRES participando en la regulación de la traducción (Romero-López y Berzal-Herranz, 2009; Romero-López y Berzal-Herranz, 2011). El subdominio III d del IRES es esencial para la traducción, es el sitio al que se le une el factor de iniciación de la traducción eIF3 y contacta directamente con la subunidad ribosomal 40S (Kieft *et al.*, 2001). El subdominio 5BSL3.2 causa una disminución del efecto potenciador de la traducción ejercido por la región 3'UTR (Romero-

López y Berzal-Herranz, 2011). En el sistema replicón utilizado en este estudio, las proteínas virales son sintetizadas de manera dependiente del IRES del virus de la encefalomiocarditis. De esta forma, en el sistema utilizado no es posible evaluar el efecto que le causa a la replicación el interferir con la interacción entre el IRES del HCV y el subdominio 5BSL3.2. Se ha descrito que el lazo interno del subdominio 5BSL3.2 interacciona además con una región de la secuencia codificante para NS5B que se localiza 200 nucleótidos 5' a 5BSL3.2. Esta región forma un tallo lazo, está centrada en el nucleótido 9110 (Diviney *et al.*, 2008; Tuplin *et al.*, 2012) y se ha propuesto que la interacción con el tallo lazo SL9110 tiene un rol en controlar la replicación del HCV. A pesar de lo que se conoce acerca de las interacciones que implican al lazo interno del subdominio 5BSL3.2, no está del todo claro cuál es la función de las mismas, ni el mecanismo de acción mediante el cual podrían estar operando ya que al parecer estarían implicados distintos aspectos del ciclo viral como la traducción y replicación. Posiblemente la unión de los aptámeros al lazo interno pueda afectar aspectos necesarios para el ciclo viral.

El aptámero P9-15 presenta unos niveles de inhibición de la replicación de aproximadamente 50%, muy similares a los de los aptámeros del grupo 1 y 3. Como se detalló anteriormente el mapeo de la región de interacción en el HCV-CRE<sub>194</sub> para el aptámero P9-15 no se corresponde con la diana de unión teórica para los aptámeros del grupo 4, sino que se protegen los residuos correspondientes a las secuencias localizadas en la región 5' del HCV-CRE<sub>194</sub> (grupo 1) y en el lazo interno del subdominio 5BSL3.2 (grupo 3). Estos resultados sugieren que aunque P9-15 tiene el motivo consenso del grupo 4, el efecto inhibitor observado esté mediado por un mecanismo semejante sino el mismo al que operarían los aptámeros pertenecientes al grupo 1 ó 3.

Las células transfectadas con el aptámero P9-8 que pertenece al grupo 5 presentan una inhibición en los niveles de replicación del RNA del HCV de aproximadamente un 75%. En este caso, la secuencia consenso mapea en una región próxima al codón de terminación de la traducción de la poliproteína. La unión de los aptámeros en esta región podría interferir con el mecanismo de terminación de la traducción provocando la síntesis de proteínas no funcionales.

Con la finalidad de evaluar si la capacidad inhibitor de la replicación del HCV observada para los aptámeros analizados se extendía para otros aptámeros seleccionados. Se realizaron ensayos de transfección de células Huh-7 portadoras de replicones subgenómicos con otros aptámeros pertenecientes a los diferentes grupos y se cuantificaron los niveles de RNA virales. En general los niveles de RNA del HCV en la mayoría de células transfectadas son similares a

los datos obtenidos para los aptámeros analizados anteriormente. Sin embargo, en algunos casos se puede llegar a observar una inhibición de hasta un 80% en la replicación del RNA del HCV. El aptámero P6-45 que presenta estos tan prometedores niveles de inhibición posee motivos consenso del grupo 1 y del grupo 4 que tienen como diana teórica las secuencias localizadas en la región 5' del HCV-CRE<sub>194</sub> y en la región entre los tallos lazos 5BSL3.2 y 5BSL3.3.

En los experimentos de inhibición realizados en células Huh-7 portadoras de sistemas replicones se pone de manifiesto el gran potencial antiviral de estas moléculas obtenidas por selección. Al considerar estos aptámeros como posibles candidatos para el desarrollo de agentes anti-HCV, es necesario tener en cuenta la estructura en cuasiespecies que presenta la población del HCV. No obstante para evitar la aparición de variantes resistentes, se podría proponer el uso combinado de diversos aptámeros anti-CRE o en conjunto con aptámeros dirigidos a dianas en otros dominios genómicos.

En una etapa posterior al estudio del dominio CRE como diana terapéutica se podría analizar el efecto de los aptámeros en un modelo animal. Debido a que el virus de la hepatitis C solo infecta humanos y chimpancés, hasta hace poco no se contaba con un modelo animal de ratón que permitiera una fácil manipulación en el laboratorio. Recientemente se desarrollaron ratones quiméricos con células hepáticas humanas. Los ratones son *knockout* para los genes *Fah*<sup>-/-</sup>/*Rag2*<sup>-/-</sup>/*Il2rg*<sup>-/-</sup>. El primer gen codifica para la proteína fumarylacetoacetato hidrolasa que participa en el catabolismo de la tirosina. Los ratones deficientes en esta proteína desarrollan enfermedad hepática y entonces son un buen modelo para la repoblación del hígado con células hepáticas humanas. El gen *Rag2* codifica una recombinasa que es esencial para la recombinación VDJ necesaria para la maduración de las células T y B. El gen *Il2rg* codifica para un receptor de citoquinas expresado en la mayoría de los linfocitos. La activación del receptor *Il2rg* estimula el crecimiento y maduración de los linfocitos. La ausencia de una respuesta inmunológica de este tipo permite que los ratones no rechacen los hepatocitos humanos. De esta forma, los ratones deficientes en estas proteínas pueden ser repoblados eficientemente por hepatocitos humanos e infectados con el virus de la hepatitis C (Bissig *et al.*). Lo que los hace un buen modelo para el estudio del efecto que podrían tener los aptámeros seleccionados en la replicación del HCV *in vivo*. De esta forma podríamos observar si los ratones infectados con el virus del HCV al ser tratados con los aptámeros dirigidos al dominio CRE son capaces de inhibir el ciclo viral en un sistema mucho más complejo que el cultivo celular.

El estudio de los dominios genómicos como dianas para la acción de una terapia antiviral es interesante debido a que su alta conservación podría disminuir la aparición de variantes resistentes. Esto último es la principal limitación de las terapias existentes que tienen como blanco de acción la proteína NS3. En el presente trabajo se realizó la caracterización directa del dominio CRE como posible diana terapéutica. Para ello se optó por afectar sus funciones mediante el uso de aptámeros, ya que mediante esta estrategia es posible preservar aspectos importantes para la biología del HCV, tales como la integridad genómica, o la disponibilidad de la RNA polimerasa. Los datos aportados en este trabajo muestran que los aptámeros seleccionados contra el dominio CRE son capaces de inhibir hasta un 80% la replicación genómica del HCV en sistemas replicones. Ello pone de manifiesto el gran potencial del dominio CRE como diana para la acción de fármacos, muestra el uso de los aptámeros en el estudio de procesos claves del ciclo viral como lo es la replicación y a su vez posiciona a los aptámeros seleccionados como potenciales candidatos para el desarrollo de agentes antivirales.

## 7. Conclusiones

- 1) Se seleccionaron una colección de moléculas que pueden distribuirse en 5 grupos definidas cada una por un motivo consenso complementario a una secuencia única en el RNA diana HCV-CRE<sub>194</sub>.
- 2) Los análisis de sensibilidad a la degradación con la RNasa T1 y Pb<sup>2+</sup> permitieron corroborar experimentalmente cuatro de las dianas de unión de los aptámeros que se correspondían con las secuencias complementarias a los motivos consensos en el HCV-CRE<sub>194</sub>.
- 3) El análisis del patrón de degradación de los aptámeros demostró que la mayoría de ellos interactúan con el RNA diana mediante los nucleótidos del motivo consenso.
- 4) La estructura secundaria de los aptámeros que tienen como dianas de unión el subdominio 5BSL3.2 puede ajustarse a estructuras del tipo tallo lazo donde la mayor parte del motivo consenso se localiza expuestos en el lazo.
- 5) Los resultados de los ensayos de competición de la unión de la RNA polimerasa al extremo 3' del genoma del HCV mostraron que aquellos que se unen al lazo apical, son capaces de competir la unión de la proteína. Sugiriendo un mecanismo de inhibición de la replicación del genoma del HCV en los sistemas replicones diferente para estos aptámeros.
- 6) Los aptámeros seleccionados son capaces de inhibir hasta un 80% los niveles de replicación en sistemas replicones del HCV, poniendo de manifiesto que el HCV-CRE<sub>194</sub> es una buena diana terapéutica.





