

“EFECTO DEL AUMENTO MUTACIONAL SOBRE EL RECONOCIMIENTO DE LOS MOTIVOS ESTRUCTURALES DEL ARN DE LA REGIÓN GENÓMICA 5’, DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C, POR FACTORES BIOQUÍMICOS”



Memoria de Tesis Doctoral

Memoria presentada por el licenciado en Química
Samuel Prieto Vega para optar al Título de Doctor

Ldo. *Samuel Prieto Vega*

Fdo.:

Vº Bº del Director de la Tesis

Dr. Jordi Gómez Castilla

Doctor en Biología

Fdo.



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ipbln



ugr

Universidad
de Granada

Instituto de Parasitología y Biomedicina “Lopez-Neyra”, CSIC

Universidad de Granada

Diciembre 2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Samuel Prieto Vega
ISBN: 978-84-9125-553-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/42775>

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio del Dr. Jordi Gómez Castilla (Laboratorio 111)
Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra" (IPBLN). Granada
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)



Se ha realizado una estancia breve de tres meses en el
Laboratory of Dr. Sunnie Thompson
Department of Microbiology
University of Alabama at Birmingham UAB



Esta tesis ha sido financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad de España
a través del programa de becas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de la
Junta para la Ampliación de Estudios JAE-preDoc 2009



JUNTA PARA AMPLIACIÓN DE ESTUDIOS

Este trabajo está avalado por la publicación:

"Geneticin stabilizes the opened conformation of the 5' region of hepatitis C virus RNA and inhibits viral replication." in the journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

by Ascensión Ariza-Mateos(1), Rosa Díaz-Toledano(2), Tim Block(4), Samuel Prieto-Vega (1), Alex Birk (5), and Jordi Gomez(1,3).

1: IPBLN Granada, 2: CBMSO Madrid, 3: CIBERehd, 4: Baruch S. Blumberg Institute, USA, 5: Department of Pharmacology, Weill Medical College of Cornell University, USA.

El doctorando SAMUEL PRIETO VEGA y el director de la tesis Dr. JORDI GÓMEZ CASTILLA. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo experimental y la redacción, han sido realizados por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada a 10 de noviembre de 2015

Director de la Tesis

Doctorando

Dr. Jordi Gómez Castilla

Samuel Prieto Vega

Fdo.:

Fdo.:

A Ti, Esther, mi mujer... de manera especial por darme sin límite y sin esperar nada, por todo y por tanto...

AGRADECIMIENTOS

Llevar a cabo una tesis doctoral ha sido la construcción más compleja que he afrontado en toda mi vida. Supera con creces mi capacidad y solo ha sido posible por la colaboración profesional de un gran equipo de científicos y el no menos importante apoyo personal de un gran número de buenas personas. Espero poder aquí agradecerles a todos la ayuda que me han brindado y con ella su parte del resultado de este trabajo.

Este trabajo ha sido realizado en el Grupo de Investigación “ArqueRNA, Arqueología del ARN, (Laboratorio 111)” bajo la dirección del Dr. Jordi Gómez Castilla, a quien quisiera reconocer su excelente dirección y su extraordinaria calidad humana. Gracias, Jordi por haberme enseñado tanto, por haberme introducido en el fascinante mundo del ARN en el que me gustaría seguir desarrollando mi carrera profesional, por hacer de mi un científico y sobre todo por hacerme mejor persona. A mis compañeras del laboratorio 111 Isabel, Rosa, Raquel y M^a Assen, por su amistad y su incondicional ayuda en todo momento. Por el buen ambiente de trabajo, por compartir las decepciones y las alegrías. Este trabajo de investigación es también mérito de ellas.

Quisiera mostrar, asimismo, mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han animado y apoyado durante la realización de esta Tesis y en especial: A los doctores D. Alfredo Berzal Herranz y Dña. Cristina Romero, a Vicente y Beatriz y a todo su grupo del laboratorio 112 por su colaboración y buenos consejos, su optimismo, por contar conmigo, por toda su ayuda, por su siempre magnífica disposición a enseñarme a ser un buen científico. A la Dra. D^a Alicia Barroso del Jesús del servicio de secuenciación. Al Dr. Antonio Larios Simón del servicio de proteómica. A Cristina Moreno Suarez del servicio de síntesis de oligos. A José Manuel Almarza Rodríguez del departamento de Informática. A María Victoria Longobardo Polanco y a Salvador Jesús Guerrero Fernández de la unidad de radioactividad. En general a todos los Drs. y personal del Instituto de Parasitología y Biomedicina “Lopez-Neyra” de Granada por toda su colaboración. A todos cuantos hicieron mi estancia agradable y mi trabajo ameno, y en especial a Jean Mathie y Kiko, cuya amistad sé que me acompañará en todo momento, gracias por los buenos momentos vividos y por los venideros. Porque la ciencia también se transpira.

A la Doctora Sunnie Thompson y a su marido Dr. Curtis Hendrickson por permitirme una fructífera estancia en su laboratorio del Departament de Microbiología de la Universidad de Alabama en Birmingham-UAB, por su admirable disposición y por su trato exquisito, por su tutela responsable y su maestría inigualable.

A todos mis amigos, especialmente a Antonio Soria, Amadeo y Nacho por su cariño, su absoluta confianza en mí y por una amistad de más de treinta años.... A mis amigos de la asociación Giner de los Ríos, cuya amistad me ha acompañado en todo momento y sé que lo seguirá haciendo. En especial a Antonio y Patricia, Antonio Bayo y Mayte, José M^a Recuerda y Antonio Peláez, a los que tengo un enorme cariño.

A toda mi familia, porque este trabajo me ha robado tiempo de estar con ella, y especialmente a mi madre, mis hermanos, mis sobrinos y mi abuela, por darme todo su amor y comprensión; a mis abuelos, porque aunque no han podido vivir esta Tesis Doctoral, siempre me animaron a dar todo de mí y siempre soñaron con compartir estos momentos conmigo. Y a mi padre que nunca perdió su fe en mí y siempre me animó a ir más allá... Gracias a todos.

INDICE	1
ABREVIATURAS, ANGLICISMOS Y ACRÓNIMOS	11
INTRODUCCIÓN	15
I.1. ACTIVIDAD DEL ARN. CONCEPTOS:	17
I.1.1. FUNCIÓN EN EL ARN.	17
I.1.2. NIVELES ESTRUCTURALES EN EL ARN.	18
<i>I.1.2.a. Estructura Primaria: Secuencias en el ARN. Ejemplos en virus y ARNm.</i>	<i>18</i>
<i>I.1.2.b. Estructuras Secundarias en el ARN. Ejemplos en virus y ARNm.</i>	<i>19</i>
<i>I.1.2.c. Estructuras Terciarias en el ARN. Ejemplos en virus y en ARNm.</i>	<i>20</i>
<i>I.1.2.d. Dinámica conformacional.</i>	<i>20</i>
I.1.3. TIPOS DE MOTIVOS ESTRUCTURALES EN EL ARN.	21
I.1.4. SIMULACIONES ESTRUCTURALES “IN SILICO” EN EL ARN.	21
I.2. TEORÍA DE CUASIESPECIES.	22
I.2.1. ESPACIO DE SECUENCIAS: GENOTIPO.	23
<i>I.2.1.a. La mutación: variabilidad de secuencias.</i>	<i>23</i>
<i>I.2.1.b. Relaciones filogenéticas.</i>	<i>23</i>
I.2.2. ESPACIO DE ESTRUCTURAS: FENOTIPO.	25
I.2.3. DE LAS CUASIESPECIES TEÓRICAS A LAS CUASIESPECIES VÍRICAS.	25
<i>I.2.3.a. Bases moleculares de la variabilidad génica de los virus ARN.</i>	<i>26</i>
<i>I.2.3.b. Medidas de la variabilidad. Tasa de error.</i>	<i>27</i>
<i>I.2.3.c. Hipótesis de la Catástrofe de Error.</i>	<i>28</i>
<i>I.2.3.d. Tolerancia al error y longitud del Genoma.</i>	<i>29</i>
I.2.4. SECUENCIA-ESTRUCTURA COMO UNIDAD EVOLUTIVA.	30
<i>I.2.4.a. Neutralidad y Robustez.</i>	<i>30</i>
<i>I.2.4.b. Direccionalidad y multidimensionalidad: evolución de las cuasiespecies.</i>	<i>31</i>
<i>I.2.4.c. La viabilidad.</i>	<i>32</i>
<i>I.2.4.d. La epístasis como efecto selectivo sobre la estructura y la viabilidad.</i>	<i>32</i>
I.2.5. VARIABILIDAD EN LAS CUASIESPECIES VIRALES.	33
I.2.6. EJEMPLOS EXPERIMENTALES DE CUASIESPECIES. MODELOS DE ESTUDIO.	
ESTRUCTURAS PRIMARIAS, SECUNDARIAS Y TERCIARIAS EN VIRUS ARN.	34
<i>I.2.6. a. Estructuras primarias en virus de ARN.</i>	<i>34</i>
<i>I.2.6. b. Estructuras secundarias y terciarias en virus de ARN.</i>	<i>35</i>

I.3. ESTUDIOS SOBRE LA RELACIÓN SECUENCIA-ESTRUCTURA EN VIRUS DE ARN:	36
I.3.1. ESTUDIOS TEÓRICOS. SIMULACIONES <i>IN SILICO</i>. MÉTODOS INFORMÁTICOS.	36
I.3.2. MÉTODOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA CUASIESPECIE:	36
<i>I.3.3.a.- Experimentos de “Evolución in vitro”:</i>	36
<i>I.3.3.b.- Ensayos de variabilidad. Ensayos de selección in vitro.</i>	37
<i>I.3.3.c.- Eficacia biológica y mutagénesis. Ensayos de competición con genomas modificados in vitro.</i>	37
<i>I.3.3.d. Ejemplos de Estudios Termodinámicos.</i>	38
<i>I.3.3.e. Métodos de análisis filogenético:</i>	38
<i>I.3.3.f. Métodos de determinación estructural del ARN en las cuasiespecies:</i>	39
I.4. IDENTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS EN EL ARN VIRAL:	41
I.4.1. EMPLEO DE FACTORES PARA EL RECONOCIMIENTO DE ESTRUCTURAS EN LA CUASIESPECIE:	41
<i>I.4.1.a. Reconocimiento de la Estructura 1ª.</i>	41
<i>I.4.1.b. Reconocimiento de estructuras 2ª de ARN: RNAsa III de Escherichia Coli</i>	42
<i>I.4.1.c. Reconocimiento de la Estructura 3ª: La RNAsa P y la Radiación UV-C</i>	44
I.4.2. RECONOCIMIENTO DE ESTRUCTURAS FUNCIONALES DEL ARN. EL RIBOSOMA	48
I.4.3 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATOS Y MIMESIS. EJEMPLOS.	48
I.5. MODELO DE ESTUDIO: EL VHC:	50
I.5.1. VHC: SECUENCIA DE ARN. ESTRUCTURAS DE SU GENOMA.	50
<i>I.5.1.a Secuencias de unión del IRES del VHC al miR-122.</i>	51
<i>I.5.1.b Estructura tARN-like en el elemento IRES del VHC.</i>	52
<i>I.5.1.c Estructuras terciarias E-loop en el elemento IRES del VHC.</i>	52
<i>I.5.1.d Transición estructural promovida por miR-122 en el IRES del VHC.</i>	53
<i>I.5.1.e Región de unión del IRES del VHC a la subunidad ribosomal 40S.</i>	53
I.5.2. CATÁSTROFE DE ERROR COMO HIPÓTESIS TERAPÉUTICA. POLIO, FMDV, VHC...	54
I.5.3. MUTÁGENOS ANTIVIRALES.	55
<i>I.5.3.a 5-fluoroacilo Fu-U:</i>	56
<i>I.5.3.b La ribavirina:</i>	56
<i>I.5.3.c La Geneticina:</i>	58
SUMARIO	60
OBJETIVOS:	63
MATERIALES Y MÉTODOS	65
MATERIALES:	67
M.1.1.- MATERIAL DE VIDRIO LIBRE DE RNASAS .	67

M.1.2.-AGUA.	67
M.1.3.- SUSPENSIÓN DE CELULOSA FOSFATO CF-11 PARA PURIFICACIONES EN COLUMNA.	67
<i>M.1.3.a.-Tratamiento de la resina CF-11:</i>	67
M.1.4.- PATRONES DE PESO MOLECULAR PARA ELECTROFORESIS.	67
M.1.5.-ISÓTOPOS RADIACTIVOS.	68
M.1.6.- OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS.	68
M.1.7.- CONSTRUCCIONES DE ADN EMPLEADAS PARA LAS REACCIONES DE TRANSCRIPCIÓN.	69
M.1.8.- EXTRACTO DE ACTIVIDAD RNASA P:	70
M.1.9.- EXTRACCIÓN DE SUBUNIDADES RIBOSOMALES 40S Y 60S:	70
M.1.10.- CEPAS BACTERIANAS:	70
<i>M.1.10.a.-Medios de cultivo para E. Coli.</i>	70
M.2.- SOLUCIONES Y TAMPONES DE TRABAJO:	71
M.2.1.- TAMPONES DE ELECTROFORESIS.	71
<i>M.2.1.a.- Tris-Borato TBE de Ambion (10x) para 1 litro de agua:</i>	71
<i>M.2.1.b.- Tris-Acetato TAE de Ambion (25x) para 1 litro de agua:</i>	71
<i>M.2.1.c.- Tampón nativo (10x):</i>	71
<i>M.2.1.d.- Tampón TMN (5x):</i>	71
<i>M.2.1.e.- Tampón TSE (10x):</i>	72
M.2.2.- TAMPONES DE CARGA EN GEL.	72
<i>M.2.2.a.- Tampón de carga en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (1.5x):</i>	72
<i>M.2.2.b.- Tampón de carga en geles nativos de poliacrilamida (1.5x):</i>	72
<i>M.2.2.c.- Tampón de carga en geles nativos de agarosa (6x):</i>	72
M.2.3.- TAMPONES DE ELUCIÓN	73
<i>M.2.3.a.- Tampón de Elución T1 (10x):</i>	73
<i>M.2.3.b.- Solución de acetato de sodio glicógeno:</i>	73
<i>M.2.3.c.- Solución de silicona al 4%</i>	73
M.2.4.- SOLUCIONES PARA LA PURIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD RNASA P HUMANA.	73
<i>M.2.4.a.-Tampón Fosfato Salino: 1 tableta de PBS Sigma /200ml de agua bidestilada.</i>	73
<i>M.2.4.b.-Tampón Purificación P humana NH₄Cl 10x:</i>	73
<i>M.2.4.c.-Tampón TKM:</i>	74
<i>M.2.4.d.-Tampón Purificación P humana NH₄Cl 50mM:</i>	74
<i>M.2.4.e.-Tampón para gradiente NH₄Cl 100mM:</i>	74
<i>M.2.4.f.-Tampón para gradiente NH₄Cl 350mM:</i>	74

<i>M.2.4.g.-Tampón para gradiente de glicerol 15%:</i>	74
<i>M.2.4.h.-Tampón para gradiente de glicerol 25%:</i>	75
M.2.5.- SOLUCIONES PARA LA PURIFICACIÓN DE SUBUNIDADES RIBOSOMALES 40S DE CÉLULAS HELa.	75
<i>M.2.5.a.- Solución de lisis celular sobre células HeLa:</i>	75
<i>M.2.5.b.- Soluciones de purificación de subunidades ribosomales 40S/60S de células HeLa.</i>	76
<i>M.2.5.c.- Gradientes de sacarosa:</i>	76
M.2.6.-TAMPONES Y SOLUCIONES DE REACCIÓN.	77
<i>M.2.6.a.-Tampón P humana 5x:</i>	77
<i>M.2.6.b.- Tampón para la reacción de la RZ de cianobacteria Synechocystis 5x:</i>	77
<i>M.2.6.c.- Tampón de reacción con ARNsA T1 en condiciones desnaturalizantes 2x:</i>	77
<i>M.2.6.d.- Tampón TFB I y II:</i>	77
M.2.7.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS.	78
M.2.8.- SECUENCIACIÓN MASIVA DE ROCHE:	78
M.3.- MÉTODOS:	79
M.3.1.- CULTIVO BACTERIANO.	79
M.3.2.- CRIO-CONSERVACIÓN DE BACTERIAS.	79
M.3.3.- TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> CON PLÁSMIDOS RECOMBINANTES.	79
<i>M.3.3.a.-Preparación de células electro competentes.</i>	79
<i>M.3.3.b.-Preparación de células competentes para choque térmico.</i>	80
<i>M.3.3.c.-Electroporación:</i>	80
<i>M.3.3.d.- Transformación por Choque térmico:</i>	80
<i>M.3.3.e.- Elección de colonias recombinantes de <i>E. coli</i>:</i>	81
M.3.4.- EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.	81
M.3.5.- SECUENCIACIÓN DE ADN.	81
M.3.6.- SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS:	81
<i>M.3.6.a.- Síntesis química de oligonucleótidos:</i>	81
<i>M.3.6.b.- Cuantificación de ácidos nucleicos.</i>	82
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):</i>	82
M.3.7.- PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	83
<i>M.3.7.a.- Extracción fenólica.</i>	84
<i>M.3.7.b.- Precipitación con etanol.</i>	84
M.3.8.-SINTESIS DE ARN. TRANSCRIPCIONES <i>IN VITRO</i>.	84
<i>M.3.8.a.- Transcripción estándar in vitro.</i>	84

<i>M.3.8.b.- Transcripción con kit comercial. (Megatranscripciones)</i>	84
<i>M.3.8.c.- Purificación de los productos de transcripción.</i>	84
M.3.9.- TÉCNICAS DE MARCAJE RADIACTIVO DEL ARN.	87
<i>M.3.9.a.-Marcaje interno.</i>	87
<i>M.3.9.b.- Transcripción preparativa marcada inteARNmente con baja actividad específica.</i>	87
<i>M.3.9.c.- Marcaje en el extremo 5':</i>	88
<i>M.3.9.d.-Marcaje en el extremo 3'.</i>	88
M.4. TÉCNICAS SEPARATIVAS: ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	89
M.4.1.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.	89
M.4.2.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTES:	89
M.4.3.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA NATIVOS:	89
M.4.4.- VISUALIZACIÓN POR AUTORADIOGRAFÍA:	89
M.5.- EXTRACCIONES DE ACTIVIDAD RNASA P DE CÉLULAS HELA:	90
M.5.1.- PURIFICACIÓN PARCIAL DE RNASA P HUMANA.	90
<i>M.5.1.a - Preparación de la fracción subcelular S20:</i>	90
<i>M.5.1.b - Preparación de la columna y desarrollo de la cromatografía de intercambio aniónico.</i>	91
<i>M.5.1.c.- Fraccionamiento en gradiente de glicerol.</i>	94
<i>M.5.1.d.- Determinación de las fracciones positivas procedentes del gradiente de glicerol.</i>	95
M.5.2.- CONCENTRACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA ACTIVIDAD RNASA P.	96
M.6.- EXTRACCIONES DE SUBUNIDADES RIBOSOMALES DE CÉLULAS HELA:	96
M.6.1.- CULTIVOS CELULARES DE LÍNEA HELA:	96
M.6.2.- LISIS DE LAS CÉLULAS HELA:	97
<i>M.6.2.a.- Lisado con Triton-x:</i>	97
<i>M.6.2.b.- Lisado por ósmosis con soluciones.</i>	97
M.6.3.- EXTRACCIÓN DE LOS RIBOSOMAS DE CÉLULAS HELA:	98
M.6.4.- SEPARACIÓN DE LAS SUBUNIDADES RIBOSOMALES 40S Y 60S DE LOS RIBOSOMAS DE CÉLULAS HELA:	98
<i>M.6.4.a.- Fraccionamiento en gradiente de sacarosa.</i>	99
M.6.5.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SUBUNIDAD RIBOSOMAL 40S.	100
M.7.- REACCIONES CON SONDAS BIOQUÍMICAS:	101
M.7.1.- DIGESTIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: ADN	101

<i>M.7.1.a.- Digestión de ADN con enzimas de restricción.</i>	101
<i>M.7.1.b.- Digestión de ADN con DNAsa RQ1.</i>	101
M.7.2.- DIGESTIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: ARN	101
<i>M.7.2.a.- Reacciones con RNAsa III de E. coli.</i>	101
<i>M.7.2.b.- Reacciones con la ribozima RZ6803 de la RNAsa P de Synechocystis.</i>	102
<i>M.7.2.c.- Reacciones con RNAsa P humana.</i>	102
<i>M.7.2.d.- Ensayos de estructura con RNAsas sensibles a simple y doble cadena.</i>	103
M.7.3.- REACCIONES CON RADIACIÓN UV-C 325NM:	103
M.8.-OTRAS REACCIONES.	104
M.8.1.- LIGACIÓN DE INSERTOS DE ADN EN PLÁSMIDOS BACTERIANOS.	104
M.8.2.-TRATAMIENTO CON PROTEINASA K Y SDS.	104
M.8.3.- ENSAYOS DE ASOCIACIÓN EN GELES NATIVOS.	105
<i>M.8.3.a.- Ensayos de anillamiento o unión visualizadas en geles nativos.</i>	105
<i>M.8.3.b.- Ensayos de reclutamiento de subunidades 40S en geles nativos: Binding</i>	105
M.8.4.- REACCIÓN DE POLIADENILACION DEL ARN.	106
M.8.5.- REACCIÓN DE POLIURIDINACIÓN DEL ARN.	106
M.8.6.- REACCIONES DE RETROTRANSCRIPCIÓN (RT).	106
RESULTADOS	109
R.1.- MODELOS DE ESTUDIO: POBLACIONES DE MUTANTES ALEATORIOS <i>IN VITRO</i> Y EN CULTIVOS TRATADOS Y SIN TRATAR CON RIBAVIRINA.	111
R.1.1.- MUTAGÉNESIS ALEATORIA <i>IN VITRO</i>:	111
<i>R.1.1.a.- Poblaciones de mutantes de ADN de la región genómica correspondiente a la secuencia VHC1-542 in vitro:</i>	111
<i>R.1.1.b.- Caracterización de las mutaciones de las poblaciones de VHC in vitro.</i>	114
R.1.2.- POBLACIONES DE VHC EXTRAIDAS DE CULTIVOS CON Y SIN TRATAR CON RIBAVIRINA.	115
<i>R.1.2.a.- Medida de los índices mutacionales in cultivo.</i>	116
R.1.3.- SECUENCIACIÓN MASIVA DE POBLACIONES DE VHC EXTRAÍDAS DE CULTIVOS.	117
<i>R.1.3.a.- Caracterización de las mutaciones de las poblaciones de VHC de cultivo.</i>	118
<i>R.1.3.b.- Identificación de las mutaciones: haplotipos de VHC (2a) en cultivos.</i>	119
<i>R.1.3.c.- Situación de las mutaciones en clones a pases largos.</i>	121

R.1.4.- POBLACIONES MUTANTES DE ARN “<i>IN VITRO</i>”.	122
<i>R.1.4.a.- Transcripciones del ARN de la región genómica del VHC1-542.</i>	122
<i>R.1.4.b.- Poblaciones in vitro de ARNs control.</i>	124
R.2.- EFECTO DE LA VARIABILIDAD SOBRE LA UNIÓN MIR122:VHC1-542.	124
R.2.1.- REACCIONES DE UNIÓN ENTRE EL MIR122* Γ- P³² ATP Y EL VHC1-542.	125
R.3.- EFECTO DE LA VARIABILIDAD SOBRE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA REGIÓN VHC1-542.	128
R.3.1.- CONTROL DE LA ACTIVIDAD RNASA III DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>.	128
R.3.2.- DIGESTIÓN CON EC-RNAsa III SOBRE EL VHC1-542.	130
<i>R.3.2.a.- Patrón de corte de la Ec-RNAsa III sobre el VHC1-542.</i>	130
<i>R.3.2.b.- Digestión de la Ec-RNAsa III sobre las poblaciones del VHC1-542.</i>	131
R.4.- ESTUDIO CONFORMACIONAL DEL VHC VS EL RATIO DE MUTACIONES.	134
R.5.- EFECTO DE LA VARIABILIDAD SOBRE LAS FRACCIONES DE CADENA SENCILLA Y DOBLE EN EL VHC1-542.	138
R.6.- ESTUDIO CONFORMACIONAL DEL VHC1-542.	139
R.7- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA GENETICINA EN LA REGIÓN VHC1-542 SOBRE LA ACTIVIDAD RNAsa III.	140
R.8.- EFECTO DE LA VARIABILIDAD SOBRE EL RECONOCIMIENTO DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA TIPO ARNT DEL VHC1-542 CON LA ACTIVIDAD RNAsa P.	143
R.8.1.- CONTROL DE LA ACTIVIDAD RNAsa P HUMANA Y DE RZ DE <i>SYNECHOCYSTIS</i>:	143
R.8.2.- DIGESTIÓN DE LA ACTIVIDAD RNAsa P SOBRE EL VHC1-542.	145
R.9.- EFECTO DE LA VARIABILIDAD SOBRE LA ESTRUCTURA TERCIARIA LOCAL E-LOOP DEL VHC.	147
R.10.- ESTUDIO DEL RECLUTAMIENTO DE LA SUBUNIDAD 40S POR EL IRES DEL VHC <i>IN VITRO</i> VS RATIO DE MUTACIONES.	149
R.10.1.- CONTROL DEL RECLUTAMIENTO DE 40S CON EL IRES CrPV1-198.	149
R.10.2.- RECLUTAMIENTO 40S-IRES VHC VS RATIO DE MUTACIONES.	151
R.11- ESTUDIO DEL RECLUTAMIENTO DE LA SUBUNIDAD 40S POR EL VHC EN CULTIVOS (TRATADOS Y SIN TRATAR CON RIBAVIRINA).	153

D.- DISCUSIÓN	159
D.1.- ANÁLISIS DEL MODELO DE ESTUDIO. CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD.	159
D.1.1.- CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD SOBRE LAS POBLACIONES <i>IN VITRO</i>.	159
<i>D.1.1.a.- Efecto de la variabilidad en el reconocimiento de la secuencia promotora por la T7-ARN Polimerasa.</i>	160
<i>D.1.1.b.- Naturaleza de la variabilidad introducida en las poblaciones in vitro.</i>	161
D.1.2.- CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD SOBRE LAS POBLACIONES <i>IN CULTIVO</i>.	161
<i>D.1.2.a.- Caracterización de la variabilidad mediante técnicas clásicas y UPDS.</i>	161
<i>D.1.2.b.- Naturaleza de la variabilidad de las poblaciones extraídas in cultivo.</i>	162
D.2.- EFECTO DE LA VARIABILIDAD EN EL RECONOCIMIENTO ESTRUCTURAL <i>IN VITRO</i>:	163
D.2.1.- EFECTO SOBRE LA UNIÓN DEL VHC1-542 CON EL MIR122. RECONOCIMIENTO DE ESTRUCTURA 1ª (SECUENCIA).	163
D.2.2.- RECONOCIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS 2ªS CON LA ACTIVIDAD RNAsa III:	164
<i>D.2.2.a.- Efectos sobre el reconocimiento de la RNAsa III en las poblaciones del control.</i>	165
<i>D.2.2.b.- Efecto de la variabilidad sobre el reconocimiento del VHC1-542 con RNAsa III.</i>	165
D.2.3.- RECONOCIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS 3ªS CON LA ACTIVIDAD RNAsa P.	167
<i>D.2.3.a.- Efectos de la variabilidad en el reconocimiento de la RNAsa P sobre un control.</i>	167
<i>D.2.3.b.- Efecto de la variabilidad en el reconocimiento de la RNAsa P sobre el VHC1-542.</i>	167
D.2.4.- RESPUESTAS DE LAS ESTRUCTURAS 3ª LOCALES TIPO <i>E-LOOP</i> FRENTE A LA VARIABILIDAD:	168
D.2.5.- RESPUESTAS CONFORMACIONALES FRENTE A LA VARIABILIDAD:	168
<i>D.2.5.a.- Efectos de la variabilidad sobre el equilibrio conformacional.</i>	169
<i>D.2.5.b.- Efectos de la variabilidad sobre la competición entre, el binding del miR122 y el switch intramolecular en el VHC1-542, a través de la actividad RNAsa III.</i>	169
<i>D.2.5.c.- Efectos de la variabilidad sobre el reconocimiento de RNAsas dependientes de estructura VI y TI.</i>	171
<i>D.2.5.d.- Efectos de la geneticina sobre el reconocimiento de la actividad RNAsa III vs variabilidad.</i>	172
D.3.- EFECTO DE LA VARIABILIDAD SOBRE EL RECLUTAMIENTO DE LA SUBUNIDAD 40S:	173
D.3.1.- EFECTO DE LA VARIABILIDAD SOBRE EL BINDING DEL CONTROL CRPV-40S <i>IN VITRO</i>:	173
D.3.2.- EFECTO DE LA VARIABILIDAD SOBRE EL BINDING IRES DEL VHC1-542:40S <i>IN VITRO</i>:	174

D.3.3.- EFECTO DE LA VARIABILIDAD SOBRE EL BINDING IRES: 40S DEL VHC IN CULTIVOS:	176
D.3.4.- ANÁLISIS DEL <i>BINDING</i> IRES-40S DEL VHC EN CLONES INF RESISTENTES TRAS PASES LARGOS.	177
CONCLUSIONE	179
S ANEXOS	183
ANEXO 1	185
ANEXO 2 y 3	193
BIBLIOGRAFÍA	199

ABREVIATURAS, ANGLICISMOS Y ACRÓNIMOS

Abreviaturas, Anglicismos y Acrónimos

5'UTR	<i>5' Untranslated Region</i> , región 5' no traducible.
3'UTR	<i>3' Untranslated Region</i> , región 3' no traducible.
RMN -C ¹³	Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono.
RMN-H ¹	Espectro de resonancia magnética nuclear de protones.
AA, aa	Aminoácido.
Ac ₂ O	Anhídrido acético.
AcOH	Ácido acético.
AcOK	Acetato potásico
ADN / ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
ALAL	<i>Apical Loop-Apical Loop</i> , interacción lazo apical con lazo apical.
ALIL	<i>Apical Loop-Internal Loop</i> , interacción lazo apical con lazo interno.
AMD	<i>Agerelated Macular Degeneration</i> degeneración macular asociada edad.
APS	Persulfato amónico.
ARN /ARN	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido Ribonucleico.
ATP	Adenosina trifostafo.
BMH	<i>Branched Multiple Hairmpins</i> , ramificación multiple de hoquillas.
cADN/ cADN	<i>copy ADN</i> , ADN copia.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DTT	1,4-Ditiotretiol.
EMSA	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética.
EtOAc	Acetato de etilo.
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , suero fetal bovino.
FME	Frecuencia de la estructura de mínima energía.
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> , Sitio de entrada interna al ribosoma.
LDI	<i>Long Distance Interaction</i> , Interacción a larga distancia.
LncARN	<i>Long non-Coding ARN</i> , ARN largo no codificante.
mARN/ ARNm	<i>Messenger ARN</i> , ARN mensajero.
miRNA/ miARN	Micro ARN.
Max	máxima.
Me	metilo.
Min	minuto.
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (forma reducida).
NcARN	<i>Non Coding ARN</i> , ARN no codificante.
NBS	N-bromosuccinimida.
NpcARN	<i>Non-Protein Coding ARN</i> , ARN no codificante de proteínas.
OD	Poder rotatorio.
PBS	<i>Primer Binding Site</i> , sitio de unión al cebador.
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa.
PEG's	Polietilen glycoles
PKR	<i>Protein Kinase ARN-activated</i> , proteína quinasa activada por ARN.
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i> , ácido nucleico peptídico.
Ppt	<i>Poly-Purine Track</i> , tramo de purinas
PUt	<i>Poly-Uridine Track</i> , tramo de poliuridinas.

Pf	punto de fusión
RNA/ ARN	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucleico.
RPR	<i>ARNse P ARN</i> , ARN de la RNAsa P.
rARN	<i>Ribosomal ARN</i> , ARN ribosomal
RT-PCR	<i>Real Time PCR</i> , PCR en tiempo real
SArMV/ VArM	Satélite del virus del mosaico del Arabis.
scARN	<i>Small Cytoplasmic ARN</i> , pequeño ARN citoplasmático
SDS	dodecilsulfato sódico
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment</i> , evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial.
siARN	<i>Small interfering ARN</i> , ARN pequeño interferente
SL	<i>Stem-loop</i>
snARN	<i>small Nuclear ARN</i> , ARN pequeño Nuclear.
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
t. a.	Temperatura ambiente
TM	Temperatura de Melting
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMSO	tetrametilsulfóxido
tARN	Transferent ARN, ARN de Transferencia ARNt
UTR-ARN	<i>UnTranslated ARN</i> , ARN no traducible
UV	Ultravioleta
VBVD	Virus de la diarrea viral bovina.
VCM	CitoMegaloVirus.
VFMD	<i>Foot-and-mouth disease virus</i> , virus de la fiebre aftosa.
VIH/ HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana.
VLA/ LAV	Virus asociado a linfadenopatía.

Anglicismos no traducidos y propuestas de traducción empleadas:

Antisense	Antisentido
Cap	Caperuza
Core	Núcleo (para el núcleo viral)
Frame-shifting	cambio de marco abierto de lectura traduccional.
Hairpin	Horquilla
Hammerhead	cabeza de martillo
Kissing-loop	interacción lazo-lazo
Kissing complex	Complejo lazo-lazo
Pseudoknot	Pseudo nudo
Riboswitch	Interruptor de ARN
Spliceosome	Espleiceosoma
Splicing	Corte y empalme
Wooble	Bamboleo

INTRODUCCIÓN

I.1. Actividad del ARN. Conceptos:

I.1.1. Función en el ARN.

En los años 80, ya se había demostrado que las moléculas de ARN podían contener la información genética codificada en sus secuencias de nucleótidos (Brenner, Jacob et al. 1961). Estaba demostrada su capacidad de hacer copias de sus secuencias, replicando su información (Weissman, Borst P et al. 1964) y también de transferir la información, al traducirse a proteínas (Palade and Siekevitz 1956) o retrotranscribirse a ADN (Temin HM and S. 1970). Por todo esto el ARN era considerado funcionalmente como un agente intermediario de la información genética. Crick, Orgel y Woese habían sugerido este paradigma molecular como posible origen de la vida (Crick 1966). Pero no fue hasta 1983, cuando los trabajos publicados por Thomas R. Cech y Sidney Altman demostraron las posibilidades catalíticas, *per sé*, de las moléculas de ARN (Cech 1983, Guerrier-Takada, Gardiner et al. 1983), otorgándoles un papel protagonista en el “*dogma central de la Biología Molecular*” (Crick 1970). El ARN se convirtió en la molécula primordial en los albores prebióticos y Gilbert concretó el modelo de “*ARN Word*” (Gilbert 1986) como base para un posible escenario evolutivo prebiótico. **(Anexo 1 Caja 1)**

Revisiones recientes recogen estudios que sugirieren la aparición de una colección original de secuencias cortas de ARN en condiciones prebióticas (Manrubia and Briones 2007, Briones, Stich et al. 2009). Estas moléculas presentarían la suficiente estabilidad y diversidad estructural, como para generar un repertorio básico de actividades funcionales, tipo corte o ligación, ventajosas en términos evolutivos y comunes entre diferentes combinaciones de secuencias. La combinación de esta colección prebiótica de estructuras modulares pudo originar la aparición de nuevas moléculas de ARN, de mayor longitud y actividades más especializadas.

Durante el transcurso de la evolución, estas actividades y funciones específicas para los ARN, se habrían ido mejorando hasta ser asumidas paulatinamente por proteínas. Aquellas actividades que la presión selectiva no ha podido mejorar se han “*fosilizado*” en el ARN (*ribozimas*), como por ejemplo el ribosoma o la subunidad ARN de la ribonucleoproteína RNAsa P, responsable de la actividad catalítica, y que se han encontrado conservadas en casi todos los organismos (Guerrier-Takada, Gardiner et al. 1983, Walker and Engelke 2006). Se han descrito *ribozimas naturales* en todos los reinos de la vida, en arqueas, en virus, en procariotas y en eucariotas, o como centros catalíticos de complejos ribonucleoproteicos.

Trabajos filogenéticos recientes señalan hacia una vía coevolutiva de los ácidos nucleicos con aminoácidos, pequeños péptidos, lípidos y otros predecesores celulares, sugiriendo una mayor complejidad en los albores prebióticos de la vida (Caetano-Anolles and Seufferheld 2013).

I.1.2. Niveles estructurales en el ARN.

El ARN es un heteropolímero con un esqueleto fosfodiéster de ribosas, que están unidas covalentemente a bases nitrogenadas formando secuencias de nucleótidos. Las secuencias de nucleótidos son susceptibles de formar puentes de hidrógeno intramoleculares entre sus bases, por complementariedad, dando lugar a regiones de doble cadena. Por otra parte, las moléculas de ARN tienden a plegarse sobre si mismas, principalmente para estabilizar los grandes potenciales electrostáticos debidos a las cargas de su esqueleto fosfodiéster. Las estructuras moleculares del ARN van a presentar, por tanto, una gran diversidad conformacional, que tiene una organización jerárquica análoga a la de las proteínas. Las secuencias de nucleótidos constituyen su “estructura primaria”. El conjunto de las regiones de doble cadena y las regiones desapareadas son su “estructura secundaria”. Las regiones con plegamientos y conformaciones tridimensionales, originadas por interacciones a larga distancia entre distintas partes de la molécula, forman su “estructura terciaria”.

I.1.2.a. Estructura Primaria: Secuencias en el ARN. Ejemplos en virus y ARNm.

Cada molécula de ARN es caracterizada por su secuencia de nucleótidos. Funcionalmente, las secuencias de bases de los ARN mensajeros codifican las secuencias de aminoácidos de las proteínas (Brenner, Jacob et al. 1961). Además de los ARN celulares, existe toda una diversidad de virus, más del 70% de los virus patógenos de los organismos superiores, cuya información genética está contenida también en secuencias de ARN. Tanto los ARNm como los ARN virales suelen estar flanqueados por regiones con secuencias no codificantes, implicadas con la propia regulación de su traducción y su replicación. Existen otros ARNs no codificantes con funciones más complejas, algunos de los cuales se verán en detalle, más adelante, en este trabajo. En el **Anexo 1 caja 2** se puede ver una clasificación general de los virus en función de la naturaleza y la estructura de sus ácidos nucleicos. Este trabajo de tesis se ha centrado en virus de ARN, cuya división **en función de su hebra** es:

- i) **Virus de hebra positiva de ARN:** Se consideran de hebra positiva porque sus secuencias de nucleótidos pueden ser traducidas directamente en los ribosomas a proteínas como los ARNm celulares. Como son el virus de la Hepatitis C (VHC) objeto de este trabajo. Los *Flavivirus* (como la fiebre amarilla o el dengue), los *Levivirus* (parásitos de bacterias), los *Coronavirus*, (de secuencias largas de ARN) como el SARS “*Síndrome Respiratorio Agudo Severo*”, los *Picornavirus* (virus de la Poliomiéltis) y otros virus parásitos de plantas como el virus del *Mosaico del Tabaco*.
- ii) **Virus de hebra negativa de ARN:** cuyas secuencias de nucleótidos no pueden traducirse directamente en los ribosomas, sino que han de ser previamente transcritas a sus secuencias positivas complementarias, como el virus de la gripe o el virus de la rabia.

I.1.2.b. Estructuras Secundarias en el ARN. Ejemplos en virus y ARNm.

Las moléculas de ARN no tienden a formar largas regiones de dobles hélices sino módulos de doble cadena de pequeño tamaño, formados por complementariedad de bases Watson-Crick (Gevertz, Gan et al. 2005). Estudios teóricos publicados, presentan recreaciones *in silico* (Schuster, Fontana W et al. 1994) que sugieren la tendencia espontánea de formación de una serie de motivos estructurales sencillos y comunes entre diferentes secuencias, por complementariedad de sus bases, con mínimos de energía pero limitada longitud modular (Briones, Stich et al. 2009). Los que se generan con más frecuencia en las recreaciones son presentados en la Figura 1.

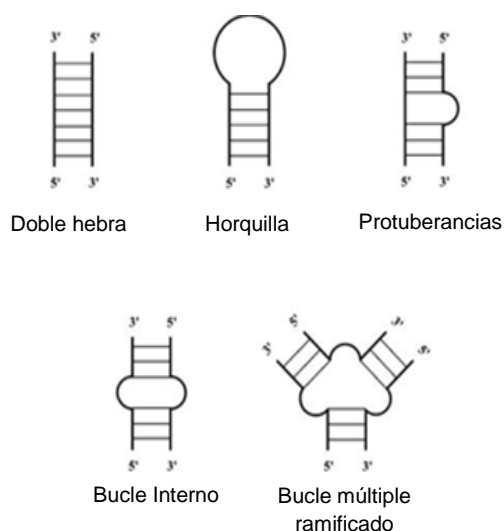


Figura 1: Principales motivos estructurales secundarios obtenidos por *ARNfold* (Hofacker 1994)

Estudios publicados posteriormente sobre la síntesis de heteropolímeros de ARN presentaron una colección de estructuras sencillas que coincidían con las previstas computacionalmente (Huang and Ferris 2003). Estos motivos de estructura secundaria han sido caracterizados en la naturaleza empleando sondas bioquímicas, como la enzima ribonucleasa III (RNAsa III) (Schweigsuth, Chelladurai et al. 1994) y con otros estudios, como los cinéticos (Nagel, Gulyaev et al. 2002).