## 8. Bibliografía

- Ago, H., T. Adachi, A. Yoshida, M. Yamamoto, N. Habuka, K. Yatsunami y M. Miyano** (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." *Structure* **7**(11): 1417-26.
- Ahn, D. G., S. B. Shim, J. E. Moon, J. H. Kim, S. J. Kim y J. W. Oh** (2011). "Interference of hepatitis C virus replication in cell culture by antisense peptide nucleic acids targeting the X-RNA." *J Viral Hepat* **18**(7): e298-306.
- Aizaki, H., K. J. Lee, V. M. Sung, H. Ishiko y M. M. Lai** (2004). "Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts." *Virology* **324**(2): 450-61.
- Alberti, A., S. Boccardo, A. Vario y L. Benvegno** (2002). "Therapy of acute hepatitis C." *Hepatology* **36**(5 Suppl 1): S195-200.
- Aldaz-Carroll, L., B. Tallet, E. Dausse, L. Yurchenko y J. J. Toulmé** (2002). "Apical loop-internal loop interactions: a new RNA-RNA recognition motif identified through in vitro selection against RNA hairpins of the hepatitis C virus mRNA." *Biochemistry* **41**(18): 5883-93.
- Ali Ashfaq, U., M. Ansar, M. T. Sarwar, T. Javed, S. Rehman y S. Riazuddin** (2011). "Post-transcriptional inhibition of hepatitis C virus replication through small interference RNA." *Virol J* **8**: 112.
- Alotte, C., A. Martin, S. A. Caldarelli, A. Di Giorgio, R. Condom, F. Zoulim, D. Durantel y O. Hantz** (2008). "Short peptide nucleic acids (PNA) inhibit hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) dependent translation in vitro." *Antiviral Res* **80**(3): 280-7.
- Alt, M., S. Eisenhardt, M. Serwe, R. Renz, J. W. Engels y W. H. Caselmann** (1999). "Comparative inhibitory potential of differently modified antisense oligodeoxynucleotides on hepatitis C virus translation." *Eur J Clin Invest* **29**(10): 868-76.
- Alt, M., R. Renz, P. H. Hofschneider y W. H. Caselmann** (1997). "Core specific antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides as potent and specific inhibitors of hepatitis C viral translation." *Arch Virol* **142**(3): 589-99.
- Alt, M., R. Renz, P. H. Hofschneider, G. Paumgartner y W. H. Caselmann** (1995). "Specific inhibition of hepatitis C viral gene expression by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides." *Hepatology* **22**(3): 707-17.
- André, P., G. Perlemuter, A. Budkowska, C. Bréchet y V. Lotteau** (2005). "Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism." *Semin Liver Dis* **25**(1): 93-104.
- Ansar, M., U. A. Ashfaq, I. Shahid, M. T. Sarwar, T. Javed, S. Rehman, S. Hassan y S. Riazuddin** (2011). "Inhibition of full length hepatitis C virus particles of 1a genotype through small interference RNA." *Virol J* **8**: 203.
- Bartenschlager, R., M. Frese y T. Pietschmann** (2004). "Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence." *Adv Virus Res* **63**: 71-180.
- Beales, L. P., D. J. Rowlands y A. Holzenburg** (2001). "The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy." *Rna* **7**(5): 661-70.

- Beguiristain, N., H. D. Robertson y J. Gomez** (2005). "RNase III cleavage demonstrates a long range RNA: RNA duplex element flanking the hepatitis C virus internal ribosome entry site." *Nucleic Acids Res* **33**(16): 5250-61.
- Bellon-Echeverria, I., A. J. Lopez-Jimenez, P. Clemente-Casares y A. Mas** (2010). "Monitoring hepatitis C virus (HCV) RNA-dependent RNA polymerase oligomerization by a FRET-based in vitro system." *Antiviral Res* **87**(1): 57-66.
- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov y P. E. Bourne** (2000). "The Protein Data Bank." *Nucleic Acids Res* **28**(1): 235-42.
- Berry, K. E., S. Waghay, S. A. Mortimer, Y. Bai y J. A. Doudna** (2011). "Crystal structure of the HCV IRES central domain reveals strategy for start-codon positioning." *Structure* **19**(10): 1456-66.
- Bielinska, A., R. A. Shivdasani, L. Q. Zhang y G. J. Nabel** (1990). "Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides." *Science* **250**(4983): 997-1000.
- Bigger, C. B., K. M. Brasky y R. E. Lanford** (2001). "DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection." *J Virol* **75**(15): 7059-66.
- Bissig, K. D., S. F. Wieland, P. Tran, M. Isogawa, T. T. Le, F. V. Chisari y I. M. Verma** (2010). "Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment." *J Clin Invest* **120**(3): 924-30.
- Blight, K. J. y C. M. Rice** (1997). "Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA." *J Virol* **71**(10): 7345-52.
- Boiziau, C., E. Dausse, L. Yurchenko y J. J. Toulmé** (1999). "DNA aptamers selected against the HIV-1 trans-activation-responsive RNA element form RNA-DNA kissing complexes." *J Biol Chem* **274**(18): 12730-7.
- Borgatti, M., I. Lampronti, A. Romanelli, C. Pedone, M. Saviano, N. Bianchi, C. Mischiati y R. Gambari** (2003). "Transcription factor decoy molecules based on a peptide nucleic acid (PNA)-DNA chimera mimicking Sp1 binding sites." *J Biol Chem* **278**(9): 7500-9.
- Bradrick, S. S., R. W. Walters y M. Gromeier** (2006). "The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase." *Nucleic Acids Res* **34**(4): 1293-303.
- Branch, A. D. y H. D. Robertson** (1991). "Efficient trans cleavage and a common structural motif for the ribozymes of the human hepatitis delta agent." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10163-7.
- Branch, A. D., D. D. Stump, J. A. Gutierrez, F. Eng y J. L. Walewski** (2005). "The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others." *Semin Liver Dis* **25**(1): 105-17.
- Bressanelli, S., L. Tomei, F. A. Rey y R. De Francesco** (2002). "Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides." *J Virol* **76**(7): 3482-92.

- Bressanelli, S., L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R. L. Vitale, M. Mathieu, R. De Francesco y F. A. Rey** (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13034-9.
- Brown-Driver, V., T. Eto, E. Lesnik, K. P. Anderson y R. C. Hanecak** (1999). "Inhibition of translation of hepatitis C virus RNA by 2'-modified antisense oligonucleotides." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **9**(2): 145-54.
- Brunel, C., R. Marquet, P. Romby y C. Ehresmann** (2002). "RNA loop-loop interactions as dynamic functional motifs." *Biochimie* **84**(9): 925-44.
- Buhler, S. y R. Bartenschlager** (2012). "New targets for antiviral therapy of chronic hepatitis C." *Liver Int* **32** Suppl 1: 9-16.
- Bukh, J., R. H. Purcell y R. H. Miller** (1992). "Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 4942-6.
- Buzayan, J. M., W. L. Gerlach y G. Bruening** (1986). "Non-enzymatic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA." *Nature* **323**: 349-353.
- Buzayan, J. M., W. L. Gerlach y G. Bruening** (1986). "Satellite tobacco ringspot virus RNA: A subset of the RNA sequence is sufficient for autolytic processing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(23): 8859-62.
- Buzayan, J. M., A. Hampel y G. Bruening** (1986). "Nucleotide sequence and newly formed phosphodiester bond of spontaneously ligated satellite tobacco ringspot virus RNA." *Nucleic Acids Res* **14**(24): 9729-43.
- Ciesiolka, J., D. Michalowski, J. Wrzesinski, J. Krajewski y W. J. Krzyzosiak** (1998). "Patterns of cleavages induced by lead ions in defined RNA secondary structure motifs." *J Mol Biol* **275**(2): 211-20.
- Cox, A. L., T. Mosbrugger, Q. Mao, Z. Liu, X. H. Wang, H. C. Yang, J. Sidney, A. Sette, D. Pardoll, D. L. Thomas y S. C. Ray** (2005). "Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans." *J Exp Med* **201**(11): 1741-52.
- Crinelli, R., M. Bianchi, L. Gentilini, L. Palma y M. Magnani** (2004). "Locked nucleic acids (LNA): versatile tools for designing oligonucleotide decoys with high stability and affinity." *Curr Drug Targets* **5**(8): 745-52.
- Crotty, S., C. Cameron y R. Andino** (2002). "Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis?" *J Mol Med (Berl)* **80**(2): 86-95.
- Chang, K. Y. y I. Tinoco, Jr.** (1997). "The structure of an RNA "kissing" hairpin complex of the HIV TAR hairpin loop and its complement." *J Mol Biol* **269**(1): 52-66.
- Cheng, J. C., M. F. Chang y S. C. Chang** (1999). "Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA." *J Virol* **73**(8): 7044-9.
- Chevalier, C., A. Saulnier, Y. Benureau, D. Flechet, D. Delgrange, F. Colbere-Garapin, C. Wychowski y A. Martin** (2007). "Inhibition of hepatitis C virus infection in cell culture by small interfering RNAs." *Mol Ther* **15**(8): 1452-62.