Por ejemplo, en los ARN de transferencia están descritos, con aproximadamente el 60% de sus bases apareadas, cuatro tallos lazo con estructura de doble hélice en forma de cruz. Otro ejemplo descrito de estructuras secundarias son los elementos reguladores del hierro (IRE), de unos 28 nucleótidos no codificantes y que regulan la traducción o la estabilidad de los ARNm de la ferritina (Theil 1993). También los virus de ARN se caracterizan por poseer en sus secuencias regiones no traducibles, más o menos complejas, y ricas en motivos estructurales secundarios como los de la Figura 1. Como por ejemplo en la región 5' no traducible (UTR) del virus VHC, que ha constituido el modelo de trabajo de esta Tesis Doctoral y que se describirá en profundidad en esta Introducción.

I.1.2.c. Estructuras Terciarias en el ARN. Ejemplos en virus y en ARNm.

La estructura terciaria del ARN es el resultado de interacciones entre distintos motivos de estructura secundaria de la molécula y del amontonamiento de las bases de su secuencia, que tienden a plegarse sobre si mismas para optimizar su conjunto y estabilizar los potenciales electrostáticos. En el **Anexo 1 Caja 3** se describen algunos de los factores que influyen en los plegamientos que originan las estructuras terciarias del ARN (Butcher and Pyle 2011).

Los motivos estructurales secundarios son la base sobre la que se construye la estructura terciaria y sus interacciones intramoleculares constituyen el factor que más contribuye termodinámicamente a su estabilidad estructural. La estructura terciaria confiere a las moléculas de ARN su topología específica, directamente relacionada con sus funciones y que es esencial para su actividad. Por ejemplo, la ribozima *hammerhead* con su característica forma de tres motivos estructurales en horquilla, de longitudes variables confluyendo en un lazo central y con unas secuencias concretas alrededor de un sitio activo que le proporcionan una actividad de autocorte (Uhlenbeck 1987).

Los **ARNt** son el mejor ejemplo de estructuración terciaria del ARN. Sus cuatro tallos lazo de doble hélice están plegados, formando una "L". La función de los ARNt es el aporte de los aminoácidos a la síntesis proteica y su fosilización en el proceso de traducción bajo la presión selectiva de la evolución, pone de manifiesto su vital importancia (Lyons and Robertson 2003). También son ejemplos de estructuras terciarias, las regiones no codificantes de los ARN virales, que adoptan estructuras terciarias complejas donde se acumulan distintos tipos de estructuras y motivos secundarios.

I.1.2.d. Dinámica conformacional.

Las estructuras secundarias y terciarias del ARN pueden formar interacciones intramoleculares locales (en cis) y de largo alcance (Butcher and Pyle 2011), dando lugar a conformaciones o reagrupamientos tipo: contactos entre horquillas (*kissing-loop*), bucles (*switches*, *riboswitches*) y pseudonudos (*pseudoknots*) que evidencian equilibrios entre formas, con potenciales funciones reguladoras de la expresión del ARN (Tucker and Breaker 2005).

Por ejemplo, el bucle (*switch*) identificado en el extremo 5'UTR del VHC y su interacción con el micro ARN hepático miR122 evidencia una posible función reguladora (Diaz-Toledano, Ariza-Mateos et al. 2009). Para sondear la existencia de estas conformaciones se han empleado reacciones con aptámeros o interacciones ARN-proteína (Coppins, Hall et al. 2007).

I.1.3. Tipos de motivos estructurales en el ARN.

Los motivos estructurales en el ARN son el resultado de una posible evolución modular (Manrubia and Briones 2007), necesaria para explicar la amplificación de su complejidad molecular (Gevertz, Gan et al. 2005). En el **Anexo 1 Caja 4** se reúnen los principales motivos estructurales descritos en el ARN, pseudonudos, apilamientos de hélices, lazos T, cremalleras de ribosas etc... (Butcher and Pyle 2011).

La importancia de los motivos estructurales ha quedado puesta de manifiesto a lo largo de los distintos trabajos publicados y que apuntan a su participación en las funciones del ARN. Los pseudonudos por ejemplo: se ha descrito un PSK en el ARN de la telomerasa, crítico para su actividad (Theimer C.A. et al. 2007) y también se ha identificado en el ARN de telómeros (TERRA, *telomeric repeat-containing ARN*) implicado con la regulación de su longitud (Luke, B. et al. 2009). Uno de los elementos más conservados de la RNAsa P es su PSK. Los virus utilizan estructuras pseudonudo para simular motivos tipo ARNt (*tARN-like*) (Nadal, Martell et al. 2002) siendo los más conocidos los identificados en los virus de plantas (Rudinger-Thirion, Olsthoorn et al. 2006).

En este trabajo de Tesis estudiaremos en profundidad la estructura *tARN-like* descrita en el elemento IRES de la región 5'UTR del VHC (Berry, Waghray et al. 2011), involucrada en el reclutamiento del ribosoma y en la traducción independiente de Cap (Filbin and Kieft 2011, Filbin, Vollmar et al. 2013).

I.1.4. Simulaciones estructurales “*in silico*” en el ARN.

La acumulación de datos estructurales, obtenidos a partir de los motivos y estructuras resueltas experimentalmente, como la ribozima “*Hammerhead*” (Uhlenbeck 1987) o ARNs ribosomales, han sido la fuente de información sobre las posibilidades y principios que rigen la organización tridimensional y los plegamientos de las cadenas de ARN (Halder and Bhattacharyya 2013). Los avances técnicos, el *software*, la capacidad computacional, los conocimientos experimentales y teóricos acumulados, junto a las restricciones que contienen aplicadas a los algoritmos informáticos, han permitido desarrollar técnicas de modelado virtual para la elucidación de estructuras de moléculas de ARNs grandes y complejos. El término “*In silico*” se usa para caracterizar simulaciones informáticas de procesos biológicos. Algunos programas disponibles para la simulación de plegamientos estructurales con el ARN son *mfold*¹, *MOLMOL*², *MC-Fold*³, *MC-Sym*, (Hofacker 2003), *ARNz* (Gruber, Neubo et al. 2007) o *InfeARNI*... Estos programas de simulación emplean algoritmos matemáticos que tratan de considerar los principios fisicoquímicos y energéticos que rigen el plegamiento de los motivos estructurales presentes en una secuencia de ARN. En el **Anexo 1 Caja 5** se presenta un resumen de los principales algoritmos bioinformáticos que se emplean en estos programas.

¹ <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>

² <http://www.msg.ucsf.edu/local/programs/molmol/manual.html>

³ <http://www.major.irc.ca/MC-Fold/>

I.2. Teoría de Cuasiespecies.

La teoría de cuasiespecies fue introducida por Manfred Eigen como un modelo que trata de explicar el origen evolutivo de la información genética, para sistemas macromoleculares prebióticos (Eigen 1971). Tomó como punto de partida la aparición y evolución de especies autorreplicativas, capaces de adquirir y almacenar la información genética. El modelo evolutivo de cuasiespecies es el resultado de los principios de replicación, mutación y selección, sobre un marco de genética de poblaciones, con altas tasas de mutación y múltiple selección de genes.

La originalidad del marco conceptual introducido por Eigen y su formulación estadística, se encontraba en la propia descripción de la población de la cuasiespecie, constituida por una distribución compleja de mutantes con una enorme variabilidad genética. La población de la cuasiespecie está caracterizada por el mutante de mayor eficacia replicativa, aquel que posee el mayor peso estadístico en la población y al que llamó “*secuencia maestra*”. Alrededor de esta secuencia se sitúan el resto de los miembros de la población formando una “*nube de mutantes*” (Figura 2).

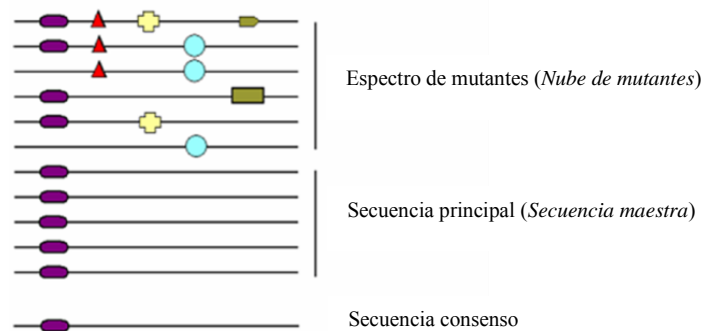


Figura 2: Esquema de la cuasiespecie teórica

Este modelo de genética de poblaciones de polímeros prebióticos, representa el efecto que ejerce la fuerza de selección sobre una población de organismos simples con una elevada variabilidad génica. Las cuasiespecies constituirían un modelo opuesto a una dinámica de poblaciones de organismos complejos que presentan una baja variabilidad frente a la selección.

Joyce defiende que la teoría de las cuasiespecies respalda implícitamente la idea del llamado “*ARN World*” (Gilbert 1986) que describimos en el **Anexo 1, caja 1**, (Joyce 1996) y su aplicación conceptual al estudio de los virus de ARN es directa (Holland 2006). De esta forma se ha podido explicar la enorme plasticidad genética viral y su capacidad de adaptación. Las complejas distribuciones de mutantes de los virus de ARN y su dinámica de poblaciones coinciden con el modelo. El elevado porcentaje de mutaciones y la multiplicidad génica confieren a “*la mutación*” una importancia por sí misma, del mismo nivel que la replicación, y no un simple factor de perturbación de la selección sobre la población (Eigen 1996).

I.2.1. Espacio de secuencias: Genotipo.

El conjunto de las diferentes secuencias de nucleótidos, con su información genética y todos los polimorfismos accesibles que están relacionadas entre sí y constituyen una misma entidad biológica, es el “*espacio de secuencias*” de una cuasiespecie y constituye su “*Genotipo*” (Eigen and Schuster 1977).

I.2.1.a. La mutación: variabilidad de secuencias.

La fidelidad de las copias de las secuencias en los ciclos replicativos está limitada por la producción y reproducción de errores (Joyce 1996), y es la responsable de la elevada variabilidad de la cuasiespecie (Eigen and Schuster 1977). Volviendo a los orígenes, en un contexto prebiótico, Johnston apunta que una replicasa primitiva de ARN podría arrastrar un ratio de error del orden de $1,1 \times 10^{-2}$, generando así una variedad de secuencias interrelacionadas (Johnston, Unrau et al. 2001). La degeneración de secuencias a partir de una secuencia original aportaría una ventaja compitiendo en un contexto evolutivo, ofreciendo posibles opciones de adaptación medioambiental o la capacidad de saltar fácilmente a cualquiera de las otras secuencias interrelacionadas. Esta variación genera un flujo evolutivo, con una direccionalidad hacia las secuencias más degeneradas. El genotipo de la cuasiespecie va a evolucionar como un gradiente de secuencias, desde la aleatoriedad mutacional hacia la selección de las secuencias más degeneradas o con más éxito replicativo.

La existencia de mutaciones comunes entre diferentes secuencias y la acumulación de una secuencia, como consecuencia de su capacidad replicativa o de la evolución desde secuencias cercanas del espacio de secuencias, sugieren un “*acoplamiento mutacional*” (Eigen 1996). Este acoplamiento mutacional en los genotipos es una característica del modelo de cuasiespecies, y está clara en su formalismo matemático. Esto implica que un fenotipo puede ser recurrente a partir de mutaciones desde fenotipos y genotipos cercanos (Holmes 2009). La degeneración del espacio de secuencias va a amplificar la capacidad del almacenamiento y la reproducción de la información, confiriendo robustez el contenido de la cuasiespecie. Todo el conjunto de la cuasiespecie actúa a modo de reservorio genético, lo que hace más rápidamente accesible su salto entre secuencias dentro de su genoma (Arias, Ruiz-Jarabo et al. 2004). En el Anexo 1 caja 6 se presentan algunos parámetros para la caracterización del espacio de secuencias de una cuasiespecie.

I.2.1.b. Relaciones filogenéticas.

El modelo de cuasiespecies difiere matemáticamente de una red neural. Por ello para comprender la degeneración del espacio de secuencias y sus fenotipos es importante realizar el estudio comparativo y el tratamiento estadístico de las secuencias de la cuasiespecie. A través de la construcción de matrices de distancias genéticas obtenidas del tratamiento comparativo de sus secuencias, es posible reconstruir las relaciones filogenéticas entre los diferentes genotipos y fenotipos (Fitch and Margoliash 1967).

Estas relaciones filogenéticas pueden trazar una forma gráfica “*tipo árbol*” y, con las restricciones impuestas, va a permitir la identificación del tronco, la raíz genética común o el antecesor común más reciente (Rico-Hesse, Harrison et al. 1998).

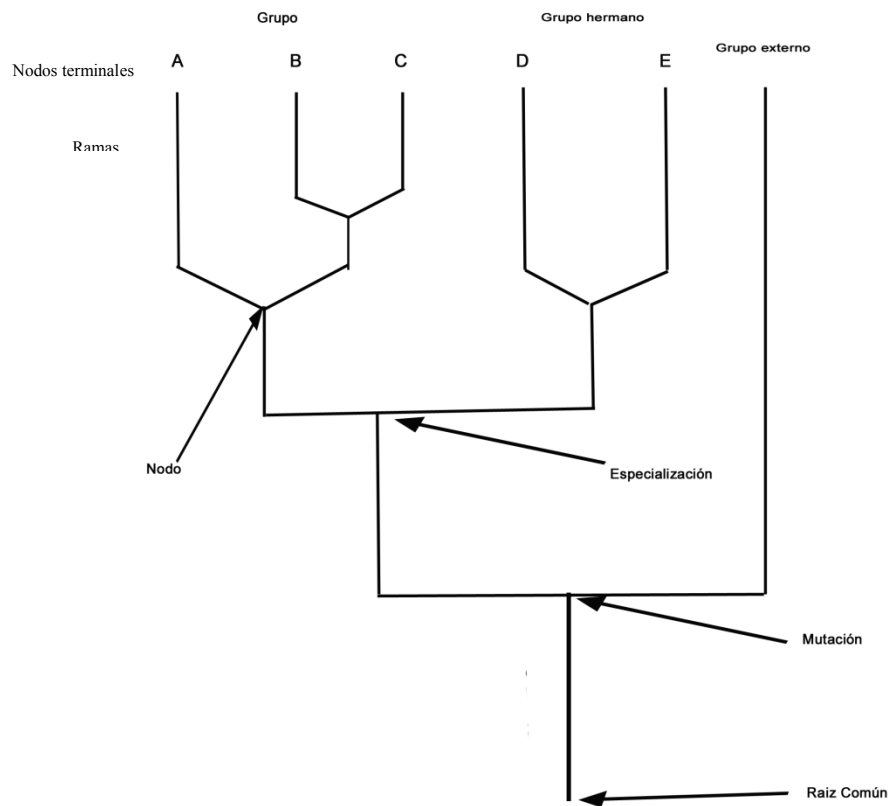


Figura 3: Esquema de un árbol filogenético. Los componentes son: los extremos o nodos terminales, que se refieren a las secuencias de interés. Los nodos internos representan ancestros comunes compartidos por las distintas ramas que se han separado por la aparición de mutaciones. La raíz respresenta la secuencia ancestral común a todos los nodos. Las secuencias relacionadas por un mismo nodo forman un grupo y los grupos que comparten un nodo son grupos hermanos. Un grupo externo es aquel que está más lejanamente emparentado con los grupos de interés y es empleado para enraizar el árbol, es decir, a situar la primera ramificación.

Los modelos filogenéticos permiten el análisis de las convergencias y las reversiones de los genomas, caracterizando direcciones evolutivas comunes a través de regiones conservadas en las secuencias. También es posible la identificación de los diferentes mecanismos involucrados en la generación de variaciones en las secuencias: sustitución o inserción de nucleótidos, delección de tripletes, y la inserción o sustitución de un segmento (Casino, McAllister et al. 1999).

Las ramas comunes identifican relaciones evolutivas entre diferentes genotipos y con ellos la reconstrucción de posibles recorridos (Culasso, Bare et al. 2014). La composición de la cuasiespecie puede tener implicaciones importantes con respecto a la persistencia viral y la respuesta a la terapia. Resultados recientes señalan a la existencia de una relación entre la heterogeneidad de la población y la respuesta al tratamiento en pacientes infectados con hepatitis C crónica (Jardim, Bittar et al. 2013).

I.2.2. Espacio de Estructuras: Fenotipo.

El conjunto de las diferentes estructuras adoptadas por las secuencias que corresponden al espacio de secuencias de una cuasiespecie, van a constituir el “*espacio de estructuras*” de la cuasiespecie y es lo que conforma el “*fenotipo de la cuasiespecie*” (Schuster 1997).

Muchas mutaciones sobre las secuencias van a descartarse por no aptas por la selección natural, afinando la distribución de la población en relación a las condiciones medioambientales. Las secuencias accesibles del espacio de secuencias de la cuasiespecie van a presentar un conjunto limitado de estructuras viables, que en muchas ocasiones constituye una única estructura común a las diferentes secuencias. Todas las estructuras de una población de ARN no van a ser funcionales o van a presentar el mismo grado de actividad, por lo que la adaptación va a localizar y seleccionar aquellas que aporten ventajas adaptativas o funcionales, apareciendo máximos de viabilidad para las secuencias portadoras de dichas estructuras (Schuster 1997).

Las estructuras tridimensionales viables están condicionadas por su contenido en módulos de motivos estructurales secundarios y por la formación de estructuras complejas a través de sus interacciones en cis, que aumentan la estabilidad del conjunto (Schuster 1997). Estudios de alineamiento múltiple de secuencias sobre el VIH, han revelado que los elementos estructurales secundarios conservados dentro de su genoma de cuasiespecie, son seis veces más estables termodinámicamente que los no conservados y confieren una mayor robustez al contexto estructural del genoma (Wagner and Stadler 1999). Las interacciones a larga distancia, *riboswitches*, *pseudoknot*... así como interacciones intermoleculares con micro ARNs, o ARNs antisentido, aumentan la estabilidad de las estructuras y han demostrado constituir el conjunto regulatorio de las funciones estructurales de los ARN virales.

I.2.3. De las cuasiespecies teóricas a las cuasiespecies víricas.

Eigen describe la cuasiespecie teórica a partir de la capacidad autoreplicativa de las moléculas dentro de un sistema autosuficiente y de la evolución de la información “genética” que contienen (Eigen 1971). Teóricamente, trata de explicar la evolución molecular de polímeros biológicos a través de la introducción de variabilidad en el sistema y de sus procesos de selección.

Desde su planteamiento, esta teoría fue consistente con los principios evolutivos darwinianos observados experimentalmente en el fago Q β *in vitro* (Spiegelman, Haruna et al. 1967). Los resultados obtenidos con su genoma poblacional representaron un ejemplo de la validez del modelo teórico pensado para replicones e introducido para la explicación del origen de la vida. Esta fue la primera demostración experimental de la teoría de las cuasiespecies en virus de ARN (Domingo, Flavell et al. 1976, Domingo, Sabo et al. 1978). Otros virus como el causante de la fiebre aftosa VFA o el de la estomatitis vesicular también demostraron una naturaleza de cuasiespecie (Domingo, Martinez-Salas et al. 1985, Holland, Domingo et al. 1990).

La realidad genética que relacionamos con las características fenotípicas de un virus, no está contenida en cada secuencia vírica en particular, sino en todas las secuencias que forman el conjunto de la cuasiespecie. Es decir, la información génica de una cuasiespecie viral es el resultado de la aportación del conjunto de todas sus secuencias, aunque dominadas por la secuencia que presenta mayor peso proporcional en la población o *secuencia maestra* (Eigen and Schuster 1977, Eigen and Schuster 1982). Conceptualmente el modelo se ajusta perfectamente a la realidad biológica que demuestran los virus: una población genómica de secuencias (ARNs) en torno a una secuencia mayoritaria o virus salvaje (*wild type*), con mayor peso en la población y relacionada con la mayor eficacia biológica en el estado estacionario de la cuasiespecie. Si se asigna una posición a cada nucleótido de la secuencia, la secuencia con la base más probable en cada posición es lo que se denomina *secuencia consenso*. (Domingo, Baranowski et al. 2000, Domingo 2002, Domingo, Holland et al. 2002, Domingo 2007, Domingo and Gomez 2007).

I.2.3.a. Bases moleculares de la variabilidad génica de los virus ARN.

La enorme variabilidad identificada en las infecciones virales es fruto de la velocidad de replicación y de las altas tasas de error de las copias (Steinhauer and Holland 1987). Las tasas de replicación demostradas experimentalmente son del orden de 10^{10} a 10^{11} viriones al día, en infecciones por VIH o VHC (Clarke, Duarte et al. 1994, Domingo, Escarmis et al. 1996, Mittler, Sulzer et al. 1998, Neumann, Lam et al. 1998). Las tasas de mutación de los virus de ARN se han estimado entre 10^{-3} y 10^{-5} mutaciones por nucleótido, lo que dado su tamaño genómico medio de 3 a 30 kb, conlleva un ratio de 0,1 a 1 mutación por genoma y ronda replicativa (Domingo, Sabo et al. 1978, Drake and Holland 1999, Domingo 2007, Domingo and Gomez 2007). Estos valores de tasa de mutación son de varios ordenes de magnitud superiores a las asociadas con la replicación de ADN, que se han descrito entre las 10^{-8} a 10^{-11} mutaciones por nucleótido (Echols and Goodman 1991).

Las limitaciones de las ARN replicasas virales son la causa de estas tasas de error. Como son su baja fidelidad de copia, la ausencia de una actividad correctora y de exonucleasas 3'-5' (Steinhauer, Domingo et al. 1992), así como a la inexistencia de mecanismos de corrección post-replicativa. Las ARN polimerasas virales también tienden a originar deleciones e inserciones al copiar tramos homopoliméricos (Bebenek, Abbotts et al. 1993). Por otra parte los fenómenos de recombinación y reordenamiento génico que mejoran la capacidad adaptativa de los virus, también son responsables de incrementar la variabilidad de sus genomas (Simmonds, Bukh J et al. 2005), especialmente en virus de ARN de polaridad positiva (Simmonds and Welch 2006). Las recombinaciones pueden ser homólogas o heterólogas dependiendo de la naturaleza de sus secuencias de origen; y replicativas o no replicativas, si requieren la amplificación del genoma viral (Domingo 2007). Estos mecanismos permiten a los virus compensar desventajas que pudieran venir arrastradas por las elevadas tasas de mutación o explorar las posibles ventajas funcionales presentes en otros genomas.

Las cuasiespecies virales están sometidas a continuos procesos de variación genética, competición y selección evolutiva. Las mutaciones que aportan alguna ventaja adaptativa a la secuencia, tenderán a fijarse en la cuasiespecie a través de la evolución molecular, aunque la mayor parte de las mutaciones identificables van a ser neutras (Kimura 1983). Las mutaciones neutras no contienen ventajas intrínsecas, sino que contribuyen a la robustez de la población frente a la selección (Quer, Hershey et al. 2001). El resultado es el de una deriva genética sobre la población se enriquece, por amplificación, de las mejores variantes pero que reserva en menor proporción el mayor número posible de variantes de menor éxito, potencialmente capaces de convertirse en dominantes en otras situaciones alternativas (Briones, de Vicente et al. 2006, Briones and Domingo 2008). El reservorio de variantes y los movimientos evolutivos de la cuasiespecie le confiere una gran capacidad adaptativa y un enorme potencial antigénico. Existiendo una relación directa entre la variabilidad de la cuasiespecie viral, dada por la tasa de mutación, la complejidad de la población y su patogenicidad (Vignuzzi, Stone et al. 2006). La contribución al *fitness* viral de la tasa de mutación y de la complejidad poblacional se ha puesto de manifiesto en la efectividad antiviral de inhibidores de la replicación combinados con agentes mutagénicos. Datos publicados han ofrecido resultados con un empleo secuencial de ambos, primero el inhibidor que ha de reducir la extensión de la población y después el mutágeno que provoca el aumento de las secuencias defectivas, arrastrando a la cuasiespecie hacia la extinción viral (Tapia, Fernandez et al. 2005, Perales, Iranzo et al. 2012).

I.2.3.b. Medidas de la variabilidad. Tasa de error.

La caracterización de la variabilidad presente en una cuasiespecie requiere de parámetros que relacionen las variaciones presentes en cada mutante respecto a la secuencia consenso de la cuasiespecie, por nucleótido o por ronda de cultivo (Domingo, Holland et al. 2002). La **tasa de error** o la **frecuencia de mutación** de una cuasiespecie viral, se define como el número de mutaciones por cada nucleótido (posición) de su secuencia respecto a la secuencia consenso y dividido por el número total de nucleótidos de la secuencia, siendo un parámetro muy preciso para describir la variabilidad (Domingo, Sheldon et al. 2012).

$$T_{mut} := \frac{n^{\circ} \text{ mut}}{\sum n^{\circ} \text{ nts} \cdot N}$$

n° nts son el número de nucleótidos de la secuencia y N es el número total de secuencias analizadas.

La complejidad de la cuasiespecie se puede estudiar a través de dos parámetros diferentes: la “**entropía de Shannon normalizada**” y P_n , que es el número de sitios polimórficos dividido por el número de nucleótidos secuenciados.

$$P_n = \frac{n^{\circ} P_s}{\sum n^{\circ} \text{ nts} \cdot N}$$

P_s “*polymorphic sites*” es el número de posiciones de la secuencia que presentan alguna secuencia con mutación en dichas posiciones.

La “*entropía Shannon*” se ha definido, en términos estadísticos, como las probabilidades de las diferentes secuencias que pueden aparecer, respecto a una determinada posición (Wolinsky, Korber et al. 1996) (Claude E. Shannon 1948 "A Mathematical Theory of Communication") (**Anexo 1 caja 6**). La entropía de Shannon normalizada se calcula como:

$$S_n = \frac{-\sum_i (P_i \ln p_i)}{\ln N}$$

Donde p_i es la frecuencia de cada secuencia en las cuasiespecies virales (Pawlotsky, Germanidis et al. 1998).

La “*entropía Shannon normalizada S_n* ” es, por tanto, una medida de la heterogeneidad específica de una determinada cuasiespecie y su valor varía de 0 (no diversidad) a 1 (máxima diversidad). También podría caracterizarse la heterogeneidad total de una cuasiespecie, como el producto de la entropía normalizada de Shannon y el logaritmo natural del número de partículas por microgramo de su ARN total (Cabot, Martell et al. 2000).

I.2.3.c. Hipótesis de la Catástrofe de Error.

La teoría de las cuasiespecies implica la existencia de un *límite de tolerancia* a la introducción de mutaciones en la población (Eigen and Schuster 1977, Swetina and Schuster 1982, Eigen and Biebricher 1988). A medida que aumentamos la tasa de mutaciones se produce un distanciamiento de la relación entre las secuencias y una disolución de la información contenida en el conjunto. La introducción de mutaciones alcanza un umbral donde la población total de mutantes es superior a la población de la secuencia consenso o “*tipo salvaje*” y la distribución de secuencias mutantes pasa a ser una distribución aleatoria: es la “**catástrofe de error**”. A partir de este límite todas las secuencias estarían presentes con igual proporción y el contenido de la información que caracteriza la cuasiespecie se pierde, es decir, se alcanza un máximo de “*entropía de Shannon*”. Este límite máximo de tolerancia a las mutaciones en la población, señala el umbral a partir del cual la selección deja de actuar y se pierde el equilibrio entre la distribución de mutantes, desapareciendo la adaptación y la optimización evolutiva (Eigen 2002). La acumulación de mutaciones por encima de este límite, provoca que todos los genomas sufran una selección negativa infinita arrastrando a la cuasiespecie a la extinción. El “**umbral de tolerancia a la mutación**” ha sido descrito como la tasa de mutación crítica, a partir de la cual la distribución de la población pierde su eficacia biológica (Hermisson, Redner et al. 2002). El concepto de catástrofe de error señala un límite de tolerancia a las mutaciones en la población. Pero el aumento del ratio de mutación no implica necesariamente alcanzar un “**umbral de extinción**”, porque éste exige la introducción de mutantes defectores en la población, letales para las estructuras funcionales y que destruyen su eficacia biológica. Cuando el porcentaje de mutantes letales en la cuasiespecie es bajo, el umbral de extinción depende del cuadrado de su eficacia biológica, que es linealmente dependiente de su tasa de mutación (Iranzo and Manrubia 2012).

El empleo de mutágenos para provocar la extinción de virus se denomina “**mutagénesis letal**” (Loeb, Essigmann et al. 1999, Anderson, Daifuku et al. 2004). Después de someter un cultivo celular a una infección de virus de ARN, tras unos pases de tratamiento en presencia de un mutágeno y varios pases sin mutágeno (ciegos), se considera **extinción viral** cuando no se detectan partículas virales al menos tras tres pases sin mutágeno y ha desaparecido la infectividad.

Esta estrategia terapéutica de “mutagénesis letal” ha llevado a la extinción viral cultivos celulares transfectados de virus ARN, al tratarlos con mutágenos como la ribavirina, aumentando su tasa de mutación por encima del máximo tolerable (Perales, Agudo et al. 2009). La mutagénesis letal se ha caracterizado *in vitro* y en cultivos, demostrando una acumulación de mutaciones próxima a la extinción viral acompañada de pérdida de infectividad de la cuasiespecie viral (Crotty, Cameron et al. 2001). Primero aumenta la variabilidad en la población sobre la que actúa una selección negativa, no detectándose ni genomas hipermutados, ni cambios en la secuencia maestra, aunque si se observa un aumento del número de mutaciones (Perales, Agudo et al. 2009). Se ha demostrado una pérdida significativa de *fitness* debida a una bajada en la capacidad replicativa y a la acumulación de mutaciones deletéreas o defectivas, provocadas por la acción de mutágenos (Quer, Hershey et al. 2001).

Las medidas de tasas de mutación indican que muchos virus se sitúan en las cercanías de sus valores del umbral de la catástrofe de error (Gago, Elena et al. 2009). Los virus son identificados y eliminados por nuestro sistema inmune, de modo que, a mayor biodiversidad más variantes presentes del virus y más capacidad de adaptación, siendo más difícil identificarlos y eliminarlos. Por lo general, en los virus de ARN, **la infectividad específica**, o porcentaje de genomas infectivos de la cuasiespecie, es significativamente baja, cayendo más aún en la replicación con altas frecuencias de mutación (Grande-Perez, Lazaro et al. 2005). La catástrofe de error se relaciona con una caída de 100 a 1000 veces en la infectividad específica junto a un incremento de diez veces de la tasa de mutaciones o de siete veces de la entropía de Shannon, pero sin modificarse la secuencia maestra de la población. La infectividad viral se pierde antes que la capacidad replicativa, señalando que el fenotipo infectivo es más sensible a las mutaciones que la replicación. De ahí que se haya demostrado que una baja multiplicidad de infección (MOI) tiende a potenciar la acción del mutágeno (Graci, Gnädig et al. 2012).

I.2.3.d. Tolerancia al error y longitud del Genoma.

La complejidad estructural y el gran tamaño de los genomas de ácidos nucleicos, requieren de maquinarias enzimáticas avanzadas de naturaleza proteica para poder replicarse, pero que a su vez requieren de enormes y complejos genomas de ácidos nucleicos para poder aparecer, es la llamada “**paradoja de Eigen**” (Eigen 1971). La existencia de una maquinaria replicativa primitiva, en un contexto modular, supone una enorme ventaja evolutiva y daría explicación al salto cuantitativo en la complejidad de

las moléculas de ARN, superando esta paradoja que condiciona los límites de longitud, variación y estructura de los genomas ARN (Manrubia and Briones 2007).

Estudios recientes aportados sobre los ratios de mutación de los genomas de los diferentes niveles biológicos, han demostrado que son inversamente proporcionales a la complejidad de las especies (Gago, Elena et al. 2009). Desde los niveles de frecuencia de mutación 10^{-2} a 10^{-3} mut/nt, para los genomas de viroides, hasta 10^{-10} a 10^{-11} mut/nt, para los genomas de ARN mensajeros en eucariotas. Los resultados evidencian la dependencia de la longitud de los genomas con la frecuencia de mutación. El ratio de mutaciones, por tanto, limita la longitud y complejidad del genoma (Domingo, Holland et al. 2002).

I.2.4. Secuencia-estructura como unidad evolutiva.

Se han empleado modelos teóricos y modelos *in silico*, para describir la evolución de la cuasiespecie *in vitro* a través de su relación genotipo-fenotipo (Eigen and Schuster 1977, Swetina and Schuster 1982, Schuster 1997). La cuasiespecie ha demostrado comportarse como una “**unidad de selección**” por el acoplamiento mutacional entre sus genotipos y fenotipos, a través de la selección de mutaciones en el espacio de secuencias (Eigen and Biebricher 1988). La selección natural actúa sobre la cuasiespecie simultáneamente a los diferentes niveles, secuencias y estructuras (Lamballerie, Crochu et al. 2002). Experimentos de evolución molecular publicados posteriormente han mostrado una distribución de las secuencias alrededor de los plegamientos accesibles, la mayoría de ellos estructuras neutras o equivalentes (Schultes and Bartel 2000). El acoplamiento mutacional va a ser el responsable de que la elevada variabilidad genómica de la cuasiespecie se dirija y sitúe en torno a los fenotipos más viables. La distribución genómica va a depender de la capacidad replicativa de los fenotipos y del efecto de la selección natural para desplazar el genoma hacia unos u otros máximos de viabilidad biológica y esto es lo que se denomina “**supervivencia del más robusto**” (San Juan, Cuevas et al. 2007).

I.2.4.a. Neutralidad y Robustez.

Las mutaciones adaptativas, en realidad, son muy pocas, y la fortaleza real de un fenotipo responde a la extensión de mutaciones neutras en torno a la secuencia maestra o en torno a los picos de máxima viabilidad (Kimura 1983). Las mutaciones se producen en el espacio de secuencias más rápidamente que su *fitness* que va a venir impuesto por las condiciones medioambientales. De esta manera la aparición de secuencias variantes es superior a su velocidad de fijación en la población (Manrubia, Escarmis et al. 2005). Una mayor diversidad de secuencias va a presentar una ventaja adaptativa al conjunto y a conferir mayor robustez al fenotipo (Schuster 1997). Por tanto, la neutralidad ha de ser un concepto relativo, dado que cualquier mutación neutra puede ser el primer paso de toda una selección a partir de una situación medioambiental concreta (Quer, Hershey et al. 2001). Así, una mayor diversidad va a conferir a la cuasiespecie una mayor adaptabilidad frente a la selección (Wilson and Szostak 1999).

Experimentos de selección *in vitro*, concluyen que la probabilidad de encontrar una secuencia funcional en un pool aleatorio de moléculas de ARN no es mayor de una de cada 10^{10} , (4^{-n} para n =longitud en nucleótidos), y que el resto no van a aportar funcionalidad (Gevertz, Gan et al. 2005). Otros experimentos sobre evolución molecular de ARNs virales y ribozimas, llevados a cabo por Szostak y sus colaboradores, comparando dos ARN catalíticos (ligasas de ribozima), demostraron una relación entre la complejidad estructural y la actividad. Los resultados sugirieron una relación entre la longitud, la complejidad de las estructuras del ARN y su actividad funcional (Carothers, Oestreich et al. 2004). En resumen, los resultados experimentales, en su conjunto, apuntan a que la evolución de la robustez de los genomas virales, tiene lugar, significativamente a través de la funcionalidad de las estructuras secundarias de su ARN (Wagner and Stadler 1999).

La robustez del genoma viral va a condicionar su capacidad evolutiva y su patogenicidad (Lauring, Acevedo et al. 2012, Lauring, Frydman et al. 2013). Se ha confirmado experimentalmente que un virus con mayor robustez genómica puede imponerse a uno de más capacidad replicativa si se aumenta su frecuencia de mutación. Y se ha descrito la existencia de especies, incluso dentro de un mismo género viral, con diferente robustez en su comportamiento vs mutágeno (San Juan, Cuevas et al. 2007, Graci, Gnädig et al. 2012).

I.2.4.b. Direccionalidad y multidimensionalidad: evolución de las cuasiespecies.

Se han empleado simulaciones informáticas para recrear los procesos evolutivos dentro de la cuasiespecie. Al introducir la estabilidad termodinámica junto a los datos obtenidos mediante selección *in silico*, los resultados apuntaron a que los mecanismos evolutivos de las cuasiespecies se producen a través de su relación genotipo-fenotipo. La evolución de la cuasiespecie comienza con una fase inicial corta de rápida adaptación y máxima diversidad del espacio de secuencias accesibles. Después le sigue una fase de evolución larga y optimización de las secuencias hasta una posición cuasiestacionaria, donde las secuencias se van a distribuir alrededor del fenotipo más viable con las restricciones medioambientales existentes. En los estados cuasi estacionarios, se incrementa la diversidad genética y optimiza el fenotipo que caracteriza la cuasiespecie (Schuster 1997).

Estos trabajos sugieren que en momentos estacionarios los espacios de secuencias oscilan lentamente en torno a los máximos de viabilidad, en torno a una **distancia de Hamming** cada 8000 replications, (Anexo 1 caja 6) desapareciendo las mutaciones negativas e inaccesibles y conservando solo aquellas que presentan alguna ventaja o son neutras. Un cambio brusco en las condiciones producirá una transición discontinua rápida que vuelve a activar la adaptación del espacio de secuencias, moviéndose hacia nuevas posiciones de máximo de viabilidad y el salto hacia un nuevo fenotipo.

I.2.4.c. La viabilidad.

El término *fitness* o *viabilidad*, entendido en el contexto de probabilidad y/o peso estadístico, es una medida de la salud o fortaleza constitutiva de la cuasiespecie, es decir, un valor que mide la estabilidad o la ventaja adaptativa que unos componentes aportan a la población total (Schuster 1997). También contempla la contribución de cada variante a la siguiente generación de la cuasiespecie (Maynard Smith 1998). El valor de *fitness* se relaciona con el incremento de la proporción de un virus respecto al tiempo, representado como incremento medio por pase o por unidad de tiempo empleada. Los máximos de probabilidad de las secuencias producen picos en la distribución que corresponden a máximos de viabilidad. La viabilidad de la cuasiespecie no es la eficacia media de sus picos sino la del conjunto de toda la distribución, que se comporta como una unidad de selección (Eigen and Biebricher 1988, Ruiz-Jarabo, Arias et al. 2000, Ruiz-Jarabo, Arias et al. 2002, C., R. et al. 2007). Los procesos evolutivos de la cuasiespecie consisten en migraciones del espacio de secuencias hacia estos máximos de viabilidad y de capacidad infectiva (Domingo and Holland 1997). En resumen el *fitness* es un término relativo que se evalúa por comparación, que describe la adaptabilidad replicativa de un organismo a su entorno, en unas condiciones concretas o frente a un virus de referencia, lo que permite llevar a cabo estrategias de competición de condiciones o mezclas de virus (Domingo, Sheldon et al. 2012).

I.2.4.d. La epístasis como efecto selectivo sobre la estructura y la viabilidad.

La epístasis es un fenómeno evolutivo que implica la interacción entre diferentes genes y que condiciona la expresión de un determinado carácter fenotípico (Phillips 2008). Esto implica que la evolución de la cuasiespecie está dirigida por toda la población a la vez, de modo que todas las secuencias van a condicionar la progresión de cualquiera de los mutantes. Es decir, el efecto de una mutación sobre la expresión está condicionado por el fondo genético donde se produce, porque cada posición del genoma es dependiente de otras posiciones o del marco genético completo (Kimura 1991). Uno de los resultados de la epístasis es su efecto sobre las uniones Watson-Crick que afecta, estadísticamente, a los genomas de virus ARN. Una mutación que rompe una interacción Watson-Crick crítica, hace disminuir la estabilidad termodinámica y reduce la viabilidad funcional de la estructura donde se encuentra (Abbink and Berkhout 2008). La aparición de mutaciones compensatorias demuestra el intento de recuperar la estabilidad termodinámica y la viabilidad funcional de las estructuras. La selección y mantenimiento de estas estructuras secundarias supone una trayectoria evolutiva que condiciona los estados de *fitness* accesibles. Estas restricciones epistáticas, entre los pares Watson-Crick puede contribuir a la conservación filogenética, como se ha observado en regiones conservadas de la región R del virus del HIV-2 y del VIS en mandriles, que conservan interacciones estructurales en pares Watson-Crick con una homología de secuencia inferior al 40% (Berkhout 1992). El ratio teórico esperado entre posiciones Watson-Crick y posiciones desapareadas debería ser inferior al observado en las regiones no codificantes de los genomas ARN víricos, poniendo de relieve su importancia funcional para el *fitness* de la cuasiespecie (Innan and Stephan 2001). Se ha

demostrado que las transiciones ocurren con más frecuencia y son compensadas más rápidamente que las transversiones, condicionando el efecto de la variabilidad sobre el mantenimiento y transmisión de las estructuras secundarias en los genomas ARN y dirigiendo sus trayectorias evolutivas (Knies, Dang et al. 2008). Debido a estas complejas interacciones, la población genómica de los virus se dirigen de un máximo a otro de *fitness* a través de diferentes trayectorias epistáticas adaptativas (Assis 2014).

En definitiva, todos los resultados señalan a la cuasiespecie como una unidad evolutiva, formada por un espacio de secuencias de ARN, compatibles con unas restricciones estructurales, con un porcentaje funcional de ellas, otras no funcionales y otras neutras pero indistinguible con las funcionales, que actúan como reservorio genético (Eigen and Biebricher 1988). Gracias a la capacidad funcional de sus estructuras, el conjunto de la cuasiespecie presenta sus actividades biológicas.

1.2.5. Variabilidad en las cuasiespecies virales.

La catástrofe de error se relaciona con la disolución estadística de la secuencia maestra en el espectro de mutantes (Eigen 1971), si bien, el efecto de la variabilidad sobre la viabilidad de la cuasiespecie es mucho más complejo. Matemáticamente, el incremento de mutaciones sólo disminuiría la proporción de la secuencia maestra en condiciones de una población genómica finita y en torno a un paisaje de un único máximo de viabilidad del fenotipo. En condiciones de población genómica infinita, aparecerán infinitos estados del fenotipo relacionados con su *fitness* y que describen movimientos adaptativos, por presión medioambiental, hacia otros máximos (Bull, Sanjuán et al. 2007).

La hipótesis de *defección letal* plantea la disminución de aquellas variantes de mayor eficacia biológica y capacidad infectiva dentro del espectro de mutantes (Perales, Arias et al. 2010) (Iranzo and Manrubia 2012). En una cuasiespecie viral, los *virus defectores* son la subpoblación de aquellas secuencias genómicas víricas capaces de replicarse, pero portadoras de mutaciones o deleciones, que las hacen incapaces de infectar células por sí mismas. Los virus defectores son considerados como parásitos intraespecíficos por su interacción antagonista dentro de la población viral. Entre estas secuencias defectivas pueden existir *virus defectivos interferentes* que se benefician de alguna manera de las otras secuencias “*cooperadoras*”, afectando a la viabilidad global de la cuasiespecie. Se ha identificado la existencia de virus defectores en infecciones celulares con poblaciones víricas complejas gracias a fenómenos de cooperación (Manrubia, Domingo et al. 2010).

Los *virus cooperadores* son las secuencias viables cuyos genomas producen correctamente todos los factores o proteínas virales necesarias para su ciclo completo (Turner and Chao 1999). Se diferencian los virus defectivos de las *partículas defectivas interferentes DIP*, en que estas pueden replicarse por sí mismas pero requieren de un virus cooperador para completar un ciclo infectivo (Perales, Agudo et al. 2011). En condiciones normales, la degeneración supone una ventaja adaptativa, pero en

condiciones mutagénicas el incremento de mutantes respecto a las secuencias viables ha demostrado generar especies defectivas que van a presentar una desventaja selectiva y tenderán a disminuir la viabilidad global de la cuasiespecie. La interferencia que genera un defecto mutagénico es un efecto en *trans* entre secuencias de diferente eficacia biológica. La interferencia de los virus defectivos se entiende como una disminución de la replicación de las secuencias cooperativas por acción de las defectivas. Estas interferencias van a afectar tanto a la distribución como a la densidad de la población, provocando una disminución en la eficacia biológica y en el tamaño poblacional de la cuasiespecie, e induciendo una dinámica “*demográfica*” que provocará una disminución de la multiplicidad de la infección.

1.2.6. Ejemplos experimentales de cuasiespecies. Modelos de estudio. Estructuras primarias, secundarias y terciarias en virus ARN.

La primera prueba experimental de una cuasiespecie viral de ARN fue el bacteriófago Q β (Domingo, Sabo et al. 1978). Otros virus descritos posteriormente confirmaron similar naturaleza poblacional, como el VSV (de la Torre and Holland 1990), el FMDV (Arias, Ruiz-Jarabo et al. 2004), el VHC (Domingo and Gomez 2007) o el VIH (Briones, de Vicente et al. 2006) todos caracterizados por presentar una enorme variabilidad génica con un genoma estadísticamente definido pero individualmente indeterminado (Domingo 2013).

Los diferentes tipos de fagos, viroides y virus, tanto vegetales como animales descubiertos, han sido la base de los principales modelos de estudio (**Anexo 1 Caja 7**). Los avances tecnológicos y el bagaje de información acumulado con estos modelos, permiten hoy en día, afrontar los estudios estructurales sobre los genomas de los ARNs víricos a todos los niveles dentro de su contexto poblacional de cuasiespecie. Es posible extraer información genómica detallada de una cuasiespecie viral a niveles estructurales y funcionales, tanto *in vitro*, como en cultivo celulares de las infecciones virales.

1.2.6. a. Estructuras primarias en virus de ARN.

Los virus de ARN se caracterizan por una secuencia nucleotídica maestra y la distribución de variantes de su genoma (haplotipos). Mediante técnicas de secuenciación clásica o secuenciación masiva se ha podido acumular en las bases de datos (EMBL-BANK, DDBJ GenBank) numerosas variantes de genomas víricos. Las técnicas de secuenciación masiva han servido para definir el espectro de mutantes, explorar las bases de su genotipo y observar las diferencias fenotípicas de viabilidad y robustez dentro de la cuasiespecie viral (Lauring, Acevedo et al. 2012). Los estudios filogenéticos sobre las secuencias hacen posible establecer relaciones entre distintas familias, diferentes genotipos, distribuciones geográficas y demográficas (Thompson, Higgins et al. 1994) (Simmonds, Bukh J et al. 2005).

1.2.6. b. Estructuras secundarias y terciarias en virus de ARN.

Los modelos *in silico* que facilitan algoritmos bioinformáticos como el *mfold*⁴, permiten identificar plegamientos de estructura secundaria presentes en las secuencias de ARN (Huynen, Perelson et al. 1996, Huynen, Stadler et al. 1996, Hofacker, Fekete et al. 1998, Zuker 2003, Tuplin, Evans et al. 2004). Introduciendo las restricciones derivadas de resultados experimentales en algunos algoritmos como el PLMM_DPSS (*Pseudoknot Local Motif Model and Dynamic Partner Sequence Stacking*) se pueden identificar posibles interacciones a larga distancia, y en especial pseudonudos (Huang and Ali 2007).

Los virus de ARN contienen regiones muy estructuradas y complejas en sus genomas, como los elementos **IRES** (*Sitio de Entrada Interna al Ribosoma*), que son ricos en motivos secundarios y terciarios. Las evidencias experimentales publicadas en los virus FMDV y VHC, sugieren la importancia de las estructuras terciarias de sus elementos IRES y sus interacciones ARN-ARN (Wang, Le et al. 1995, Kieft, Zhou et al. 1999). Los IRES son responsables de la traducción del ARN mensajero a través de mecanismos independientes de cap, son característicos de los genomas víricos y esenciales para la viabilidad viral (Thompson 2012). Sirva de ejemplo el IRES descrito en el genoma del VIH por parte del profesor López-Lastra y colaboradores (Vallejos, Deforges et al. 2011). También están presentes en el ARN de mensajeros celulares (Martinez-Salas 1999, Martinez-Salas, Ramos et al. 2001).

Los elementos de estructura secundaria y terciaria presentes en los elementos IRES son los responsables de conferirle afinidad y especificidad por la subunidad ribosomal 40S y su reclutamiento independiente de cap para el inicio de la traducción (Kieft, Zhou et al. 2001). Dada la enorme importancia de su función la conservación de su secuencia y estructura es crítica (Fernandez, Fernandez-Miragall et al. 2011). Estudios de análisis mutacional sobre los IRES en virus como VHC, revelan que la mayor parte de las sustituciones provocan cambios compensatorios en sus estructuras secundarias, acompañadas de un ligero cambio en su actividad que sugiere la acción de la selección natural sobre la eficiencia de la traducción de los genomas víricos (Martinez-Salas, Ramos et al. 2001).

En resumen, las características funcionales del ARN viral, están contenidas en sus elementos estructurales. La actividad de estos elementos depende directamente de sus motivos de estructura secundaria y su contexto de estructura terciaria. Por tanto, la afinidad funcional y el grado de actividad de los elementos estructurales del ARN viral van a depender de la integridad de sus estructuras secundarias y terciarias.

⁴ <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>

I.3. Estudios sobre la relación Secuencia-Estructura en virus de ARN:

I.3.1. Estudios Teóricos. Simulaciones *in silico*. Métodos Informáticos.

Los modelos teóricos propuestos para explicar el comportamiento de los virus de ARN son extraídos de la naturaleza de cuasiespecie de su genoma y su relación “*secuencia-estructura*”. Los modelos toman como punto de partida el crecimiento exponencial de una población de secuencias virales auto replicativas (Eigen 1971, Eigen and Schuster 1977, Eigen and Biebricher 1988).

Desde la descripción de la teoría de cuasiespecies, se diseñaron simulaciones *in silico* de auto organización para representar gráfica y visualmente la variabilidad de sus genomas (Eigen and Schuster 1977). La variabilidad se introdujo en los modelos a través de las limitaciones en la fidelidad de copia, con la producción y transmisión de errores. Los diferentes escenarios evolutivos son introducidos a través de las ecuaciones termodinámicas y cinéticas, que condicionan y restringen la replicación de las secuencias (Eigen and Schuster 1982). La introducción de estas restricciones en el modelo emula la presión selectiva y los fenómenos de competición que reproducen la evolución del sistema y describen la necesaria mejora evolutiva de la cuasiespecie (Domingo, Escarmis et al. 1996). El resultado final responde a una distribución típica del modelo de cuasiespecie, consistente con los fundamentos de la teoría de un “*ARN World*” y conceptualmente aplicable al estudio de las poblaciones de virus de ARN (Holland 2006)

Otros trabajos sobre la evolución de las cuasiespecies emplearon algoritmos informáticos para la descripción de las estructuras presentes en los genomas víricos (Huynen, Perelson et al. 1996, Huynen, Stadler et al. 1996, Hofacker, Fekete et al. 1998). Greenwell y sus colaboradores han presentado recientemente una revisión muy completa sobre el desarrollo del modelaje *in silico* que ha acompañado los estudios sobre la evolución de las moléculas de ARN (Stich, Briones et al. 2007) (Coveney, Swadling et al. 2012).

I.3.2. Métodos Experimentales para el estudio estructural de la cuasiespecie:

Los modelos experimentales de las cuasiespecies virales, presentan ciertas limitaciones, como son: las escalas de tiempo para la recreación de fenómenos evolutivos, las limitaciones bioquímicas intrínsecas a la reactividad del ARN o el marco estadístico frente a elevados conjuntos poblacionales de secuencias (Schuster and Stadler 1999). Los avances técnicos y tecnológicos han facilitado a los modelos experimentales el diseño de estrategias para salvar todas estas limitaciones.

I.3.3.a.- Experimentos de “evolución *in vitro*”:

Los primeros experimentos con el fago Q β demostraron la posibilidad de estudiar miles de generaciones a escala de laboratorio y describir su **respuesta evolutiva a la presión selectiva** (Spiegelman, Haruna et al. 1967). Biebricher llevo a

cabo **cinéticas** *in vitro* de la evolución del fago que hizo posible la descripción de algunos pasos, condiciones de reacción y mecanismos evolutivos (Eigen and Biebricher 1988).

En la actualidad las técnicas de selección *in vitro* han demostrado ser muy eficientes para la identificación de secuencias de ARNs catalíticos y selección de aptámeros, y han ayudado a profundizar en su relación estructura-función (Ellington and Szostak 1990, Gevertz, Gan et al. 2005, Stoltenburg, Reinemann et al. 2007).

I.3.3.b.- Ensayos de variabilidad. Ensayos de selección *in vitro*.

Los principios darwinianos que rigen la evolución molecular de los virus de ARN convierten la **variabilidad** de las secuencias en las poblaciones víricas, en un factor a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo un estudio de elucidación estructural y funcional. Los **estudios mutacionales** confirmaron la existencia experimental de poblaciones genómicas variables con estructura de cuasiespecie en el fago Q β . Estas estrategias mutacionales fueron fundamentales para poner a prueba la introducción de variabilidad en la población y demostrar los procesos de convergencia y divergencia génica de la evolución de las cuasiespecies virales (Domingo, Flavell et al. 1976, Domingo, Sabo et al. 1978).

En la actualidad se emplean técnicas de selección de secuencias dentro de una población variable para identificar aquellas variantes que hacen óptima la respuesta de una estructura. Berzal y su grupo han empleado **técnicas selectivas** (SELEX) para el diseño y selección de aptámeros (pequeños oligonucleótidos aleatorios generados *in vitro*) y siARN de uso terapéutico (Wilson and Szostak 1999, Marton, Romero-López et al. 2012). Estas técnicas permiten determinar las dianas terapéuticas, dentro de una población de secuencias y estructuras heterogéneas de ARN, como herramientas interferentes contra patógenos. Estrategias de **SELEX**, permiten distinguir los aptámeros que presenten más afinidad por una secuencia-estructura de ARN, y llevar a cabo la selección, dentro de una población compleja de secuencias y estructuras, de aquella que optimice dicha afinidad, mediante un enriquecimiento exponencial (Ecland, Szostack et al. 1995).

I.3.3.c.- Eficacia biológica y mutagénesis. Ensayos de competición con genomas modificados *in vitro*.

“El fitness de una población viral es proporcional a su variabilidad, y será mayor cuanto mayor sea la variabilidad de la población porque tendrá más posibilidades de presentar y seleccionar variantes mejor adaptadas” (Fisher 1941). Es decir, la reducción del tamaño poblacional puede provocar la disminución de la variabilidad generando la amplificación relativa y la fijación de subpoblaciones de menor potencial adaptativo. En cuasiespecies virales de ARN ha sido demostrado claramente que la disminución poblacional da lugar a la aparición de cuellos de botella poblacionales que disminuyen la viabilidad de la cuasiespecie (Muller 1964, Chao 1990, Domingo, Escarmis et al. 1996, Manrubia, Escarmis et al. 2005).

La evaluación de **la eficacia biológica** o *fitness* de una población, o de una mutación dirigida, consiste en mutar de manera concreta una secuencia, amplificar y poner a prueba en cultivo la viabilidad de la posición mutada por comparación con la *wild type*. La información obtenida de la comparación es directamente proporcional a la viabilidad de la mutación concreta, de una interacción o de una estructura en particular. Experimentos de **mutagénesis dirigida** sobre virus con genomas sencillos han servido para poner a prueba el *fitness* relacionado con las mutaciones. La **inserción dirigida** de mutaciones en las secuencias génicas de ARN permite evaluar interacciones entre ARN y/o proteínas, por la comparación de su viabilidad con la de su secuencia *wild type*. Las estrategias de evaluación del *fitness* **por competición viral** han sido empleadas para poner a prueba actividades y funciones en el ARN. Experimentos de competición en cultivos o en organismos hospedadores, permiten la evaluación del *fitness relativo* de dos virus, a través de su proporción respecto a tiempo. Estudios de competición entre virus frente a su resistencia, pusieron de manifiesto la reversión de las mutaciones a la secuencia consenso (Domingo, Flavell et al. 1976, Domingo 2013).

La mutagénesis es una forma eficaz para estudiar los motivos estructurales y su relación estructura-función. Las mutaciones introducidas en la población o dirigidas en concreto a una posición puntual, o incluso la delección de un fragmento o regiones completas de la secuencia, permiten analizar sus respuestas y/o su influencia sobre la viabilidad de la cuasiespecie. También se han llevado a cabo estudios de *fitness* mediante mutagénesis poblacional con fines terapéuticos (Martinez, Vartanian et al. 1994). El uso de mutágenos como antivirales que arrastren a la población de la cuasiespecie viral hacia su catástrofe de error es una de las estrategias más investigadas actualmente frente a virus como el de la polio, el VFMD, el VHI o el VHC (Vignuzzi, Stone et al. 2005), (Arias, Ruiz-Jarabo et al. 2004, Sierra, Airaksinen et al. 2007) (Ortega-Prieto, Sheldon et al. 2013, Perales, Beach et al. 2013).

I.3.3.d. Ejemplos de Estudios Termodinámicos.

La evaluación termodinámica de las interacciones ARN-ARN, contiene una información crucial sobre la composición estructural de las cuasiespecies virales. Se está utilizando la técnica llamada “análisis termodinámico de heterodúplex por electroforesis en gel bajo un gradiente de temperatura de alta resolución” (TGGE), para caracterizar la presencia de múltiples variantes estructurales en la cuasiespecie del virus de la hepatitis C (Lu, Funsch et al. 1995).

I.3.3.e. Métodos de análisis filogenético:

La **genómica comparativa** consiste en el estudio de las distintas secuencias consenso identificadas para una misma cuasiespecie y que junto a sus mapas estructurales del genoma, nos permiten elucidar las relaciones funcionales, filogenéticas y evolutivas dentro de la cuasiespecie (Domingo and Gomez 2007, Blackard JT, Ma G et al. 2012). Las técnicas filogenéticas han demostrado ser unas herramientas muy útiles para la descripción y clasificación de los virus de ARN. De las cuasiespecie viral se han

identificado subtipos geográficamente localizados, variantes genéticas antigénicas dentro de un mismo serotipo o dentro de un mismo animal infectado, incluso se han descrito su rápida diversificación en cultivos celulares. El análisis de clones de la cuasiespecie nos ofrece la información de su complejidad estructural, que no es posible extraer de las secuencias consenso (Domingo, Martínez-Salas et al. 1985, Domingo, Baranowski et al. 2000).

Los estudios de **filodinámica** que se llevan a cabo relacionando muestras de una cuasiespecie en una distribución temporal o geográfica, permiten identificar sus diferentes caminos evolutivos. El método de **análisis de partición de cuasiespecies** (PAQ) se emplea para estudiar la distribución de secuencias de la población, agrupándolas en torno a las mínimas distancias genéticas de Hamming existentes entre ellas (Baccam, Thompson et al. 2001). P. Simmonds ha presentado recientemente un análisis sobre el VHC que ha permitido profundizar en la diversificación de secuencias en genotipos o subtipos, en la determinación de los elementos de secuencia que son variables o invariables y esenciales (Simmonds, Bukh J et al. 2005, Simmonds 2013, Smith, Bukh et al. 2014)

I.3.3.f. Métodos de determinación estructural del ARN en las cuasiespecies:

El empleo de reactivos químicos y bioquímicos para interaccionar con el ARN y el análisis bioestadístico de los resultados, permiten el estudio estructural de las cuasiespecies:

- (i) **Secuenciación masiva:** Esta técnica permite la evaluación de la tasa de error de la cuasiespecie frente a su secuencia consenso. Se ha empleado secuenciación masiva para analizar la variabilidad en las secuencias de la cuasiespecie de virus de ADN como la hepatitis B (VHB). Estos estudios confirmaron la posibilidad de la detección simultánea de mutaciones en las diferentes regiones del genoma, así como la complejidad del espacio de secuencias y de estructuras de las cuasiespecies del VHB. Los resultados obtenidos sugirieron la naturaleza esencial de algunos motivos estructurales (tipo horquilla) y que algunos de estos motivos parecen ser esenciales para la replicación viral. También se ha demostrado con esta técnica que ciertos nucleótidos pueden estar involucrados en señalización dentro de estructuras funcionales del genoma y ciertas mutaciones identificadas se han asociado con resistencia al tratamiento (Homs, Buti et al. 2011). La secuenciación masiva también confirmó la heterogeneidad genómica del virus de la anemia infecciosa del salmón (VsISA), y como las propiedades estructurales de su ARN están ligadas con su virulencia (Markussen, Sindre et al. 2013). En este trabajo de Tesis Doctoral se ha empleado la secuenciación masiva para estudiar el efecto que ejerce la variabilidad sobre las secuencias de la cuasiespecie de VHC y analizar su efecto sobre su funcionalidad estructural.
- (ii) **Microarrays:** el empleo de microarrays, con secuencias de oligonucleótidos impresas sobre su superficie y complementarias a las del VHC ha permitido realizar un análisis estructural de su ARN, a través de la capacidad de hibridación de sus secuencias genómicas para cada una de sus posiciones (Martell, Briones et al. 2004). Este análisis permitió examinar múltiples posiciones de la secuencia simultáneamente, y obtener

información sensible de la estructura del VHC. Los resultados pusieron de manifiesto el diferente grado de compactación estructural para las regiones del genoma analizadas, y característicos de la cuasiespecie. También se analizaron por esta técnica los patrones de hibridación diferencial entre distintos genotipos del VHC y que difieren en su respuesta al tratamiento con interferón.

- (iii) ***Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE)***: es una técnica *in vitro* desarrollada para el análisis estructural de ácidos nucleicos. El fundamento de esta técnica es la modificación bioquímica del componente azúcar de los nucleótidos que constituyen la columna vertebral de la secuencia, empleando un reactivo químico. La velocidad y el grado de modificación sobre cada base permite llevar a cabo un análisis diferencial de la interferencia y que se relaciona con la flexibilidad de la secuencia en cada posición. Esta “flexibilidad” se correlaciona con estado de apareamiento de la base con su complementaria, lo que permite a través del procesamiento de los resultados establecer la estructura secundaria del ARN (Wilkinson, Merino et al. 2006, Lucks, Mortimer et al. 2011, Burrill and Andino 2013, Loughrey, Watters et al. 2014). Se ha empleado con éxito técnicas de *SHAPE* en la descripción estructural de regiones de IRES virales de Picornavirus (Fernandez, Fernandez-Miragall et al. 2011) ó de VHC en combinación con *microarrays* (Romero-Lopez, Barroso-Deljesus et al. 2012, Romero-Lopez, Barroso-Deljesus et al. 2014). También se ha empleado *SHAPE* para analizar la estructura genómica del VIH-1 en sus diferentes estados posibles durante la infección y confirmando que el primer 10% del genoma del VIH-1 existe siempre en una única conformación, predominante para sus cuatro estados posibles (Wilkinson, Gorelick et al. 2008, Watts, Dang et al. 2009). Se sondearon con *SHAPE* las variantes naturales de la secuencia y la estructura del viroide del mosaico latente del melocotón (VdPLM) y confirmaron las estructuras secundarias que habían sido previamente prescritas (Dubé A, Bolduc F et al. 2011). Empleando mutagénesis dirigida a posiciones concretas, se confirmó la existencia de motivos estructurales en su población genómica, en concreto la formación de un *pseudoknot*. Es importante destacar que este estudio reveló que la heterogeneidad de un viroide es a nivel de secuencia y estructura. Recientemente se ha empleado *SHAPE* para el estudio estructural del virus del dengue facilitando la investigación de sus estructuras locales, para todas las posiciones en la secuencia de manera independiente y demostrando ser particularmente útil en la predicción de interacciones secundarias y terciarias en sus genomas ARN (Sztuba-Solinska and Le Grice 2014).
- (iv) ***El mapeo enzimático específico de estructuras (STS Sequence-Targged Site)***, con actividades que responden a motivos ARN, como por ejemplo: la RNAsa P, una endonucleasa específica de estructuras terciarias tipo ARNt (Altman 1995). La enzima RNAsa P ha sido empleada *in vitro*, para el reconocimiento de similitudes estructurales al ARNt, cerca del codón de inicio AUG en el ARN del virus de la hepatitis C, evidenciando la sensibilidad al corte de las secuencias variantes naturales del ARN de la cuasiespecie viral del VHC (Piron, Beguiristain et al. 2005).

I.4. Identificación de estructuras en el ARN viral:

La integridad de los elementos estructurales en el ARN viral, en especial de los elementos locales de estructura secundaria, el contexto y la estabilidad de sus genomas van a condicionar el *fitness* de la población viral (Wagner and Stadler 1999). Las interacciones ARN-ARN, desempeñan un papel fundamental en la regulación de la expresión génica y junto a la variabilidad de sus secuencias, van a modular la competencia entre los ARNm virales y celulares por la afinidad de unión con las proteínas del hospedador (Duss O, Michel E et al. 2014). Estos resultados señalan la existencia de una adaptación conformacional entre las proteínas y los ARNm celulares, que confiere a la unión una cierta afinidad no específica y que va a permitir a los mensajeros virales secuestrar las maquinarias celulares.

Es evidente que la identificación y caracterización estructural del genoma de la cuasiespecie viral es fundamental para comprender los mecanismos que rigen su ciclo vital y su capacidad infectiva. Dada la arquitectura modular de las moléculas de ARN, las estructuras de los genomas de las cuasiespecies virales son el resultado de una combinación limitada de dominios comunes con unas posibilidades de reconocimiento de sus secuencias y/o estructuras.

I.4.1. Empleo de factores para el reconocimiento de estructuras en la cuasiespecie:

Con las técnicas de secuenciación y los algoritmos de plegamiento (como el *Mfold*, entre otros), podemos predecir la estructura secundaria del ARN, pronosticar posibles interacciones terciarias y plegamientos. El empleo de factores o sondas nos permite testar estructuralmente el ARN para confirmar o descartar las estructuras pronosticadas por los plegamientos teóricos. **Los factores bioquímicos** son oligonucleótidos, enzimas y actividades específicas que permiten identificar regiones de simple cadena, doble cadena, o motivos estructurales más complejos (dsARN largos, interacciones a larga distancia, *tARN-like*). **Los factores físicos** son propiedades físicas, como la radiación UV-C que permite identificar estructuras terciarias locales (***E-loop***).

I.4.1.a. Reconocimiento de la Estructura 1ª.

La secuencia consenso de una cuasiespecie viral se establece por técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos. Con una secuenciación masiva se pueden obtener todas las variantes de secuencia presente en la cuasiespecie. Se pueden evaluar la fidelidad de la base en cada posición de la secuencia de ARN, dentro de la población, por su acoplamiento, por complementariedad de bases con oligonucleótidos complementarios. Esta técnica permite convertir la afinidad de cada posición por el oligo en variabilidad estadística o grado de integridad de la secuencia genómica de la cuasiespecie (Martell, Briones et al. 2004).

El empleo de agentes químicos como por ejemplo Pb^{2+} , DMS u otros reactivos que reaccionan con los nucleótidos expuestos de las moléculas de ARN (simple cadena ssARN) nos van a permitir reconocer las estructuras sin hibridar presentes en las

moléculas de ARN de los genomas víricos (Kirsebom and Ciesiolka 2014). Se emplean factores bioquímicos como las enzimas endoribonucleasas V1 (que digiere de forma no específica secuencias de ARN bicatenario) y T1 (que digiere moléculas de ARN de cadena simple después de residuos de guanina en su extremo 3'terminal), para discriminar las secciones de doble y simple cadena de las moléculas de ARN de la cuasiespecie viral (Kertesz, Wan et al. 2010).

I.4.1.b. Reconocimiento de estructuras 2^{as} de ARN: RNAsa III de *Escherichia Coli*

Las enzimas RNAsa III son endoribonucleasas dependientes de Mg²⁺ que cortan específicamente moléculas de ARN en regiones de doble cadena. La actividad y dominio básico de la RNAsa III está conservada en todas las especies de bacterias y eucariotas, resaltando la importancia de sus funciones, en especial en el control de la expresión génica, la defensa contra las infecciones virales y el silenciamiento genético (Nicholson 1999). Algunas RNAsa III, como *Drosha* ó *Dicer*, son enzimas muy estudiadas dentro de los organismos eucariotas por su importante papel en los procesos de maduración de micro ARNs y de expresión genética (Court, 1993; Nicholson, 2003).

La RNAsa III de *Escherichia Coli* fue identificada por Robertson y Viñuela simultáneamente, aunque fue purificada y descrita por Robertson (Billeter, Libonati et al. 1966, Robertson 1967, Robertson and Dunn 1975, Robertson 1982). No es un enzima esencial en *E.coli*, su principal función es la de procesar los precursores de ARN ribosomal rARN, pero su ausencia ha demostrado generar problemas de crecimiento en las bacterias (Babitzke, Granger et al. 1993).

Está formada por un dominio catalítico con la actividad ribonucleasa (RND) situado en el extremo N-terminal, y un dominio de unión al dsARN (dsRBD) situado en el extremo C-terminal. Actúa como un homodímero con un único centro activo formado por la interacción cooperativa de ambos monómeros (Zhang et al, 2004). Su centro catalítico está cargado negativamente y debe acomodar para su procesamiento el sustrato de ARN de doble cadena que también está cargado negativamente. Por ello, los cationes de magnesio juegan un papel esencial para superar la repulsión electrostática entre la enzima y la dsARN y facilitar una unión catalíticamente competente al sitio de corte.

La actividad fosfodiesterasa de la RNAsa III se produce a través de un mecanismo de hidrólisis que requiere cationes metálicos divalentes y una molécula de agua, como nucleófilo (Robertson 1967). Los productos de corte sobre dsARN generan extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo, así como dos bases protuberantes si el sustrato es dsARN perfecto (Robertson 1982). La actividad estándar RNAsa III de *E. coli* implica la digestión de dos cadenas de ARN en conformación de doble hélice (Robertson 1982). Se ha establecido como sustrato estándar de la actividad RNAsa III a una doble cadena de ARN de longitud mínima de 20 a 22 pares de bases en dos vueltas de hélice, en base al procesamiento de un sustrato natural de doble cadena de ARN (el R1.1) procedente de un transcrito del fago T7 Figura 3: (Nicholson 2014).

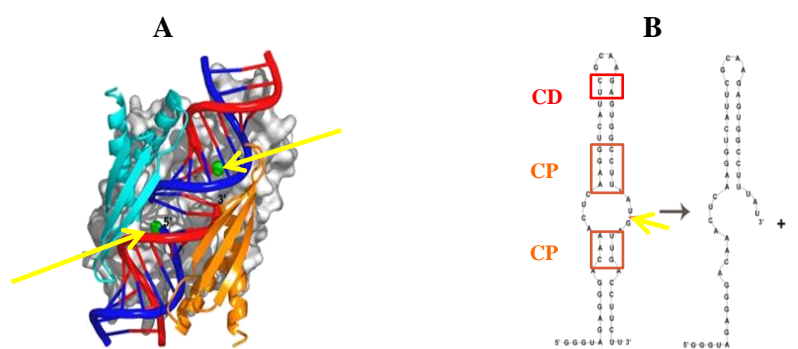


Figura 3: Reconocimiento de sustrato en la RNAsa III.

A): Imagen de superficie para la estructura cristalina de RNAsa III clase I (*Aquifex aeolicus*) unida al ARN sustrato R1.1. Las flechas amarillas indican sobre los puntos verdes los extremos de corte 5' y 3'. Adaptada de (MacRae & DouADN, 2007)

B): Punto de corte, en condiciones primarias, de la RNAsa III de *E. Coli* sobre el fragmento R1.1. Las cajas proximales se muestran en naranja (CP) y la distal en rojo (CD). Las flechas amarillas indica el punto de corte. Adaptado de (Nicholson, 2003)

Este mecanismo genera productos de corte en los extremos 3' del ARN de un tamaño de entre 11 y 15 pares de bases y estructura tipo horquilla (Nicholson 1999). No se ha establecido una secuencia patrón para el reconocimiento y el procesamiento de la RNAsa III, aunque si se han identificado rasgos determinantes de secuencia y estructura para la reacción de corte (Pertzev and Nicholson 2006). Concretamente se sabe que los diez pares de bases a partir del punto de corte de la RNAsa III afectan a la reactividad, en especial los dos últimos pares de bases (caja distal) y las cuatro primeras pares de bases (caja proximal) (Robertson 1982) Figura 3B. También se ha descrito su capacidad de reconocer el apilamiento coaxial de hélices cortas de ARN, siempre que presenten una hélice más o menos continua y de longitud suficiente (Franch, T. et al. 1999.).

Se han identificado restricciones limitantes de la digestión y cortes sobre motivos de dsARN con imperfecciones, cuando la estructura secundaria no es perfecta, entonces los puntos de corte sobre el sustrato dependerán de los elementos específicos de la secuencia y estructura, como la presencia de un bucle interno o protuberancias, que promueven el corte de una sola de las hebras de la doble cadena (Zhang, Kolb et al. 2004).

La especificidad de la actividad RNAsa III de *E. coli* frente al sustrato depende de la fuerza iónica del medio. Los **cortes primarios** son los observados *in vivo*, en condiciones de fuerza iónica fisiológica (150 mM KCl) y serán los cortes preferentes en las reacciones *in vitro* en condiciones de concentración elevada de iones monovalentes (150-300 mM). En condiciones de baja fuerza iónica o con exceso de enzima, la RNAsa III corta en otros puntos adicionales, que no se observan por lo general *in vivo*, y que consideramos **cortes secundarios**. Con una baja concentración de iones monovalentes, la RNAsa III va a digerir puntos de corte primario y secundario (Dunn 1976).

I.4.1.c. Reconocimiento de la Estructura 3^a: La RNAsa P y la Radiación UV-C

El reconocimiento de estructuras terciarias de ARN, requiere el empleo de sondas topológicamente selectivas del sustrato, capaces de ofrecer una respuesta frente a elementos estructurales tridimensionales, plegamientos debidos a interacciones intramoleculares o diferentes configuraciones del ARN, como son por ejemplo la RNAsa P o la radiación ultravioleta.

A) Descripción general de la RNAsa P: es un complejo de ribonucleoproteína con actividad endorribonucleasa, *in vivo*, implicado en el procesamiento y maduración del extremo 5' de los *pre-ARNt* (Altman and Smith 1971). Su actividad fue descrita por primera vez por S. Altman y H. Robertson en la *E. coli* (Robertson, Altman et al. 1972). Experimentos *in vitro* demostraron que era su ARN, el componente responsable de su actividad catalítica dependiente de iones Mg^{2+} y no las unidades proteicas, definiendo así una de las primeras “**ribozimas**” descubiertas capaz de actuar *in trans* (Guerrier-Takada 1983, Altman 1989). En cualquier caso se ha demostrado que las proteínas son imprescindibles para el procesamiento *in vivo* (Chamberlain, Lee et al. 1998, Fan, Goodier et al. 1998). Posteriormente ha sido encontrada en todos los reinos de la vida, en casi todos los organismos desde bacterias a seres humanos y en todos los compartimentos celulares con síntesis de ARNt (Walker and Engelke 2006).

La RNAsa P se compone de una gran **subunidad de ARN** (RPR) y de una o más subunidades de proteínas (RPPs), una sola en bacterias, de cuatro a cinco en arqueas y hasta diez en eucariotas (Evans, Marquez et al. 2006). La RNAsa P es una enzima muy conservada y antigua, que puede haber estado presente en el último ancestro común de todos los organismos, como un fósil molecular de un mundo ARN prebiótico (Gilbert 1986, Evans, Marquez et al. 2006, Jarrous and Gopalan 2010).

El mecanismo enzimático de la actividad RNAsa P se lleva a cabo a través de una reacción de hidrólisis que produce extremos de corte 5'-fosfato y 3'-hidroxilo sobre su sustrato (Robertson, Altman et al. 1972, Kirsebom and Trobro 2009). La RNAsa P reconoce su sustrato *in trans* por su topología y no por complementariedad de bases: no emplea el apareamiento de bases para su posicionamiento o el reconocimiento del sustrato, y no forma intermedios de reacción por uniones covalentes con el sustrato (Doudna and Lorsch 2005).

Reconocimiento de sustratos: La RNAsa P es capaz de reconocer la estructura terciaria en forma de “L”, independientemente de la secuencia, de todos los precursores de los ARNt y procesarlos, reconociendo a través de múltiples interacciones la estructura global del sustrato (Chang and Smith 1973). El reconocimiento del sustrato no tiene que ser perfecto, por lo que puede reconocer y procesar estructuras subóptimas próximas al ARNt (*tARN-like*) aunque con menor eficacia (Yuan and Altman 1994, Kirsebom 2007). La ribozima bacteriana, llamada M1, corta eficazmente la estructura en forma de horquilla formada por el apilamiento coaxial del tallo aceptor y del tallo lazo T de los ARNt (Figura 4) (Holm and Krupp 1992, Hansen, Pfeiffer et al. 2001).

Existen muchos resultados sobre la actividad bacteriana que demuestran su capacidad para reconocer y digerir un grupo heterogéneo de ARNs además de procesar todos los precursores del ARNt (Peck-Miller and Altman 1991, Altman, Wesolowski et al. 2005, Ko and Altman 2007, Yang and Altman 2007). La RNasa P de eucariotas reconoce y digiere otros ncARNs, y es necesaria para la transcripción de tARNs y otros ncARNsm por parte de la ARN polimerasa III. También se ha descrito su importancia para la transcripción de genes codificantes para rARNs por la ARN polimerasa I (Yang and Altman 2007, Coughlin, Pleiss et al. 2008, Wilusz, Freier et al. 2008). La importancia de la actividad RNasa P ha quedado de manifiesto en el procesamiento del ARN en la célula, y además se la relaciona con las maquinarias celulares necesarias para la expresión genética (Reiner, Ben-Asouli et al. 2006, Jarrous and Gopalan 2010).

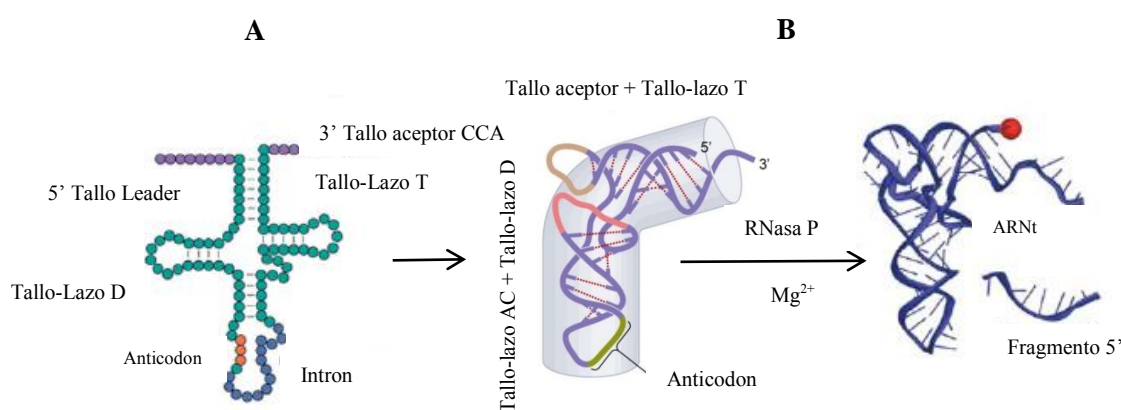


Figura 4: A: Proceso de maduración del extremo 5' los ARNt mediado por la RNasa P. Los tARNs se transcriben como precursores inactivos (pre-tARN). Necesitan un proceso de maduración postranscripcional antes de incorporarse al metabolismo celular. Durante la maduración se producen modificaciones como la eliminación de la secuencia 5' leader (RNasa P) y del fragmento en 3' (ARNsa Z). En algunos tARNs se produce el splicing de intrones y en los en tARNs de eucariotas se produce la incorporación del CCA (que une el aminoácido que transportará el ARNt) y la modificación de ~20% de los nucleótidos. **A)** Estructura esquemática en trébol del ARNt: la secuencia sin modificar en verde, las secuencias 5' leader y tráiler en morado, en azul el intrón y en color naranja el anticodón (Hopper & Phizicky, 2003) **B)** Estructura terciaria en "L" con las características estructurales del tARN. La RNasa P cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster del pre-tARN para eliminar un fragmento de secuencia en 5' en presencia de Mg^{2+} (La esfera roja representa el grupo fosfato) (Kazantsev & Pace, 2006).

RNasa P de *Synechocystis* (Figura 5A): ha sido descrita con una subunidad M1 (RPR) que presenta la actividad catalítica y una subunidad proteica, no esencial pero determinante para la eficiencia relativa de su digestión (Pascual and Vioque 1996). Sus sustratos naturales son los precursores de ARNt y otros ARNt-like, y no requiere que presenten una secuencia CCA a una distancia (30 nts) del final 3' del pre-ARNt para cortar con eficiencia (Pascual and Vioque 1999).

RNasa P humana (Figura 5B): presenta un componente de ARN (H1) mucho más pequeño que la M1 bacteriana. El sustrato mínimo reconocido por la RNasa P humana requiere el equivalente al tallo aceptor y al dominio T del ARNt, con al menos un nucleótido protuberante (de adenina o citosina) en el punto de unión entre ambas hélices, así como de una secuencia de enlace de simple cadena entre los dominios del anti codón y el tallo lazo D (Carrara, Calandra et al. 1995). Se ha sugerido que la localización del punto exacto del corte en el sustrato, se hace sobre la hélice del apilamiento coaxial del tallo aceptor y el tallo-lazo T (Yuan, Hwang et al. 1992).

En la figura 5 se puede ver las similitudes estructurales entre las unidades RPR de las RNAsas P humana y bacteriana. Ambas presentan cinco regiones conservadas CR que constituyen su núcleo estructural (I a V), y que están situadas en posiciones comparables dentro de su estructura secundaria con sus hélices (P1-P4 y P7-P11) en posiciones relativas similares (Evans, Marquez et al. 2006, Marquez, Chen et al. 2006). En las RPRs eucariotas se han descrito diferencias estructurales y funcionales significativas como un gran lazo interno en la hélice P3 con capacidad de anclaje de las subunidades proteicas (Lindahl, Fretz et al. 2000, Perederina and Krasilnikov 2010).