- Chomczynski, P. y N. Sacchi** (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley y M. Houghton** (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." *Science* **244**(4902): 359-62.
- Da Rocha Gomes, S., E. Dausse y J. J. Toulmé** (2004). "Determinants of apical loop-internal loop RNA-RNA interactions involving the HCV IRES." *Biochem Biophys Res Commun* **322**(3): 820-6.
- Dahari, H., M. Major, X. Zhang, K. Mihalik, C. M. Rice, A. S. Perelson, S. M. Feinstone y A. U. Neumann** (2005). "Mathematical modeling of primary hepatitis C infection: noncytolytic clearance and early blockage of virion production." *Gastroenterology* **128**(4): 1056-66.
- Diepolder, H. M., R. Zachoval, R. M. Hoffmann, E. A. Wierenga, T. Santantonio, M. C. Jung, D. Eichenlaub y G. R. Pape** (1995). "Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection." *Lancet* **346**(8981): 1006-7.
- Diviney, S., A. Tuplin, M. Struthers, V. Armstrong, R. M. Elliott, P. Simmonds y D. J. Evans** (2008). "A hepatitis C virus cis-acting replication element forms a long-range RNA-RNA interaction with upstream RNA sequences in NS5B." *J Virol* **82**(18): 9008-22.
- Domingo, E., C. Escarmis, N. Sevilla, A. Moya, S. F. Elena, J. Quer, I. S. Novella y J. J. Holland** (1996). "Basic concepts in RNA virus evolution." *Faseb J* **10**(8): 859-64.
- Domingo, E., D. Sabo, T. Taniguchi y C. Weissmann** (1978). "Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population." *Cell* **13**(4): 735-44.
- Drake, J. W., B. Charlesworth, D. Charlesworth y J. F. Crow** (1998). "Rates of spontaneous mutation." *Genetics* **148**(4): 1667-86.
- Duconge, F. y J. J. Toulmé** (1999). "In vitro selection identifies key determinants for loop-loop interactions: RNA aptamers selective for the TAR RNA element of HIV-1." *RNA* **5**(12): 1605-14.
- Dutkiewicz, M. y J. Ciesiolka** (2005). "Structural characterization of the highly conserved 98-base sequence at the 3' end of HCV RNA genome and the complementary sequence located at the 5' end of the replicative viral strand." *Nucleic Acids Res* **33**(2): 693-703.
- Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour y K. Bienz** (2002). "Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex." *J Virol* **76**(12): 5974-84.
- Eigen, M. y P. Schuster** (1977). "The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle." *Naturwissenschaften* **64**(11): 541-65.
- el-Awady, M. K., N. G. el-Din, W. T. el-Garf, S. S. Youssef, M. H. Omran, J. el-Abd y S. A. Goueli** (2006). "Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus genotype 4 replication in HepG2 cells." *Cancer Cell Int* **6**: 18.
- Ellington, A. D. y J. W. Szostak** (1990). "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands." *Nature* **346**(6287): 818-22.

- Enomoto, N., I. Sakuma, Y. Asahina, M. Kurosaki, T. Murakami, C. Yamamoto, N. Izumi, F. Marumo y C. Sato** (1995). "Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region." *J Clin Invest* **96**(1): 224-30.
- Farci, P., A. Shimoda, A. Coiana, G. Diaz, G. Peddis, J. C. Melpolder, A. Strazzera, D. Y. Chien, S. J. Munoz, A. Balestrieri, R. H. Purcell y H. J. Alter** (2000). "The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies." *Science* **288**(5464): 339-44.
- Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian, R. H. Purcell, H. J. Alter y P. V. Holland** (1975). "Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B." *N Engl J Med* **292**(15): 767-70.
- Feldstein, P. A., J. M. Buzayan y G. Bruening** (1989). "Two sequences participating in the autolytic processing of satellite tobacco ringspot virus complementary RNA." *Gene* **82**(1): 53-61.
- Ferrandon, D., I. Koch, E. Westhof y C. Nusslein-Volhard** (1997). "RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFIN ribonucleoprotein particles." *Embo J* **16**(7): 1751-8.
- Ferrari, E., J. Wright-Minogue, J. W. Fang, B. M. Baroudy, J. Y. Lau y Z. Hong** (1999). "Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in Escherichia coli." *J Virol* **73**(2): 1649-54.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver y C. C. Mello** (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-11.
- Friebe, P. y R. Bartenschlager** (2002). "Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication." *J Virol* **76**(11): 5326-38.
- Friebe, P., J. Boudet, J. P. Simorre y R. Bartenschlager** (2005). "Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication." *J Virol* **79**(1): 380-92.
- Friebe, P., V. Lohmann, N. Krieger y R. Bartenschlager** (2001). "Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication." *J Virol* **75**(24): 12047-57.
- Fukuda, K., Y. Toyokawa, K. Kikuchi, K. Konno, R. Ishihara, C. Fukazawa, S. Nishikawa y T. Hasegawa** (2008). "Isolation of RNA aptamers specific for the 3' X tail of HCV." *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* **52**(1): 205-6.
- Gagnon, K. T. y D. R. Corey** (2012). "Argonaute and the nuclear RNAs: new pathways for RNA-mediated control of gene expression." *Nucleic Acid Ther* **22**(1): 3-16.
- Gale, M. J., Jr., M. J. Korth, N. M. Tang, S. L. Tan, D. A. Hopkins, T. E. Dever, S. J. Polyak, D. R. Gretch y M. G. Katze** (1997). "Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein." *Virology* **230**(2): 217-27.
- Gamble, C., M. Trotard, J. Le Seyec, V. Abreu-Guerniou, N. Gernigon, F. Berree, B. Carboni, B. Felden y R. Gillet** (2009). "Antiviral effect of ribonuclease conjugated oligodeoxynucleotides targeting the IRES RNA of the hepatitis C virus." *Bioorg Med Chem Lett* **19**(13): 3581-5.

- Georgopapadakou, N.** (2007). "Discontinued drugs in 2005: anti-infectives." *Expert Opin Investig Drugs* **16**(1): 1-10.
- Gerlach, J. T., H. Diepolder y G. R. Pape** (1999). "Determination of Hepatitis C Virus-Specific CD4(+) T-Cell Activity in PBMC." *Methods Mol Med* **19**: 413-22.
- Gonzalez-Carmona, M. A., S. Schussler, M. Serwe, M. Alt, J. Ludwig, B. S. Sproat, R. Steigerwald, P. Hoffmann, M. Quasdorff, O. Schildgen y W. H. Caselmann** (2006). "Hammerhead ribozymes with cleavage site specificity for NUH and NCH display significant anti-hepatitis C viral effect in vitro and in recombinant HepG2 and CCL13 cells." *J Hepatol* **44**(6): 1017-25.
- Gonzalez-Carmona, M. A., A. Vogt, T. Heinicke, M. Quasdorff, P. Hoffmann, Y. Yildiz, C. Schneider, M. Serwe, R. Bartenschlager, T. Sauerbruch y W. H. Caselmann** (2011). "Inhibition of hepatitis C virus gene expression by adenoviral vectors encoding antisense RNA in vitro and in vivo." *J Hepatol* **55**(1): 19-28.
- Goodchild, J.** (2000). "Hammerhead ribozymes: biochemical and chemical considerations." *Curr Opin Mol Ther* **2**(3): 272-81.
- Gosert, R., D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H. E. Blum, K. Bienz y D. Moradpour** (2003). "Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons." *J Virol* **77**(9): 5487-92.
- Grakoui, A., D. W. McCourt, C. Wychowski, S. M. Feinstone y C. M. Rice** (1993). "Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites." *J Virol* **67**(5): 2832-43.
- Gredell, J. A., A. K. Berger y S. P. Walton** (2008). "Impact of target mRNA structure on siRNA silencing efficiency: A large-scale study." *Biotechnol Bioeng* **100**(4): 744-55.
- Green, R., A. D. Ellington y J. W. Szostak** (1990). "In vitro genetic analysis of the Tetrahymena self-splicing intron." *Nature* **347**(6291): 406-8.
- Group, E. S.** (2002). "Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration." *Retina* **22**(2): 143-52.
- Guerniou, V., R. Gillet, F. Berree, B. Carboni y B. Felden** (2007). "Targeted inhibition of the hepatitis C internal ribosomal entry site genomic RNA with oligonucleotide conjugates." *Nucleic Acids Res* **35**(20): 6778-87.
- Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace y S. Altman** (1983). "The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme." *Cell* **35**(3 Pt 2): 849-57.
- Halfon, P. y S. Locarnini** (2011). "Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors." *J Hepatol* **55**(1): 192-206.
- Hamazaki, H., S. Ujino, N. Miyano-Kurosaki, K. Shimotohno y H. Takaku** (2006). "Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons." *Biochem Biophys Res Commun* **343**(3): 988-94.

- Hamilton, A. J. y D. C. Baulcombe** (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." *Science* **286**(5441): 950-2.
- Hampel, A. y R. Tritz** (1989). "RNA catalytic properties of the minimum (-)sTRSV sequence." *Biochemistry* **28**(12): 4929-33.
- Hampel, A., R. Tritz, M. Hicks y P. Cruz** (1990). "'Hairpin' catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA." *Nucleic Acids Res* **18**(2): 299-304.
- Han, J. H. y M. Houghton** (1992). "Group specific sequences and conserved secondary structures at the 3' end of HCV genome and its implication for viral replication." *Nucleic Acids Res* **20**(13): 3520.
- Hanahan, D. y M. Meselson** (1983). "Plasmid screening at high colony density." *Methods Enzymol* **100**: 333-42.
- Hanecak, R., V. Brown-Driver, M. C. Fox, R. F. Azad, S. Furusako, C. Nozaki, C. Ford, H. Sasmor y K. P. Anderson** (1996). "Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus gene expression in transformed hepatocytes." *J Virol* **70**(8): 5203-12.
- Heintges, T., J. Encke, J. zu Putlitz y J. R. Wands** (2001). "Inhibition of hepatitis C virus NS3 function by antisense oligodeoxynucleotides and protease inhibitor." *J Med Virol* **65**(4): 671-80.
- Henry, S. D., P. van der Wegen, H. J. Metselaar, H. W. Tilanus, B. J. Scholte y L. J. van der Laan** (2006). "Simultaneous targeting of HCV replication and viral binding with a single lentiviral vector containing multiple RNA interference expression cassettes." *Mol Ther* **14**(4): 485-93.
- Hijikata, M., H. Mizushima, T. Akagi, S. Mori, N. Kakiuchi, N. Kato, T. Tanaka, K. Kimura y K. Shimotohno** (1993). "Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus." *J Virol* **67**(8): 4665-75.
- Hofacker, I. L., M. Fekete, C. Flamm, M. A. Huynen, S. Rauscher, P. E. Stolorz y P. F. Stadler** (1998). "Automatic detection of conserved RNA structure elements in complete RNA virus genomes." *Nucleic Acids Res* **26**(16): 3825-36.
- Hofacker, I. L. y H. Tafer** (2010). "Designing optimal siRNA based on target site accessibility." *Methods Mol Biol* **623**: 137-54.
- Honda, M., E. A. Brown y S. M. Lemon** (1996). "Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA." *Rna* **2**(10): 955-68.
- Hoofnagle, J. H.** (1997). "Hepatitis C: the clinical spectrum of disease." *Hepatology* **26**(3 Suppl 1): 15S-20S.
- Hosoya, T., H. Takeuchi, Y. Kanesaka, H. Yamakawa, N. Miyano-Kurosaki, K. Takai, N. Yamamoto y H. Takaku** (1999). "Sequence-specific inhibition of a transcription factor by circular dumbbell DNA oligonucleotides." *FEBS Lett* **461**(3): 136-40.
- Hutchins, C. J., P. D. Rathjen, A. C. Forster y R. H. Symons** (1986). "Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid." *Nucleic Acids Res* **14**(9): 3627-40.



- Ito, T. y M. M. Lai** (1997). "Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome." *J Virol* **71**(11): 8698-706.
- Ivashkina, N., B. Wolk, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H. E. Blum, F. Penin y D. Moradpour** (2002). "The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment." *J Virol* **76**(24): 13088-93.
- Jackson, A. L., S. R. Bartz, J. Schelter, S. V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet y P. S. Linsley** (2003). "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi." *Nat Biotechnol* **21**(6): 635-7.
- Jacobson, I. M., J. G. McHutchison, G. Dusheiko, A. M. Di Bisceglie, K. R. Reddy, N. H. Bzowej, P. Marcellin, A. J. Muir, P. Ferenci, R. Flisiak, J. George, M. Rizzetto, D. Shouval, R. Sola, R. A. Terg, E. M. Yoshida, N. Adda, L. Bengtsson, A. J. Sankoh, T. L. Kieffer, S. George, R. S. Kauffman y S. Zeuzem** (2011). "Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection." *N Engl J Med* **364**(25): 2405-16.
- Kaito, M., S. Watanabe, K. Tsukiyama-Kohara, K. Yamaguchi, Y. Kobayashi, M. Konishi, M. Yokoi, S. Ishida, S. Suzuki y M. Kohara** (1994). "Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study." *J Gen Virol* **75** ( Pt 7): 1755-60.
- Kantzanou, M., M. Lucas, E. Barnes, H. Komatsu, G. Dusheiko, S. Ward, G. Harcourt y P. Klenerman** (2003). "Viral escape and T cell exhaustion in hepatitis C virus infection analysed using Class I peptide tetramers." *Immunol Lett* **85**(2): 165-71.
- Kapadia, S. B., A. Brideau-Andersen y F. V. Chisari** (2003). "Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 2014-8.
- Kaplan, D. E., K. Sugimoto, K. Newton, M. E. Valiga, F. Ikeda, A. Aytaman, F. A. Nunes, M. R. Lucey, B. A. Vance, R. H. Vonderheide, K. R. Reddy, J. A. McKeating y K. M. Chang** (2007). "Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C." *Gastroenterology* **132**(2): 654-66.
- Khaliq, S., S. Jahan, B. Ijaz, W. Ahmad, S. Asad y S. Hassan** (2011). "Inhibition of hepatitis C virus genotype 3a by siRNAs targeting envelope genes." *Arch Virol* **156**(3): 433-42.
- Khaliq, S., S. Jahan, B. Ijaz, W. Ahmad, S. Asad, A. Pervaiz, B. Samreen, M. Khan y S. Hassan** (2010). "Inhibition of core gene of HCV 3a genotype using synthetic and vector derived siRNAs." *Virol J* **7**: 318.
- Kieft, J. S., K. Zhou, R. Jubin y J. A. Doudna** (2001). "Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA." *Rna* **7**(2): 194-206.
- Kikuchi, K., T. Umehara, K. Fukuda, J. Hwang, A. Kuno, T. Hasegawa y S. Nishikawa** (2003). "RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region." *J Biochem* **133**(3): 263-70.
- Kikuchi, K., T. Umehara, K. Fukuda, A. Kuno, T. Hasegawa y S. Nishikawa** (2005). "A hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) domain III-IV-targeted aptamer inhibits translation by binding to an apical loop of domain III." *Nucleic Acids Res* **33**(2): 683-92.

- Kim, M., H. Kim, S. P. Cho y M. K. Min** (2002). "Template requirements for de novo RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase on the viral X RNA." *J Virol* **76**(14): 6944-56.
- Kim, Y. K., C. S. Kim, S. H. Lee y S. K. Jang** (2002). "Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication." *Biochem Biophys Res Commun* **290**(1): 105-12.
- Kim, Y. K., S. H. Lee, C. S. Kim, S. K. Seol y S. K. Jang** (2003). "Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation." *RNA* **9**(5): 599-606.
- Kole, R., A. R. Krainer y S. Altman** (2012). "RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides." *Nat Rev Drug Discov* **11**(2): 125-40.
- Kolupaeva, V. G., T. V. Pestova y C. U. Hellen** (2000). "An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus." *J Virol* **74**(14): 6242-50.
- Kolykhalov, A. A., E. V. Agapov, K. J. Blight, K. Mihalik, S. M. Feinstone y C. M. Rice** (1997). "Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA." *Science* **277**(5325): 570-4.
- Kolykhalov, A. A., S. M. Feinstone y C. M. Rice** (1996). "Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA." *J Virol* **70**(6): 3363-71.
- Kolykhalov, A. A., K. Mihalik, S. M. Feinstone y C. M. Rice** (2000). "Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo." *J Virol* **74**(4): 2046-51.
- Korf, M., D. Jarczak, C. Begger, M. P. Manns y M. Kruger** (2005). "Inhibition of hepatitis C virus translation and subgenomic replication by siRNAs directed against highly conserved HCV sequence and cellular HCV cofactors." *J Hepatol* **43**(2): 225-34.
- Kronke, J., R. Kittler, F. Buchholz, M. P. Windisch, T. Pietschmann, R. Bartenschlager y M. Frese** (2004). "Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs." *J Virol* **78**(7): 3436-46.
- Kruger, K., P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling y T. R. Cech** (1982). "Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena." *Cell* **31**(1): 147-57.
- Kumar, R., S. K. Singh, A. A. Koshkin, V. K. Rajwanshi, M. Meldgaard y J. Wengel** (1998). "The first analogues of LNA (locked nucleic acids): phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA." *Bioorg Med Chem Lett* **8**(16): 2219-22.
- Kumar, U., J. Brown, J. Monjardino y H. C. Thomas** (1993). "Sequence variation in the large envelope glycoprotein (E2/NS1) of hepatitis C virus during chronic infection." *J Infect Dis* **167**(3): 726-30.
- Lambot, M., S. Fretier, A. Op De Beeck, B. Quatannens, S. Lestavel, V. Clavey y J. Dubuisson** (2002). "Reconstitution of hepatitis C virus envelope glycoproteins into liposomes as a surrogate model to study virus attachment." *J Biol Chem* **277**(23): 20625-30.