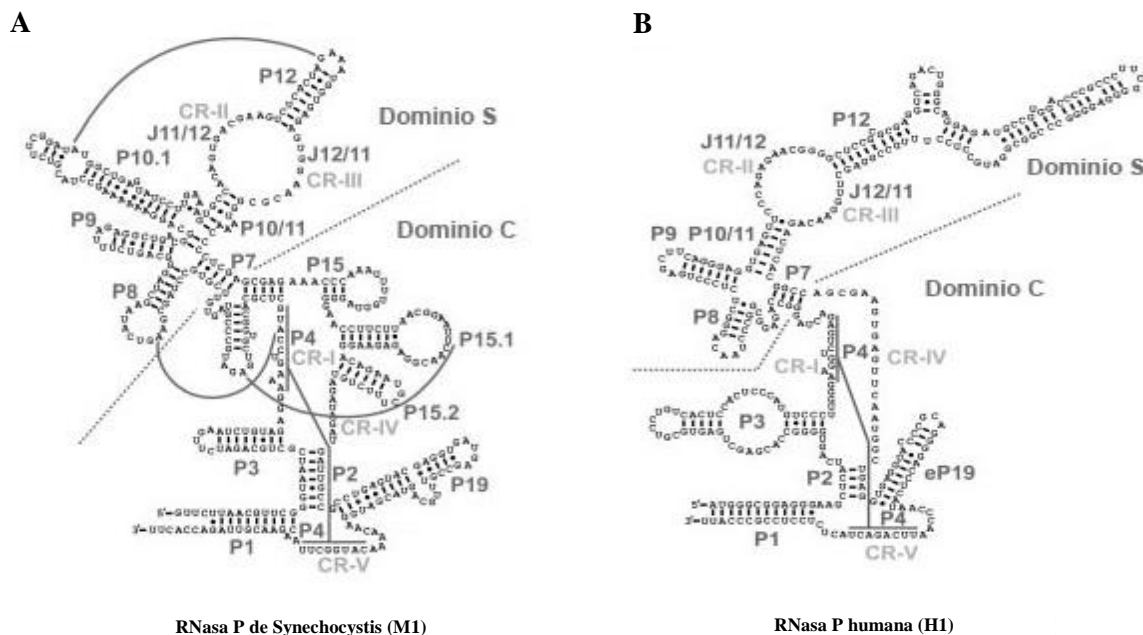


Figura 5: Estructuras secundarias de la RNasa P de *Synechocystis* y humana: A: RPR de *Synechocystis* tipo bacteriano representado como M1. B: RPR humana (H1) de 340 nt de longitud. El dominio de la especificidad (S) y del dominio catalítico (C) están separados por líneas de puntos y con las líneas continuas se han representado las interacciones terciarias de largo alcance.

Sustratos de las RNAsas P de *Synechocystis* y humana: El sustrato estándar de la RNasa P en todos los organismos, son los *pre-ARNt*. El mecanismo de su reconocimiento está relacionado con el papel de las regiones universalmente conservadas de su estructura. La estructura de la RNasa P presenta una cierta plasticidad, lo que le permite reconocer y digerir otros sustratos diferentes (Hartmann RK, Gossringer M et al. 2009). La actividad procesa los sustratos ARNt de manera eficiente, mientras que por lo general los sustratos diferentes al *pre-ARNt* se procesan con peores rendimientos. Las RNAsas P digieren sustratos similares al ARNt, como ARN mensajeros de transferencia (tmARN) que pueden ser reconocidos de una manera análoga (Komine Y, Kitabatake M et al. 1994). Pero el reconocimiento de otros sustratos, como los ARN ribosomales 4.5S con quienes los ARNt no comparten una amplia similitud estructural, probablemente se lleve a cabo de una manera diferente (Guerrier-Takada and Altman 1984). Algunas variantes de RNasa P (MRP) presentan un mecanismo catalítico con una especificidad de sustrato que parece depender de características de secuencia, e incluso sobre ARN de simple cadena (Esakova, Perederina et al. 2011).

B) La Radiación UV-C (254nm) induce la formación de dímeros de pirimidina y digestiones inespecíficas en el ADN (Burrows and Muller 1998). En ciertas regiones del ARN, además de formar dímeros de pirimidina e hidratos de uridina, la radiación UV-C puede ser absorbida por la presencia de motivos estructurales llamados *E-loop* (Branch, Benenfeld et al. 1985).

Estas estructuras terciarias locales han sido caracterizados en los ARNs por la formación de enlaces covalentes intramoleculares (*crosslink*) entre bases próximas desapareadas, e inducidos por la radiación ultravioleta. Los *E-loop* han sido identificados por la serie de nucleótidos conservados formando bucles internos asimétricos entre tramos de doble cadena. En la figura 6 se ha presentado la estructura *E-loop* canónica (Leontis and Westhof 1998).

E-loop canónico

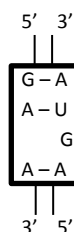


Figura 6: Estructura terciaria local *E-loop*. Ejemplo de la secuencia canónica y esquema de la estructura *E-loop*.

Se han descrito estructuras *E-loop* en ARNr eucariota, en la subunidad ARNr 5S de células *HeLa* (Branch AD, Benenfeld BJ et al. 1989) o en viroides de plantas como el viroide de la patata, en el virus de la hepatitis delta (Branch AD, Benenfeld BJ et al. 1989), en ribozimas (Hsu AW, Kilani AF et al. 2000).

La radiación ultravioleta además de inducir la formación de *crosslink*, puede producir otra respuesta diferente, la **autodigestión** en una posición específica próxima a la estructura *E-loop*. Se ha caracterizado recientemente esta “**actividad autocatalítica**” inducida por la radiación UV-C en *E-loops* presentes en las regiones IRES del VHC y del virus de la diarrea viral bovina CSFV (Ariza-Mateos, Prieto-Vega et al. 2012).

Se ha descrito un mecanismo de auto digestión oxidativa sobre el ARN inducido por la radiación UV-C que explica los resultados obtenidos *in vitro* con ambos virus (Jacobs, Resendiz et al. 2011).

Estas actividades entre moléculas evolutivamente divergentes, pone de manifiesto la existencia de esta estructura terciaria local *E-loop*, y la capacidad de respuesta conformacional a la radiación UV (Leontis and Westhof 1998).

I.4.2. Reconocimiento de estructuras funcionales del ARN. El ribosoma

Una forma de identificar estructuras funcionales en el ARN vírico, es la construcción de un mapa estructural de su genoma y buscar homologías en la base de datos con estructuras ya descritas e identificadas para alguna ribozima conocida (Denman 1993). Los IRES son regiones de genomas de ARN, ricas en elementos estructurales, que presentan la capacidad de reclutar las maquinarias ribosomales para una traducción independiente de cap. Revisiones recientes han descrito características estructurales comunes de los distintos tipos de regiones IRES que pueden ser muy útiles para la identificación de estos elementos sobre los genomas víricos a partir de su contexto estructural (Thompson 2012).

La región IRES del VHC presenta la capacidad estructural de reclutar la subunidad 40S del ribosoma sin ningún requerimiento proteico. Se han descrito todos los acoplamientos entre el ribosoma y el IRES del VHC empleando experimentos de protección (Lytle, Wu et al. 2001). Están descritas las funciones de cada paso de la construcción del ribosoma, sus requerimientos catalíticos, las interacciones y los motivos implicados en la unión. (Lyons, Lytle et al. 2001, Lytle, Wu et al. 2002).

Los ribosomas, descubiertos por George Emil Palade en los años 50, son la maquinaria celular responsable de la síntesis de proteínas en los seres vivos. Están formados por una fracción de ARN y una serie de proteínas, formando un complejo riboproteico, organizado en dos subunidades, una mayor y una menor (60S/40S, respectivamente en las células eucariotas). Los ARN ribosómicos (80% del contenido de ARN citoplasmático celular) son el componente catalítico de los ribosomas y se encargan de crear los enlaces peptídicos entre los aminoácidos en formación durante la síntesis de proteínas. La actividad peptidil-transferasa del centro activo del ribosoma es la base de la síntesis de proteínas, y es independiente de su contenido proteico (Polacek and Mankin 2005). Los ribosomas llevan a cabo la síntesis de proteínas a través de una serie de procesos enzimáticos que implican el reconocimiento estructural de sustratos (ARNm y ARNt), su colocación, traslación y traducción de ARNm (Moazed and Noller 1991, Korostelev and Noller 2007, Strobel and Cochrane 2007, Zhu, Korostelev et al. 2011).

I.4.3 Especificidad de sustratos y Mimesis. Ejemplos.

El reconocimiento por antonomasia de las secuencias de los ARNs, se realiza en el centro de decodificación de los ribosomas, donde cada triplete de bases del ARNm es reconocido y traducido a un aminoácido en la síntesis proteica. Resultados recientes sugieren que la fidelidad de la traducción puede verse alterada por una “*mimesis geométrica*” en la incorporación de la tercera base del triplete en el anti codón del ARNt (Demeshkina, Jenner et al. 2012). Esta “mimesis” pone de manifiesto la influencia estructural en el reconocimiento de las secuencias de los ARNm impuesta por las uniones canónicas de las dos primeras posiciones del codón (Demeshkina, Jenner et al. 2013).

Las secuencias de los ARNm claves para la interacción con los sitios catalíticos o de unión, se han seleccionado y mantenido muy conservadas durante la evolución, favoreciendo la conservación de formas a través de la secuencia. Las actividades enzimáticas celulares son, por lo general, muy específicas en la identificación de sus sustratos y de sus restricciones medioambientales. Cambios en las condiciones químicas pueden afectar al reconocimiento del sustrato, permitiendo a las enzimas actuar sobre sustratos diferentes a su estándar y/o a presentar respuestas diferentes a las esperadas, como digestiones secundarias o inespecíficas (Dunn 1976). De todas las circunstancias que van a modificar la especificidad de una actividad enzimática, el ejemplo más llamativo es *la mimesis molecular*. Este fenómeno estructural es la capacidad evolutiva de una molécula de adoptar una estructura, susceptible de ser identificada por una actividad biológica, a priori, para la que no ha sido diseñada, pero que le aporta algún tipo de ventaja (Springer, Graffe et al. 1989, Springer, Portier et al. 1998).

En los virus, esta mimesis molecular está ligada a la evolución de su propio ARN y a la selección funcional de sus genomas (Panagiotis A. Tsonis and Dwivedi 2008). Uno de los ejemplos de mimesis molecular encontrados comúnmente en genomas virales y más estudiados, son las estructuras tipo *ARNt-like*. Encontradas originalmente en el extremo 3' del ARN de virus de plantas, se aminoacilan con aminoacil-ARNt sintetasas, y presentan propiedades estructurales similares a los ARNt (Panagiotis A. Tsonis and Dwivedi 2008). Se ha descrito *in vitro*, una estructura *ARNt-like* en el elemento IRES del extremo 5' UTR del VHC (Nadal, Martell et al. 2002), así como en otros IRES virales (CSFV, BVDV o el CrPV) en dominios relacionados con el reclutamiento de las subunidades ribosomales y los procesos de síntesis de proteínas (Lyons and Robertson 2003). En regiones IRES de picornavirus han sido descritas estructuras miméticas ARNt implicadas en el inicio de la traducción. Se ha demostrado la capacidad de estas estructuras miméticas de reclutar la *glycyl-ARNt* sintetasa (GARS), promoviendo el acomodamiento del IRES en el sitio de unión del ribosoma de ARNm, y mejorando así el paso de la formación del complejo 48S de iniciación de la traducción (Andreev, Hirnet et al. 2012).

Kief recientemente ha resuelto por técnicas de difracción de R-X, las estructuras que pueden adoptar estos ARN virales para imitar la estructura ARNt, a través de un conjunto muy diferente de interacciones intramoleculares y cambios conformacionales (Timothy M. Colussi, David A. Costantino et al. 2014). Estos cambios de conformación identificados confirieron a la estructura mimética una doble misión: una, imitar el ARNt que conduce a reacciones de aminoacilación (Pinck, Yot et al. 1970), y otra diferente que multiplica sus opciones funcionales de interactuar con otras posibles complementariedades de unión. Las estructuras emuladas han sido descritas, en especial, en interacciones con proteínas (aminoacil ARNt sintetasas, RNasa P), como factores de elongación o reclutamiento de unidades ribosomales (Lyons and Robertson 2003). Podemos decir, por tanto, que la actividad RNasa P señala la presencia de una estructura *ARNt-like* y nos permite la aproximación a su caracterización funcional (Robertson, Altman et al. 1972, Komine Y, Kitabatake M et al. 1994).

I.5. Modelo de estudio: el VHC:

La existencia de un virus hepático diferente del A y del B, fue propuesta en los años 70 (NANBHV). Su existencia se comprobó experimentalmente con posterioridad siendo denominado virus de la hepatitis C VHC (Choo, Kuo et al. 1989). El virus de la hepatitis C (VHC) es el causante de una enfermedad infecciosa del hígado que afecta aproximadamente al 2% de la población mundial (de 130 y 170 MM de personas). La infección puede ser asintomática, pero su estado crónico puede producir cirrosis, insuficiencia hepática, cáncer de hígado o varices esofágicas y gástricas potencialmente fatales (Ryan KJ and C. 2004). La hepatitis C es la causa principal de trasplantes de hígado y suele recurrir tras ellos, no existiendo ninguna vacuna contra el virus. Las últimas terapias están funcionando en un 90% de los casos, en algunos genotipos virales.

El VHC es un virus hepatotrópico de la familia *Flaviviridae* y género *Hepacivirus* que se transmite principalmente a través de la exposición percutánea directa, transfusión sanguínea, trasplantes o jeringuillas contaminadas (Lemon, Knipe et al. 2007). La pervivencia del virus es de pocas horas, liberando aproximadamente 10^{12} partículas virales por día y persona. La alta capacidad replicativa del VHC unido a la ausencia de función correctora de errores de su polimerasa, genera su variabilidad génica, característica de una cuasiespecie vírica (Martell, Esteban et al. 1992). Existen seis genotipos descritos, con un 35% aproximado de diferencias nucleotídicas entre sus genomas y cada genotipo presenta a su vez, una serie de subtipos, con variaciones de secuencia en torno al 25% (Simmonds, Bukh J et al. 2005). Recientemente se ha expandido las variantes con un 7 genotipos (Smith, Bukh et al. 2014).

I.5.1. VHC: Secuencia de ARN. Estructuras de su genoma.

El VHC presenta un genoma de simple cadena de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 9.600nt, que contiene un único marco abierto de lectura (ORF), flanqueado por dos regiones no traducibles en 5' y 3' (UTRs).

La región 5'UTR-VHC (1-370nt) es una de las regiones más conservadas y más estructuradas en el genoma del virus. Contiene una serie de dominios ricos en motivos estructurales que constituyen un elemento IRES (el IRES mínimo estaría comprendido entre los nucleótidos VHC1-342nt). Éste presenta la capacidad de reclutar la subunidad 40S del ribosoma en ausencia de los factores de inicio de la traducción y es el responsable de la traducción de una manera independiente de cap (Lytle, Wu et al. 2002). El reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S requiere del correcto plegamiento terciario de la molécula de ARN del virus en su región 5'UTR-(IRES). Se ha demostrado que la funcionalidad del IRES del VHC depende de la fuerza iónica del medio, con un óptimo situado en la concentración de sales fisiológica (equivalente a 0.9% de cloruro de sodio) (Kieft, Zhou et al. 1999). A continuación se presenta un esquema de la estructura secundaria de su genoma ARN en la figura 7:

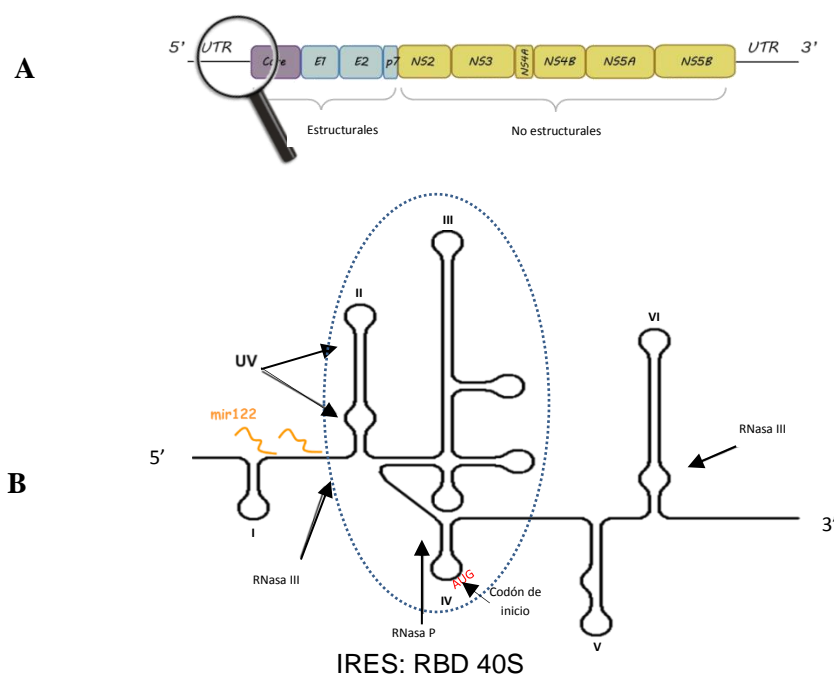


Figura 7: Esquema de la organización genómica del VHC. Detalles de la región IRES. A) Esquema del genoma completo del ARN del virus del VHC. B) Estructura de la región 5'UTR (IRES) VHC1-370+core. Las flechas negras sitúan las principales señales estructurales descritas por sondas bioquímicas y físicas. En el óvalo discontinuo azul se remarca la región RBD, responsable directa del reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S. En rojo el codón de inicio de la traducción.

Dada su importancia funcional la secuencia del IRES está bien conservada entre todos los genotipos del VHC (Martinez-Salas, Ramos et al. 2001, Perard, Leyrat et al. 2013). Los dominios I y II son críticos para la replicación del virus (Friebe, Lohmann et al. 2001). Los dominios II y IV actúan colocando los puntos de anclaje en el IRES para la subunidad ribosomal 40S y el dominio IV contiene el codón de inicio de la traducción, que se solapa parcialmente con parte de la secuencia codificante para la proteína del cápside o *core* (Pestova, Shatsky et al. 1998). El dominio III presenta un pseudonudo en su base con el dominio IV, fundamental para situar el codón de inicio de la traducción (342nt) en el “sitio P” y que ha demostrado ser absolutamente necesario para su actividad. La inserción de mutaciones en la estructura desestabiliza las interacciones terciarias entre los residuos del bucle IIIef y las bases complementarias en dominio IV provocando una fuerte reducción en su capacidad de reclutar el ribosoma e iniciar la traducción (Wang, Le et al. 1995).

I.5.1.a Secuencias de unión del IRES del VHC al miR-122.

El VHC replica preferentemente en células hepáticas humanas, que presentan las proteínas receptoras de superficie adecuadas y factores celulares requeridos para su ciclo vital (Drummer HE, Boo I et al. 2006, Rusyn I and SM 2014). Las células hepáticas expresan abundantemente el micro ARN 122 (miR122) y en los extremos UTR del genoma del VHC se han identificado tres posibles secuencias diana para él: una en el extremo 3' UTR en el dominio hipervariable, y las otras dos están localizadas en el extremo 5'UTR entre los dominios I y II, del extremo 5'UTR (Lagos-Quintana,

Rauhut et al. 2002). Estudios publicados por Jopling, Sarnow y colaboradores han demostrado experimentalmente que estas interacciones con el miR122, contribuyen a la estabilización del genoma y actúan a nivel de la regulación de los procesos replicativos y traduccionales del virus (Jopling, Yi et al. 2005).

I.5.1.b Estructura *ARNt-like* en el elemento IRES del VHC.

Se ha propuesto el empleo de la actividad de la RNAsa P para la identificación de estructuras tipo ARNt, al conservar ésta actividad su sensibilidad frente a variantes de ARN estructurados como el ARNt (*tARN-like*) (Lyons and Robertson 2003). La respuesta de la actividad frente a la existencia de estructuras *ARNt-like* ha sido confirmada en otras estructuras *ARNt-like* presentes en elementos IRES de pestivirus animales como el VCSF y el VBVD o del VCrP. La actividad RNAsa P produce *in vitro*, un corte específico en el extremo 5' UTR del VHC, cerca del codón AUG de inicio de la traducción, que señala la existencia de una estructura *ARNt-like* (Nadal, Martell et al. 2002, Sabariego, Nadal et al. 2004, Piron, Beguiristain et al. 2005). Esta estructura *ARNt-like* parece jugar un papel esencial en la preservación de la conformación funcional del elemento IRES, necesaria para gestionar de manera eficiente el proceso de síntesis de proteínas independiente de cap (Piron, Beguiristain et al. 2005).

I.5.1.c Estructuras terciarias *E-loop* en el elemento IRES del VHC.

En el dominio II del extremo 5'-UTR del VHC (en su elemento IRES) se ha descrito la existencia de una estructura terciaria local *E-loop* (Figura 9). Este *E-loop* se caracterizó a través de la formación de enlaces covalentes tipo *crosslink*, inducidos por la luz UV entre bases enfrentadas en un bucle interno de la base del dominio II (Lyons, Lytle et al. 2001). Recientemente se ha descrito otra respuesta estructural diferente en este *E-loop*, inducida también por la radiación ultravioleta, un autocorte en una situación muy específica de la zona apical del tallo lazo II (U78-C79) con productos mayoritarios 5'P y 3'P (y en menor cantidad 3' OH).

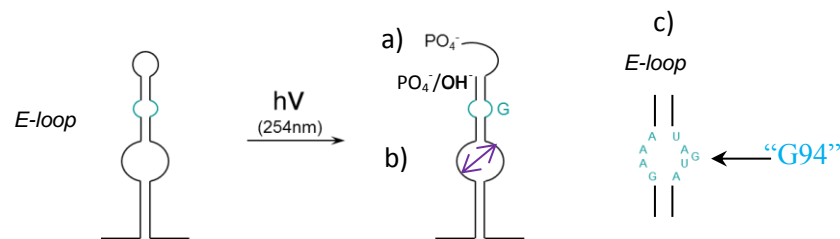


Figura 8: Estructura terciaria local *E-loop*. Estructura *E-loop* descrita en el dominio II del extremo 5' del genoma del VHC (Ariza-Mateos, Prieto-Vega et al. 2012). La luz ultravioleta de 254nm produce dos efectos sobre esta estructura *E-loop*: a) Autodigestión. b) formación de un enlace covalente intramolecular tipo *crosslink*. c) En azul se describe la secuencia que constituye el elemento *E-loop* con la G94 esencial indicada.

Las dos respuestas son dependientes de la secuencia del bucle interno del dominio II que forma el *E-loop* y una única mutación en la posición "G94" o una delección de la hebra derecha inhibe el autocorte. El sustrato mínimo del *E-loop* que

responde a la luz ultravioleta es de unos 33nts, lo que es consistente con la posible importancia de esta actividad en un posible mundo ARN prebiótico.

En el IRES del virus de la peste porcina clásica VCSF también se ha identificado la formación de enlaces *crosslink* y un autocorte (en una posición específica U44-A45) inducidos por la radiación UV-C que señalan la existencia de una estructuras terciarias *E-loop*. Las estructuras terciarias locales *E-loop* se han relacionado con la unión a proteínas y al inicio de la síntesis de proteínas (Ariza-Mateos, Prieto-Vega et al. 2012).

I.5.1.d Transición estructural promovida por miR-122 en el IRES del VHC.

Se ha propuesto que el virus de la hepatitis C presenta su extremo 5'UTR como un equilibrio conformacional entre dos formas, una abierta y otra cerrada formando un bucle. La forma cerrada se forma por la unión de sus secuencias flanqueantes 3' y 5', que tienen una elevada complementariedad, y encierra su elemento IRES (VHC1-342) dentro del bucle. Se ha descrito, experimentalmente, un cambio conformacional entre ambas formas e inducido por la interacción del micro ARN miR122 (el micro ARN más abundante y específico del hígado) en estas dianas (Díaz-Toledano, Ariza-Mateos et al. 2009). A continuación en la figura 9 se presenta un esquema del equilibrio conformacional y su cambio provocado por el miR122.

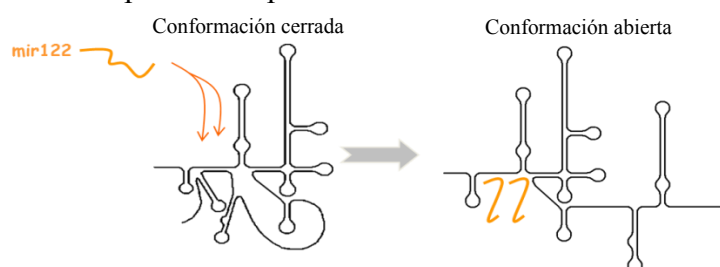


Figura 9: Cambio conformacional inducido por el miR122 hepático (Díaz-Toledano 2009)

Se empleó la actividad RNAsa III y otras herramientas bioquímicas clásicas sobre esta región, para confirmar, *in vitro*, que la conformación cerrada cambia a una conformación abierta por unión con el miR122. La transición estructural sugiere un papel específico del miR-122 en la infección del hígado por VHC (Jopling, Yi et al. 2005).

I.5.1.e Región de unión del IRES del VHC a la subunidad ribosomal 40S.

Se ha descrito en detalle la unión entre el extremo 5'UTR del VHC y la subunidad 40S ribosomal que se produce en ausencia de factores de inicio de la traducción (Lytle, Wu et al. 2002). Se ha descrito la aportación de los distintos motivos estructurales del IRES en esta interacción. El *pseudoknot* descrito en la base del tallo lazo III, fragmentos de secuencia conservados y el tallo lazo II demostraron una gran protección frente a la ARNasa A, indicando la existencia de múltiples uniones directas con la subunidad ribosomal (Lyons, Lytle et al. 2001). También se ha descrito la protección del motivo estructural *ARNt-like* presente en el IRES del VHC y su

importancia para el posicionamiento del codón AUG de inicio de la traducción (Piron, Beguiristain et al. 2005).

La subunidad 40S parece interactuar con secuencias en el bucle IIIId, en la hélice entre IIIc y IIIId y con residuos que flanquean el *pseudoknot* y el codón de inicio de la traducción (Martinez-Salas, Ramos et al. 2001). Después de formarse el complejo el binario 40S-IRES, y la unión del eIF3 al dominio IIIb, es necesario que se forme el complejo ternario eIF2-GTP-Met-ARNt para la formación del complejo de iniciación 48S que va a conducir el inicio de la traducción (Pestova, Shatsky et al. 1998, Kolupaeva, Pestova et al. 2000) (Odreman-Macchioli, Tisminetzky et al. 2000).

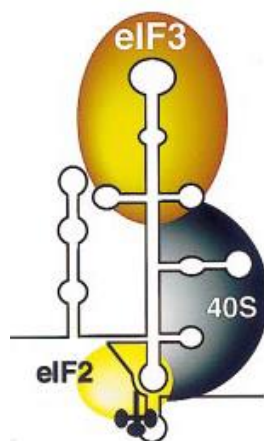


Figura 10: Interacciones del IRES del HCV. Sitios de unión del eIF2, eIF3 y subunidad ribosomal 40S descritos (Odreman-Macchioli, Tisminetzky et al. 2000, Martínez-Salas, Ramos et al. 2001).

I.5.2. Catástrofe de Error como Hipótesis terapéutica. Polio, FMDV, VHC...

La adaptabilidad genómica inherente en los virus como medida defensiva frente a fármacos o al propio sistema defensivo de la célula hospedadora, es entre otros factores, la causante de transmitir su resistencia (Domingo and Holland 1997, Perales, Iranzo et al. 2012). Esta característica de la cuasiespecie es responsable de los estados crónicos de las infecciones de virus como el HIV-1 o el VHC (Ortega-Prieto, Sheldon et al. 2013, Perales, Beach et al. 2013). En virus ARN la frecuencia de mutación es tan alta que las mutaciones de resistencia aparecen en las secuencias incluso antes de la aplicación de un fármaco (Nájera, Holguin et al. 1995, Holmes 2004, Cullen 2006). Sus genomas se encuentran tan próximos al umbral mutacional que se ha sugerido el uso de la mutagénesis como una posible estrategia de investigación y de principio terapéutico para arrastrar a sus poblaciones a la catástrofe de error (Domingo, Flavell et al. 1976, Domingo and Holland 1997).

La búsqueda de la extinción de los virus ARN rebasando el límite máximo tolerable de su tasa de mutación, constituye la base de las estrategias de **mutagénesis letal** (Anderson, Daifuku et al. 2004). En los últimos diez años, siguiendo la hipótesis de **defección letal**, la introducción de mutaciones defectivas inducidas en el genoma de una cuasiespecie viral, se ha convertido en una importante estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades virales (Grande-Perez, Sierra et al. 2002, Ruiz-Jarabo, Arias et al. 2002, Grande-Perez, Gomez-Mariano et al. 2005).

Los estudios con varios virus de ARN han demostrado que el aumento de la frecuencia de la mutación, se tradujo en una disminución de la infectividad del virus o incluso en la extinción, consecuente con la entrada del virus en catástrofe de error. La estrategia ha demostrado ser eficaz *in vitro*, sometiendo al virus a una serie de pases en presencia de mutágenos, para virus tan diferentes como el virus del SIDA VIH-1, el virus de la fiebre aftosa VFMD, el virus de la coriomeningitis linfocítica VLCM, poliovirus, etc... y se han obtenido resultados alentadores en cultivos celulares transfectados de VHC (Ortega-Prieto, Sheldon et al. 2013). En el VFMD se han identificado nucleótidos concretos de su genoma (M296I) relacionados explícitamente con la replicación viral que demuestran una especial resistencia frente a mutágenos. Los resultados experimentales señalan a estas posiciones como posibles dianas terapéuticas al afectar directamente a su capacidad infectiva (Sierra, Airaksinen et al. 2007). Se han identificado regiones sensibles en los genomas de *Picornavirus* que sufren alteraciones importantes provocadas por mutágenos análogos de nucleósidos. Las mutaciones generadas por los mutágenos provocan distorsiones en ciertos dominios estructurales vitales para las interacciones de las polimerasas, lo que refuerza el empleo de la mutagénesis letal como una posible estrategia terapéutica (Perales, Agudo et al. 2009). En la actualidad existen fármacos mutagénicos como la ribavirina, en fase de ensayos clínicos preliminares y uso aprobado, que se piensa que pueden ejercer acción antiviral como mutágeno. (Loeb, Essigmann et al. 1999, Anderson, Daifuku et al. 2004, Moreno, Gallego et al. 2011)

I.5.3. Mutágenos antivirales y antibióticos.

El uso de mutágenos químicos sobre el genoma de ARN del virus de la estomatitis vesicular y el virus de la polio, permitió incrementar su ratio de mutaciones de 1,1 a 2,8 veces (Holland, Domingo et al. 1990). Los mutágenos pueden dar lugar a la aparición de una subpoblación de genomas defectivos sobre la cuasiespecie, por sobreexpresión de fenotipos recurrentes y disminución del número de genomas óptimos, lo que de alguna manera perjudica la eficacia biológica de toda la cuasiespecie (Holmes 2004, Holmes 2009). Algunos de los mutágenos más empleados frente a cuasiespecies virales son 5-azacytidina (5-AZA-C), pro-flavina, nitroguanidina, ácido nitroso, 5-fluorouracil (5-Fu-U), ribavirina, etc...

Los resultados con mutágenos sobre poblaciones de FMDV han corroborado una disminución de su eficacia biológica antes de alcanzar la extinción viral (Domingo, Gonzalez-Lopez et al. 2005). También se ha demostrado la pérdida de viabilidad de la cuasiespecie del VLCM provocada por la interferencia de mutantes defectivos en coinfecciones no tratadas con mutágeno (Perales, Mateo et al. 2007). La acumulación de mutaciones negativas que van afectar a la capacidad replicativa de los virus, parece ser de una importancia vital para su infectividad y responsable de su extinción. (Grande-Perez, Lazaro et al. 2005, Iranzo and Manrubia 2012).

I.5.3.a 5-fluorouracilo Fu-U:

El 5-fluorouracilo fue descrito por Charles Heidelberger a finales de la década de los cincuenta (Heidelberger, Chaudhuri et al. 1957). Es un potente inhibidor utilizado en el tratamiento de algunas formas de cáncer por su analogía con la base nitrogenada Uracilo. Se ha descrito su unión irreversible a la enzima timidilato sintetasa, lo que inhibe la división celular y el crecimiento tumoral (Grande-Perez, Sierra et al. 2002). El Fu-U inhibe la síntesis del ARN e interviene en la síntesis de ADN promoviendo desequilibrios metabólicos y apoptosis celular. Los resultados experimentales avalan las investigaciones que se están llevando a cabo en la actualidad sobre el empleo del Fu-U como agente mutagénico antiviral. El uso del 5-Fu-U incrementó el ratio de mutaciones y la proporción de mutantes letales del VSV y del *polio virus* (Holland, Domingo et al. 1990). Se ha demostrado la actividad mutagénica del Fu-U sobre poblaciones del *Arenavirus* de la *coriomeningitis linfocítica* (VCL). Su uso provoca un incremento del ratio de mutaciones, aumenta la complejidad del espectro de secuencias mutantes y arrastra al virus VCL a la extinción (Grande-Perez, Gomez-Mariano et al. 2005).

I.5.3.b La ribavirina:

La ribavirina es una guanosina sintética (ribonucleósido 1-β-D-ribofuranosil-1, 2,4-triazol-3-carboxamida) que ha demostrado actividad antiviral de amplio espectro contra una gran variedad de virus de ARN, y es capaz de reducir la carga de poliovirus infeccioso por debajo de 0,00001% en cultivo celular. Es utilizado como un inhibidor nucleosídico para detener la síntesis de ARN viral.

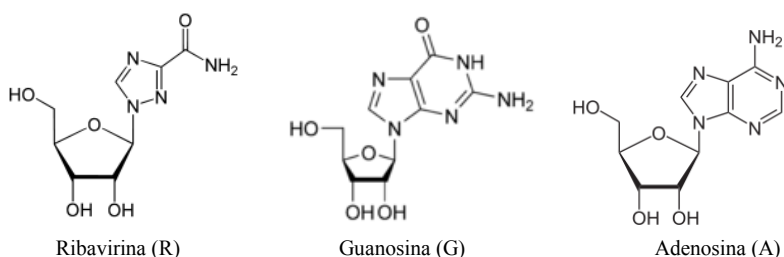


Figura 11: Estructura comparada de la ribavirina y sus nucleósidos análogos

El grupo carboxamida de la ribavirina, dependiendo de su rotación, se asemeja al de la adenosina o al de la guanosina (figura 11), lo que le permite incorporarse en las secuencias de ARNs virales como un análogo (Crotty, Cameron et al. 2001).

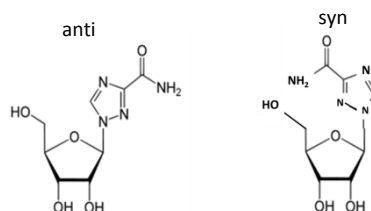


Figura 12: Confórmers de ribavirina.

Los datos experimentales obtenidos mediante CR-X y RMN indican que la ribavirina existe principalmente en conformación "syn", es decir, el plano de su base nitrogenada está dirigido hacia la ribosa. En esta conformación no podría formar enlaces de hidrógeno con las bases enfrentadas de la cadena, porque su base no está situada

dentro de las distancias de enlace (figura 12). La ribavirina adopta conformación "*anti*" cuando orienta la parte más voluminosa de su base alejada de su ribosa y es cuando puede incorporarse en las secuencias de ARN en lugar de cualquier guanosina o adenosina. Una ribavirina "*anti*" puede aparear igualmente bien con citidina y rotando su carboxamida formar puentes de hidrógeno con uridina, formando pares de una afinidad similar con uracilo o citosina (Maag, Castro et al. 2001). Estas incorporaciones inducen mutaciones en la replicación dependiente de ARN y son las que se han relacionado directamente con su actividad antiviral. Las mutaciones se reproducen por igual al emparejamiento con citidina y uridina durante la síntesis de ARN viral. De modo que la incorporación de una ribavirina opuesta a una C va a producir las mutaciones $C \rightarrow U$ y $G \rightarrow A$, y las mutaciones $U \rightarrow C$ y $A \rightarrow G$ deben aparecer como resultado de la incorporación de una ribavirina en oposición a una U. La cuantificación derivada de las mutaciones [$G \rightarrow A + C \rightarrow T$] y la opuesta [$A \rightarrow G + T \rightarrow C$] se puede considerar por tanto, una medida de la actividad mutagénica de la ribavirina (Ortega-Prieto, Sheldon et al. 2013). La hipermutación provocada por la ribavirina en los genomas puede ser letal para los virus de ARN. Pero no ha sido demostrado aún que la acción antiviral de la ribavirina se deba a un mecanismo mutagénico de interferencia con la replicación viral. Los resultados experimentales han sugerido la existencia otros posibles mecanismos: Se ha descrito que la ribavirina puede estar relacionada con la disminución drástica de los niveles de GTP intracelular (Streeter, Witkowski et al. 1973) y tal vez, con la inhibición de la formación del cap de los ARNm (Goswami, Borek et al. 1979). Se ha descrito su efecto sobre la modulación de la respuesta inmune antiviral Th1 (Hultgren, Milich et al. 1998). También se ha relacionado con una inhibición de las ARN-polimerasas virales (Bougie and Bisailon 2003), y ha demostrado provocar una desregulación de los genes involucrados en la señalización del interferón INF (Feld, Nanda et al. 2007).

La ribavirina se ha empleado para el tratamiento de la infección por virus de la hepatitis C en combinación con interferón- α , y en combinación con PEG-interferón alfa-2b en infecciones persistentes (Davis, Esteban-Mur et al. 1998). Recientemente, se ha demostrado que su acción antiviral frente al virus de la hepatitis C y de la polio, está relacionada con un aumento de las mutaciones en sus genomas ARNs, como resultado de la incorporación de la ribavirina por las polimerasas del VHC (Domingo, Sheldon et al. 2012) y del poliovirus (Crotty, Cameron et al. 2001). También se han publicado resultados similares con arenavirus (Moreno, Gallego et al. 2011). Recientemente se han encontrado una caída de 2 a 3 logaritmos, de título viral, en cultivos de poblaciones de mutantes de poliovirus tratadas con ribavirina respecto a una población WT. Estos resultados señalan un aumento de la sensibilidad de las poblaciones mutantes respecto a la población salvaje y respalda el uso de la ribavirina como tratamiento contra las cuasiespecies virales de poliovirus y la mutagénesis letal como una buena estrategia para combatir las infecciones virales (Lauring, Acevedo et al. 2012). Los datos publicados más recientes, indican que la ribavirina arrastra al virus VHC a la "catástrofe de error" (Ortega-Prieto, Sheldon et al. 2013). Por lo tanto, el empleo de ribonucleósidos mutagénicos podría representar una clase importante de agentes antivirales.

I.5.3.c La Geneticina:

La geneticina (G418) es un antibiótico aminoglucósido que se sintetiza a partir de *Micromonospora rhodorangea* y tiene una estructura similar a la gentamicina B1 (Wagman, Testa et al. 1974). Se ha propuesto su uso clínico como un agente anti-parasitario (Griffiths, Balakrishnan et al. 1998), y se ha demostrado su efectividad en el tratamiento de trastornos de tipo genético (Barton-Davis, Cordier et al. 1999). Presenta una baja toxicidad en modelos animales, inferior a la estreptomycin, y superior a la higromicina B (Sangkuhl, Schulz et al. 2004).

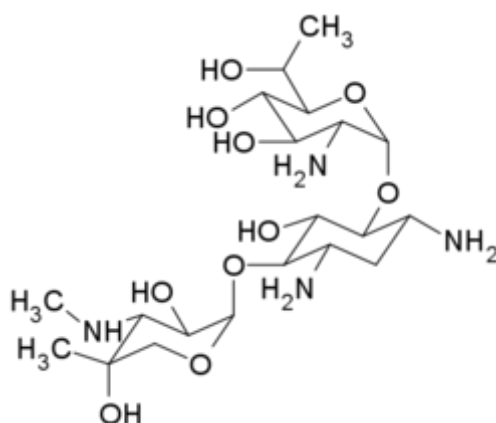


Figura: Estructura química de la geneticina. Nombre IUPAC (2 R ,3 S ,4 R ,5 R ,6 S)-5-amino-6-[(1 R ,2 S ,3 S ,4 R ,6 S)-4,6-diamino-3-[(2R,3R,4R,5R)-3,5-diidrossi-5-metil-4-metilaminoossan-2-ossi-2-idrossicicloesil]ossi-2- (1-hidroxietil) Oxan-3,4-diol.