- Larrea, E., R. Aldabe, E. Molano, C. M. Fernandez-Rodriguez, A. Ametzazurra, M. P. Civeira y J. Prieto** (2006). "Altered expression and activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) in hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro studies." *Gut* **55**(8): 1188-96.
- Laxton, C., K. Brady, S. Moschos, P. Turnpenny, J. Rawal, D. C. Pryde, B. Sidders, R. Corbau, C. Pickford y E. J. Murray** (2011). "Selection, optimization, and pharmacokinetic properties of a novel, potent antiviral locked nucleic acid-based antisense oligomer targeting hepatitis C virus internal ribosome entry site." *Antimicrob Agents Chemother* **55**(7): 3105-14.
- Lechner, F., D. K. Wong, P. R. Dunbar, R. Chapman, R. T. Chung, P. Dohrenwend, G. Robbins, R. Phillips, P. Klenerman y B. D. Walker** (2000). "Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus." *J Exp Med* **191**(9): 1499-512.
- Lederberg, E. M. y S. N. Cohen** (1974). "Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid." *J Bacteriol* **119**(3): 1072-4.
- Lee, H., H. Shin, E. Wimmer y A. V. Paul** (2004). "cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome." *J Virol* **78**(20): 10865-77.
- Lee, P. A., L. M. Blatt, K. S. Blanchard, K. S. Bouhana, P. A. Pavco, L. Bellon y J. A. Sandberg** (2000). "Pharmacokinetics and tissue distribution of a ribozyme directed against hepatitis C virus RNA following subcutaneous or intravenous administration in mice." *Hepatology* **32**(3): 640-6.
- Lesburg, C. A., M. B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A. F. Mannarino y P. C. Weber** (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site." *Nat Struct Biol* **6**(10): 937-43.
- Levesque, M. V., D. Levesque, F. P. Briere y J. P. Perreault** (2010). "Investigating a new generation of ribozymes in order to target HCV." *PLoS One* **5**(3): e9627.
- Lieber, A., C. Y. He, S. J. Polyak, D. R. Gretch, D. Barr y M. A. Kay** (1996). "Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes." *J Virol* **70**(12): 8782-91.
- Logvinoff, C., M. E. Major, D. Oldach, S. Heyward, A. Talal, P. Balfe, S. M. Feinstone, H. Alter, C. M. Rice y J. A. McKeating** (2004). "Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10149-54.
- Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann y R. Bartenschlager** (1999). "Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line." *Science* **285**(5424): 110-3.
- Lourenco, S., F. Costa, B. Debarges, T. Andrieu y A. Cahour** (2008). "Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by cis-acting RNA elements and trans-acting viral factors." *FEBS J* **275**(16): 4179-97.
- Lukavsky, P. J., G. A. Otto, A. M. Lancaster, P. Sarnow y J. D. Puglisi** (2000). "Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function." *Nat Struct Biol* **7**(12): 1105-10.
- Luo, G., S. Xin y Z. Cai** (2003). "Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA." *J Virol* **77**(5): 3312-8.

**Lyons, A. J., J. R. Lytle, J. Gomez y H. D. Robertson** (2001). "Hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA contains a tertiary structural element in a functional domain of stem-loop II." *Nucleic Acids Res* **29**(12): 2535-41.

**Macejak, D. G., K. L. Jensen, S. F. Jamison, K. Domenico, E. C. Roberts, N. Chaudhary, I. von Carlowitz, L. Bellon, M. J. Tong, A. Conrad, P. A. Pavco y L. M. Blatt** (2000). "Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes." *Hepatology* **31**(3): 769-76.

**Macejak, D. G., K. L. Jensen, P. A. Pavco, K. M. Phipps, B. A. Heinz, J. M. Colacino y L. M. Blatt** (2001). "Enhanced antiviral effect in cell culture of type 1 interferon and ribozymes targeting HCV RNA." *J Viral Hepat* **8**(6): 400-5.

**Malcolm, B. A., R. Liu, F. Lahser, S. Agrawal, B. Belanger, N. Butkiewicz, R. Chase, F. Gheyas, A. Hart, D. Hesk, P. Ingravallo, C. Jiang, R. Kong, J. Lu, J. Pichardo, A. Prongay, A. Skelton, X. Tong, S. Venkatraman, E. Xia, V. Girijavallabhan y F. G. Njoroge** (2006). "SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(3): 1013-20.

**Martell, M., J. I. Esteban, J. Quer, J. Genesca, A. Weiner, R. Esteban, J. Guardia y J. Gomez** (1992). "Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution." *J Virol* **66**(5): 3225-9.

**Martell, M., J. Gomez, J. I. Esteban, S. Sauleda, J. Quer, B. Cabot, R. Esteban y J. Guardia** (1999). "High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA." *J Clin Microbiol* **37**(2): 327-32.

**Marton, S., B. Berzal-Herranz, E. Garmendia, F. J. Cueto y A. Berzal-Herranz** (2012). "Anti-HCV RNA Aptamers Targeting the Genomic cis-Acting Replication Element." *Pharmaceuticals* **5**(1): 49-60.

**Marton, S., J. A. Reyes-Darias, F. J. Sánchez-Luque, C. Romero-López y A. Berzal-Herranz** (2010). "In vitro and ex vivo selection procedures for identifying potentially therapeutic DNA and RNA molecules." *Molecules* **15**(7): 4610-38.

**McCaffrey, A. P., L. Meuse, M. Karimi, C. H. Contag y M. A. Kay** (2003). "A potent and specific morpholino antisense inhibitor of hepatitis C translation in mice." *Hepatology* **38**(2): 503-8.

**McCaffrey, A. P., K. Ohashi, L. Meuse, S. Shen, A. M. Lancaster, P. J. Lukavsky, P. Sarnow y M. A. Kay** (2002). "Determinants of hepatitis C translational initiation in vitro, in cultured cells and mice." *Mol Ther* **5**(6): 676-84.

**McLauchlan, J., M. K. Lemberg, G. Hope y B. Martoglio** (2002). "Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets." *Embo J* **21**(15): 3980-8.

**McMullan, L. K., A. Grakoui, M. J. Evans, K. Mihalik, M. Puig, A. D. Branch, S. M. Feinstone y C. M. Rice** (2007). "Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(8): 2879-84.

**McHutchison, J. G. y M. W. Fried** (2003). "Current therapy for hepatitis C: pegylated interferon and ribavirin." *Clin Liver Dis* **7**(1): 149-61.

- McHutchison, J. G., K. Patel, P. Pockros, L. Nyberg, S. Pianko, R. Z. Yu, F. A. Dorr y T. J. Kwok** (2006). "A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients." *J Hepatol* **44**(1): 88-96.
- Meister, G. y T. Tuschl** (2004). "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA." *Nature* **431**(7006): 343-9.
- Mills, D. R., R. L. Peterson y S. Spiegelman** (1967). "An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule." *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**(1): 217-24.
- Mironov, A. S., I. Gusarov, R. Rafikov, L. E. Lopez, K. Shatalin, R. A. Kreneva, D. A. Perumov y E. Nudler** (2002). "Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria." *Cell* **111**(5): 747-56.
- Mischiati, C., M. Borgatti, N. Bianchi, C. Rutigliano, M. Tomassetti, G. Feriotto y R. Gambari** (1999). "Interaction of the human NF-kappaB p52 transcription factor with DNA-PNA hybrids mimicking the NF-kappaB binding sites of the human immunodeficiency virus type 1 promoter." *J Biol Chem* **274**(46): 33114-22.
- Mischiati, C., M. Borgatti, G. Feriotto, C. Rutigliano, L. Breda, N. Bianchi y R. Gambari** (2002). "Inhibition of HIV-1 LTR-driven in vitro transcription by molecular hybrids based on peptide nucleic acids mimicking the NF-kappaB binding site." *Int J Mol Med* **9**(6): 633-9.
- Missale, G., R. Bertoni, V. Lamonaca, A. Valli, M. Massari, C. Mori, M. G. Rumi, M. Houghton, F. Fiaccadori y C. Ferrari** (1996). "Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response." *J Clin Invest* **98**(3): 706-14.
- Moradpour, D., V. Brass, E. Bieck, P. Friebe, R. Gosert, H. E. Blum, R. Bartenschlager, F. Penin y V. Lohmann** (2004). "Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication." *J Virol* **78**(23): 13278-84.
- Moradpour, D., F. Penin y C. M. Rice** (2007). "Replication of hepatitis C virus." *Nat Rev Microbiol* **5**(6): 453-63.
- Nahvi, A., N. Sudarsan, M. S. Ebert, X. Zou, K. L. Brown y R. R. Breaker** (2002). "Genetic control by a metabolite binding mRNA." *Chem Biol* **9**(9): 1043.
- Ndjomou, J., O. G. Pybus y B. Matz** (2003). "Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates indicates a unique pattern of endemic infection in Cameroon." *J Gen Virol* **84**(Pt 9): 2333-41.
- Neddermann, P., M. Quintavalle, C. Di Pietro, A. Clementi, M. Cerretani, S. Altamura, L. Bartholomew y R. De Francesco** (2004). "Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture." *J Virol* **78**(23): 13306-14.
- Neumann, A. U., N. P. Lam, H. Dahari, D. R. Gretch, T. E. Wiley, T. J. Layden y A. S. Perelson** (1998). "Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy." *Science* **282**(5386): 103-7.