Se ha propuesto que la geneticina interacciona con estructuras del ribosoma, perturbando la fase de elongación de la síntesis de proteínas, de células procariotas y eucariotas. Concretamente se ha descrito su interacción con estructuras terciarias de ARN que actúan como un interruptor durante la traducción y que están formadas por bucles internos asimétricos, con pares de bases no canónicos (Fourmy, Recht et al. 1996). Se ha demostrado que esta interacción en el sitio-A en el ARN ribosomal bacteriano 16 S provoca una pérdida de fidelidad de la traducción, al interferir con este motivo esencial de ARN (Vicens and Westhof 2003, Vicens and Westhof 2003). La resolución de la estructura cristalina de la geneticina unida al motivo de ARN que contiene el sitio-A ha proporcionado un conocimiento detallado de esta interacción. Estos estudios también han observado que la geneticina es capaz de responder frente a varias variaciones filogenéticas asociadas con la resistencia.

La resistencia a la geneticina es conferida por el gen neo (Tn5 APH2) que codifica la expresión de una enzima con actividad aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APT). La actividad APT es capaz de fosforilar los grupos hidroxilo de geneticina suprimiendo su efecto sobre el bloqueo de la síntesis proteica (Hadfield, Jordan et al. 1990). La expresión génica de esta enzima es empleada habitualmente en biología celular, insertada en plásmidos, porque permite la selección de líneas celulares

transfectadas de forma estable (Grimm 2004, Wurm 2004). En la actualidad hay muchos plásmidos de expresión comerciales que emplean el gen neo como marcador seleccionable de líneas celulares.

Las concentraciones de geneticina empleadas para la selección de líneas de bacterias y algas, es de un máximo de 5 mg/L. Para células de mamíferos se utilizan en concentraciones de 400 mg /L aproximadamente para la selección y 200 mg /L para el mantenimiento de la línea. Aunque la concentración óptima para la selección de clones resistentes va a depender de la línea celular que se emplee y del plásmido que contenga el gen de la resistencia. Por consiguiente es necesario calibrar la curva de dosis-mortalidad para determinar cuál es la mejor condición para cada sistema experimental.

La geneticina se ha empleado como inhibidor de la proliferación, en cultivos celulares de virus, al menos, de dos géneros virales diferentes de la familia *Flaviviridae*: *Flavivirus* y *Pestivirus*. Se ha descrito su eficacia contra la infección del virus de la diarrea viral bovina (BVDV), miembro del género *Pestivirus* (Birk, Dubovi et al. 2008). También se ha demostrado su eficacia contra el virus del dengue, miembro del género *Flavivirus* (Zhang, Mason et al. 2009). Los mecanismos antivirales de la geneticina no han sido descritos y su eficacia contra los virus nunca ha sido demostrada in vivo. Pero se sabe que es capaz de bloquear la proliferación del virus del dengue sin inhibir la replicación del virus de la fiebre amarilla (VFA) en un mismo cultivo celular. Este resultado sugiere que su acción se debe a una interacción directa con el ARN viral, porque si fuera a nivel de traducción celular, ambos virus deberían verse inhibidos. En cualquier caso, la geneticina ha demostrado interactuar con estos motivos estructurales esenciales del ARN viral, provocando una distorsión de las estructuras funcionales, vitales para estos virus. Es factible pensar por tanto que la geneticina puede ser capaz de inhibir también el crecimiento del VHC, que comparte estructuras de ARN en regiones similares con estos virus.

La secuencia de la región 5' no traducible del ARN del VHC está muy conservada, y sus estructuras funcionales deben estarlo también (Domingo and Gomez 2007). La región VHC1-542 presenta una gran variedad de motivos estructurales, responsables de su participación en funciones virales esenciales, tales como la iniciación de la traducción, la replicación viral, el equilibrio de la proporción entre la entrada en la traducción o en la replicación y en la propia estabilidad del genoma viral. Son especialmente significativos sus motivos de doble cadena de ARN que presentan un equilibrio conformacional (a modo de interruptor) (Beguiristain, Robertson et al. 2005, Diaz-Toledano, Ariza-Mateos et al. 2009); y su dominio *t-ARN like* (Boehringer, Thermann et al. 2005). Ambos son identificados con el uso de RNAsas dependientes de la estructura, como la RNasa P o la RNasa III. La interacción de la geneticina con esta región VHC1-542 promueve el switch y es vital para la actividad viral (Ariza-Mateos, Diaz-Toledano et al. 2015). La evaluación de la interacción de la geneticina con la propia integridad de las estructuras frente a la variabilidad, puede proporcionar una importante información sobre la actividad del fármaco y la posible susceptibilidad al tratamiento.

Sumario

En la documentación de este trabajo de Tesis Doctoral, han surgido una serie de preguntas como: ¿Cuándo una mutación es funcionalmente neutra o estructuralmente neutral? (Wagner and Stadler 1999) ¿Es posible arrastrar a la extinción un virus, aumentando y acumulando de mutaciones su genoma? (Perales, Agudo et al. 2011) ¿El umbral de tolerancia coincide con la crisis de su eficacia biológica y señala la extinción viral? (Schuster 2011). Si el aumento de la tasa de mutación arrastra a la población a la extinción, porque ocurre: ¿por acumulación de errores en el genoma o por acumulación de mutantes no viables en la población? (Tejero et al., 2010)(Ortega-Prieto, Sheldon et al. 2013) ¿Dónde está el límite de tolerancia a la mutación? (Sheldon, Beach et al. 2014).

En su conjunto estas cuestiones nos han llevado a preguntarnos: ¿Qué cantidad de distorsión mutacional es capaz de tolerar un elemento estructural hasta dejar de ser funcional para el genoma ARN de una cuasiespecie viral?

Para responder a esta pregunta hemos diseñado una estrategia que nos permita valorar la integridad estructural en el marco poblacional que constituye una cuasiespecie viral. La evaluación de los diferentes elementos y a los distintos niveles estructurales, se ha llevado a cabo a través de la evaluación de las respuestas a sondas bioquímicas y biofísicas, que reconocen y responden (con mayor o menor especificidad) a dichas estructuras. Se ha elegido un modelo de VHC, en el que nuestro grupo ya dispone de una dilatada experiencia y una vasta recopilación de información y resultados. Se ha seleccionado la región VHC1-542, especialmente conservada a nivel de secuencia, rica en motivos y elementos estructurales, y que contiene el elemento IRES con un dominio RDS, responsable del reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S. Todo esto, convierte a nuestro modelo VHC1-542, en un candidato idóneo para estudiar el efecto que ejerce la variabilidad sobre el reconocimiento de sus motivos y elementos estructurales.

La variabilidad se ha introducido en la población de secuencias de una forma aleatoria, empleando un método de PCR mutagénica, permitiéndonos generar unas poblaciones del VHC1-542 con ratios de mutaciones y grado de complejidad poblacional crecientes. También se seleccionaron poblaciones del ARN del VHC1-570 extraídas de cultivos celulares transfectados. Se tomaron estas poblaciones a pase 0 y a pase 4, con el fin de poder comparar el efecto de la variabilidad, de la selección natural, producida en los cultivos tras una serie de pases y su efecto sobre los reconocimientos estructurales. Y se tomó también una población tras 4 pases tratados con ribavirina, con la intención de poder evaluar el efecto de la variabilidad inducida por el uso de mutágenos exógenos que arrastran los cultivos a la extinción viral.

Finalmente se puso a prueba los efectos de la variabilidad, en cada población, sobre el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S. Esto nos permite evaluar funcionalmente el conjunto estructural que constituye el IRES del VHC1-542/570 *in vivo* e *in cultivo*. Establecida esta estrategia a seguir, se plantearon los Objetivos a perseguir con este trabajo de Tesis Doctoral, a fin de dar respuesta o al menos, aproximarnos en lo posible, a la pregunta que nos planteamos. Las respuestas encontradas en los efectos de la variabilidad pueden representar por si mismas una confirmación de los mecanismos de acción de la *mutagénesis letal* como estrategia terapéutica frente a virus de ARN como el VHC.

OBJETIVOS

Nuestro laboratorio tiene una amplia experiencia en la identificación y caracterización, *in vitro*, de estructuras ARN en genomas virales. La región genómica 5' no traducible del virus de la hepatitis C (VHC1-542) está significativamente conservada y es muy rica en motivos estructurales, que conforman un elemento IRES, vital para la traducción viral independiente de cap. Trabajos previos han caracterizado estos motivos y el dominio RBD de reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S, empleando su interacción con factores bioquímicos y biofísicos cuyas respuestas frente a los motivos estructurales descritos en esta región, están bien definidas.

Considerando las características de cuasiespecie del VHC, el incremento de la tasa de mutaciones debe aumentar la variabilidad hasta un límite de tolerancia mutacional (catástrofe de error) y una pérdida del mantenimiento y la transmisión de la identidad genética común a toda la cuasiespecie (M. Eigen 1971). Partiendo de esta hipótesis, los objetivos planteados en este trabajo, se centran en el estudio de la integridad estructural del elemento IRES del virus de la hepatitis C, frente al incremento de mutaciones. Hemos tratado de analizar la dependencia de las respuestas estructurales de los factores de reconocimiento con el ratio de mutaciones presentes en la población, dentro de la hipótesis de la “mutagénesis letal” y como posible vía terapéutica para la extinción de las cuasiespecies víricas.

Dados los planteamientos generales expuestos en la introducción de este trabajo de Tesis sobre la relación de la variabilidad genómica de las cuasiespecies virales con su catástrofe de error, se abordarán los siguientes objetivos en este trabajo:

OBJETIVOS:

- 1.- Generar un modelo con la región genómica del VHC1-542 que ponga de manifiesto el efecto de la variabilidad mutacional sobre los motivos estructurales del elemento IRES.
- 2.- Examinar el reconocimiento de los diferentes motivos estructurales presentes en la región del VHC1-542 a todos los niveles (secuencia, dsARN, 3^a), en función del ratio creciente de mutaciones introducidas de manera aleatoria.
- 3.- Evaluar el efecto que va a ejercer el incremento del ratio de mutaciones sobre la afinidad del reclutamiento (*KD*) de la subunidad ribosomal 40S por el elemento IRES del VHC.
- 4.- Estudiar el efecto que ejerce la selección sobre la variabilidad genómica del elemento IRES del VHC en cultivos a diferentes pases, analizando la afinidad de su reclutamiento (*KD*) de la subunidad ribosomal 40S.
- 5.- Analizar el efecto de la ribavirina y la geneticina sobre la variabilidad genómica del elemento IRES del VHC y estudiar cómo afecta a la afinidad de su reclutamiento (*KD*) de la subunidad ribosomal 40S en cultivo.

Materiales y Métodos

Materiales:

M.1.1.- Material de vidrio libre de RNAsas .

Todo el material de vidrio utilizado durante el desarrollo de este trabajo experimental fue horneado a 200°C durante 6 horas. Los tubos de reacción (2 ml) y las pipetas Pasteur (de vidrio), fueron siliconizados empleando una solución de silicona (BioChemica-AppliChem) en cloroformo al 4%, lavados varias veces con agua destilada y horneados a 200°C durante 6 horas.

M.1.2.-Agua.

Toda el agua para la fabricación de los tampones y soluciones en contacto con el ARN empleada, fue agua estéril para inyectables adquirida por vía comercial a través de la compañía Braun Medical.

M.1.3.- Suspensión de celulosa fosfato CF-11 para purificaciones en columna.

La resina CF-11 empleada en la purificación de ARN (eliminación de rNTPs no incorporados, sales y ADN), es un tipo de celulosa de fibra corta derivada del algodón, que posee la capacidad de separar ARN de simple y doble cadena en función de las condiciones de elución.

M.1.3.a.-Tratamiento de la resina CF-11:

1. 130 gr de resina CF-11 pesados (Whatman). Lavados durante 30 min en agitación empleando un litro de solución 0.1M NaOH. Dejamos reposar 30 minutos. Transcurrido este tiempo retiramos el sobrenadante.

2. Realizamos 10 lavados consecutivos empleando un 1 litro de agua bidestilada. Cada lavado consta de 30 minutos de agitación, y 30 minutos de reposo, tiempo tras el cual se retira el sobrenadante. En los últimos lavados el sobrenadante debe de ser transparente.

3. Conservamos la suspensión en 1 litro de EDTA 2 mM pH 8 a 4°C hasta su utilización.

M.1.4.- Patrones de peso molecular para electroforesis.

1. ARN Century™ Marker-Plus (Ambion): patrón de peso molecular para ARN preparado según indicaciones del fabricante. Su transcripción en presencia de GTP[α -³²P] origina siete transcritos marcados radiactivamente de 100, 200, 300, 400, 500, 750 y 1000 nucleótidos de longitud.

2. Decade™ Marker System (Ambion): patrón de peso molecular para ARN preparado según indicaciones del fabricante. El tratamiento con T4 polinucleótido quinasa (PNK) en presencia de ATP[γ -³²P] da lugar a fragmentos de ARN marcados radiactivamente de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y 150 nucleótidos de longitud.

3. 2-Log ADN Ladder (NEB): patrón de peso molecular para electroforesis en gel de agarosa que incluye fragmentos de ADN comprendidos entre 100-10000 pares de bases.

M.1.5.-Isótopos radiactivos.

Los isótopos radiactivos empleados para el marcaje de los ARNs fueron suministrados por la compañía Perkin Elmer.

- GTP [α -³²P]:** con una actividad específica de 3000Ci/mmol, 250 μ Ci a una concentración de 10mCi/ml.
- pCp [$5'$ -³²P]:** con una actividad específica de 3000Ci/mmol, 250 μ Ci a una concentración de 10mCi/ml.
- GTP [γ -³²P]:** con una actividad específica de 6000Ci/mmol, 250 μ Ci a una concentración de 10mCi/ml.
- ATP [γ -³²P]:** con una actividad específica de 6000Ci/mmol, 250 μ Ci a una concentración de 10mCi/ml.

M.1.6.- Oligonucleótidos empleados.

Los oligodesoxirribonucleótidos sintéticos (ODNs) utilizados en este trabajo fueron sintetizados por regla general en el servicio de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” de Granada. La síntesis se llevó a cabo en el sintetizador 3400 ADN Synthesizer (Applied Biosystems), siendo purificados posteriormente por HPLC.

Nombre ODN	Secuencia 5' → 3'
VHC-GENOTIPO 1b	
T7-VHC 1-22 ECO (+)	TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AAT TCG CCA GCC CCC GAT TGG GGG CGA
AGT-HIND III-VHC570-554(-)	AGT AAG CTT CCC AGG CCC TGC CCT CG
AGT-HIND III VHC542-537(-)	AGT GAT CTA TGG TGG AGT GT
AGT HIND III VHC402-386(-)	AGT AAG CTT CCT GTG GGC GGC GGT TG
AGT HIND III VHC130-119(-)	AGT AAG CTT GGG AGG GGG GGT
VHC-GENOTIPO 2a	
2a-pT7-GGG-VHC 1-20(+)	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CCT GCC CCT AAT AGG GGC G
2a-VHC 570-551(-)	CCC CAG GAT TTG CCA GTG GA
2a-VHC 542-522(-)	CTT TAG GGA TGG GCT GGC GCC
2a-VHC 521-502(-)	TCC ACG TGG CTG GGA CCG CT
VHC539-520(-) JC1 Donw	TAG GGA TGG GCT GGC GCC TT
VHC566-546(-) JC1 Donw	AGG ATT TGC CAG TGG AGC GC
VHC251-273(+)^{2a}JC1ED-UP	AGC CGA GTA GCG TTG GGT TGC GA
VHC287-310(-)^{2a}JC1EDonw	CTC GCA AGC GCC CTA TCA GGC AGT

VHC22(+) 2aM13EDUP	GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTA CCT GCC CCT AAT AGG GGC GAC
VHC251-273(+) 2aM13EDUP	GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTA GCC GAG TAG CGT TGG GTT GCG A
VHC287-310(-) 2aM13EDonw	CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCC TCG CAA GCG CCC TAT CAG GCA GT
VHC570(-) 2aM13EDonw	CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCC CCC AGG ATT TGC CAG TGG AGC GCC
IRES - CrPV	
T7-ECORI CrPV1-18(+) UP	TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AAT TCA TGT GAT CTT GCT TGT AA
AGT- HINDIII-CrPV198-182(-)	AGT AAG CTT TAT CTT GAA ATG TAG C
OTROS PRIMERS	
P-TyARN Donw(-)	TGA TGG TGG TGG GGG AAG
asT7R1.1	AAG AAG GTC AAT CAT AAA GGC CAC TCT TGC GAA TGA CCT TGA GTT TGT CCC TCT ACC CTA TAG TGA GTC GTA TTA
R1.1 UP	AAG AAG GTC AAT CAT AAA GGC
Oligo d(A)-anchor primer	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CAA AAA AAA AAA AAA AAA
dT-Pst	CTG CAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT
dA-Pst	CTG CAG AAA AAA AAA AAA AAA AAA
miR-122	TGG AGT GTG ACA ATG GTG TTT GT
PUC/M13 forward	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC
PUC/M13 reverse	TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C
Promotor T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
miR-122*	UGG AGU GUG ACA AUG GUG UUU GU

*Este oligorribonucleótido sintético fue sintetizado por la compañía IDT (*Integrated ADN Technologies*) y purificados por HPLC.

M.1.7.- Construcciones de ADN empleadas para las reacciones de transcripción.

1.- pN (1-4728) Bluescript: contiene los 4728 primeros nucleótidos del virus de la hepatitis C (VHC) genotipo 1b tras el promotor de la T7 ARN polimerasa (clon cedido por el Dr. Stanley M. Lemon). Tras digerir con el enzima de restricción Bln I proporciona un molde para la transcripción de un fragmento de ARN correspondiente a los 570 primeros nucleótidos del genoma viral. En caso de ser digerido con el enzima *Aat II*, el producto de transcripción resultante cuenta con los primeros 402 nucleótidos. Empleando el plásmido como molde y los oligonucleótidos T7-GGG-ECOR I VHC 1-22 (+) y VHC 536-542 (-) Hind III-AGT, se obtiene un producto de PCR que permite la transcripción del fragmento de ARN correspondiente a los 542 primeros nucleótidos del genoma viral.

2.-pUC19Tyr: contiene clonado bajo el promotor de la T7 ARN polimerasa el precursor ARNt para la tirosina de *E. Coli* (sustrato natural de la RNAsa P de *E. Coli*). Tras digestión con el enzima de restricción *Fok I* proporciona un molde para la transcripción de un ARN de 131 nucleótidos de longitud del ARNt^{tyr}.(Altman and Smith 1971).

3.- pGEM3Z-VHC: El ARNm del VHC1-570 fue clonado dentro del vector pGEM®-3Zf(-) (Promega) entre las dianas de restricción EcoR/Hind III. Los insertos de ADN correspondientes al genoma del VHC1-570 fueron obtenidos por PCR y las dianas de restricción EcoR I y Hind III fueron añadidas posteriormente mediante PCR empleando la pareja de oligonucleótidos empleando los oligonucleótidos T7-GGG-ECOR I-VHC 1-22(+) y AGT-Hind III VHC570(-). El vector se digieren con el enzima de restricción Hind III, proporcionando un molde para la transcripción bajo el control de la T7 ARN polimerasa. Los transcritos generados corresponden a los ARNs T7-GGG-ECOR I-VHC1-570-Hind III-AGT. La secuencia nucleotídica correspondientes al VHC1-570 genotipo 1b, empleada para el diseño de los oligonucleótidos se encuentra disponible en la base de datos de GenBank bajo los siguientes números de acceso: gb|AF139594.2|

M.1.8.- Extracto de actividad RNAsa P:

La actividad RNAsa P humana fue purificada a partir de 30g de células HeLa según el protocolo descrito por Bartkiewicz (Bartkiewicz, Gold et al. 1989) y modificado por (Nadal, Martell et al. 2002). Más adelante se describe en detalle el método de extracción y purificación de la actividad RNAsa P.

M.1.9.- Extracción de subunidades ribosomales 40S y 60S:

La extracción de subunidades ribosomales humanas, se llevó a cabo a partir de 3g de células HeLa según el protocolo descrito en las publicaciones (Pestova, Hellen et al. 1996, Lytle, Wu et al. 2001, Landry, Hertz et al. 2009, Thompson 2012) con modificaciones respecto a la lisis de las células HeLa. Más adelante se presentará el método de extracción y purificación de las subunidades ribosomales 40S y 60S.

M.1.10.- Cepas bacterianas:

Todas las construcciones plasmídicas empleadas en este trabajo fueron introducidas por electroporación o por choque térmico en la cepa bacteriana *Escherichia Coli DH5α*, con genotipo: $\phi 80dlacZ\Delta M15$, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *supE44*, *relA1*, *deoR*, $\Delta(lacZYA-argF)$ U169, *phoA*.

M.1.10.a.-Medios de cultivo para *E. Coli*.

i) Medio líquido LB (*Luria-Bertani*):

	[concentración]
NaCl	10 gr/l
Triptona	10 gr/l
Extracto de levadura	5 gr/l

ii) Medio sólido LA (LB-Agar):

Agar bacteriológico	15 gr/l de LB
---------------------	---------------

ii) Placas LA-Amp-IPTG-Xgal

	[concentración]
Ampicilina	100 µg/ml
IPTG	150 µg/ml
Xgal	40 µg/ml

M.2.- Soluciones y Tampones de Trabajo:

M.2.1.- Tampones de electroforesis.

M.2.1.a.- Tris-Borato TBE de Ambion (10x) para 1 litro de agua:

1x	[concentración]
Tris-Borato	89 mM
Na ₂ EDTA	2 mM

M.2.1.b.- Tris-Acetato TAE de Ambion (25x) para 1 litro de agua:

1x	[concentración]
Tris-Acetato	40 mM
Na ₂ EDTA	1 mM

M.2.1.c.- Tampón nativo (10x):

1x	[concentración]
Tris-Acetato	500 mM
Ac ₂ Mg	100 mM

M.2.1.d.- Tampón TMN (5x):

1x	[concentración]
Tris-Acetato pH 7.6	100 mM
Ac ₂ Mg	50 mM
NaCl	500 mM

M2.1.e.- Tampón TSE (10x):

	[concentración]
Tris-HCl pH 7.5	0.5 M
NaCl	1 M
EDTA pH 7.5	10 mM

M2.2.- Tampones de carga en gel.

M.2.2.a.- Tampón de carga en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (1.5x):

	[concentración]
Formamida desionizada	97.5% (v/v)
EDTA pH 7.5	10 mM
Azul de bromofenol	0.03% (p/v)
Xilencianol	0.03% (p/v)

M.2.2.b.- Tampón de carga en geles nativos de poliacrilamida (1.5x):

	[concentración]
Glycerol	30% (v/v)
TMN 5x	20% (v/v)
ARNt levadura	4% (p/v)
Azul de bromofenol	0.03% (p/v)
Xilencianol	0.03% (p/v)

M.2.2.c.- Tampón de carga en geles nativos de agarosa (6x):

	[concentración]
Sacarosa	20% (p/v)
EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 8	50 mM
Azul de bromofenol	0.03% (p/v)
Xilencianol	0.03% (p/v)

M2.3.- Tampones de Elución**M2.3.a.- Tampón de Elución T1 (10x):**

	[concentración]
Tris-HCl pH 7.5	100 mM
EDTA pH 7.5	10 mM

M2.3.b. - Solución de acetato de sodio glicógeno:

	[concentración]
CH ₃ COONa pH 5.2	3 M
Glicógeno	0.2 µg/µl

M.2.3.c.- Solución de silicona al 4%

	[concentración]
Dimetil-diclorosilano	4% (v/v)
Cloroformo	99%

M.2.4.- Soluciones para la purificación de la actividad RNAsa P humana.**M.2.4.a.-Tampón Fosfato Salino: 1 tableta de PBS Sigma /200ml de agua bidestilada.**

	[concentración]
Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 7.4	10 mM
KCl	2.7 mM
NaCl	137 mM

M.2.4.b.-Tampón Purificación P humana NH₄Cl 10x:

	[concentración]
Tris-HCl pH 7	100 mM
MgCl ₂	150 mM
NH ₄ Cl	500 mM

M.2.4.c.-Tampón TKM:

	[concentración]
Tris-HCl pH 7	10 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	0.15 mM
Glicerol	10%

M.2.4.d.-Tampón Purificación P humana NH₄Cl 50mM:

	[concentración]
Tris-HCl pH 7	20 mM
NH ₄ Cl	50 mM
MgCl ₂	15 mM
Glicerol	10%

M.2.4.e.-Tampón para gradiente NH₄Cl 100mM:

	[concentración]
Tris-HCl pH 7	20mM
NH ₄ Cl	100mM
MgCl ₂	15mM
Glicerol	10%

M.2.4.f.-Tampón para gradiente NH₄Cl 350mM:

	[concentración]
Tris-HCl pH 7	20mM
NH ₄ Cl	350mM
MgCl ₂	15mM
Glicerol	10%

M.2.4.g.-Tampón para gradiente de glicerol 15%:

	[concentración]
Tris-HCl pH 8	50 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM
Glicerol	15%

M.2.4.h.-Tampón para gradiente de glicerol 25%:

	[concentración]
Tris-HCl pH 8	50 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM
Glicerol	25%

M.2.5.- Soluciones para la purificación de subunidades Ribosomales 40S de células HeLa.**M.2.5.a.- Solución de lisis celular sobre células HeLa:***i) Solución de lisis con detergente:*

	[concentración]
Tris-HCl pH 7,5	15 mM
NaCl	300 mM
MgCl ₂	6 mM
Triton-X100	1% (v/v)
Heparina	1 mg/mL

ii) Soluciones de lisis por osmosis:

Buffer Hipotónico	[concentración]
Hepes/KOH pH7.6	20 mM
DTT	1 mM
AcO ₂ Mg	1,5 mM
KCL	10 mM

Buffer Isotónico	[concentración]
Hepes/KOH pH7.6	35 mM
NaCl	146 mM
Glucosa	11 mM
+1/4 de pastilla de Inhibidores de proteasas	

Buffer S10	[concentración]
Hepes/KOH pH7.6	100 mM
DTT	25 mM
AcO ₂ Mg	20 mM
AcOK	600 mM
+1/4 de pastilla de Inhibidores de proteasas	

M2.5.b.- Soluciones de purificación de subunidades ribosomales 40S/60S de células HeLa.

	[concentración]
BUFFER A	Colchón de sacarosa
TRIS-CIH pH:7,5	20 mM
Ac ₂ Mg	6 mM
KCL	500 mM
SUCROSA	1 M
DTT	2 mM
BUFFER B	Solución de resuspensión
TRIS-CIH pH:7,5	20 mM
Ac ₂ Mg	6 mM
KCL	150 mM
SUCROSA	100 mM
DTT	2 mM
BUFFER C	Solución C de extracción
TRIS-CIH pH:7,5	20 mM
EDTA	0,2 mM
KCL	10 mM
MgCl ₂	1 mM
SUCROSA	1 M
DTT	1 mM

M.2.5.c.- Gradientes de sacarosa:

	[concentración]
Sacarosa	10-30%
Tris-HCl PH=7,4	20 mM
Ac ₂ Mg	6 mM
KCl	0,5 M
EDTA	0,1 mM
DTT	1 mM

M.2.6.-Tampones y soluciones de reacción.**M.2.6.a.-Tampón P humana 5x:**

	[concentración]
HEPES-KOH pH 7.5	50 mM
(CH ₃ COO) ₂ Mg	50 mM
CH ₃ COONH ₄	500 mM

M.2.6.b.- Tampón para la reacción de la RZ de cianobacteria *Synechocystis* 5x:

	[concentración]
Tris-HCl pH 7.5	250 mM
MgCl ₂	500 mM

M.2.6.c.- Tampón de reacción con ARNsa T1 en condiciones desnaturizantes 2x:

	[concentración]
Citrato sódico pH 4.5	20 mM
EDTA	1 mM
Urea	7 mM
Azul de bromofenol	0.03% (p/v)
Xilencianol	0.03% (p/v)

M.2.6.d.- Tampón TFB I y II:

TFB I	[concentración]
CIRb	100 mM
Cl ₂ Mn	50 mM
AcOK	30 mM
Glicerol	15%
TFB II	
MOPS pH 7.0	10 mM
CIRb	10 mM
Cl ₂ Ca	75 mM
Glicerol	15%

M.2.7.- Análisis Bioinformáticos.

La predicción de la estructura secundaria del ARN se ha llevado a cabo con la versión 3 del programa *mfold*, al que se puede acceder en el servidor *mfold*: <http://mfold.ARN.albany.edu/?q=mfold/ARN-Folding-form>. La alineación de secuencias se llevó a cabo empleando los programas informáticos on-line ClustalW2 en la dirección <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

M.2.8.- Secuenciación masiva de Roche:

Todas las muestras extraídas de cultivos, se secuenciaron por técnicas de secuenciación masiva, dentro del Proyecto CDTI entre el grupo de investigación CIBERHED, al que pertenece nuestro grupo “*ArqueARN*” y la compañía **ROCHE**.

Las muestras de los cultivos fueron aportadas por el Dr. Domingo Esteban del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid. Se trata de muestras de ARN de VHC extraídas de los sobrenadantes de los cultivos de células de línea Huh 7.5 cedidas por el Dr. C. Rice (*Rockefeller University NY*) en pase 0, en pase 4 y en pase 4 tratadas con ribavirina.

Se realizaron reacciones de retrotranscripción y posterior PCR-NESTED, para obtener los cADN, de las poblaciones de ARN virales de los cultivos. Se construyeron *primers* con marcadores M13 prescritos por ROCHE para la pirosecuenciación con sus equipos (M.8.4/5/6).

Las secuenciaciones masivas se realizaron con el equipo GS-FLX de PCR emulsión polimerasa proporcionado por Roche, en el Instituto de Investigación de enfermedades Hepáticas del Val de Hebrón de Barcelona, gracias a la colaboración de su director el Dr. Ignacio Esteban y el Dr. Josep Quer.

M.3.- Métodos:

M.3.1.- Cultivo bacteriano.

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo, se cultivaron en medio líquido y en medio sólido. Los cultivos en medio líquido se realizaron en LB (apartado M.1.10.a) suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml, cuando ha sido requerido. Los inóculos se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante un tiempo aproximado comprendido entre las 12 y 16 horas. Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas Petri de LB-agar (apartado M.1.10.a) suplementadas con ampicilina a una concentración 100 µg/ml, IPTG a 150100 µg/ml y Xgal a 40 µg/ml. Una vez sembradas las bacterias se incubaron durante 12-16 horas en cámara termostatzada a 37°C.

M.3.2.- Crio-conservación de bacterias.

Tras crecer aproximadamente de 12-16 horas en medio LB líquido (O/N), el cultivo de bacterias fue congelado a -80°C en crioviales de 2 ml con glicerol al 30%. El stock se conservó a -80° hasta su uso.

M.3.3.- Transformación de *E. coli* con plásmidos recombinantes.

La incorporación de plásmidos recombinantes en la cepa bacteriana *E. coli* DH5α ElectroMAX™ de Invitrogen, se efectuó mediante dos técnicas, de electroporación y de choque térmico:

A partir de una colonia de *E. coli* cepa DH5α, ElectroMAX™ de Invitrogen, aislada mediante la técnica de agotamiento en placa, se inocularon en 25 ml de LB y dejaron crecer en agitación (1600 rpm) a 37°C (O/N) durante 12-16 horas. Se inocular 20 ml de este cultivo iniciador en 1 litro de LB y dejó crecer a 37°C en agitación hasta que el cultivo alcance un valor de densidad óptica O.D₆₀₀ medido a 600 nm de 0.6 unidades (aproximadamente 3 horas).

M.3.3.a.-Preparación de células electro competentes.

Se colocaron las células en hielo durante 15-25 min. Se reparten en botellas de polipropileno (Beckman Coulter) para centrifuga, de 250 ml de capacidad, y atemperan en hielo. Se centrifugan las células a 4 °C y 4000 g durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante, y se resuspende el pellet con cuidado y se lavan las células con 250 ml de agua a 4°C. Centrifugar de nuevo a 4°C y 4000g durante 10 minutos. Repetir un segundo lavado con 250 ml agua a 4°C y centrifugar de nuevo a 4000 g durante 10 minutos a 4°C. Se resuspende el pellet con cuidado y se lavan las células con 250 ml de glicerol al 10% a 4°C. Se centrifuga una vez a 4°C y a más de 4000g durante 10 minutos. Se resuspende el pellet resultante en 1 ml de agua con glicerol al 10% y se hacen alícuotas de 50µl que se congelan en un baño de nieve carbónica-etanol. Las alícuotas se almacenan a -80°C hasta su utilización.

M.3.3.b.-Preparación de células competentes para choque térmico.

Se centrifugan 300 ml de cultivo celular en seis *falcom* de polipropileno (Beckman Coulter) para centrifuga a 4 °C y 4300g durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante, y resuspende cada pellet con cuidado en 2 ml de buffer TFB I. Se reúnen los 12 mL en un solo falcom y se lavan todos con 1 ml de TFB I y se reúnen. Se incuban 10 minutos en hielo a 4°C. Centrifugar de nuevo a 4°C y 4300g durante 10 minutos. Se elimina muy bien el sobrenadante, y se resuspende el pellet de células en 6ml de Buffer TFB II. Se alícuota en 100µl por eppendorf y congelan en nitrógeno líquido. Las alícuotas se almacenan a -80°C hasta su utilización.

M.3.3.c.-Electroporación:

Se eliminan las sales de la solución antes de aplicar el pulso de corriente eléctrica, realizando una micro diálisis de 10-20µl de la solución plasmídicas, empleando discos de membrana de 0.025µm (VSWP-Millipore) sobre agua destilada durante 30 minutos.

- i) Se añaden 5µl del producto de ligación plasmídico dializado sobre 50µl de células electrocompetentes (apartado M.1.10), previamente descongeladas en hielo. Se mezclan bien por pipeteo evitando la formación de burbujas.
- ii) Se transfiere la muestra a una cubeta de electroporación *Gebe Pulser® Cuvette* de 0.2cm (Bio-Rad) atemperada previamente en hielo. Inmediatamente aplicar un pulso eléctrico sencillo de una duración de 5-6 milisegundos a 2.5KV y 129 ohmios de resistencia en el dispositivo *BTX Electro Cell Manipulator® 600*. Se recuperamos inmediatamente las células lavando la cubeta con 1 ml de medio LB previamente atemperado a 37°C. Pasar la muestra a un tubo de cultivo.
- iii) Incubar en agitación (225rpm) a 37°C durante unos 45min a 1 hora. Tiempo necesario para que las bacterias expresen el gen de resistencia al antibiótico codificado por el plásmido. Sembrar en placa Petri con medio selectivo (LA-Ampicilina-IPTG-Xgal) un volumen comprendido entre 10-100µl del cultivo bacteriano. Incubar a 37°C durante unas 16 horas, período de tiempo tras el cual se observa la aparición de colonias blancas y azules.

M.3.3.d.- Transformación por Choque térmico:

Sin necesidad de diálisis previa, se toma una alícuota de células DH5α competentes a -80° y se descongelan en hielo. Añadir de 10 a 100 nanogramos del plásmido a introducir. Se ponen en hielo 30 minutos (agitando cada diez minutos para evitar que las células precipiten en el fondo). Se hace un choque de calor “*heat shock*” a 42° durante 2 minutos. Se vuelven a incubar en hielo 10 minutos. Se recuperan en 400 µl LB y se incuban 1 hora con agitación. Sembrar en placa con medio selectivo (LA-Ampicilina-IPTG-Xgal) un volumen entre 10-100µl del cultivo bacteriano. Incubar a 37°C durante 16 horas, tras el cual se observa la aparición de colonias blancas y azules.

M.3.3.e.- Elección de colonias recombinantes de *E. coli*:

Las bacterias transformadas fueron seleccionadas debido a la resistencia al antibiótico Ampicilina conferida por el plásmido. Las colonias recombinantes se identificaron en función de su coloración, lo cual depende de la expresión diferencial del gen de la β -galactosidasa. La cepa bacteriana DH5 α y los plásmidos empleados en el transcurso de este trabajo experimental, es defectiva para la síntesis de β -galactosidasa, debido a la deleción del gen que codifica para su péptido α . Los plásmidos que portan este gen restauran la expresión en las células transformadas mediante un fenómeno de complementación genética. Así, en presencia del sustrato cromogénico X-gal y del IPTG como agente inductor del Operón-*lac*, las células transformadas expresan β -galactosidasa y procesan el X-gal, generando un compuesto insoluble de color azul. El sitio de clonación múltiple en este tipo de plásmidos se sitúa dentro del marco abierto de lectura del gen del péptido α , por lo que en los plásmidos recombinantes que contienen un inserto, la pauta de lectura del gen *lacZ* se encuentra alterada; no se produce alfa complementación, no se expresa β -galactosidasa, y por tanto las colonias crecen con su habitual color blanco. Para este tipo de selección las células transformadas se sembraron en medio LA conteniendo ampicilina 100 μ g/ml, X-gal 40 μ g/ml e IPTG 150 μ g/ml.

M.3.4.- Extracción de ADN plasmídico.

Los plásmidos empleados durante el desarrollo del trabajo experimental fueron extraídos de la cepa bacteriana correspondiente mediante mini preparación utilizando el kit Wizard®Plus SV Minipreps Purification System (Promega) siguiendo las instrucciones y protocolos aportados por el fabricante.

M.3.5.- Secuenciación de ADN.

La secuenciación de las muestras de ADN fue llevada a cabo por el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” de Granada. Se realizó mediante el procedimiento de secuenciación cíclica utilizando la química BigDye Terminator v3.1 y electroforesis en sistema de capilar múltiple automático. El equipo utilizado fue el secuenciador 3130XL-Genetic Analyzer de Applied Biosystems.

M.3.6.- Síntesis de ácidos nucleicos:**M.3.6.a.- Síntesis química de oligonucleótidos:**

Todos los oligodesoxirribonucleótidos sintéticos que se han utilizado en nuestro trabajo fueron sintetizados por el servicio de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” de Granada. Se empleó el sintetizador 3400 Synthesizer de Applied Biosystems, y purificación posterior de los productos por HPLC.

M.3.6.b.- Cuantificación de ácidos nucleicos.

La cuantificación de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante espectrofotometría. La concentración de los ácidos nucleicos en solución fue determinada utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Nucliber).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

i.PCR en condiciones estándar: Las reacciones de amplificación de ADN mediante PCR se llevaron a cabo generalmente en un volumen de reacción de 100 µl. En la mezcla de reacción se incluyó 10-50 ng de ADN molde, 1.5U de la enzima ADN polimerasa AmpliTaq® Gold (*Applied Biosystems*) en el tampón de reacción suministrado por la casa comercial *PCR Buffer II 1X* (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl), 1.5 mM de MgCl₂ (Roche), 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, y 20 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos que actúan como cebadores en la reacción. Se utilizó el termociclador iCycler (Bio-Rad). El protocolo estándar de amplificación del termociclador empleado fue el siguiente:

Ciclos	Temperatura-Etapa	Tiempo
1 ciclo	95° C - Comienzo en caliente	10 min
25-30 ciclos	94° C - Desnaturalización	45 seg
	TM -2° C - Anillamiento	45 seg
	72° C - Extensión	1 min
1 ciclo	72° C - Extensión final	10 min
1 ciclo	4° C	∞

No obstante el número de ciclos de desnaturalización, anillamiento y extensión, la temperatura de hibridación de los cebadores (TM-2°C), y los tiempos de anillamiento y extensión, fueron optimizados según las condiciones concretas para cada reacción en base al resultado obtenido. Tras la comprobación visual del resultado de la reacción de PCR en gel de agarosa TAE 1X teñido con bromuro de ethidio, los productos fueron purificados utilizando el kit *High Pure PCR* (*Roche-Applied Science*), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

ii.PCR en condiciones mutagénicas (Martinez, Vartanian et al. 1994): Las reacciones de amplificación de ADN mediante PCR mutagénica, empleadas para la obtención de poblaciones con mutaciones aleatorias en ratio creciente, se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 100 µl. En la mezcla de reacción se incluyó 10-50ng de ADN molde, 1.5U de la enzima ADN polimerasa AmpliTaq® Gold (*Applied Biosystems*) en el tampón de reacción suministrado por la casa comercial, *PCR Buffer II 1X* (10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl), 1.5mM de MgCl₂ (Roche) y 0,5 mM en MnCl₂, así como cantidades desbalanceadas de los dNTPs, y 20 pmoles de cada uno de

los oligonucleótidos que actúan como cebadores en la reacción. Se utilizó el termociclador iCycler (Bio-Rad).

1x	[Concentración]
ADN molde	50ng
Buffer 5x	1x
MgCl ₂ 25 mM	2,5 mM
MnCl ₂ 5 mM	0,5 mM
primer 5' sense	0,4 μM
primer 3' antisense	0,4 μM
Taq Promega	2,5 U

Cantidades desbalanceadas de los dNTPs:

	HM 180 nM	HM 240 nM	HM 300 nM	HM 1M
10x	Conc. final	Conc. final	Conc. final	Conc. final
dATP	1,8 mM	2,4 mM	3 mM	10 mM
dCTP	1,8 mM	2,4 mM	3 mM	10 mM
dTTP	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
dGTP	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM

El protocolo estándar de amplificación del termociclador empleado fue el siguiente:

Ciclos	Temperatura-Etapa	Tiempo
1 ciclo	95° C - Comienzo en caliente	10 min
50 ciclos	94° C - Desnaturalización	30 seg
	TM -2° C - Anillamiento	30 seg
	72° C - Extensión	1 min
1 ciclo	72° C - Extensión final	10 min
1 ciclo	4° C	∞

M.3.7.- Purificación de ácidos nucleicos.

La purificación de los ácidos nucleicos ha sido realizada metodológicamente por extracción fenólica y precipitación con etanol son técnicas ampliamente utilizadas para la eliminación de proteínas presentes en las mezclas de reacción, y para cambio de tampón.

M.3.7.a.- Extracción fenólica.

Las muestras se llevaron a un volumen final de 50-100 µl con agua estéril (Braun Medical). Se agregó un volumen igual de fenol saturado en cloroformo y alcohol isoamílico (Invitrogen), en el caso de tratarse de moléculas de ADN, o fenol saturado en agua (Invitrogen), para el caso de moléculas de ARN. Las dos fases se mezclaron vigorosamente mediante agitación con vortex durante 1min, y fueron nuevamente separadas por centrifugación a 12000 g, durante 4 min a temperatura ambiente. Se rescató la fase acuosa y se pasó a un tubo limpio. Seguidamente se realizaron dos lavados consecutivos de la fase orgánica con otros 50-100 µl de agua estéril.

M.3.7.b.- Precipitación con etanol.

Las fases acuosas resultantes se precipitaron añadiendo: un 10% de acetato sódico 3 M pH 5.2 con 0.2 µg/µl de glicógeno, y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (Merck). La mezcla se mantuvo durante 30-60min a -20°C, en algunas ocasiones 1 hora a -80°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 10000 rcf durante 1 hora. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se secó por centrifugación a vacío durante 5 min. El sedimento fue resuspendido en un volumen apropiado de agua estéril.

M.3.8.- Síntesis de ARN. Transcripciones *in vitro*.

M.3.8.a.- Transcripción estándar *in vitro*.

La reacción estándar de transcripción empleada en el transcurso de este trabajo, se llevó a cabo con la T7 ARN Polimerasa de Promega, en un volumen final de reacción de 25 µl. La mezcla de reacción incluye 1-2 µg de ADN molde, 1.4U/µl de T7 ARN polimerasa (Promega) en el tampón de reacción suministrado por la casa comercial 1x (40 mM Tris-HCl pH 7.9, 6 mM MgCl₂, 2 mM espermidina, 10 mM NaCl), 0.4 mM de cada uno de los rNTPs (Promega), 4 mM DTT (Promega), y 20U de ARNsin®Plus (Promega). La reacción fue incubada durante un tiempo comprendido entre 1-4 horas a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo el ADN molde fue eliminado incubando la reacción de transcripción durante 20 minutos a 37°C en presencia de DNAsa RQ1 (Promega). Se empleó 1U de DNAsa por cada microgramo de ADN molde utilizado en la reacción de transcripción.

M.3.8.b.- Transcripción con kit comercial. (Megatranscripciones)

En los casos concretos en los que se precisó la síntesis de cantidades elevadas de ARN se hizo uso del kit MEGAscript®T7 de (Ambion). La reacción se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

M.3.8.c.- Purificación de los productos de transcripción.

Salvo cuando empleamos el kit comercial MEGAscript®T7 (Ambion), el cuyo caso la purificación se efectuó usando las columnas comerciales MEGAclean (Ambion),

el resto de productos de transcripción fue purificado siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- i) **Extracción fenólica:** tras la reacción de digestión con RQ1-ADNsa añadimos 975 μ l de TSE 1X y 500 μ l de fenol saturado en agua (Invitrogen) en tubos eppendorf siliconizados de 2ml. Agitamos en vortex durante 1min y posteriormente centrifugar a 11000 rpm, a temperatura ambiente durante 4 minutos. Recogemos la fase acuosa e incorporar 1 volumen de etanol frío (1 ml). Mezclar bien.
- ii) **Fraccionamiento en columnas de CF-11:** La purificación a través de columnas de celulosa fosfato CF-11 (Whatman) permite eliminar sales, nucleótidos no incorporados en la reacción y seleccionar para su elución exclusivamente el ARN de simple cadena:

Preparación y equilibrado de las columnas: en una jeringa de vidrio de 1 ml (RUTHE-Normax) introducimos 3 capas de lana de vidrio siliconizada y horneada. Fijamos la jeringa sobre un soporte y añadimos resina CF-11 (Whatman) convenientemente preparada, hasta alcanzar un lecho de fase estacionaria de unos 0.2 ml. Dejar compactar por decantación durante 15 min evitando que se seque. Transcurrido este tiempo la columna se equilibra dejando pasar en este orden: 1ml de TSE 1X, 1 ml de agua, y 3 ml de TSE-1X: EtOH (v/v), previamente desgasificados a vacío durante 20 min.

Elución del ARN y precipitación:

- a) Se pasan los 2ml de muestra de uno en uno e ir recogiendo fracciones de 1ml en eppendorf normales.
- b) Se lava la columna con 3ml de TSE-1x: EtOH y recogen los 3 ml en otros 3 tubos eppendorf normales.
- c) Se eluye el transcrito con 2ml de agua en dos tubos eppendorf de plástico siliconizado. Cuando se hayan recogido las 7 fracciones de la columna, para el caso de las moléculas de ARN marcadas radiactivamente con ^{32}P , chequeamos los tubos con un contador Geiger-Müller. Una elución correcta implica el siguiente orden de recuperación del material radiactivo medido en cuentas por segundo (CPS): la obtención de la mayor cantidad de CPS (>2000 cuentas) en los dos primeros mililitros de elución (lo que corresponde a nucleótidos radiactivos no incorporados), un descenso acusado durante los lavados, con un mínimo de CPS en el quinto mililitro de elución (<100 cuentas). Finalmente el número de CPS debe ascender de forma acusada en el sexto y séptimo tubo, lo cual corresponde a la molécula de ARN marcada y eluída en agua (>2000 cuentas).
- d) Pasar los dos últimos mililitros (sexto y séptimo tubo), que corresponden al ARN eluído en agua, a un tubo COREX siliconizado (3%) donde se precipitará el ARN añadiendo un 10% de su volumen de acetato sódico 3M pH 5.2 con glicógeno a 0.2 μ gr/ μ l, y 2.5 volúmenes de etanol frío. Mezclamos bien y dejamos O/N una noche a

-20°C ó 1 hora a - 80°C. Centrifugamos a 4°C durante 90 min a una velocidad de 10000rcf. Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado de ARN en un frasco secador conectado a vacío durante 5-10 minutos. Resuspendemos el precipitado en 10µl de agua y 20µl de tampón desnaturante de carga en geles de acrilamida, mediante agitación en vortex durante 10 minutos.

iii) ***Purificación en gel de poliacrilamida desnaturante:***

La muestra de transcripción resuspendida en agua y tampón de carga desnaturante se carga en un gel acrilamida 7M urea de 0.4mm de grosor. La mayoría de fragmentos de ARN purificados fueron marcados radiactivamente, sin embargo para aquellos casos en los cuales se purificó ARN frío, se empleó como guía el mismo fragmento de ARN marcado radiactivamente. Las bandas se visualizaron por autoradiografía y se escindieron del gel siguiendo el protocolo detallado a continuación:

a) Terminada la electroforesis, el gel retirando una sola placa de vidrio, se cubre la superficie del gel con film transparente y fija con cinta adhesiva los bordes. Hacer unas etiquetas fluorescentes que repartimos por los márgenes del gel, con flechas que indiquen el fondo de los pocillos y la migración de los colorantes.

b) Exponemos el gel con 2 películas de doble emulsión Super RX (FUJIFILM) superpuestas dentro de un casete durante el tiempo necesario para su observación (5-10 minutos). Revelamos las películas de autoradiografía.

c) Enmarcar con un rotulador las bandas que interesa recortar. Cortamos el trozo de película para dejar una ventana. Solapamos la película con el gel original haciendo uso de las etiquetas. Recortar las bandas de acrilamida usando un bisturí estéril. Las bandas de acrilamida se sumergen en 2ml de tampón T1-1x en un tubo COREX (para depositarlas dentro del líquido se emplean espátulas horneadas). Los tubos se dejan en agitación toda una noche a temperatura ambiente.

d) Sacamos los 2ml de tampón T1-1x, que contienen el ARN eluído de las bandas de acrilamida, utilizando una pipeta Pasteur de vidrio estirada y siliconizada. Precipitamos en tubo COREX añadiendo un 10% de su volumen de AcONa 3M pH 5 con glicógeno a 0.2µgr/µl, y 2.5 volúmenes de EtOH frío. Mezclamos bien y dejamos 1 noche a -20°C o 1 hora a - 80°C. Centrifugamos a 4°C durante 90min a una velocidad de 10000rcf. Eliminamos el sobrenadante y secamos el precipitado de ARN en un frasco secador conectado a vacío durante 5-10 minutos. Resuspendemos el precipitado en 20µl de agua y guardar a -20°C hasta su posterior utilización.

M.3.9.- Técnicas de marcaje radiactivo del ARN.

M.3.9.a.-Marcaje interno.

El marcaje a lo largo de toda la cadena de ARN se realizó mediante la incorporación de 40 μ Ci (4 μ l) del isótopo radiactivo GTP [α -³²P], a la mezcla de reacción para la transcripción estándar. El producto de transcripción se purifica según se detalla en el apartado anterior.

Cuantificación del ARN marcado internamente con GTP [α -³²P] en solución.

La concentración de los transcritos radiactivos marcados inteARNmente con GTP [α -³²P] se determinó calculando la cantidad de isótopo radiactivo incorporado en la reacción, en base a las medidas en CPM (cuentas por minuto) obtenidas en el contador de radioisótopos *Quick Count 2000 (Bioscan)*. Para ello se aplicó la siguiente fórmula matemática:

$$\frac{\frac{\mu\text{gr rNTPs}}{\mu\text{l}} \text{GTP}[\alpha^{-32}\text{P}] \times \mu\text{l GTP}[\alpha^{-32}\text{P}]}{\text{CPM}} = \frac{\mu\text{gr transcrito}}{\frac{\text{CPM}}{\mu\text{l}} \text{transcrito}}$$

Donde la primera parte de la ecuación corresponde a la cantidad en microgramos de ribonucleótidos no radiactivos agregados a la reacción de transcripción, y el valor en CPM/ μ l del GTP [α -³²P] incorporado en la reacción de transcripción. La segunda parte de la ecuación corresponde a los datos del transcrito sintetizado *in vitro*: el valor en microgramos del transcrito sintetizado (incógnita a despejar), y el valor en CPM/ μ l obtenido para dicho transcrito.

M.3.9.b.- Transcripción preparativa marcada inteARNmente con baja actividad específica.

Cuando fue necesaria la síntesis a mayor escala de transcritos marcados inteARNmente con una baja actividad específica. En estos casos la reacción se escaló 40 veces con respecto a la transcripción estándar, excepto en lo que se refiere a la cantidad de isótopo radiactivo añadido en la reacción. La transcripción se realizó en un volumen final de 1ml, compuesto por 40 μ g de ADN molde, 1.4 U/ μ l de T7 ARN polimerasa (Promega) en el tampón de reacción suministrado por la casa comercial 1X (40 mM Tris-HCl pH 7.9, 6 mM MgCl₂, 2 mM espermidina, 10 mM NaCl), 0.4mM de cada uno de los rNTPs (Promega), 4 mM DTT (Promega), 0.8 U/ μ l de ARNsin®Plus (Promega), y 100 μ Ci (10 μ l) de GTP[α -³²P]. La reacción fue incubada durante un tiempo comprendido entre 1-4 horas a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo el ADN molde fue eliminado incubando la reacción de transcripción durante 15 minutos a 37°C en presencia de DNAsa RQ1 (Promega). Se empleó 1U de DNAsa por cada microgramo de ADN molde utilizado en la reacción de transcripción.

La purificación se realizó escalando el protocolo detallado previamente (M.3.8.c); se emplearon jeringas de plástico estériles de 5 ml, el número de fracciones recogidas durante la elución en columnas de CF-11 fue 4 veces mayor.

M.3.9.c.- Marcaje en el extremo 5':

i) Marcaje en 5' de ARNs largos durante la transcripción. El marcaje de ARNs largos en su extremo 5' se realizó mediante la incorporación de 90 μCi (9 μl) del isótopo radiactivo GTP [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] a la mezcla de reacción de transcripción estándar, acompañado de una disminución en la concentración de rGTP (0.1 mM) dentro de la mezcla de rNTPs. El producto de transcripción se purifica según se detalla en el apartado (M.3.8.c).

ii) Marcaje en 5' de oligonucleótidos de ADN o ARN. Los oligonucleótidos de ADN o ARN procedentes de síntesis automática no contienen fosfato en 5' por lo que es innecesaria su desfosforilación previa. La reacción de fosforilación se realizó en un volumen final de 10 μl , conteniendo entre 10-50 pmoles de oligonucleótido a marcar, 1U/ μl de T4 polinucleótido quinasa (NEB) en el tampón suministrado por la casa comercial 1x (70 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl_2 , y 5 mM DTT), y 20 μCi (2 μl) del isótopo ATP [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]. La reacción se incubó durante 1 hora a 37°C, después se inactivó el enzima por calor tratando la mezcla 20 min a 65°C. La purificación de las moléculas marcadas se realizó según se detalla en el apartado (M.3.8.c), o mediante una extracción con fenol seguida de una precipitación con etanol, en el caso de que la finalidad fuese conservar la mayor cantidad posible de molécula marcada.

M.3.9.d.-Marcaje en el extremo 3':

La reacción de marcaje del ARN en su extremo 3' se realizó en un volumen final de 10 μl , mediante incorporación de 20-30 μCi (2-3 μl) de isótopo radiactivo pCp[5'- ^{32}P] en una mezcla de reacción que incluye 2-3 μg de ARN (MEGAscript®T7), 2 U/ μl de T4 ARN ligasa (Promega) en el tampón de reacción suministrado por la casa comercial 1X (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, y 1 mM ATP), 2 U/ μl de ARNsin®Plus (Promega), 0.01% BSA, y 1% PEG. La reacción se mantiene durante 4 días a 4°C, tras el cual se sometió a tratamiento con proteinasa K y posterior precipitación con etanol (M.3.7.b). Después se llevó a un volumen final de 100 μl con agua, se añadieron 900 μl de TSE 1X y 1000 μl de etanol y se sometió al mismo protocolo de purificación empleado para una transcripción estándar (M.3.8.c).

M.4. Técnicas separativas: Electroforesis de ácidos nucleicos.

M.4.1.- Electroforesis en geles de agarosa.

Los geles de agarosa se prepararon al 0.8-2% (p/v) (Promega) en tampón TAE 1x. Las muestras se cargaron en presencia de tampón de carga no desnaturizante 1x para geles de agarosa. La electroforesis se desarrolló en tampón TAE 1x a un voltaje comprendido entre 80-150V. Los geles fueron teñidos una vez finalizada la electroforesis con una solución de bromuro de etidio en agua a una concentración de 0.5µg/ml, desteñidos y visualizados en un transiluminador convencional con luz ultravioleta.

M.4.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes:

Para su elaboración se utilizó una solución de poliacrilamida al 40% compuesta por acrilamida: bisacrilamida en una proporción 19:1 (Sigma/National Diagnostics). Los geles se prepararon entre el 4 y el 10% de poliacrilamida (p/v), en TBE 1x ó 0.5x y 7M de urea. El porcentaje del gel fue determinado en función del tamaño del fragmento sujeto a estudio. Como iniciadores de la reacción de polimerización se emplearon una solución de persulfato de amonio al 0.08% (p/v) (Sigma) y TEMED al 0.08% (v/v) (Sigma). Las muestras se prepararon en tampón de carga desnaturizante 1x. La electroforesis se desarrolló en tampón TBE 1x, ó 0.5x a 25-35 mA aproximadamente, durante un tiempo variable en función de la longitud del ARN analizado y la capacidad resolutive del gel.

M.4.3.- Electroforesis en geles de poliacrilamida nativos:

Los geles de acrilamida nativos se obtuvieron empleando la misma solución de acrilamida: bisacrilamida que para las condiciones desnaturizantes, aunque disuelta en tampón nativo 1x (M.2.1.c). No se añadió urea. El porcentaje de acrilamida empleado estuvo comprendido entre el 4-10% (p/v). Como catalizadores de la reacción de polimerización se utilizaron persulfato de amonio y TEMED, tal y como se describe en el apartado anterior. Tras la reacción de asociación las muestras se prepararon en tampón de carga no desnaturizante 1x, y fueron conservadas en hielo hasta su posterior carga en gel. Antes de cargar las muestras se realizó una pre-electroforesis de 30min con una intensidad de corriente de 8-12 mA. La electroforesis se desarrolló en tampón nativo 1x, a 4°C en cámara termostatazada, manteniendo un amperaje constante de entre 8 y 12 mA, y un tiempo de carrera de entre 10 a 16 horas.

M.4.4.- Visualización por Autorradiografía:

Los productos de reacción, que requirieron su separación tras los experimentos, y que finalizan con electroforesis el gel de poliacrilamida, para el caso de moléculas marcadas con P³², fueron visualizados por autorradiografía. Los geles de acrilamida se expusieron dentro de un casete BioMax (Kodak) con pantalla intensificadora BioMax MS (Kodak) en presencia de una película de doble emulsión Super-RX (FUJIFILM).

Los casetes se almacenaron a -80°C el tiempo necesario para la observación de los resultados. Las películas de radiografía fueron reveladas en un revelador Curix 60 (Agfa). Los geles fueron secados sobre papel Whatman a 80°C en condiciones de vacío cuando fue necesaria la cuantificación de los resultados. En estos casos los geles secos se expusieron en un casete Storage Phosphor Screen (GE Healthcare) y se visualizaron usando el escáner Typhoon 9400 (Amersham Biosciences).

M.5.- Extracciones de actividad RNAsa P de células HeLa:

M.5.1.- Purificación parcial de RNAsa P humana.

La actividad RNAsa P humana fue purificada a partir de 30g de células HeLa según el protocolo de Bartkiewicz (Bartkiewicz, Gold et al. 1989) con algunas modificaciones (Nadal, Robertson et al. 2003) referidas al método de seguimiento de la ribonucleoproteína y a la obtención del homogeneizado celular.

M.5.1.a - Preparación de la fracción subcelular S20:

La compañía belga Cilbiotech suministró un volumen comprendido entre 3-4 litros de medio de cultivo líquido (10^6 células/ml) con el equivalente a 30 gr en peso (3-4 litros) de células HeLa frescas. En el momento de su recepción, al inicio del proceso de purificación, la viabilidad celular debe ser del 95% aproximadamente; razón por la cual se realiza una comprobación mediante tinción con un colorante vital (azul tripan al 0.4%) y recuento en cámara de Neubauer. Para mantener la viabilidad durante todo el proceso de manipulación las células han de mantenerse a 4°C .

- a) Dividir el volumen de cultivo de células recibido en botellas de polipropileno para centrifuga de 250 ml de capacidad atemperadas en hielo. Centrifugamos a 1200 rpm y 4°C , durante 6 minutos. Retiramos el medio de cultivo por decantación.
- b) Resuspender los precipitados en 10 ml de PBS frío y unir de forma que queden dos botellas de células con 40-50 ml de PBS cada una. Centrifugar a 1200 rpm y 4°C durante 6 minutos. Retirar el sobrenadante. Esto constituye el primero lavado en PBS.
- c) Resuspender los precipitados de células en 30 ml de PBS frío, transferir a dos tubos tipo falcons de 50 ml atemperados en hielo. Realizar dos lavados adicionales en PBS centrifugando a 1200 rpm y 4°C durante 6 minutos.
- d) Después del tercer lavado con PBS retirar el sobrenadante y añadir 30 ml de TKM frío a cada uno de los falcons. Centrifugamos a 1200 rpm y 4°C , durante 6 minutos. Retiramos el sobrenadante. Este es el primer lavado en TKM. Realizamos un segundo lavado con TKM en las mismas condiciones. El TKM es un medio con baja sal que hace que las células capten agua por osmosis.
- e) Tras el segundo lavado con TKM, retirar el sobrenadante y resuspender el precipitado llevando la muestra a un volumen final de 100 ml empleando TKM frío. Añadir 2 pastillas de *Coctel Complete EDTA free* (ROCHE) disueltas en 2 ml de

TKM. Este reactivo contiene una mezcla de inhibidores de proteasas. Incorporamos también 100 μ l de DTT 1M.

- f) Pasar la muestra por la prensa francesa (Thermo Electron Corporation) utilizando el émbolo “Manual Fill 40K cell” con capacidad para 35 ml. Aplicar una presión de 2000 psi y realizar dos pases por cada 35 ml de muestra, siguiendo las indicaciones de manejo del equipo para garantizar la ruptura homogénea del preparado celular. La presión aplicada se estableció tras un proceso de optimización a partir de mini-preparaciones de extracto crudo con actividad RNAsa P.
- g) El homogeneizado celular obtenido en la prensa francesa es llevado a un volumen final de 120 ml con TKM frío. Dividir la muestra en 6 tubos de policarbonato transparentes con pared gruesa para ultracentrífuga (Beckman Coulter 082-355631). Centrifugamos a 20000g y 4°C durante 30 minutos en el rotor 70Ti (Beckman Coulter). Retirar la fracción S20 (citoplasma soluble) empleando pipetas *Pasteur* horneadas y siliconizadas. La fracción S20 es la fase intermedia transparente localizada entre la grasa superficial y los restos de membranas y núcleos depositados en el fondo del tubo.
- h) Ajustar la fracción S20 a un volumen final de 150 ml a concentración 20 mM Tris-HCl pH 7, 15 mM MgCl₂, y 50 mM NH₄Cl utilizando el tampón “Purificación P humana 10X NH₄Cl”.

M.5.1.b - Preparación de la columna y desarrollo de la cromatografía de intercambio aniónico.

La RNAsa P posee una carga mayoritariamente negativa debido a su componente de ARN, es por ello que se realiza una cromatografía de intercambio aniónico. La resina empleada es una combinación de sefarosa y agarosa sobre la cual los grupos químicos dimetil-aminoetil (DEAE) crean la carga positiva.

M.5.1.b.1 Preparación y empaquetamiento de la resina.

Con suficiente antelación debe prepararse la columna, de tal modo que se encuentre lista para ser cargada el mismo día en el cual se reciben las células. Antes de empaquetar la resina dentro de la columna lavar el dispositivo y las conducciones con una solución de NaOH 1N durante unos 30 minutos aproximadamente. aclarar con abundante agua bidestilada.

M.5.1.b.1.1 Tratamiento de la resina:

La resina se encuentra disuelta en etanol al 20% para evitar contaminaciones microbianas, por lo que precisa de una serie de lavados previos al empaquetamiento. Con tal fin mezclar 250 ml de DEAE-Sefarosa (Sigma) con 200 ml de tampón “purificación P humana NH₄Cl 50 mM”. Agitar suavemente en una probeta y dejar en decantación el tiempo necesario. Retirar el sobrenadante y realizar 4-5 lavados adicionales siguiendo el mismo procedimiento. Los lavados llevan mucho tiempo, ya que las bolitas de resina en buen estado tardan muchas horas en depositarse en el fondo del recipiente. Se aconseja dejar sedimentar la resina durante las noches y comenzar con

los lavados 3-4 días antes de la recepción de las células. Conservar la resina en todo momento a una temperatura de 4°C.

M.5.1.b.1.2 Empaquetado de la resina:

La resina se empaqueta dentro de una columna de cromatografía XK26 (GEH-Amersham) que cuenta con un sistema de doble cilindro. El cilindro externo actúa de camisa de refrigeración y está conectado con un baño refrigerado que mantiene la temperatura de la camisa a 4°C (Julabo F12ED). El volumen de cilindro interno es de 200 ml. Por otro lado la columna se conecta a una bomba peristáltica (Pharmacia Biotech Pump-P1).

- a) Para empaquetar la resina se agita suavemente en el tampón del último lavado y se vierte con ayuda de una pipeta serológica de forma continua y suave contra la pared del reservorio de empaquetamiento. Es muy importante que no se formen burbujas durante el proceso. Dejar una noche a 4°C para que la resina sedimente.
- b) Equilibrar la columna pasando un volumen (~160ml) de tampón “purificación P humana NH₄Cl 50 mM” desgasificado. Regular el flujo de la columna para que se ajuste a una velocidad de 1.7 ml/min. La columna queda en este punto a la espera de cargar la fracción S20.

M.5.1.b.2 Desarrollo de la cromatografía: fraccionamiento en gradiente de NH₄Cl.

- a) Cargar la fracción S20 en la columna (150 ml).
- b) Cuando haya terminado de entrar la muestra, lavar la columna durante toda la noche empleando 8 volúmenes de tampón “purificación P humana NH₄Cl 50 mM” (1200 ml). El flujo de la columna durante esta etapa se reduce a valores próximos a 0.8ml/min.
- c) Iniciar un gradiente lineal de NH₄Cl comprendido entre 100-350 mM, del cual se pasarán a través de la columna 500 ml. El gradiente se consigue conectando la columna a un formador de gradientes (*Gradient Mixer GM-1 Pharmacia*), que consiste en un sistema de vasos comunicantes con agitación.
- d) Recoger fracciones de 10 ml cada una usando un colector de fracciones (Pharmacia LKB-RediFrac). Guardar las fracciones del gradiente a 4°C a medida que se van recogiendo para su posterior análisis. Hacer un seguimiento de la concentración de proteínas mediante un espectrofotómetro de lectura continua acoplado al sistema (UVis-920 GE *Healthcare* con filtro de 280nm) y un registrador de datos (CR112-Millipore).

M.5.1.b.3.- Determinación de las fracciones positivas del gradiente de NH₄Cl.

De aproximadamente 50 fracciones recolectadas se escoge una de cada tres para realizar dos tipos de ensayos en paralelo: 1) un ensayo de actividad sobre un sustrato natural, y 2) una cuantificación relativa del componente de ARN RPR H1 (M.3.6.b). Con este doble seguimiento se pretende detectar la presencia de RNAsa P activa y

minimizar el número de alícuotas significativas para evitar otras actividades paralelas que copurificadas con la RNAsa P.

M.5.1.b.3.1- Ensayo de actividad sobre un sustrato natural.

Se emplea como sustrato natural el *pret-ARN^{tyr}* de *E. coli* (131nt) marcado internamente con GTP [α -³²P]; transcrito a partir del ADN plasmídico *p-UC19Tyr-Fok I* con antelación. La reacción se lleva a cabo según el protocolo de digestión estándar con RNAsa P humana (M.7.2.c.) con las siguientes modificaciones:

- i) Se ensayan 2 μ l de cada fracción cruda procedente del gradiente de cloruro de amonio.
- ii) La concentración del sustrato (*pre-ARN^{tyr}* de *E. Coli*), es de 1nM.
- iii) Transcurrido el tiempo de reacción se añade 1 μ l de fenol saturado en agua (Invitrogen) y se realiza una fenolización de los productos mediante pipeteo.
- iv) Antes de desnaturalizar y cargar en gel de poliacrilamida desnaturalizante, se añade 1 μ l de ARNt a 5 μ g/ μ l en cada tubo de reacción.

M.5.1.b.3.2- RT-PCR semicuantitativa para la RPR HI.

Preparación del sustrato para la reacción:

Tomar muestras de 100 μ l de cada una de las fracciones crudas del gradiente de cloruro de amonio que se pretenden analizar. Incorporar 100 μ l de agua a cada una de las muestras, mezclar y precipitar añadiendo un 10% de su volumen de acetato de sodio 3M pH 5 con glicógeno a 0.2 μ g/ μ l, y 2.5 volúmenes de etanol frío. Mantener 30 minutos a -20°C. Centrifugamos a 13200rcf durante 20 minutos a 4°C. Retiramos el sobrenadante y resuspendemos el precipitado en 10 μ l de agua. Utilizamos 2 μ l para cada reacción de retrotranscripción.

Retrotranscripción (RT):

Para la obtención del cADN se empleó el kit “*High Capacity cADN Reverse Transcription*” (Applied Biosystems). Como paso previo antes de incorporar la mayoría de componentes de reacción, la muestra preparada según el paso anterior se desnaturalizó en presencia de una mezcla aleatoria de hexámeros. Para ello se empleó un volumen de 10 μ l que contenía 2 μ l del extracto precipitado procedente del gradiente de cloruro de amonio, y 2 μ l de mezcla comercial de hexámeros 10x. Se calentó durante 2min a 95°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La reacción de retrotranscripción se realizó en un volumen final de 20 μ l; incluyendo los 10 μ l ya mencionados, el tampón suministrado por la casa comercial 1x, 4mM de cada uno de los dNTPs (mezcla del fabricante), 20U de ARNsin[®]Plus (Promega), y 50U del enzima retrotranscriptasa MultiScribe (Applied Biosystems). Se incubó durante 30min a 16°C, y durante otros 30min a 42°C. Finalmente se inactivó el enzima calentando 5 minutos a 85°C.

M.5.1.b.3.3 PCR semicuantitativa.

Para hacer la PCR a tiempo real se utilizó el kit *SsoFast Probes Supermix* (BIORAD). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 15 µl. En la mezcla de reacción se incluyó 1 µl del cADN molde obtenido en la reacción anterior, 40 nM de cada uno de los cebadores específicos para la RPR H1 (H1 213-226 (+), y H1 274-255 (-)), 3 pmoles de la sonda tipo *Taqman* H1-228, y 7.5 µl de la mezcla comercial *SsoFast Probes 1X* (BIORAD). Se empleó el termociclador *CFX96 Real Time System* (BIORAD). El programa de amplificación fue el siguiente:

Ciclos	Temperatura-Etapa	Tiempo
1 ciclo	98° C - Comienzo en caliente	10 seg
60 ciclos	98° C - Desnaturalización	5 seg
	52° C - Anillamiento	10 seg
	60° C - Extensión	10 seg

M.5.1.c.- Fraccionamiento en gradiente de glicerol.

En esta etapa del proceso de purificación se realiza un fraccionamiento por centrifugación en gradiente de glicerol. El glicerol posee la ventaja de contribuir a mantener la estructura de las proteínas evitando su desnaturalización.

M.5.1.c.1 Preparación de los gradientes de glicerol.

Preparar seis tubos para ultracentrífuga Ultraclear-14ml (Beckman Coulter) con un gradiente lineal de glicerol comprendido entre 15-25%. Para ello se emplean los tampones de glicerol al 15% y al 25%, un gradientómetro SG (Amersham Biosciences), un pequeño agitador magnético, y una placa agitadora. Con la ayuda de una bomba peristáltica (Pharmacia Biotech Pump-P1) depositar gota a gota de forma suave y ascendente la mezcla del gradiente, hasta completar un volumen de 11ml por tubo. Los gradientes deben hacerse con 24 horas de antelación y conservarse a 4°C.

M.5.1.c.2 Concentración de las fracciones positivas procedentes del gradiente de NH₄Cl.

Según los resultados obtenidos en los ensayos de actividad sobre sustrato natural y RT-PCR semicuantitativa, unir las fracciones positivas de forma consecutiva con objeto de concentrar la muestra empleando columnas de filtración Amicon Ultra-15 (Millipore), con un volumen de exclusión de 50K. Centrifugar a 4°C siguiendo las indicaciones del fabricante de forma tal que el volumen final del concentrado sea de 6ml aproximadamente.

M.5.1.c.3 Ultra centrifugación en gradientes de glicerol y fraccionamiento.

- a) Cargar con cuidado en la parte superior de cada uno de los gradientes de glicerol, 1ml de muestra concentrada. Equilibrar los tubos de la ultracentrifuga (rotor Beckman Coulter SW-40) y centrifugar a 35000 rpm y 4°C durante 23 horas. Preparar 30-40 tubos de vidrio numerados.
- b) Recoger las fracciones del gradiente de glicerol pinchando cada tubo en la base con una jeringa acoplada a un sistema de recolección de fracciones (Beckman coulter Ref. 343890) acoplado a una bomba peristáltica (Pharmacia Biotech Pump-P1). Recoger 8 gotas por cada tubo de vidrio horneado y siliconizado de forma consecutiva.
- c) Repetir la misma operación para cada uno de los gradientes de forma que se recojan sobre los mismos tubos las mismas fracciones. Se obtendrán 30-40 fracciones de 1.5-2 ml cada una.

M.5.1.d.- Determinación de las fracciones positivas procedentes del gradiente de glicerol.

Para determinar las fracciones que contienen actividad RNAsa P se debe realizar en paralelo dos pruebas:

1) Ensayos de actividad sobre *pre-ARNt^{tyr}* y ARN de VHC1-570, y

2) Cuantificación relativa por RT-PCR del componente de ARN (RPR H1). Las fracciones a analizar en esta ocasión corresponden a la mezcla de alícuotas de 1µl procedentes de 4 fracciones consecutivas del gradiente de glicerol.

M.5.1.d.1 Ensayos de actividad:

Además del *pre-ARNt^{tyr}* de *E. coli*, ensayar la actividad RNAsa P sobre el fragmento de ARN 1-570 de VHC marcado internamente con GTP [α -³²P]. El *pre-ARNt* es más resistente al posible efecto de las RNAsas contaminantes del extracto que el IRES de VHC, asimismo su patrón de corte se encuentra bien caracterizado. Las reacciones se llevan a cabo según el protocolo de digestión estándar con RNAsa P humana (M.7.2.c.) con las siguientes modificaciones:

- ✓ Se ensaya 1µl del sumatorio de alícuotas procedentes de 4 fracciones consecutivas del gradiente de glicerol.
- ✓ La concentración del sustrato, *pre-ARNt^{tyr}* de *E. coli* y VHC1-570, es de 1 nM.
- ✓ Transcurrido el tiempo de reacción se añade 1 µl de fenol saturado en agua (Invitrogen) y se realiza una fenolización de los productos mediante pipeteo. Antes de desnaturalizar y cargar en gel de poliacrilamida desnaturalizante se añade 1 µl de ARNt a 5 µg/µl en cada tubo de reacción.

M.5.1.d. 2 RT-PCR semicuantitativa para la RPR HI.

Se procedió según el protocolo detallado en el apartado 3.2 de esta sección. Como sustrato para la reacción de retrotranscripción se emplearon 2 µl del sumatorio de alícuotas procedentes de 4 fracciones consecutivas del gradiente de glicerol.

M.5.2.- Concentración y conservación de la Actividad RNAsa P.

- a) Se concentraron las fracciones positivas según los resultados de los ensayos anteriores. Emplear columnas de filtración Amicon Ultra-4 ml Ultracel (Millipore) con un volumen de exclusión de 50K. Centrifugar a 4°C siguiendo las indicaciones del fabricante de forma tal que el volumen final del concentrado sea de 100 µl aproximadamente.
- b) Se hicieron alícuotas de 10 µl en *ependorf* siliconizados convenientemente rotuladas. Guardadas a -80°C.

Realizar ensayos de actividad sobre *pre-ARNt^{tyr}* de *E. coli* y VHC1-570 individuales para cada serie de fracciones del extracto enriquecido en actividad RNAsa P. En esta ocasión los productos de digestión se someten a tratamiento con proteinasa K (M.8.2.) antes de su carga en gel de poliacrilamida desnaturalizante.

M.6.- Extracciones de Subunidades ribosomales de Células HeLa:

Protocolo modificado de Pestova et. Al (1996), Mol Cell Biol, 6859-6869.

Durante la puesta a punto de las técnicas de extracción y purificación de subunidades ribosomales de células HeLa, en el laboratorio de la profesora S. Thompson en la Universidad de Birmingham en Alabama (USA), se emplearon pellet de 1L de células Hela, comercial, que contenía aproximadamente unos 3gr de células y que se servían congelados. Una vez de vuelta a nuestro laboratorio, se puso a punto la propia producción y extracción de cultivos celulares de una línea de células HeLa.

M.6.1.- Cultivos celulares de línea HeLa:

Se cultivaron células HeLa para la extracción de las subunidades ribosomales utilizadas en este trabajo. Los cultivos se llevaron a cabo en medio de cultivo, de suero fetal bovino líquido suplementado con alta concentración de glucosa DMEM+FBS 10%, preparado en el servicio de cultivos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” de Granada. Las células se cultivaron y mantuvieron a una apropiada temperatura de 37°C y una mezcla de gases controlada de 5% CO₂ y 95% O₂ en un incubador celular. Las células crecieron de manera adherente sobre la superficie de los frascos de cultivo. Una vez sembradas las células se incubaron durante 24-48 horas en el incubador celular termostatzado a 37°C.

Las células en continua división durante el cultivo, se mantuvieron creciendo hasta ocupar toda el área disponible en los frascos (Flask T-25, T-75, T-175 de Becton and Dickinson), aproximadamente una confluencia superior al 90%.

- 1) En este punto se realizó pase de las células a un nuevo frasco para el mantenimiento del cultivo. Se trató así de evitar el agotamiento de los nutrientes del medio, la acumulación de células apoptóticas o necróticas, la inhibición de la división celular por estrés de contacto y la diferenciación celular promiscua provocada por los contactos intercelulares excesivos y la presión poblacional. También se trata de evitar la acumulación de productos metabólicos potencialmente tóxicos y células muertas, con la renovación de medio fresco.
- 2) Tratamiento con tripsina: la tripsinización nos permite en cultivos adherentes de células HeLa despegarlas de los flask. El tratamiento se hizo con la mínima cantidad de tripsina posible, apenas 0,5% respecto al medio, con una incubación de unos 2 minutos a 37° en el incubador y una neutralización rápida con medio fresco en proporción superior a 1/10 con la tripsina empleada.
- 3) El pase de las células: transferimos un pequeño número de células a un nuevo continente. Los cultivos se pasaron regularmente para evitar la senescencia asociada a una alta densidad celular prolongada.
- 4) Los cultivos se propagaron hasta alcanzar mayor número de flask y mayor cantidad de células y medio (500ml/12 flask).
- 5) Se concentraron y recogieron las células cultivadas tras al menos 3 pases y no más de 20 pases.
- 6) Se recogieron cada vez unos 12 flask T-175, que contenían en torno a 500ml de medio enriquecido y aproximadamente 3 gramos de células HeLa, levantadas con tripsina, concentradas y centrifugadas. Se mantuvieron a 4°C en hielo para su tratamiento.

M.6.2.- Lisis de las células HeLa:

M.6.2.a.- Lisado con Triton-x:

Lisamos el pellet de células HeLa con 15 mL de Buffer de Lisis (con Triton X100) por cada pellet. Mantenemos cada pellet de células por separado en sus *falcons* de recepción. Mezclamos bien, durante 5 a 10 minutos. Pasamos a tubos de centrifuga y balanceamos los pesos usando más buffer de lisis para centrifugar. Realizamos un aclarado del lisado, centrifugando durante 20 minutos a 4°C y 10.000 RPM, usando un rotor ss-34. Pasamos los sobrenadantes del aclarado del lisado a nuevos *falcons* en hielo. Y tiramos los pellet de las células.

M.6.2.b.- Lisado por ósmosis con soluciones.

Se partió de al menos $5 \cdot 10^7$ células en cultivo subconfluyente, correspondiente a unos 10-12 flask T-175 o lo que es lo mismo 400-500 ml de cultivo (2-3gr de pellet de células). Levantamos las células con tripsina (M.6.1.a.ii). Se inactivó la tripsina con medio DMEM+FBS 10%. Se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm para formar el pellet de células HeLa. El pellet celular se lava con 10 volúmenes de buffer isotónico. Se mezcla bien con la pipeta y se homogeneiza el pellet, unificado y siempre a 4°C

Es importante tener en cuenta que el volumen ha de ser referido siempre al volumen de pellet celular inicial. Medido con un *falcon* similar en paralelo donde pondremos el volumen de agua equivalente al pellet. Siempre se mantiene a 4°C.

Se centrifugan durante 5 minutos a 1500 rpm. Se resuspende el pellet en 1.5 volúmenes de buffer hipotónico, homogeneizando bien con la pipeta, e incuba a 4°C en hielo durante 20 minutos. Se rompen las células en un homogeneizador *Dounce* con 25 *Stokes*. Se suplementa el volumen del lisado con 0.2 volúmenes de buffer S10 (respecto del pellet original de células).

Se retiran los núcleos centrifugando a 10.000 g durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante y se mide en el nano-drop la concentración de proteínas que debe estar entre 35-50 mgr/ μ l, con un aspecto viscoso y lechoso. En este paso los lisados S10 están listos y se pueden congelar a -80°C (volumen final \sim 1.500 μ l).

M.6.3.- Extracción de los Ribosomas de células HeLa:

Se preparan tubos de centrifuga tipo 42 y se colocan en el fondo 3mL de solución colchón de sacarosa (buffer A). Con extremo cuidado se coloca gota a gota 1mL de buffer hipotónico sobre los tres anteriores. Siempre con un extremo cuidado para evitar que se mezclen, por tanto tratando de evitar que se disturben las soluciones. Entonces se continúa poniendo con similares precauciones, gota a gota, el aclarado de lisado del pellet sobre la solución de sacarosa (obtenido por cualquiera de los dos procedimientos descritos). Hasta los 12mL, por lo que cuando se termine el lisado completaremos con buffer hipotónico. Se emplea un tubo por pellet y se balancean (0.1g) antes de centrifugar. Se realiza un nuevo aclarado del lisado, centrifugando durante 4 horas a 4°C y 42.000 RPM, usando un rotor ss-34 *in sorvall*.