- Nordstrom, K. y E. G. Wagner** (1994). "Kinetic aspects of control of plasmid replication by antisense RNA." *Trends Biochem Sci* **19**(7): 294-300.
- Nulf, C. J. y D. Corey** (2004). "Intracellular inhibition of hepatitis C virus (HCV) internal ribosomal entry site (IRES)-dependent translation by peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs)." *Nucleic Acids Res* **32**(13): 3792-8.
- Oh, J. W., G. T. Sheu y M. M. Lai** (2000). "Template requirement and initiation site selection by hepatitis C virus polymerase on a minimal viral RNA template." *J Biol Chem* **275**(23): 17710-7.
- Otto, G. A. y J. D. Puglisi** (2004). "The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation." *Cell* **119**(3): 369-80.
- Parisien, M. y F. Major** (2008). "The MC-Fold and MC-Sym pipeline infers RNA structure from sequence data." *Nature* **452**(7183): 51-5.
- Patel, D. J. y A. K. Suri** (2000). "Structure, recognition and discrimination in RNA aptamer complexes with cofactors, amino acids, drugs and aminoglycoside antibiotics." *J Biotechnol* **74**(1): 39-60.
- Patel, D. J., A. K. Suri, F. Jiang, L. Jiang, P. Fan, R. A. Kumar y S. Nonin** (1997). "Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes." *J Mol Biol* **272**(5): 645-64.
- Poynard, T., M. F. Yuen, V. Ratzu y C. L. Lai** (2003). "Viral hepatitis C." *Lancet* **362**(9401): 2095-100.
- Prabhu, R., P. Vittal, Q. Yin, E. Flemington, R. Garry, W. H. Robichaux y S. Dash** (2005). "Small interfering RNA effectively inhibits protein expression and negative strand RNA synthesis from a full-length hepatitis C virus clone." *J Med Virol* **76**(4): 511-9.
- Prody, G. A., J. T. Bakos, J. M. Buzayan, I. R. Schneider y G. Bruening** (1986). "Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA." *Science* **231**(4745): 1577-80.
- Proske, D., S. Gilch, F. Wopfner, H. M. Schatzl, E. L. Winnacker y M. Famulok** (2002). "Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation." *Chembiochem* **3**(8): 717-25.
- Randall, G., A. Grakoui y C. M. Rice** (2003). "Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 235-40.
- Ray, P. S. y S. Das** (2004). "Inhibition of hepatitis C virus IRES-mediated translation by small RNAs analogous to stem-loop structures of the 5'-untranslated region." *Nucleic Acids Res* **32**(5): 1678-87.
- Rehermann, B.** (2009). "Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence." *J Clin Invest* **119**(7): 1745-54.
- Reusken, C. B., T. J. Dalebout, P. Eerligh, P. J. Bredenbeek y W. J. Spaan** (2003). "Analysis of hepatitis C virus/classical swine fever virus chimeric 5'NTRs: sequences within the hepatitis C virus IRES are required for viral RNA replication." *J Gen Virol* **84**(Pt 7): 1761-9.
- Reynolds, J. E., A. Kaminski, A. R. Carroll, B. E. Clarke, D. J. Rowlands y R. J. Jackson** (1996). "Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon." *RNA* **2**(9): 867-78.

- Reynolds, J. E., A. Kaminski, H. J. Kettinen, K. Grace, B. E. Clarke, A. R. Carroll, D. J. Rowlands y R. J. Jackson** (1995). "Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation." *EMBO J* **14**(23): 6010-20.
- Rijnbrand, R., P. Bredenbeek, T. van der Straaten, L. Whetter, G. Inchauspe, S. Lemon y W. Spaan** (1995). "Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation." *FEBS Lett* **365**(2-3): 115-9.
- Rijnbrand, R., P. J. Bredenbeek, P. C. Haasnoot, J. S. Kieft, W. J. Spaan y S. M. Lemon** (2001). "The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs." *Rna* **7**(4): 585-97.
- Robertson, D. L. y G. F. Joyce** (1990). "Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA." *Nature* **344**(6265): 467-8.
- Romano, N. y G. Macino** (1992). "Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences." *Mol Microbiol* **6**(22): 3343-53.
- Romero-López, C., A. Barroso-delJesús, E. Puerta-Fernández y A. Berzal-Herranz** (2005). "Interfering with hepatitis C virus IRES activity using RNA molecules identified by a novel in vitro selection method." *Biol Chem* **386**(2): 183-90.
- Romero-López, C. y A. Berzal-Herranz** (2009). "A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome." *RNA* **15**(9): 1740-52.
- Romero-López, C. y A. Berzal-Herranz** (2011). "The functional RNA domain 5BSL3.2 within the NS5B coding sequence influences hepatitis C virus IRES-mediated translation." *Cell Mol Life Sci*.
- Romero-Lopez, C., B. Berzal-Herranz, J. Gomez y A. Berzal-Herranz** (2012). "An engineered inhibitor RNA that efficiently interferes with hepatitis C virus translation and replication." *Antiviral Res* **94**(2): 131-8.
- Romero-López, C., R. Diaz-González, A. Barroso-delJesús y A. Berzal-Herranz** (2009). "Inhibition of hepatitis C virus replication and internal ribosome entry site-dependent translation by an RNA molecule." *J Gen Virol* **90**(Pt 7): 1659-69.
- Romero-López, C., R. Diaz-González y A. Berzal-Herranz** (2007). "Inhibition of hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation by an RNA targeting the conserved III<sub>f</sub> domain." *Cell Mol Life Sci* **64**(22): 2994-3006.
- Romero-López, C., F. J. Sánchez-Luque y A. Berzal-Herranz** (2006). "Targets and tools: recent advances in the development of anti-HCV nucleic acids." *Infect Disord Drug Targets* **6**(2): 121-45.
- Sakai, A., M. S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S. U. Emerson, R. H. Purcell y J. Bukh** (2003). "The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11646-51.
- Sakamoto, N., C. H. Wu y G. Y. Wu** (1996). "Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes." *J Clin Invest* **98**(12): 2720-8.
- Sanger, F., S. Nicklen y A. R. Coulson** (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.

**Scarabino, D., A. Crisari, S. Lorenzini, K. Williams y G. P. Tocchini-Valentini** (1999). "tRNA prefers to kiss." *Embo J* **18**(16): 4571-8.

**Semmo, N., M. Lucas, G. Krashias, G. Lauer, H. Chapel y P. Klenerman** (2006). "Maintenance of HCV-specific T-cell responses in antibody-deficient patients a decade after early therapy." *Blood* **107**(11): 4570-1.

**Semple, S. C., A. Akinc, J. Chen, A. P. Sandhu, B. L. Mui, C. K. Cho, D. W. Sah, D. Stebbing, E. J. Crosley, E. Yaworski, I. M. Hafez, J. R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K. G. Rajeev, K. F. Wong, L. B. Jeffs, L. Nechev, M. L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M. A. Maier, M. Srinivasulu, M. J. Weinstein, Q. Chen, R. Alvarez, S. A. Barros, S. De, S. K. Klimuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W. L. Cantley, Y. K. Tam, M. Manoharan, M. A. Ciufolini, M. A. Tracy, A. de Fougerolles, I. MacLachlan, P. R. Cullis, T. D. Madden y M. J. Hope** (2010). "Rational design of cationic lipids for siRNA delivery." *Nat Biotechnol* **28**(2): 172-6.

**Sen, A., R. Steele, A. K. Ghosh, A. Basu, R. Ray y R. B. Ray** (2003). "Inhibition of hepatitis C virus protein expression by RNA interference." *Virus Res* **96**(1-2): 27-35.

**Serikov, R., V. Petyuk, Y. Vorobijev, V. Koval, O. Fedorova, V. Vlassov y M. Zenkova** (2011). "Mechanism of antisense oligonucleotide interaction with natural RNAs." *J Biomol Struct Dyn* **29**(1): 27-50.

**Shi, S. T., K. J. Lee, H. Aizaki, S. B. Hwang y M. M. Lai** (2003). "Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2." *J Virol* **77**(7): 4160-8.

**Shin, D., H. Lee, S. I. Kim, Y. Yoon y M. Kim** (2009). "Optimization of linear double-stranded RNA for the production of multiple siRNAs targeting hepatitis C virus." *Rna* **15**(5): 898-910.

**Shin, E. C., U. Seifert, T. Kato, C. M. Rice, S. M. Feinstone, P. M. Kloetzel y B. Rehmann** (2006). "Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection." *J Clin Invest* **116**(11): 3006-14.

**Simmonds, P.** (2001). "The origin and evolution of hepatitis viruses in humans." *J Gen Virol* **82**(Pt 4): 693-712.

**Simmonds, P.** (2004). "Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on." *J Gen Virol* **85**(Pt 11): 3173-88.

**Simmonds, P., E. C. Holmes, T. A. Cha, S. W. Chan, F. McOmish, B. Irvine, E. Beall, P. L. Yap, J. Kolberg y M. S. Urdea** (1993). "Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region." *J Gen Virol* **74** ( Pt 11): 2391-9.

**Simmonds, P., A. Tuplin y D. J. Evans** (2004). "Detection of genome-scale ordered RNA structure (GORS) in genomes of positive-stranded RNA viruses: Implications for virus evolution and host persistence." *RNA* **10**(9): 1337-51.

**Simoës, E. A. y P. Sarnow** (1991). "An RNA hairpin at the extreme 5' end of the poliovirus RNA genome modulates viral translation in human cells." *J Virol* **65**(2): 913-21.

**Smith, D. B. y P. Simmonds** (1997). "Characteristics of nucleotide substitution in the hepatitis C virus genome: constraints on sequence change in coding regions at both ends of the genome." *J Mol Evol* **45**(3): 238-46.



- Smolic, R., M. Smolic, J. H. Andorfer, C. H. Wu, R. M. Smith y G. Y. Wu** (2010). "Inhibition of hepatitis C virus replication by single-stranded RNA structural mimics." *World J Gastroenterol* **16**(17): 2100-8.
- Song, Y., P. Friebe, E. Tzima, C. Junemann, R. Bartenschlager y M. Niepmann** (2006). "The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site." *J Virol* **80**(23): 11579-88.
- Spahn, C. M., J. S. Kieft, R. A. Grassucci, P. A. Penczek, K. Zhou, J. A. Doudna y J. Frank** (2001). "Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit." *Science* **291**(5510): 1959-62.
- Steyaert, J.** (1997). "A decade of protein engineering on ribonuclease T1--atomic dissection of the enzyme-substrate interactions." *Eur J Biochem* **247**(1): 1-11.
- Su, A. I., J. P. Pezacki, L. Wodicka, A. D. Brideau, L. Supekova, R. Thimme, S. Wieland, J. Bukh, R. H. Purcell, P. G. Schultz y F. V. Chisari** (2002). "Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15669-74.
- Suzuki, T., K. Ishii, H. Aizaki y T. Wakita** (2007). "Hepatitis C viral life cycle." *Adv Drug Deliv Rev* **59**(12): 1200-12.
- Tafer, H., S. L. Ameres, G. Obernosterer, C. A. Gebeshuber, R. Schroeder, J. Martinez y I. L. Hofacker** (2008). "The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs." *Nat Biotechnol* **26**(5): 578-83.
- Takigawa, Y., M. Nagano-Fujii, L. Deng, R. Hidajat, M. Tanaka, H. Mizuta y H. Hotta** (2004). "Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome." *Microbiol Immunol* **48**(8): 591-8.
- Tallet-Lopez, B., L. Aldaz-Carroll, S. Chabas, E. Dausse, C. Staedel y J. J. Toulmé** (2003). "Antisense oligonucleotides targeted to the domain IIIId of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent in vitro translation." *Nucleic Acids Res* **31**(2): 734-42.
- Tanaka, H., P. Vickart, J. R. Bertrand, B. Rayner, F. Morvan, J. L. Imbach, D. Paulin y C. Malvy** (1994). "Sequence-specific interaction of alpha-beta-anomeric double-stranded DNA with the p50 subunit of NF kappa B: application to the decoy approach." *Nucleic Acids Res* **22**(15): 3069-74.
- Tanaka, T., N. Kato, M. J. Cho, K. Sugiyama y K. Shimotohno** (1996). "Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome." *J Virol* **70**(5): 3307-12.
- Taniguchi, S., H. Okamoto, M. Sakamoto, M. Kojima, F. Tsuda, T. Tanaka, E. Munekata, E. E. Muchmore, D. A. Peterson y S. Mishiro** (1993). "A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein: implication for an escape from antibody." *Virology* **195**(1): 297-301.
- Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano y C. M. Rice** (2005). "Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase." *Nature* **435**(7040): 374-9.
- Theissen, G., A. Richter y N. Lukacs** (1989). "Degree of biotinylation in nucleic acids estimated by a gel retardation assay." *Anal Biochem* **179**(1): 98-105.

**Thimme, R., J. Bukh, H. C. Spangenberg, S. Wieland, J. Pemberton, C. Steiger, S. Govindarajan, R. H. Purcell y F. V. Chisari** (2002). "Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15661-8.

**Thimme, R., D. Oldach, K. M. Chang, C. Steiger, S. C. Ray y F. V. Chisari** (2001). "Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection." *J Exp Med* **194**(10): 1395-406.

**Trejo-Avila, L., R. Elizondo-Gonzalez, C. Trujillo-Murillo Kdel, P. Zapata-Benavides, C. Rodriguez-Padilla y A. M. Rivas-Estilla** (2007). "Antiviral therapy: inhibition of Hepatitis C Virus expression by RNA interference directed against the NS5B region of the viral genome." *Ann Hepatol* **6**(3): 174-80.

**Tsukiyama-Kohara, K., N. Iizuka, M. Kohara y A. Nomoto** (1992). "Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA." *J Virol* **66**(3): 1476-83.

**Tuerk, C. y L. Gold** (1990). "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase." *Science* **249**(4968): 505-10.

**Tuplin, A., D. J. Evans y P. Simmonds** (2004). "Detailed mapping of RNA secondary structures in core and NS5B-encoding region sequences of hepatitis C virus by RNase cleavage and novel bioinformatic prediction methods." *J Gen Virol* **85**(Pt 10): 3037-47.

**Tuplin, A., M. Struthers, P. Simmonds y D. J. Evans** (2012). "A twist in the tail: SHAPE mapping of long-range interactions and structural rearrangements of RNA elements involved in HCV replication." *Nucleic Acids Res.*

**Tuschl, T., P. D. Zamore, R. Lehmann, D. P. Bartel y P. A. Sharp** (1999). "Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro." *Genes Dev* **13**(24): 3191-7.

**Uhlenbeck, O. C.** (1987). "A small catalytic oligoribonucleotide." *Nature* **328**(6131): 596-600.

**Urbani, S., B. Amadei, P. Fisicaro, D. Tola, A. Orlandini, L. Sacchelli, C. Mori, G. Missale y C. Ferrari** (2006). "Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses." *Hepatology* **44**(1): 126-39.

**Vassilaki, N., P. Friebe, P. Meuleman, S. Kallis, A. Kaul, G. Paranhos-Baccala, G. Leroux-Roels, P. Mavromara y R. Bartenschlager** (2008). "Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication." *J Virol* **82**(23): 11503-15.

**Veedu, R. N., B. Vester y J. Wengel** (2007). "In vitro incorporation of LNA nucleotides." *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **26**(8-9): 1207-10.

**Veedu, R. N., B. Vester y J. Wengel** (2008). "Polymerase chain reaction and transcription using locked nucleic acid nucleotide triphosphates." *J Am Chem Soc* **130**(26): 8124-5.

**Veedu, R. N., B. Vester y J. Wengel** (2009). "Efficient enzymatic synthesis of LNA-modified DNA duplexes using KOD DNA polymerase." *Org Biomol Chem* **7**(7): 1404-9.

**Vlassov, A. V., B. Korba, K. Farrar, S. Mukerjee, A. A. Seyhan, H. Ilves, R. L. Kaspar, D. Leake, S. A. Kazakov y B. H. Johnston** (2007). "shRNAs targeting hepatitis C: effects of sequence and structural features, and comparison with siRNA." *Oligonucleotides* **17**(2): 223-36.

- von Hahn, T., J. C. Yoon, H. Alter, C. M. Rice, B. Rehermann, P. Balfe y J. A. McKeating** (2007). "Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo." *Gastroenterology* **132**(2): 667-78.
- Wakita, T., D. Moradpour, K. Tokushihge y J. R. Wands** (1999). "Antiviral effects of antisense RNA on hepatitis C virus RNA translation and expression." *J Med Virol* **57**(3): 217-22.
- Wakita, T. y J. R. Wands** (1994). "Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligodeoxynucleotides. In vitro model for selection of target sequence." *J Biol Chem* **269**(19): 14205-10.
- Wang, C., S. Y. Le, N. Ali y A. Siddiqui** (1995). "An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region." *Rna* **1**(5): 526-37.
- Wang, C., P. Sarnow y A. Siddiqui** (1993). "Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism." *J Virol* **67**(6): 3338-44.
- Wang, Q., C. H. Contag, H. Ilves, B. H. Johnston y R. L. Kaspar** (2005). "Small hairpin RNAs efficiently inhibit hepatitis C IRES-mediated gene expression in human tissue culture cells and a mouse model." *Mol Ther* **12**(3): 562-8.
- Wang, T. H., R. C. Rijnbrand y S. M. Lemon** (2000). "Core protein-coding sequence, but not core protein, modulates the efficiency of cap-independent translation directed by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus." *J Virol* **74**(23): 11347-58.
- Watrin, M., F. Von Pelchrzim, E. Dausse, R. Schroeder y J. J. Toulmé** (2009). "In vitro selection of RNA aptamers derived from a genomic human library against the TAR RNA element of HIV-1." *Biochemistry* **48**(26): 6278-84.
- Wedemeyer, H., X. S. He, M. Nascimbeni, A. R. Davis, H. B. Greenberg, J. H. Hoofnagle, T. J. Liang, H. Alter y B. Rehermann** (2002). "Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection." *J Immunol* **169**(6): 3447-58.
- Weiner, A. J., H. M. Geysen, C. Christopherson, J. E. Hall, T. J. Mason, G. Saracco, F. Bonino, K. Crawford, C. D. Marion, K. A. Crawford y et al.** (1992). "Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8): 3468-72.
- Welch, P. J., R. Tritz, S. Yei, M. Leavitt, M. Yu y J. Barber** (1996). "A potential therapeutic application of hairpin ribozymes: in vitro and in vivo studies of gene therapy for hepatitis C virus infection." *Gene Ther* **3**(11): 994-1001.
- White, R. R., J. A. Roy, K. D. Viles, B. A. Sullenger y C. D. Kontos** (2008). "A nuclease-resistant RNA aptamer specifically inhibits angiopoietin-1-mediated Tie2 activation and function." *Angiogenesis* **11**(4): 395-401.
- Wilson, J. A., S. Jayasena, A. Khvorova, S. Sabatinos, I. G. Rodrigue-Gervais, S. Arya, F. Sarangi, M. Harris-Brandts, S. Beaulieu y C. D. Richardson** (2003). "RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2783-8.