Después de centrifugar, se descarga el sobrenadante extrayéndolo por aspiración a vacío con una pipeta *Pasteur*, con cuidado de no tocar el pellet transparente que contiene los ribosomas. Se resuspenden los pellet de los ribosomas en 2mL de buffer B por cada pellet (en cada tubo), dejando la solución a 50-150 A260u/ml. La resuspensión ha de realizarse con la pipeta suavemente para evitar la aparición de burbujas, nunca vortexeando, y con mucho cuidado o aparecerán muchas burbujas. Se tratan con puromicina, para eliminar los ARNm de los ribosomas, 4 mM final de un stock de 100 mM, por tanto se ponen 80 μ L de Puromicina por cada 2 mL de solución resuspendida de los ribosomas. Se incuban a 4°C en hielo durante 10 minutos. Se transfiere a 37°C e incuban durante otros 40 minutos. Se añade KCl 0.5 M final, teniendo en cuenta que la solución está a 150 mM, por lo que debemos realizar los cálculos para añadir 350 mM, o sea, 175 μ l de la solución stock de 4 M de KCl.

M.6.4.- Separación de las subunidades ribosomales 40S y 60S de los ribosomas de células HeLa:

Se separan las subunidades ribosomales en gradiente continuo de sacarosa del 10% al 30%. Colocando aproximadamente 0,5 ml de la solución de los ribosomas por cada gradiente de 12 ml y balanceamos cada gradiente empleando el buffer B. Centrifugamos a 28.000 rpm durante 17 horas a 4°C O/N. Las subunidades 40S y 60S son detectadas a 260nm: (40S = $A_{260}/235 \geq 1.45$ y 60S = $A_{260}/280 \geq 1.85$). (M.3.6.b.)

M.6.4.a.- Fraccionamiento en gradiente de sacarosa.

En esta etapa del proceso de purificación se realiza un fraccionamiento por centrifugación en gradiente de sacarosa. La sacarosa posee la ventaja de contribuir a mantener la estructura de los ribosomas evitando su desnaturalización.

M.6.4.a.i.- Preparación de los gradientes de glicerol.

Preparar dos tubos para ultracentrífuga Ultraclear-12ml (Beckman Coulter) con un gradiente lineal de sacarosa comprendido entre 10-30%. Para ello se emplean los tampones de sacarosa al 10% y al 30%, un gradientómetro SG (Amersham Biosciences), un pequeño agitador magnético, y una placa agitadora. Con la ayuda de una bomba peristáltica (Pharmacia Biotech Pump-P1) depositamos gota a gota de forma suave y ascendente la mezcla del gradiente, hasta completar un volumen de 12 ml por tubo. Los gradientes deben hacerse con 24 horas de antelación, congelarse a -80° y conservarse a 4°C toda la noche.

M.6.4.a.ii.- Fraccionamos en columnas de sacarosa:

Se fraccionan, recogiendo de manera manual desde arriba y con mucho cuidado, $400\ \mu\text{l}$ por fracción de las columnas de sacarosa de $\sim 12\ \text{ml}$, con $\sim 0.5\ \text{ml}$ de extracto, después de centrifugar. Obtendremos 30 fracciones diferentes. Mediremos la concentración en el nano-drop y representaremos. Elegimos las fracciones adecuadas que contienen nuestros ribosomas y concentramos reunidas, mediante Amicon Centricon de 2mL (10000K para las subunidades 40S y 50000K para las 60S). Eluimos finalmente en buffer C. Medimos en el nano-drop que la concentración de las subunidades ribosomales sea superior a 1 mM. La concentración de las subunidades se calcula directamente de la medida del nano drop: $[40\text{S}] \text{ nM} = A_{260}/235 \geq 1.45 \times 50$ y $[60\text{S}] \text{ nM} = A_{260}/280 \geq 1.85 \times 50$. (M.3.6.b.) Las Subunidades ribosomales se van a conservar a -80° hasta su uso, en alícuotas de $20\ \mu\text{l}$ y una concentración superior a 1mM. Solo se descongelaran en hielo y para su uso inmediato. En la figura M.1 se presenta la representación gráfica de la concentración de ARN purificada por fracción:

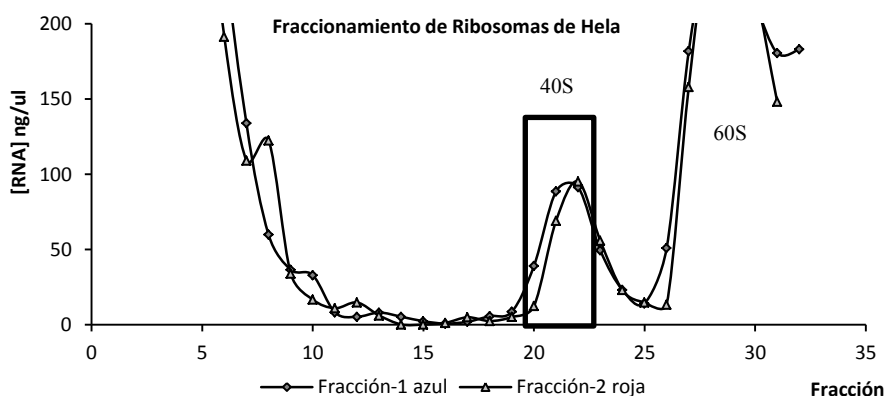


Figura M.1: Separación de las subunidades ribosomales 40S y 60S. Fraccionamiento de los gradientes de sacarosa empleados para la separación de las subunidades.

M.6.5.- Evaluación de la actividad de la subunidad ribosomal 40S.

Se evaluó la actividad del acoplamiento de las subunidades 40S frente al IRES del CrPV1-198 α P³²GTP, siguiendo el procedimiento de doble saturación descrito en la bibliografía (ref. libro), empleando la relación de la doble saturación de experimentos de *binding-filter*, se calibra la fracción de los ribosomas activos, en condiciones estructurales optimas, susceptibles de ser reclutados.

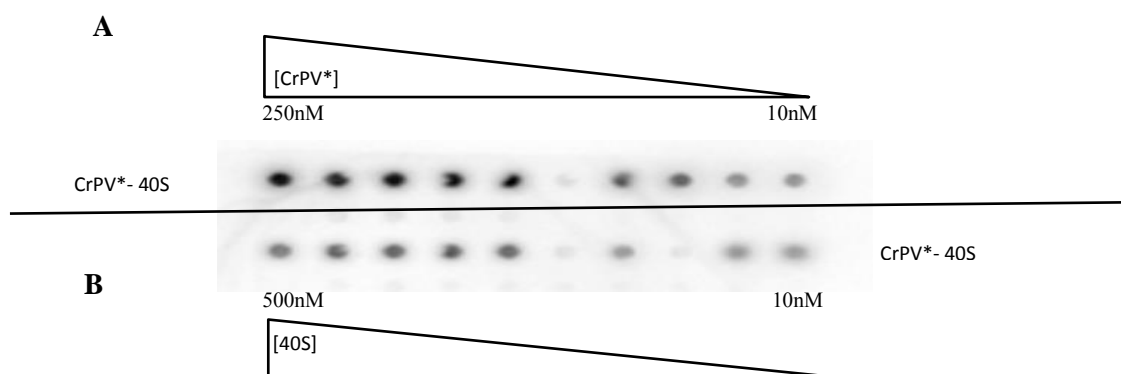


Figura M.2: Experimentos de *binding-filter* de doble saturación de subunidades 40S y de IRES de CrPV. A) [40S]= cte =10nM y [CrPV1-198 α P³²GTP]* de 10 a 250 nM. B) Saturación de [CrPV1-198 α P³²GTP]* cte.=10nM y las Subunidades [40S]= de 10 a 500 nM.

Los experimentos de calibración de la fracción de actividad de las subunidades ribosomales 40S, se realizaron para todas las extracciones purificadas de ribosomas. Se procedió a llevar a cabo la doble saturación de los reclutamientos según las reacciones de unión descrita en la bibliografía, (ver apartado de los Materiales y Métodos M.8.3.b). Los resultados se trataron y se han representado en forma de las medias normalizadas, del reclutamiento de las subunidades ribosomales obtenidas de ambas saturaciones.

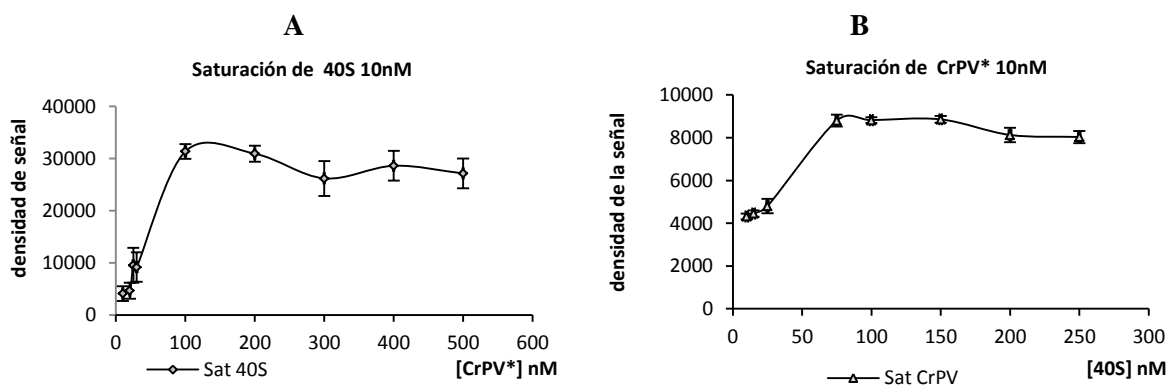


Figura M.3: Curvas de saturación de las subunidades ribosomales 40S. A) [40S]= cte =10nM y [CrPV]* de 10 a 250 nM. B) Saturación de [CrPV]* cte=10nM y las Subunidades 40S [40S]= de 10 a 500 nM.

En el panel A se observa como las subunidades ribosomales 40S a 10nM se saturan a una concentración de 100 nM de [CrPV1-198 α P³²GTP]* y en el panel B, 10nM [CrPV1-198 α P³²GTP]* saturan la unión con aproximadamente 60nM subunidades de 40S. Lo que significa una actividad de las subunidades ribosomales aptas para su reclutamiento de ~ 60%.

La media de actividades obtenidas en las diferentes extracciones de las subunidades ribosomales 40S fue de $43,14 \pm 12,77$ % de actividad de las subunidades extraídas. Lo que significa, que solo dicho porcentaje de la concentración total de las subunidades serán activas. Este valor fue empleado para la corrección de las concentraciones efectivas de subunidades 40S en los cálculos de las KD.

M.7.- Reacciones con sondas Bioquímicas:

M.7.1.- Digestión de ácidos nucleicos: ADN

M.7.1.a.- Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Todas las digestiones con finalidad puramente analítica se llevaron a cabo con una cantidad de ADN sustrato aproximada de 300 ng. Las digestiones con finalidad preparativa, como los moldes para transcripción in vitro, se emplearon 10 µg de ADN o 1 µg de cADN aproximadamente. En general se usaron 3U de enzima por microgramo de ADN a digerir, para un volumen de enzima no superior al 10% del volumen total de la reacción. El tampón de reacción fue el suministrado por la casa comercial (NEB, Fermentas y ROCHE), a concentración 1x. En el caso de doble digestión se tuvo en cuenta la compatibilidad entre las enzimas. La incubación se realizó en estufa a 37°C durante un tiempo aproximado de 3 horas, a veces toda una noche, según fabricante. Los enzimas fueron inactivados por tratamiento con calor según las indicaciones del fabricante. Se efectuó una electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio de una alícuota de la reacción para visualizar los productos antes de proceder a su purificación. La purificación se realizó mediante extracción fenólica y precipitación con etanol (M.3.7).

M.7.1.b.- Digestión de ADN con DNAsa RQ1.

La enzima DNAsa RQ1 procedente de páncreas bovino, y libre de RNAsas contaminantes (Promega), se usó para destruir el ADN molde empleado en las reacciones de transcripción. Se incorporó 1U de RQ1 ADNsa por microgramo de ADN molde y se incubó durante 15min a 37°C.

M.7.2.- Digestión de ácidos nucleicos: ARN

M.7.2.a.- Reacciones con RNAsa III de *E. coli*.

Las condiciones salinas del tampón empleado en todas las reacciones de digestión con RNAsa III de *E. coli* corresponden a condiciones de corte primario o secundario según sea de interés (R.3). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl, e incluyó 0.6 nM del ARN sustrato en tampón P humana 1x, 20U de ARNsin®Plus (Promega), 2 µg de ARNt de levadura (Ambion), y el enzima RNAsa III (Ambion). La RNAsa III se utilizó a una concentración variable, determinada según experimentos de calibración sobre el ARN sustrato correspondiente. El ARN sustrato y

el tampón de reacción fueron precalentados durante 1min a 90°C de forma paralela antes de ser puestos en contacto. Tras su unión, se dejó renaturalizar la mezcla, a temperatura ambiente durante 15 min. Transcurrido este tiempo se incorporaron el resto de componentes. Después de un periodo de incubación de 1 hora a 37°C se detuvo la reacción añadiendo tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Los productos fueron desnaturalizados antes de ser resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Los resultados se visualizaron por autorradiografía.

M.7.2.b.- Reacciones con la ribozima RZ6803 de la RNAsa P de *Synechocystis*.

La ribozima de la cianobacteria *Synechocystis Sp.* (RZ6803) se obtuvo por transcripción in vitro a partir del ADN plasmídico pT76803-Dra I empleando el kit comercial MEGAscript®T7 (Ambion).

La reacción se realizó en un volumen final de 10 µl compuesto por tampón RZ cianobacteria 1x, 20U de ARNsin®Plus (Promega), un 4% de PEG, 1 M KCl, el ARN sustrato a una concentración de 1.8 nM final y la ribozima a concentración variable en función del experimento. El óptimo fue calibrado sobre sustrato natural y corresponde a 67.5 nM final. El protocolo precisa de una pre incubación del ribozima de 15 min a 37°C, en el medio de reacción sin sustrato, para su correcto plegamiento. Transcurrido este tiempo se incorpora el ARN sustrato y se incuba a 37°C durante 1 hora. Las reacciones se detuvieron en hielo con tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Para este caso concreto, y debido a la gran cantidad de sales del medio reactivo, no se realizó desnaturalización previa carga en gel.

M.7.2.c.- Reacciones con RNAsa P humana.

Cada reacción se realizó en un volumen final de 10µl, conteniendo 0.9 nM del ARN sustrato en tampón P humana 1X, 20U de ARNsin®Plus (Promega), un 4% de PEG, y 0.5 µl del extracto purificado con actividad RNAsa P humana (M.5). El ARN sustrato y el tampón de reacción fueron precalentados durante 1 minuto a 90°C de forma paralela antes de ser puestos en contacto. Tras su unión, la mezcla se dejó renaturalizar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se incorporaron el resto de componentes de reacción. Después de un periodo de incubación de 30 minutos a 30°C, las muestras fueron sometidas a un tratamiento con proteinasa K y SDS a 62°C (M.8.2). Posteriormente se realizó una precipitación con etanol y acetato de sodio con glicógeno. Los productos fueron resuspendidos en agua y tampón de carga, y desnaturalizados antes de ser resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Los resultados se visualizaron por autorradiografía.

M.7.2.d.- Ensayos de estructura con RNAsas sensibles a simple y doble cadena.

Para determinar la estructura del ARN se emplearon las siguientes endonucleasas:

- i) ARNsa T1: procedente de *Aspergillus Oryzae*. Cataliza la hidrólisis en 3' del enlace fosfodiéster de las guaninas desapareadas, generando extremos 5'-OH y 3'-P, a través de intermediarios 2'-3'-P cíclico (Ehresmann, Baudin et al. 1987).
- ii) ARNsa V1: procedente de veneno de cobra (*Naja Oxiana*). Es una endonucleasa que procesa regiones de ARN apareadas con un tamaño mínimo aproximado de 4-5 pares de bases, sin preferencia de secuencia. También reconoce ribonucleótidos desapareados en conformación apilada (Ehresmann, Baudin et al. 1987). Los productos de corte cuentan con extremos 5'-P y 3'-OH (Lowman and Draper 1986).

M.7.2.d.i.- Reacciones con ARNsa T1.

La reacción de digestión parcial en condiciones nativas se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl, e incluyó 300 CPM final del ARN sustrato en tampón P humana 1x, 2 µg de ARNt de levadura (Ambion), y 0.001 µg/µl de ARNsa T1 (Calbiochem). El ARN sustrato y el tampón de reacción fueron precalentados durante 1min a 90°C de forma paralela antes de ser puestos en contacto. Tras su unión, se dejó renaturalizar la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se incorporaron el resto de componentes. La reacción se incubó a 37°C durante 20 min, y se detuvo inmediatamente en un baño de nieve carbónica en etanol después de añadir tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

M.7.2.d.ii.- Reacciones con ARNsa V1.

La reacción de digestión parcial en condiciones nativas se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl, e incluyó 300 CPM del ARN sustrato en tampón P humana 1X, 2µg de ARNt de levadura (Ambion), y 0.0001U/µl de ARNsa V1 (Ambion). El ARN sustrato y el tampón de reacción fueron precalentados durante 1 minuto a 90°C de forma paralela antes de ser puestos en contacto. Tras su unión, se dejó renaturalizar la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se incorporaron el resto de componentes. La reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos, y se detuvo inmediatamente en un baño de nieve carbónica en etanol después de añadir tampón de carga para geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

M.7.3.- Reacciones con Radiación UV-c 325nm:

Se preparó una lámpara UV previamente, a fin de acondicionar a la reacción y evitar las contaminaciones de RNAsas. Para ello se cubrió la superficie con film transparente (sujeto con celo por los bordes). Se puso encima una bolsa con hielo durante 20 minutos aproximadamente para enfriar la lámpara. Se prepararon las muestras para la reacción: tomando la cantidad adecuada de muestra (300 CPM final) y secada en el *Speed-Vac*. Se resuspende la muestra en buffer 10 µl de Robertson. Se resuspende la muestra con pipeta. Se ponen las muestras en la lámpara. Se someten las

muestras a irradiación durante 30 segundos, con 30 segundos de reposo por 3 veces (total 3 minutos de irradiación y 3 minutos de reposo). Se toman las muestras y se ponen en tubos de vidrio. Se añaden 20 µl de buffer de carga de acrilamida. Se desnaturalizan los productos de la reacción calentando 1 minuto a 90°C y poniendo en hielo después. Cargar en un gel de acrilamida.

M.8.-OTRAS REACCIONES.

M.8.1.- Ligación de insertos de ADN en plásmidos bacterianos.

Para realizar ligaciones de insertos dentro de vectores plasmídicos se utilizó la enzima T4 ADN ligasa, que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos 5'-P y 3'-OH de moléculas de ADN de doble cadena. Tanto el cADN inserto como el vector fueron digeridos con las mismas enzimas de restricción, y purificados por extracción con fenol cloroformo y precipitación con etanol. La reacción de ligación se realizó en un volumen de 10 µl compuesto por: 50 ng de cADN vector (usualmente pGEM®-3Zf (-) o pGEM®-T) en tampón de ligación rápida 1x (30 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, y un 5% de PEG), y 3U de T4 ADN ligasa (Promega). La reacción se incubó toda la noche a 4°C.

Para la ligación en el vector pGEM®-T Easy (Promega), el cADN procedente de las reacciones de PCR fue purificado utilizando el kit High Pure PCR (Roche-Applied Science). La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen de 10 µl, siguiendo las instrucciones del fabricante: 50 ng de pGEM®-T *Easy* vector en tampón de ligación rápida 1x (30 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, y un 5% de PEG), y 3U de T4 ADN ligasa (Promega). La relación molar entre inserto vector fue 3:1, aunque en ocasiones se empleó un exceso molar de inserto de 6 veces. La incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente, ó durante una noche a 4°C. En ambos casos, antes de proceder a la transformación de bacterias se inactivó el enzima T4 ADN ligasa mediante tratamiento por calor a 65°C durante 15 minutos.

M.8.2.-Tratamiento con proteinasa K y SDS.

La proteinasa K es una serín proteasa de amplio espectro, mientras que el dodecilsulfato sódico (SDS) es un surfactante empleado como detergente. El tratamiento combinado con ambos reactivos permitió eliminar proteínas capaces de interferir en la visualización de los resultados por electroforesis en gel de acrilamida, y garantizar el cese en la actividad de diferentes enzimas. Se incubó una dilución de proteinasa K (Ambion) en agua a concentración 1 µg/µl durante 5 minutos a 63°C (preactivada por calor). Por cada 10 µl de reacción a tratar con proteinasa se añadieron: 5 µg de ARNt de levadura (Ambion), 0.7 µl de SDS al 10%, 0.7 µl de EDTA 100 mM pH 8 y 0.6 µl de proteinasa K (1µg/µl) previamente activada. Tras un tiempo de incubación de 12 minutos a 63°C, la mezcla fue precipitada con etanol y resuspendida en 10µl de agua.

M.8.3.- Ensayos de asociación en geles nativos.

M.8.3.a.- Ensayos de anillamiento o unión visualizadas en geles nativos.

Para caracterizar el cambio conformacional experimentado por algunas moléculas de ARN y para la caracterización de la estructura primaria de los ARNs, se realizaron ensayos de anillamiento o acoplamiento con oligonucleótidos como el micro ARN miR122. La molécula portadora de señal radiactiva fue siempre la de menor tamaño: El micro ARN miR122- ATP [γ - 32 P] para las reacciones de binding con VHC1-542 sin marca radioactiva. La reacción de hibridación se llevó a cabo en un volumen de 10 μ l compuesto por 0.6 nM del ARN (300 CPM final) sujeto a estudio (VHC1-542) en tampón P humana 1x, 20U de ARNsin®Plus (Promega), 2 μ g de ARNt de levadura (Ambion), y el ARN mayor a unir, a concentración calibrada. El proceso se detuvo por adición en frío de tampón de carga no desnaturizante para geles de poliacrilamida. El ARN sustrato VHC1-542 fue desnaturizado y renaturalizado en el tampón de reacción del mismo modo descrito en los protocolos de reacción para RNAsa III y RNAsa P humana, antes de las reacciones de binding. Se incubaron las reacciones de unión unos 20-30 minutos y de 25 a 37°. Las moléculas unidas se apreciaron como un retraso en la movilidad electroforética de las moléculas marcadas en geles de poliacrilamida nativos.

M.8.3.b.- Ensayos de reclutamiento de subunidades 40S en geles nativos: *Binding*

Se realizaron pruebas del reclutamiento de las subunidades ribosomales 40S con la región VHC1-542. La molécula portadora de señal radiactiva fue siempre la de menor tamaño, el ARN VHC 1-542 marcado internamente con GTP [α - 32 P] para las reacciones de unión con la subunidad ribosomal 40S humana extraída de células HeLa. La reacción de hibridación se llevó a cabo en un volumen de 10 μ l compuesto por 0.6 nM del ARN (300 CPM final) sujeto a estudio (VHC1-542) en tampón P humana 1x, 20U de ARNsin®Plus (Promega), 2 μ g de ARNt de levadura (Ambion), y el ARN mayor a unir, a concentración variable. El proceso se detuvo por adición en frío de tampón de carga no desnaturizante para geles de poliacrilamida. El ARN sustrato VHC1-542 fue desnaturizado y renaturalizado en el tampón de reacción del mismo modo descrito en los protocolos de reacción para RNAsa III y RNAsa P humana, antes de las reacciones de binding. Se incubaron las reacciones de unión unos 20-30 minutos y de 25 a 37°. Los reclutamientos de las subunidades 40S fueron apreciados como una banda retrasada en la movilidad electroforética, de las moléculas sustrato marcadas, en geles de poliacrilamida nativos. Por otra parte, la cuantificación de los reclutamientos se llevó a cabo a través de phosphorimage de las bandas de los geles de retardo. También se cuantificaron por *binding filter*, pasando las reacciones, arrastradas por *Recon Buffer* 1x, a través de filtros de nitrocelulosa (HybondTM-C Extra de 45Micron, de Amersham Biosciences), que retiene las moléculas de ARN marcadas unidas a las subunidades 40S. Se visualizaron los filtros y se cuantificaron por phosphorimage (M.4.4.).

M.8.4.- Reacción de poliadenilación del ARN.

La enzima Poli(A) polimerasa de *E. coli* cataliza la incorporación independiente de molde de AMP, a partir de ATP, en el extremo 3' de un ARN. En el presente trabajo se empleó como técnica para la identificación de los puntos de corte exactos producidos por la digestión con endonucleasas específicas, concretamente para la identificación de la banda X obtenida por la digestión con RNAsa III.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, que incluyó: una fracción del fragmento de ARN sujeto a análisis, 1 mM ATP, y 5U de Poli(A) polimerasa (NEB) en el tampón de reacción suministrado por el fabricante 1X (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 250 mM NaCl, 10 mM MgCl₂). Tras 10 minutos de incubación a 37°C se añadieron 200 μ l de agua estéril, y se realizó una extracción fenólica y precipitación con etanol. El precipitado fue resuspendido en 10 μ l de agua, de los cuales 5 μ l se destinaron a reacciones de retrotranscripción y posterior PCR-NESTED, y determinación de la secuencias por secuenciación.

M.8.5.- Reacción de poliuridinación del ARN.

La enzima Poli (U) polimerasa cataliza la adición independiente de molde de UMP, a partir de UTP, al extremo 3' de un ARN. En este caso el enzima recombinante en *E. coli* procede de *Schizosaccharomyces Pombe*. En el presente trabajo se empleó como técnica para la identificación de los puntos de corte exactos producidos por la digestión con la endonucleasa RNAsa III.

La reacción se hizo en un volumen final de reacción de 25 μ l, compuestos por: una fracción del fragmento del ARN sujeto de análisis, 0.5 mM UTP, 20U de ARNsin®Plus (Promega), y 2U de Poli (U) polimerasa (NEB) en el tampón de reacción suministrado por el fabricante 1x (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, y 1 mM DTT). Tras 10 minutos de incubación a 37°C se añadieron 200 μ l de agua estéril, y se realizó una extracción fenólica y precipitación con etanol. El precipitado se resuspendió en 10 μ l de agua, de los cuales 5 μ l se destinaron a reacciones de retrotranscripción y posterior PCR-NESTED.

M.8.6.- Reacciones de retrotranscripción (RT).

La reacción de retrotranscripción se realizaron en un volumen final de 20 μ l compuesto por: una fracción del ARN disponible, el ODN correspondiente a concentración 1 μ M, 20U de ARNsin®Plus (Promega), mezcla de dNTPs a 1 mM (Roche), 10 ng/ μ l del ARN MS2 (Roche), y 10U de retrotranscriptasa (Roche) en el tampón suministrado por la casa comercial 1X (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 8 mM MgCl₂, y 30 mM KCl). El ARN que actúa como molde y el ODN cebador deben desnaturalizarse y renaturalizarse juntos antes de montar la reacción. Por esta razón se calentaron a 90°C durante 1 minuto y, después de incorporar el tampón de reacción, se mantuvieron a temperatura ambiente 15 minutos. La incubación se desarrolló a 55°C durante 30 minutos, tras lo cual se inactivó el enzima calentando 5 minutos a 85°C.

Cuando la temperatura de anillamiento del cebador fue demasiado baja con respecto a la temperatura de incubación de la RT de Roche, se empleó la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV). Este fue el caso concreto de los productos de las reacciones de poliadenilación y poliuridinación (apartado R.3), que emplearon los dT-Pst y dA-Pst para la síntesis del cADN correspondiente. En estas ocasiones las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l con la siguiente composición: 5 μ l de producto de la reacción de poliadenilación ó poliuridinación, el primer adecuado a concentración 1 μ M, 20U de ARNsin®Plus (Promega), mezcla de dNTPs a 1mM (Roche), y 15U de enzima AMV RT (USB) en el tampón proporcionado por el fabricante 1X (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 8 mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1 mM DTT). La incubación se realizó a 37°C durante 30 minutos. En ambos casos se empleó un volumen comprendido entre 2-3 μ l del cADN generado para las reacciones posteriores de PCR.

También se emplearon las técnicas de retrotranscripción, para la obtención de los ADN provenientes de los ARN de los cultivos de VHC genotipo 2a, proporcionadas por el profesor E. Domingo, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Los ARN fueron extraídos de los cultivos de VHC genotipo 2a, en pase 0, en pase 4 y en pase 4 tratados con ribavirina. (R.1.).

RESULTADOS

RESULTADOS

De lo expuesto en el apartado de Introducción de este trabajo de Tesis Doctoral, se ha llegado al convencimiento de que la eficacia biológica de las funciones del genoma viral y con ellas, la propia eficacia de la cuasiespecie, están condicionadas por la integridad sus estructuras. Para perseguir los objetivos planteados, se ha llevado a cabo un estudio, a todos los niveles estructurales (estructuras 1^a, 2^a, 3^a, 3^a local etc...) del genoma ARN del VHC. Se han preparado poblaciones del genoma viral *in vitro* con un rango creciente de mutaciones. Y otras poblaciones del VHC extraídas de los sobrenadantes de cultivos de células Huh 7.5 transfectadas con el virus. Se han empleando factores físicos y químicos con respuestas específicas de estructura del ARN para sondear las diferentes estructuras presentes (ver Material y Métodos). Las respuestas obtenidas de los factores, en función del ratio de mutaciones, nos proporcionan una medida del efecto que ejercen las mutaciones sobre su reconocimiento y por tanto, sobre la integridad de las estructuras.

R.1.- Modelos de estudio: poblaciones de mutantes aleatorios *in vitro* y en cultivos tratados y sin tratar con ribavirina.

R.1.1.- Mutagénesis aleatoria *in vitro*:

R.1.1.a- Poblaciones de mutantes de ADN de la región genómica correspondiente a la secuencia VHC1-542 *in vitro*:

Se construyeron cinco poblaciones de cPCRs, del fragmento de ADN genotipo 1b del VHC1-542 con cantidades crecientes de mutaciones, como sustratos del modelo (Anexo 3 figura 1). Se usó como molde una construcción de ADN T7-VHC1-542 (para poder transcribir después a ARN), y se obtuvo la población *wild type* amplificado por PCR convencional (Material y Métodos M.1.7). Para obtener poblaciones de mutantes empleamos PCR en condiciones mutagénicas crecientes introduciendo iones Mn^{2+} y desbalanceando la concentración de los distintos nucleótidos de manera progresiva como se presenta en la tabla adjunta R1.1 (M.3.6.c) (Martinez, Vartanian et al. 1994).

	WT	Mut 1	Mut 2	Mut 3	Mut 4
dNTPs final	dATP dCTP: 0,2 mM dGTP dTTP: 0,2 mM	dATP dCTP: 0,2 mM dGTP dTTP: 0,2 mM	dATP dCTP: 300 μ M dGTP dTTP: 0,2 mM	dATP dCTP: 240 μ M dGTP dTTP: 0,2 mM	dATP dCTP: 180 μ M dGTP dTTP: 0,2 mM
iones divalentes	Mg^{2+} :2,5mM	Mn^{2+} :0,5mM Mg^{2+} :2,5mM	Mn^{2+} :0,5mM Mg^{2+} :2,5mM	Mn^{2+} :0,5mM Mg^{2+} :2,5mM	Mn^{2+} :0,5mM Mg^{2+} :2,5mM

Tabla R1.1: Concentraciones de dNTPs y Mn^{2+} para la PCR mutagénica

Se ha caracterizado cada población obtenida de PCR en función de su grado de mutagenización, obteniendo el ratio de mutaciones que contenían. Para ello, se han empleado técnicas clásicas de subclonaje y el método de secuenciación *Sanger* con los productos de PCR (ver Material y Métodos). Una vez obtenida la secuenciación y utilizando la herramienta bioinformática *ClustalW2*, se ha realizado un alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas de cada población. Se correlacionaron todas las mutaciones identificadas en las secuencias con sus posiciones y se calcularon los ratios de mutación, como mutaciones por nucleótido para cada una de las poblaciones. Los resultados obtenidos de los ratio de mutaciones son presentados en la tabla R1.2 desde la población *wild type* hasta la población de mutantes 4 (M.8).

Ratio mutaciones	wt	Mut 1	Mut 2	Mut 3	Mut 4
mut/nt	5,55E-04	5,55E-03	1,12E-02	1,42E-02	2,43E-02

Tabla R1.2: Ratio de mutaciones de las poblaciones *in vitro* de mutantes.

Los productos de PCR de las cinco poblaciones se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa, como se presenta en el panel A de la figura R1.3. Los amplicones purificados de las PCR fueron cuantificados y las cantidades obtenidas para cada población se han representado frente a su ratio de mutaciones panel B de la figura R1.3.

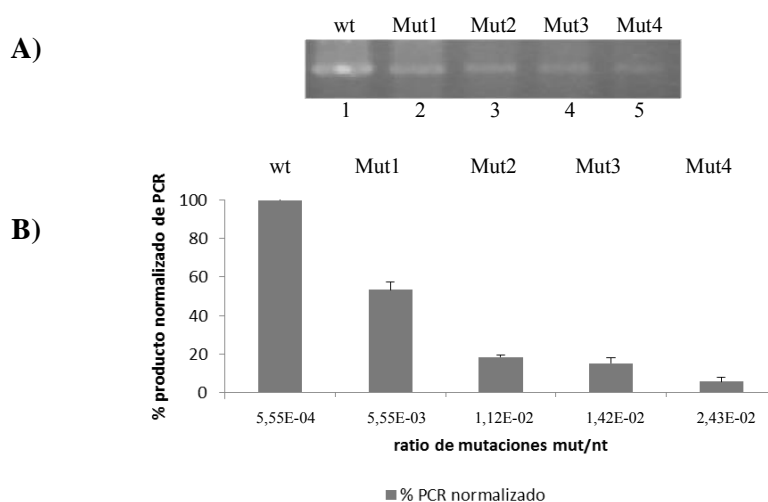


Figura R1.3: Resultados de las PCR sobre las poblaciones de VHC: A) Electroforesis en gel de agarosa, de los productos de PCR de las cinco poblaciones wt y mutantes 1-4 del VHC1-542 carriles del 1-5 respectivamente. B) Relación normalizada de las cantidades de ADN obtenidas en PCR mutagénica vs wt. Se ha representado la media de tres experimentos con su desviación estándar en función de los ratios de mutación obtenidos *a posteriori* para cada población.

En la imagen de gel del panel A de la figura R.1.3, se puede apreciar como la intensidad de cada banda producto disminuye claramente desde la población wt a la población mut 4, apuntando a una caída en la eficacia de la reacción con el aumento de las mutaciones en la población. En la gráfica del panel B de la figura R.1.3 se aprecia la caída en la cantidad de producto obtenido de las PCR con el incremento del ratio de mutaciones introducidas en la población. La disminución de producto de PCR obtenida fue de más del 90% en la población de mutantes 4, respecto a la cantidad obtenida para la población wt.

El método de clonaje y secuenciación dio un resultado creciente del número de secuencias wt en las poblaciones con el aumento de las condiciones mutagénicas, mientras que lo esperado debía de ser una disminución. Un aumento del ratio de mutaciones en cada población debería estar acompañado de un aumento del número de secuencias mutantes, de las mutaciones por secuencia y de una disminución de las secuencias wt. Este resultado apuntaba a la existencia de una ventaja relativa de las secuencias wt sobre las mutantes en algún paso del método de subclonaje empleado y que introducía un sesgo en la técnica. Para corregir posibles desviaciones producidas en el proceso de subclonaje el criterio que se estableció fué considerar, en un principio, estas secuencias wt como artefactos debidos al método y descartarlas, considerando la secuencia wt como un solo haplotipo dentro de cada población. En la Tabla R.1.4, se presentan los diferentes resultados obtenidos de la secuenciación: cada columna representa una población de VHC1-542 con un índice de mutaciones, y cada fila, los diferentes valores obtenidos para cada categoría:

La población wt presentó un índice basal de mutaciones aleatorias de 5,55E-04 mutaciones por nucleótido respecto a la secuencia consenso del genotipo 1b (ver M.M.3.6.c). Los resultados obtenidos para las cuatro poblaciones mutantes ofrecen un incremento, en el ratio de mutaciones de hasta 2,43E-02 para la población más mutada (tabla R1.2).

VHC1-542	wt	Mut 1	Mut 2	Mut 3	Mut 4
Clones secuenciados	40	35	35	38	43
Secuencias leídas	38	27	23	23	18
n° mutaciones	12	82	129	140	97
Haplotipos	8	19	22	22	17
Mutaciones por secuencia	0,9	4	6,8	7,2	8,4
Delecciones por secuencia	0	0,04	0,52	1,10	1,07
Entropía de Shannon*	0,16	0,19	0,28	0,29	0,31
Ratio mut/nt	5,55E-04	5,55E-03	1,12E-02	1,42E-02	2,43E-02

*Sn se ha calculado siguiendo la fórmula presentada en la introducción I.2.3.b.

Tabla R1.4: Resultados de la secuenciación. Poblaciones *in vitro* del VHC1-542 g.1b.

Para confirmar si la desproporción de secuencias wt son artefactos, se evaluó el método de clonaje con un fragmento de ADN más corto (VHC1-130), y se usó un kit de clonación, El202S de *NEB Biolabs Inc.*, que garantiza la eliminación de artefactos en los procesos de ligación (*P-GEN Tmini*) y transformación (*E-Coli 10β*). Siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante, la secuenciación no evidenció ningún artefacto identificable ni la desproporción de secuencias wt. La cantidad de secuencias wt cae con el aumento de las condiciones mutagénicas como cabía de esperar. Este resultado confirmó que las secuencias wt que aumentaban en las poblaciones con el aumento de mutaciones eran artefactos. Los resultados obtenidos con el kit son presentados en la tabla R1.5, y como se puede apreciar son similares a los presentados en la tabla R1.4, confirmando el descarte de las secuencias wt artefactuales.

	Mut1	Mut2	Mut3	Mut4
Clones secuenciados	32	24	35	35
n° mutaciones	17	14	20	33
Haplotipos	9	12	12	10
Ratio mut/nt	5,51E-03	1,60E-02	1,80E-02	2,55E-02

Tabla R1.5: Resultados obtenidos con el kit de control de la clonación, *EI202S* de *NEB Biolabs Inc.*

Confirmada la validez de los resultados obtenidos y que se han presentado en la tabla R1.4 estos confirmaron un incremento de las mutaciones por secuencia desde 1 mutación por secuencia en la población wt, hasta más de 8 mutaciones por secuencia en la población más mutada (Mut 4). El nivel máximo de mutaciones obtenido en estas poblaciones, ha sido el mayor que permitieron obtener las técnicas utilizadas. Aumentaron las mutaciones totales en la población y las deleciones por secuencia con el incremento del ratio de mutaciones. El número de haplotipos en las poblaciones casi alcanza el número de secuencias secuenciadas con el incremento del ratio de mutaciones a partir de la población de mutantes 2. Y los valores de entropía de Shannon normalizada señalan que la diversidad de la población se duplica desde la población wt a la más mutada. El rango de mutaciones de estas poblaciones de trabajo, supera el ratio que presentan infecciones con VHC 2a sobre cultivos celulares Huh 7.5, en los límites de su extinción viral, por el tratamiento con mutágenos como la ribavirina (Ortega-Prieto, Sheldon et al. 2013). Por tanto, estas poblaciones de ratio de mutación creciente del fragmento VHC1-542, pueden ser un buen modelo de trabajo para estudiar el efecto del incremento de las mutaciones aleatorias sobre la integridad estructural, en un contexto de cuasiespecie viral.

R.1.1.b.- Caracterización de las mutaciones de las poblaciones de VHC *in vitro*.

Se caracterizaron, para cada población, las mutaciones identificadas en la secuenciación por su naturaleza. En la tabla R1.6 se presentan las proporciones de las diferentes mutaciones para cada una de las poblaciones y su representación gráfica:

	% Pu/Pu	% Py/Py	% Pu/Py	% Py/Pu	% GAP
WT	16,67	25,00	33,33	16,67	8,33
Mut 1	34,15	42,68	18,29	3,66	1,22
Mut 2	33,33	37,98	10,08	10,08	8,53
Mut 3	45,00	31,43	8,57	5,71	9,29
Mut 4	23,71	38,14	3,09	7,22	27,84

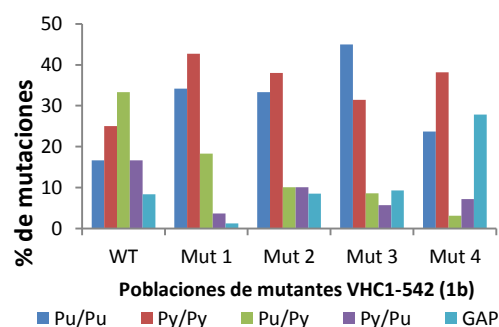


Tabla R1.6: Caracterización de la naturaleza de las mutaciones en las poblaciones de mutantes. Tabla con las transiciones si se trata de mutaciones de bases de purinas por purinas (Pu/Pu) o pirimidinas por pirimidinas (Py/Py). Transversiones si se trata de mutaciones de purinas por pirimidinas (Pu/Py) o viceversa (Py/Pu). También se cuantificaron las deleciones o saltos en la secuencia (GAP). A la derecha representación gráfica de las diferentes familias de mutaciones para cada población *in vitro* del VHC1-542(1b).