- Wilson, J. A. y C. D. Richardson** (2005). "Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region." *J Virol* **79**(11): 7050-8.
- Winkler, W., A. Nahvi y R. R. Breaker** (2002). "Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression." *Nature* **419**(6910): 952-6.
- Winkler, W. C., S. Cohen-Chalamish y R. R. Breaker** (2002). "An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 15908-13.
- Wolk, B., D. Sansonno, H. G. Krausslich, F. Dammacco, C. M. Rice, H. E. Blum y D. Moradpour** (2000). "Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines." *J Virol* **74**(5): 2293-304.
- Wu, C. H. y C. H. Wu** (1998). "Targeted inhibition of hepatitis C virus-directed gene expression in human hepatoma cell lines." *Gastroenterology*. **114**(6): 1304-12.
- Yamada, N., K. Tanihara, A. Takada, T. Yorihuzi, M. Tsutsumi, H. Shimomura, T. Tsuji y T. Date** (1996). "Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome." *Virology* **223**(1): 255-61.
- Yanagi, M., R. H. Purcell, S. U. Emerson y J. Bukh** (1999). "Hepatitis C virus: an infectious molecular clone of a second major genotype (2a) and lack of viability of intertypic 1a and 2a chimeras." *Virology* **262**(1): 250-63.
- Yanagi, M., M. St Claire, S. U. Emerson, R. H. Purcell y J. Bukh** (1999). "In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2291-5.
- Yi, M. y S. M. Lemon** (2003). "3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA." *J Virol* **77**(6): 3557-68.
- Yi, M. y S. M. Lemon** (2003). "Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication." *RNA* **9**(3): 331-45.
- Yokota, T., N. Sakamoto, N. Enomoto, Y. Tanabe, M. Miyagishi, S. Maekawa, L. Yi, M. Kurosaki, K. Taira, M. Watanabe y H. Mizusawa** (2003). "Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs." *EMBO Rep* **4**(6): 602-8.
- You, S. y C. M. Rice** (2008). "3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U)." *J Virol* **82**(1): 184-95.
- You, S., D. D. Stump, A. D. Branch y C. M. Rice** (2004). "A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication." *J Virol* **78**(3): 1352-66.
- Zamecnik, P. C. y M. L. Stephenson** (1978). "Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(1): 280-4.
- Zaug, A. J. y T. R. Cech** (1986). "The intervening sequence RNA of Tetrahymena is an enzyme." *Science* **231**(4737): 470-5.

**Zhang, H., R. Hanecak, V. Brown-Driver, R. Azad, B. Conklin, M. C. Fox y K. P. Anderson** (1999). "Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant." *Antimicrob Agents Chemother* **43**(2): 347-53.

**Zhang, J., O. Yamada, T. Sakamoto, H. Yoshida, H. Araki, T. Murata y K. Shimotohno** (2005). "Inhibition of hepatitis C virus replication by pol III-directed overexpression of RNA decoys corresponding to stem-loop structures in the NS5B coding region." *Virology* **342**(2): 276-85.

**Zhao, J. J. y G. Lemke** (1998). "Rules for ribozymes." *Mol Cell Neurosci* **11**(1-2): 92-7.

## 9. Abreviaturas

A	adenina
ALAL	Interacción establecida entre un lazo apical y un lazo interno. ( <i>Apical Loop- Apical Loop</i> )
ALIL <i>Loop</i> )	Interacción establecida entre un lazo apical y un lazo interno. ( <i>Apical Loop- Internal</i>
APS	Persulfato de amonio
ARFP/F	Proteína que se sintetiza a partir del marco de lectura corrido del HCV. ( <i>Alternative Reading Frame Protein o F frameshift protein</i> ).
Asn	asparagina
ATP	Adenosina 5' trifosfato.
Biotin-16-UTP	UTP biotinilado mediante la unión al carbono 16 de la biotina.
BrEt	Bromuro de Etidio.
C	citosina
°C	Grados Celsius
Ci	Curio
CD4+ y CD8+	
CD81	
CHO	Células del ovario de hámster chino ( <i>Chinese hamster ovary cells</i> ),
cm	centímetro.
CRE	Sitio que actúa en cis necesario para la replicación. <i>Cis Acting Replication Element</i> .
CTP	Citidina 5' trifosfato.
DMEM	Medio de Eagle modificado por Duplecco
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DNasa	Desoxirribonucleasa.
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato.
DO	Densidad óptica.
DTT	Ditiotreitol.

E1 y E2	glicoproteínas de la envoltura del HCV 1 y 2.
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético.
eIF2 y eIF3	Factor de Inicio de la Traducción 2 y 3.
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis.
ER	Retículo endoplásmico.
esiRNAs	Endorribonuclease prepared siRNA
EtOH	Etanol
G	guanina
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.
GFP	Proteína verde fluorescente ( <i>green fluorescent protein</i> )
Glu	Glutamina
GTP	Guanosina 5' trifosfato.
HCV	Virus de la Hepatitis C. <i>Hepatitis C Virus</i> .
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HDV	Virus de la hepatitis delta ( <i>Hepatitis delta virus</i> )
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana adquirida ( <i>Human immunodeficiency virus</i> )
hr	horas
HV	Región Hiper variable.
IL-2	Interleuquina 2
IFN	Interferón.
IRES	Sitio de entrada interno del ribosoma. ( <i>Internal Ribosome Entry Site</i> )
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.
Kd	Constante de disociación.
kDa	Kilo Daltons.
kV	Kilo voltios.
LB	Medio Luria-Bertani
LDL	lipoproteína de baja densidad
LDLR	receptor de las lipoproteínas de baja densidad.

LNA	Análogo de un ácido nucleico que posee una unión metileno entre el 2'-O y 4'-C del anillo de ribosa que cierra al azúcar en la conformación 3'endo ( <i>locked nucleic acid</i> ).
M	Molar
mA	miliamperios.
2'-MEO	Análogo de un ácido nucleico con el grupo 2' OH de la ribosa con un grupo metoxietil.
Met-tRNA	RNA de transferencia unido a la metionina.
MHC	Complejos Principal de Histocompatibilidad. ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	minutos.
mRNA	RNA mensajero.
N	Nucleótido (A, C, G, T o U)
NEB	<i>New England Biolabs</i> .
NS1-5	Proteínas no estructurales del HCV.
NTP	Nucleósido trifosfato.
NTPase	Enzima que hidroliza los nucleósidos trifosfato con la concomitante liberación de energía. Generalmente esta reacción está acoplada a otras reacciones.
ODN	Oligodesoxinucleótido.
2'-OMe	Análogo de un ácido nucleico con el grupo 2' OH de la ribosa que ha sido metilado.
OMS	organización mundial de la salud
ORF	Marco de lectura abierto ( <i>Open Reading Frame</i> )
<sup>32</sup> P	Fósforo 32. Isótopo radiactivo del fósforo.
Pb <sup>2+</sup>	Plomo
PBS	sitio de unión de primer ( <i>primer binding site</i> ) o Tampón fosfato salino, ( <i>Phosphate buffered saline</i> ).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pC <sup>32</sup> P	citidina 3' 5' bifosfato marcada en 5' con fosfato 32.
PEG-IFN	Interferón unido a polietilenglicol.
pH	$-\log_{10} [H^+]$
PKR	Proteína Kinasa K ( <i>protein kinase k</i> )



PMO	oligonucleótidos basados en fosforodiamidatos de morfolino donde la ribosa es remplazada por un anillo de morfolino y el fosforotioato o fosfodiéster, ( <i>phosphorodiamidate morpholino oligo</i> )
PNA	Ácidos Nucleicos Peptídicos. ( <i>Peptide nucleic acid</i> )
polyU/UC	región rica en U/UC del HCV
PS	Análogo de un ácido nucleico con un asufre en el grupo fosfato.
R	purina (A o G)
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA.
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA ( <i>RNA Induced Silencing Complex</i> ).
RNA	Ácido Ribonucleico. <i>Ribonucleic Acid</i> .
RNAi	RNA de interferencia.
RNasa	Ribonucleasa.
rpm	revoluciones por minuto.
RRL	Lisados de reticulocitos de conejo ( <i>rabbit reticulocyte lysate</i> )
SELEX	Métodos de selección <i>in vitro</i> de aptámeros. Del inglés: <i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i> .
SLIII, SLII, SLI	Tallos lazos III, II y I de la <i>X tail</i> del HCV.
SR-BI	Scavenger Receptor B tipe 1
s	segundo/s.
SBF	suero bovino fetal
SDS	Duodecil sulfato sódico.
T	timina
TAE	Tampón Tris-Acetato EDTA
TAR	Región de respuesta a la transactivación.
TB	Tamón Tris-Borato.
TBE	Tampón Tris-Borato EDTA.
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamino.
Tris	Trihidroximetil amino metano.
tRNA	RNA de transferencia.

Tyr	Tirosina
T1L	Digestión con RNasa T1 del RNA en condiciones desnaturalizantes. ( <i>T1 ladder</i> )
U	unidades de enzima.
U	uracilo.
UTR	Región no traducible. ( <i>Untranslated region</i> ).
V	voltios.
VLDL	lipoproteína de muy baja densidad.
X-gal	5-Br-4-Cl-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido.
Y	pirimidina (U, T o C)