Los resultados de la tabla R1.6, indican que las mutaciones introducidas son mayoritariamente transiciones pero no se aprecia ninguna tendencia relacionada con su ratio de mutaciones, señalando su naturaleza aleatoria e independiente de procesos selectivos.

R.1.2- Poblaciones de VHC extraídas de cultivos con y sin tratar con ribavirina.

Para completar el modelo de trabajo *in vitro*, se obtuvieron poblaciones del cADN del fragmento VHC1-570 de forma análoga a las que se prepararon *in vitro*, pero a partir de su ARN extraído de cultivos celulares. Para ello, se utilizaron cultivos de células Huh7.5, cedidos amablemente por el Dr. C. Rice de la Universidad Rockefeller de Nueva York. Los doctores C. Perales y E. Domingo del CBMSO transfectaron los cultivos celulares con el VHC, genotipo 2a, extrajeron el ARN de los sobrenadantes y nos facilitaron las muestras de tres poblaciones. Concretamente, tres poblaciones de ARN de VHC: una población correspondiente a un cultivo en *pase 0*, una segunda población de *pase 4* (sin tratar) y una tercera población de *pase 4* tratada con ribavirina y ya próxima a la extinción viral.

Los ARNs de las tres poblaciones recibidas del CBMSO (moléculas ARN/ μ L) se retrotranscribieron mediante técnicas de 3'RACE y se les adicionaron colas poli-A con terminal transferasa. Después se amplificaron por PCR empleando oligo dT-*anchor primer* y los productos se clonaron y secuenciaron. Las secuencias se alinearon con *ClustalW* frente la secuencia consenso de la región VHC1-570 genotipo 2a, lo que permitió identificar las posiciones mutadas y caracterizar dichas mutaciones. En la tabla R1.7 se presentan los resultados extraídos del análisis bioinformático de la secuenciación para cada población, a pase 0, a pase 4 sin tratar y a pase 4 tratada con ribavirina.

VHC1-570 (2a)	Pase 0	Pase 4	Pase 4 + Rb
Moléculas ARN/μL recibidas del CBMSO	8,00E+06	6,40E+06	7,20E+03
Número de mutaciones	1	5	41
Número de saltos	0	1	5
Número de Secuencias	10	9	26
Número de haplotipos	2	6	26
muts/secuencia	0,1	0,6	1,6
Ratio mutaciones	1,77 E-05	1,52 E-03	2,79 E-03

Tabla R1.7: Caracterización de las poblaciones extraídas de cultivos del VHC1-570 (2a). Resultados de la secuenciación.

El ratio de mutaciones para la población a pase 0 fue de 1,77E-05 mutaciones por nucleótido que se incrementaron hasta las 1,52E-03 tras 4 pases y que casi se duplica hasta las 2,79E-03 mutaciones nucleótido para la población tras cuatro pases tratada con la ribavirina. Los resultados fueron de un importante crecimiento de número de mutaciones por secuencia desde la población a pase 0 con 0,1 mutaciones por secuencia hasta las 0,6 mutaciones por secuencia tras cuatro pases, y 1,6 mutaciones por secuencia en los cuatro pases tratados con ribavirina. El incremento de mutaciones tras los cuatro pases se ve acompañado de un incremento del número de haplotipos y que se iguala al número total de lecturas de secuencias (26 de 26), en la población a pase 4 tratada con ribavirina.

Se caracterizaron las mutaciones identificadas en las poblaciones extraídas de los cultivos. En la tabla adjunta R1.8 se presentan:

VHC1-570 (2a)	% Pu/Pu		% Py/Py		% Pu/Py				% Py/Pu				% GAP
	A/G	G/A	T/C	C/T	A/T	A/C	G/C	G/T	T/A	T/G	C/A	C/G	
Pase 0	0		100		0				0				0
Pase 4	20	20	20	20	0				0				20
	40		40		0				0				
Pase 4 + RB	9,76	12,2	7,32	19,51	4,88	14,63	14,63	2,44	0,00	4,88	7,32	2,44	12,20
	21,95		26,83		36,59				14,63				12,20

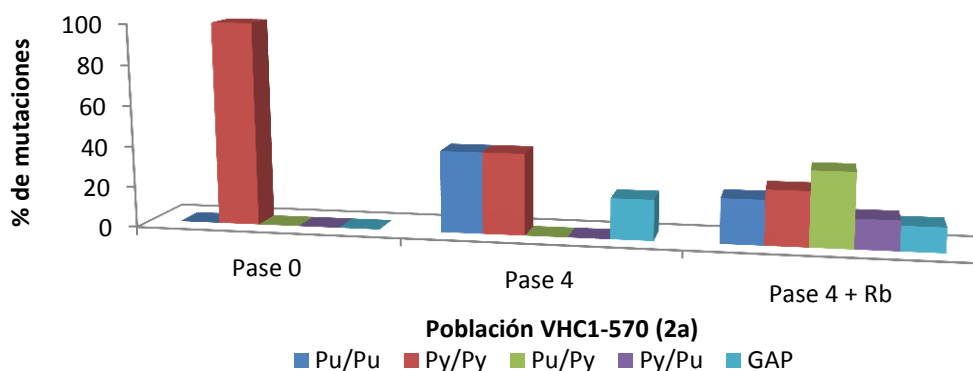


Tabla R1.8 Caracterización de la naturaleza de las mutaciones en las poblaciones extraídas de cultivos del VHC1-570(2a). En la parte superior se presenta la tabla de las mutaciones organizadas por su naturaleza, encontradas en la secuenciación para cada una de las tres poblaciones extraídas de cultivo del VHC1-570 (2a). Abajo se presenta la representación gráfica de cada familia de mutaciones para cada población, a pase 0, a pase 4 y a pase 4 tratada con ribavirina.

Las mutaciones encontradas en la población a pase 0 son todas transiciones de Py/Py, mientras que a pase 4 se reparten entre Py/Py y Pu/Pu en similar proporción. En los cultivos tras cuatro pases tratados con ribavirina, los resultados muestran una diversificación total de las mutaciones repartiéndose entre transiciones y transversiones, que no se identificaron sin el tratamiento.

R.1.2.a.- Medida de los índices mutacionales *in cultivo*.

Se cuantificaron las mutaciones de G/A, C/T y A/G, T/C, para evaluar la actividad mutacional de los pases y la actividad mutagénica de la ribavirina de las poblaciones del VHC extraídas de cultivos tratados frente a los no tratados (Moreno, Gallego et al. 2011, Ortega-Prieto, Sheldon et al. 2013). Tal y como está descrito en la bibliografía se calcularon los porcentajes de mutaciones $[G \rightarrow A + C \rightarrow T]$ y $[A \rightarrow G + T \rightarrow C]$ y el índice mutagénico a través de la relación entre ambos, para la valoración de la actividad mutagénica en los cultivos:

$$\text{índice mutagénico} = \frac{[G \rightarrow A + C \rightarrow T]}{[A \rightarrow G + T \rightarrow C]}$$

Los resultados obtenidos de los índices de mutación sobre las secuencias para las tres poblaciones extraídas en cultivo, se presentan en la tabla R1.9:

VHC1-570 (2a)	Pase 0	Pase 4	Pase 4 +Rb
% [G/A+C/T]	0,00	40,00	31,71
% [A/G+T/C]	100,00	40,00	17,07
[G/A+C/T] / [A/G+T/C]	0,00	1,00	1,88

Tabla R1.9: Índices mutacionales en cultivos del VHC1-570(2^a).

Los valores obtenidos para estos índices mutacionales son de 0 en la población a pase 0 a un valor de 1 tras cuatro pases, indicando un aumento de la variabilidad generado por el propio proceso de los pases de cultivo. Tras el tratamiento con ribavirina, el valor de la relación de índices casi se duplica, alcanzando un valor de 1,88 consistente con la actividad mutagénica atribuida a la ribavirina en la bibliografía.

R.1.3.- Secuenciación masiva de poblaciones de VHC extraídas de cultivos.

Las tres poblaciones de ARN del VHC genotipo 2a extraído de los cultivos fueron secuenciadas también de forma masiva, empleando para ello el sistema de pirosecuenciación de Roche (ver Material y Métodos). Las secuencias obtenidas para las tres poblaciones se trataron bioinformáticamente comparándolas con respecto a la secuencia consenso de la región VHC1-570 genotipo 2a (ver M.M.3.6). El conjunto de los resultados más relevantes obtenidos se presentan a continuación en la tabla R1.11:

VHC1-570 genotipo (2a)		Pase 0		Pase 4		Pase 4 + Rb (100µM)	
moléculas ARN/µL	mol/µL	8,00E+06		6,40E+06		7,20E+03	
n° mutaciones	mut	122		1040		2062	
n° lecturas	sec	12125		13722		22289	
n° nts analizados	nts	5378485		6734772		10466093	
mutación/lectura	mut/sec	0,02		0,13		0,31	
Haplotipos por sección		1	3	3	12	9	9
Haplotipos ttls.		3		36		81	
n° nts diferentes	k	0,03		0,13		0,29	
ratio mutación por posición	r	4,92E-03		9,25E-03		1,10E-02	
Entropía de Shannon	Sn	0,08		0,19		0,30	
Ratio mutaciones	mut/nt	5,60 E-05		4,76 E-04		1,15 E-03	

Tabla R1.10: Resultados obtenidos por secuenciación masiva.

En primer lugar se puede apreciar como el número de mutaciones encontradas tras los cuatro pases del cultivo aumenta en un orden de magnitud, de 122 a 1040 respecto al cultivo a pase 0, y como se dobla alcanzando las 2063 mutaciones en el cultivo tras cuatro pases tratado con ribavirina. El ratio de mutaciones calculado para la población de pase 0 fue de 5,60 E-05 mut/nt, del mismo rango que el obtenido por técnicas clásicas. Para la población del pase 4 el ratio fue de 4,76E-04mut/nt y para la

población de pase 4 tratada con la ribavirina, de $1,15E-03$ mut/nt. Estos resultados obtenidos muestran un incremento del ratio de mutaciones de un orden de magnitud a los cuatro pases que se incrementa otro orden al tratar con ribavirina. Por otra parte las mutaciones por secuencia aumentan seis veces a los cuatro pases y quince veces al tratar con ribavirina, más del doble que sin tratar. La entropía de Shannon normalizada pasa a más del doble tras los cuatro pases y de casi cuatro veces tras los cuatro pases tratando con ribavirina, que es algo menos del doble que sin el tratamiento.

En Cultivo	VHC1-570 (2a)	Pase 0	Pase 4	Pase 4 + Rb
Secuenciación Sanger	Número de lecturas	10	9	26
	nts secuenciados	5.660	5.094	15.282
	mutaciones/secuencia	0,1	0,6	1,6
	Número de mutaciones	1	5	41
	Número de saltos	0	1	5
	Haplotipos	2	6	26
	Ratio mutaciones	1,77 E-05	1,52 E-03	2,79 E-03
Secuenciación masiva	n° lecturas	12.125	13.722	22.289
	nts secuenciados	5.378.485	6.734.772	10.466.093
	mutaciones/secuencia	0,02	0,13	0,31
	Número de mutaciones	122	1040	2062
	Haplotipos	3	36	81
	Ratio mutaciones	5,60 E-05	4,76 E-04	1,15 E-03

R1.11: Comparativa de los resultados por ambas técnicas de secuenciación.

Los resultados obtenidos por ambas técnicas, son análogos, salvando las distancias debidas a la enorme resolución que permite obtener la secuenciación masiva, como se aprecia en el resultado del ratio de mutaciones de la población a pase 4 que es de un orden de magnitud superior al obtenido por secuenciación masiva. Los incrementos y relaciones obtenidas tanto en los ratios de mutación como en las mutaciones por secuencia, son las mismas por ambas metodologías, validando los valores obtenidos para estas poblaciones.

R.1.3.a.- Caracterización de las mutaciones de las poblaciones de VHC de cultivo.

La clasificación de las mutaciones identificadas, en las tres poblaciones de VHC (2a), mediante secuenciación masiva se presentan en la tabla R1.12. Las mutaciones obtenidas mediante la secuenciación masiva en la población de pase 0 se encuentran muy concentradas en un 53% de transiciones (Py/Py) de T→C y un 48% de transversiones (Py/Pu) C→A. En la población de pase 4 se observa un enriquecimiento por encima del 95% y una diversificación de las transiciones junto a una desaparición casi completa de las transversiones C→A (Py/Pu) que quedaron por debajo del 5%. En la población de pase 4 tratada con ribavirina se concentran las mutaciones sobre las transiciones de C→T (Py/Py) en más de un 70% y de G→A (Pu/Pu) en un 19%, duplicandose las transversiones respecto a la población de pase 4 sin tratar alcanzando un 10% del total de las mutaciones identificadas.

VHC1-570 (2a)		Pase 0	Pase 4	Pase 4 + Rib (100µM)
% Pu/Pu	A/G		29,19	
	G/A		39,63	18,98
% Py/Py	T/C	52,46	5,15	
	C/T		21,46	70,39
% Pu/Py	A/T			
	A/C			6,01
	G/C			
	G/T			
% Py/Pu	T/A			
	T/G			
	C/A	47,54	4,57	
	C/G			4,62

VHC1-570 (2a)	Pase 0	Pase 4	Pase 4 + Rib (100µM)
% [G→A+C→U]	0,00	61,08	89,37
% [A→G+U→C]	52,46	34,34	0,00
[G/A+C/U] / [A/G+U/C]	0,00	1,78	2,60

Tabla R1.12: Caracterización de las mutaciones por secuenciación masiva *in cultivo*. En la tabla superior se presentan las mutaciones identificadas en la secuenciación masiva de las tres poblaciones extraídas de cultivo y clasificadas por su naturaleza. En la tabla inferior se presentan los índices mutacionales calculados a partir de la relación de mutaciones identificadas.

Los índices mutagénicos calculados a partir de la secuenciación masiva fueron análogos a los obtenidos por técnicas Sanger (ver epígrafes de los resultados R.1.1.c. y R.1.2.c.) y son presentados en la tabla R1.12. Estos valores muestran un incremento de la relación de índices de 0 a 1,78 a los 4 pases y alcanza el valor 2,60 a los 4 pases con tratamiento con ribavirina.

R.1.3.b.- Identificación de las mutaciones: haplotipos de VHC (2a) en cultivos.

La secuenciación masiva ha permitido la lectura de 12.125 secuencias sobre la región de VHC1-570 del genotipo 2a, a pase 0. En estas secuencias se ha identificado solo una secuencia en un primer sector de lectura (VHC1-286) y dos mutaciones, en las posiciones 301 y 392 en el segundo sector de lectura (VHC274-544). La entropía de Shannon normalizada fue 0 en el primer sector de la secuenciación (0,08 en el segundo) lo que apunta una elevada resistencia a la mutación. Se han encontrado tres haplotipos 301T/392C, 301T/392A, 301C/392C de los cuatro posibles (301C/392A no ha aparecido en las lecturas). La distribución de las mutaciones fue en un 52,46% de T por C en la posición 301 y en un 47,54% de C por A en la 392. En la tabla adjunta R1.13 se presentan las mutaciones identificadas en las lecturas de la secuencia y sus proporciones relativas en la población. El 99% de las secuencias presentaron las mutaciones 301T y 392C y suponen el haplotipo mayoritario encontrado en la población.

12125 secuencias	posición	Lecturas mutantes				%			
		A	C	G	T	A	C	G	T
1	301	0	64	0	7971	0	0,797	0	99,28
2	392	58	7977	0	0	0,722	99,28	0	0

Tabla R1.13: Mutaciones identificadas en los cultivos a pase 0 por secuenciación masiva.

Los resultados de la población a pase 4 con 13.722 lecturas de secuencias, ha puesto de manifiesto un aumento de la complejidad identificando hasta 36 mutaciones en 13 posiciones mutadas y, que se presentan a continuación en la tabla R.1.14:

13.722 secuencias	posición	Lecturas mutantes				%			
		A	C	G	T	A	C	G	T
1 V1	46	394	0	13328	0	2,871	0	97,1	0
2 V1	247	118	0	13604	0	0,86	0	99,1	0
1 V2	301	0	80	0	11404	0	0,697	0	99,3
2 V2	348	0	11393	0	91	0	99,21	0	0,79
3 V2	380	11382	0	102	0	99,11	0	0,89	0
4 V2	392	71	11413	0	0	0,618	99,38	0	0
5 V2	400	11365	0	119	0	98,96	0	1,04	0
6 V2	459	103	0	11381	0	0,897	0	99,1	0
7 V2	466	0	11389	0	95	0	99,17	0	0,83
8 V2	485	11333	0	151	0	98,69	0	1,32	0
9 V2	509	0	11413	0	71	0	99,38	0	0,62
10 V2	520	11403	0	81	0	99,3	0	0,71	0
11 V2	532	0	11408	0	76	0	99,34	0	0,66

Tabla R.1.14: Mutaciones de VHC1-570 (2a) en cultivos a pase 4. Se han presentado las posiciones mutadas en ambos sectores de lectura, con el número de lecturas obtenidas para cada mutación en cada una de esas posiciones y los porcentajes a los que corresponden respecto al número total de lecturas. V1: corresponde al primer sector secuenciado VHC23-286. V2: corresponde al segundo sector secuenciado VHC274-544.

En la tabla R1.14 se presentan las 2 posiciones mutadas identificadas en el primer sector de lectura y 11 en el segundo sector. Las lecturas obtenidas de la secuenciación masiva han permitido identificar 36 haplotipos diferentes de los 8.192 posibles, dados por la combinación de las 13 posiciones mutadas identificadas con dos opciones en cada posición (3 haplotipos en el primer sector de los cuatro posibles y 12 en el segundo de los 4.096 posibles).

El aumento de la complejidad poblacional de 3 variantes de secuencia a pase 0 hasta 36 tras cuatro pases, es consistente con el aumento de la entropía de Shannon obtenido de 0,08 en la población a pase 0, a un valor de 0,19 tras cuatro pases. La entropía de S_n del primer sector de lectura ha sido de 0.16 y de 0.21 la del segundo sector, señalando la mayor resistencia a la mutación de la primera sección de lectura.

Los resultados de la población a pase 4 tratada con ribavirina, con 22.289 lecturas de secuencias, han demostrado un aumento aún mayor, de la complejidad. Se han obtenido 16 posiciones mutadas con 9 haplotipos diferentes identificados para cada sector de lectura de los 512 posibles. En resumen, la secuenciación masiva ha identificado 81 haplotipos diferentes en total, de las 65.536 posibilidades que se podrían obtener de las 16 posiciones mutadas con dos opciones por posición y que se presentan a continuación en el cuadro de la tabla R.1.15:

22.289 secuencias	posición	Lecturas mutantes				%			
		A	C	G	T	A	C	G	T
1 V1	46	174	0	22115	0	0,781	0	99,2	0
2 V1	70	180	0	22109	0	0,808	0	99,2	0
3 V1	107	0	22100	0	189	0	99,15	0	0,85
4 V1	166	0	19572	0	2717	0	87,81	0	12,2
5 V1	176	0	22153	0	136	0	99,39	0	0,61
6 V1	186	415	0	21874	0	1,862	0	98,1	0
7 V1	207	0	22150	0	139	0	99,38	0	0,62
8 V1	218	0	22093	0	196	0	99,12	0	0,88
1 V2	340	0	16659	0	248	0	98,53	0	1,47
2 V2	367	16534	373	0	0	97,79	2,206	0	0
3 V2	385	0	16787	0	120	0	99,29	0	0,71
4 V2	403	0	16721	0	186	0	98,9	0	1,1
5 V2	416	164	0	16743	0	0,97	0	99	0
6 V2	453	0	16468	0	439	0	97,4	0	2,6
7 V2	473	245	0	16662	0	1,449	0	98,6	0
8 V2	512	0	16620	287	0	0	98,3	1,7	0

Tabla R1.14: Mutaciones de VHC1-570 (2a) en cultivos a pase 4 con ribavirina. En negrita se han resaltado las mutaciones mayoritarias en la población.

Los valores de incremento de entropía de Shannon tras cuatro pases y tratamiento con ribavirina han sido de 0,30, coherente con el aumento del número de haplotipos que ha identificado la secuenciación masiva y consistente con su actividad mutagénica. El valor de Sn ha sido de 0,33 en el primer sector de lectura y 0,28 en el segundo, lo que pone de manifiesto que la ribavirina va a actuar con una incidencia ligeramente superior sobre el primer sector.

R.1.3.c.- Situación de las mutaciones en clones a pases largos.

Se han caracterizado dos clones persistentes y resistentes al tratamiento con interferón IFN a 100 pases, con mutaciones concretas en la región VHC1-570 (2a):

VHC1-570 (2a) p100 IFN10					
Clon	Mutación	Región	Clon	Mutación	Región
2	C-118 (Delección)	5'UTR	6	C-118 (Delección)	5'UTR
	-----	5'UTR	6	T301C	5'UTR

Tabla R1.15: Mutaciones identificadas sobre las poblaciones de VHC1-570 (2ª) en cultivos clones 2 y 6.

Estos dos clones, C2 y C6, han demostrado resistencia al interferón tras un elevado número de pases, en cultivos en células Huh 7.5 con el VHC genotipo 2a y contienen mutaciones en **posiciones esenciales** de la región VHC1-570. En la figura R1.16 se han situado las mutaciones identificadas en estos dos clones concretos sobre las estructuras y las mutaciones identificadas en la secuenciación masiva sobre las poblaciones extraídas de los cultivos:

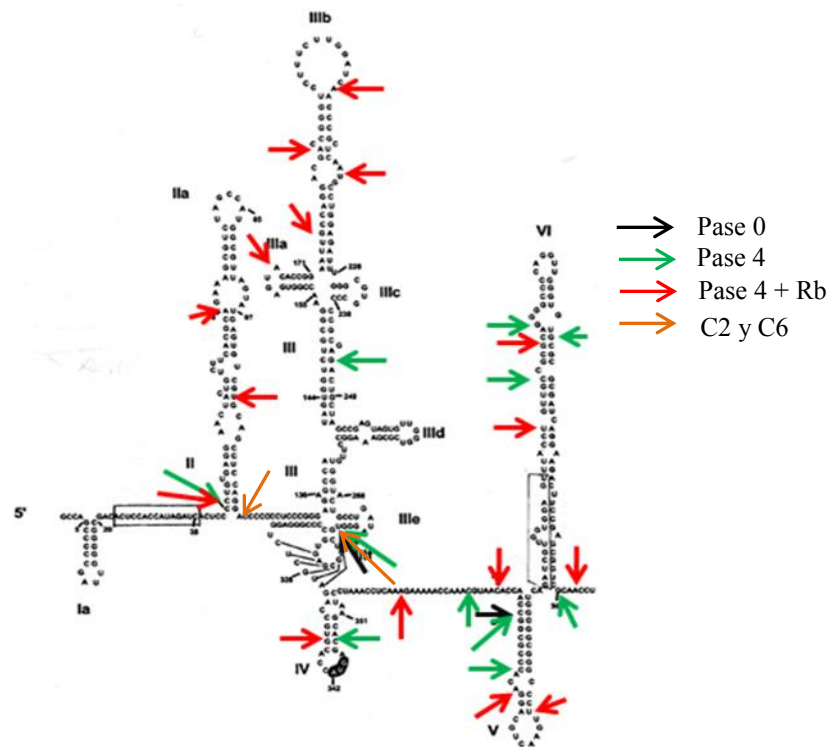


Figura R.1.16: Situación de las mutaciones identificadas sobre las poblaciones de VHC1-570 (2a) en cultivos. Con flechas negras las mutaciones identificadas en pase 0, con flechas verdes las mutaciones identificadas tras 4 pases y con flechas rojas las mutaciones identificadas tras 4 pases y tratamiento con ribavirina. Con flecha naranja se sitúan las mutaciones identificadas en los Clones 2 y 6.

R.1.4.- Poblaciones mutantes de ARN “in vitro”.

R.1.4.a.- Transcripciones del ARN de la región genómica del VHC1-542.

Se han sintetizado cinco poblaciones de ARN correspondientes a las poblaciones de mutantes *in vitro*, marcadas internamente con ³²P y sin marcar (ver material y métodos).

Para la localización y purificación de las bandas producto de la transcripción sin marcar, se emplearon transcritos marcados internamente con ³²P de la misma longitud del fragmento y cuyas bandas electroforéticas visualizadas por autoradiografía sirvieron de referencia por movilidad electroforética para poder recortar las bandas de los transcritos sin marcar, en paralelo (recuadros).

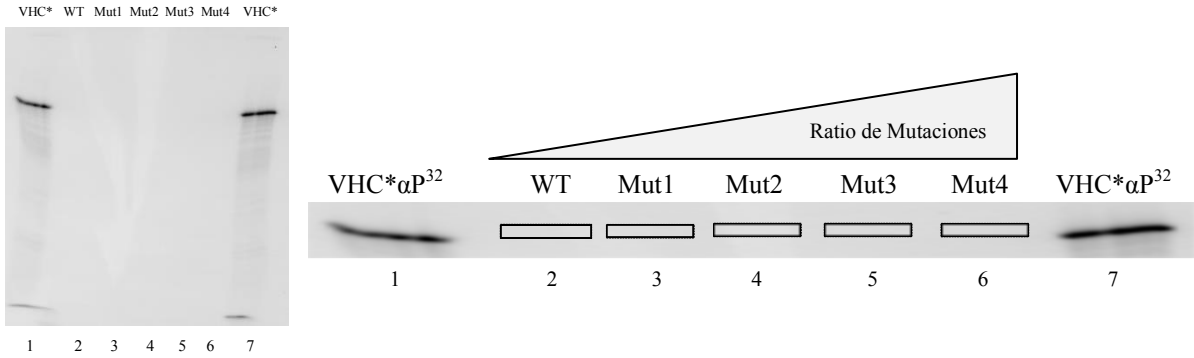


Figura R.1.17: Autoradiografía de un gel de poliácridamida para la purificación de los productos de las transcripciones no marcadas de las poblaciones de VHC1-542. A la izquierda gel completo y a la derecha detalle ampliado de las bandas producto. Los carriles 1 y 7 son los transcritos de ARN VHC*αGTP³² marcados inteARNmente que nos sirven de guía en el gel. Y los carriles 2, 3, 4, 5 y 6 contienen las bandas con los transcritos fríos de las poblaciones de VHC1-542 WT, Mut1, Mut2, Mut3 y Mut4 respectivamente, con ratios de mutación creciente. Los recuadros marcan la situación de las hipotéticas bandas producto de los ARN fríos.

En el panel A de la figura R1.17 se puede observar como la intensidad de la banda producto de la transcripción, decae acusadamente con las poblaciones a medida que aumenta su ratio de mutaciones. En las gráficas del panel B se han representado las cantidades de productos obtenidos de las transcripciones, a través de sus medias normalizadas respecto a la población wt, con su desviación estándar, frente a los ratios de mutaciones y a la entropía de Shannon normalizada de las poblaciones:

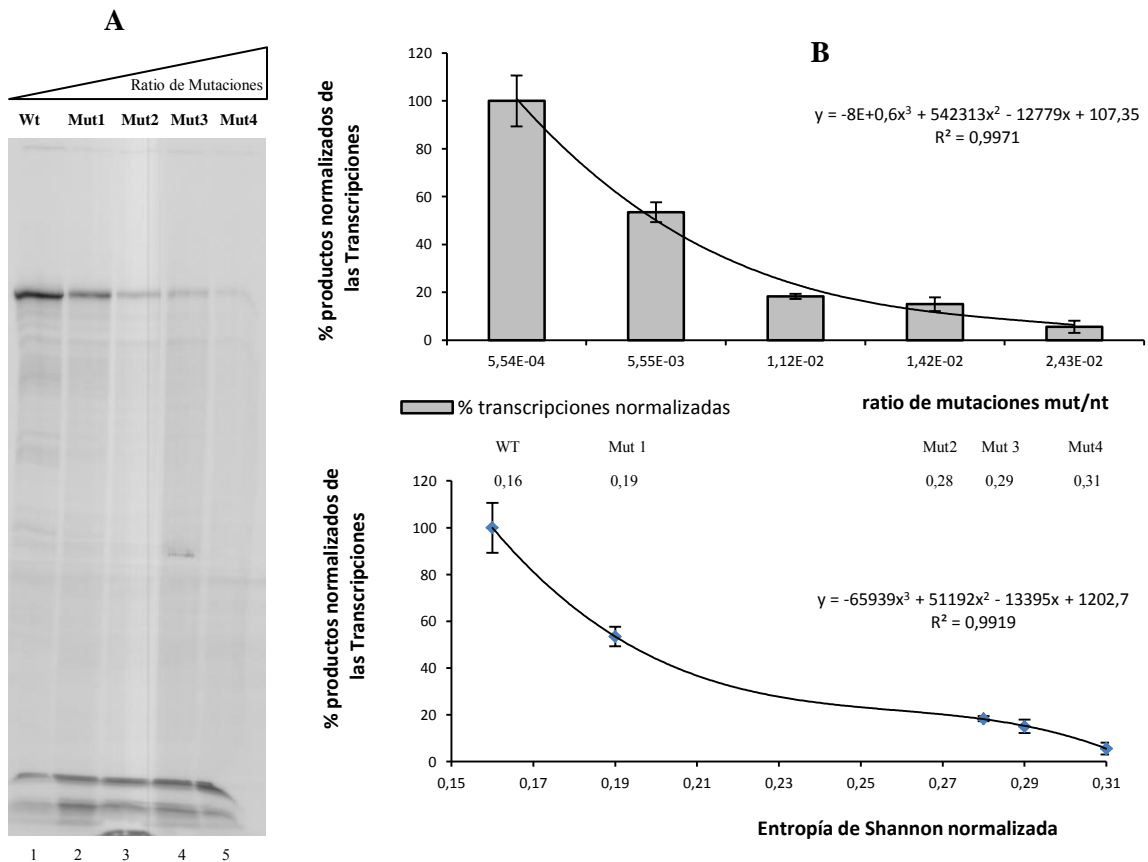


Figura R.1.18: Transcripciones del ARN de las poblaciones del VHC1-542 (in vitro) con ratios crecientes de mutaciones: A) Autoradiografía del gel de poliácridamida desnaturalizante al 4% con las distintas poblaciones de transcritos del VHC1-542. Carril 1 población wt, carriles 2 a 5 corresponden a las poblaciones mutantes 1 a 4 respectivamente. B) Representaciones gráficas de las medias normalizadas de los productos de la transcripción, con sus desviaciones estándar, arriba respecto a los índices de mutación y abajo respecto a la entropía de Shannon normalizada de cada una de las poblaciones.

Los resultados ofrecieron una caída superior al 90% de la cantidad de producto de la transcripción. El comportamiento fue análogo respecto al aumento de la complejidad expresada en función de la entropía de Shannon normalizada de las poblaciones. Dado que el promotor de la T7 estaba incluido en los fragmentos de partida que se han amplificado y mutagenizado por PCR, estos resultados sugieren que existe una importante dependencia de la integridad de las secuencias promotoras y su reconocimiento, con las mutaciones. Esto se analizará en profundidad en el apartado de la discusión de este trabajo.

R.1.4.b.- Poblaciones *in vitro* de ARNs control.

Se han construido otras poblaciones análogas a las obtenidas con el VHC1-542 *in vitro*, para diferentes moléculas de ARN control: el fragmento R.1.1 del fago T7 (60nts), el *pre-tARN^{tyr}* (107nts) y el elemento IRES del virus de la parálisis del grillo CrPV (1-198nts). Se han empleado para ello, los mismos procedimientos que se han seguido con el VHC y se ha asumido por tanto, que presentan similares ratios de mutaciones a los obtenidos para el VHC (M.3.6.c). En todos los casos se detectó un descenso en la eficiencia de síntesis de ARN similar al observado en las poblaciones de VHC, consistente con la introducción de mutaciones a nivel de la secuencia promotora.

R.2.- Efecto de la variabilidad sobre la unión miR122:VHC1-542.

Para obtener una medida del efecto que ejercen las mutaciones sobre la integridad de las estructuras primarias de la región del VHC1-542 (genotipo 1b), se han analizado dos zonas concretas de esta región, que se unen por complementariedad de bases al micro ARN miR122.

Este micro ARN miR122 (5'-UGGAGUGUGACAAAUGGUGUUUGU-3'), presenta siete nucleótidos de su secuencia, denominados "*seed sequence*" (5'-UGGAGUGUGA-), que encuentran complementariedad en dos zonas de la región VHC1-52, y cuya interacción se relaciona con una modulación de la replicación viral (Jopling, Yi et al. 2005, Jopling, Schutz et al. 2008, Diaz-Toledano, Ariza-Mateos et al. 2009, Roberts, Lewis et al. 2011).

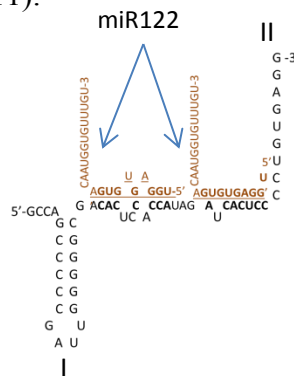


Figura R.1.19: Unión imperfecta del miR122 con la región VHC1-52: Representación de la unión de los dos miR122 por su complementariedad de secuencia en la región de simple cadena existente entre los dominios I y II del extremo 5'UTR del VHC1-52.

R.2.1.- Reacciones de unión entre el miR122* γ -P³² ATP y el VHC1-542.

Para realizar este estudio se empleó una estrategia de unión, entre un oligo sintético del ARN miR122 marcado radioactivamente en su extremo 5' y el ARN de la región del VHC1-542 sin marcar. La región VHC1-542 fue previamente desnaturalizada-renaturalizada térmicamente, para que se reestructure antes de la incubación con el micro ARN. El producto de la unión correspondiente a la unión del VHC1-542 y el mir122* γ -P³²ATP, se resolvió por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (ver material y métodos).

Se calibró el acoplamiento para situar el rango de la reacción de unión antes de la saturación. Para ello se procedió a incubar el miR122* γ -P³²ATP (2 ng/ μ L) con cantidades del VHC1-542, en relación molar de: 1:0,1, 1:0,3, 1:1, 1:3 y 1:10, durante 30 minutos a 37°C en buffer RNAsa P humana. La relación de saturación de la unión fue 1:1 mir122* γ -P³²ATP:VHC1-542, como se puede establecer de las autorradiografías presentadas en la figura R2.1:

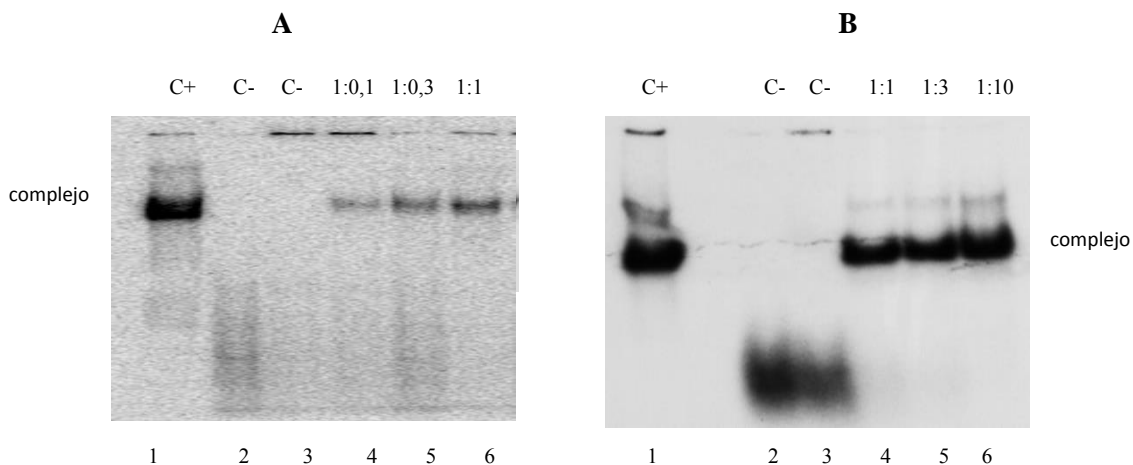


Figura R.2.1: Autorradiografía del gel de poliacrilamida en condiciones nativas, de la unión de miR122 γ -P³² ATP: VHC1-542. Los carriles 1 de ambos paneles son el control positivo con exceso de ARN VHC sin marcar (30ng/ μ L). Los carriles 2 y 3 son el control negativo sin VHC (solo el miR122 γ - P³²ATP), incubados en agua y en buffer P humana respectivamente. Los carriles del Panel A) 4, 5 y 6 corresponden a la banda producto de unión miR122 γ - P³² ATP:VHC1-542 en proporción 1:0.1, 1:0.3 y 1:1. Los carriles del Panel B) 4, 5 y 6 corresponden a los productos de unión miR122 γ - P³² ATP:VHC1-542 en proporción. 1:1, 1:3 y 1:10.

Establecido el límite de saturación de la unión a 1:1 molar, se procedió a incubar el miR122* γ - P³² ATP, a tres relaciones molares 1:0.1, 1:0.3 y 1:1, con cada una de las cinco poblaciones transcritas del VHC1-542 (de la wt a la Mut 4), durante 30 minutos a 37°C en buffer de la RNAsa P humana.

Las señales obtenidas, correspondientes al complejo de unión, se cuantificaron y se representó su porcentaje frente al ratio de mutaciones de cada una de las poblaciones. Los resultados de los experimentos, por triplicado para cada población, se presentan en la figura R2.2:

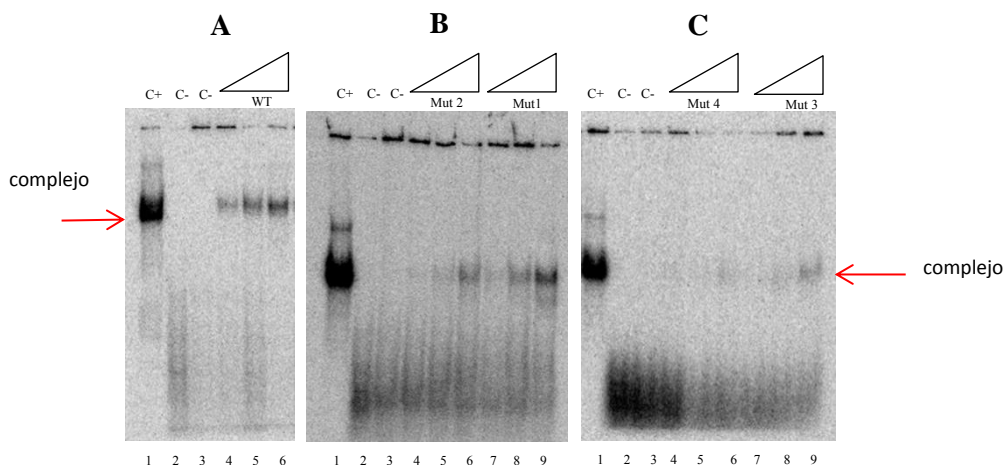


Figura R.2.2: Autoradiografías de electroforesis del gel de poliacrilamida en condiciones nativas de los acoplamientos VHC1-542-miR122 γ -P³² ATP. La banda producto de unión (flechas rojas) formada entre 2 ng/ μ L de miR122* γ -P³²ATP y diferentes proporciones 1:0.1, 1:0.3 y 1: 1 de VHC1-542 (sin marcar) y con las diferentes poblaciones: Panel A) Población Wt. Panel B) Poblaciones Mutantes 2 y Mutantes 1. Panel C) Poblaciones Mutantes 4 y Mutantes 3. Los carriles 1 son el control positivo con exceso de VHC1-542. Los carriles, 2 y 3 son los controles negativos de miR122 sin VHC, en agua y en Buffer P humana. Los carriles 4, 5, 6 y 7, 8, 9, corresponden a las relaciones moleculares 1:0.1, 1:0.3 y 1: 1 de VHC1-542.

Se han recortado en las imágenes de arriba de las autoradiografías de los gels de la figura R.2.2, las bandas correspondientes al complejo normalizadas frente a la banda del complejo del control positivo (carriles 1) y se han colocado a la misma altura en una sola imagen. El detalle de las autoradiografías se presenta a continuación en la figura R.2.3:

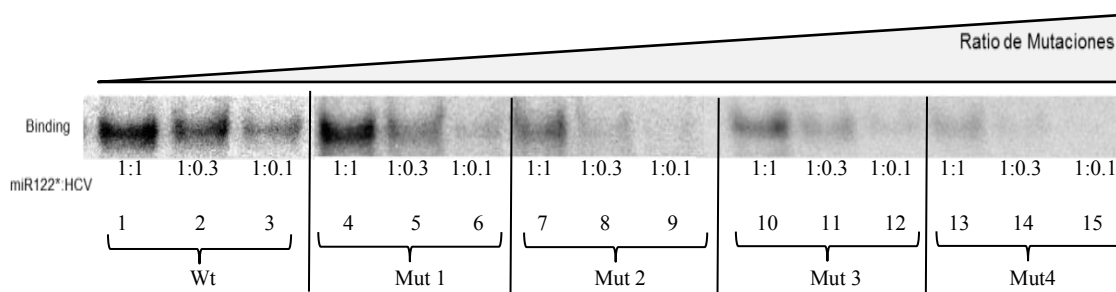


Figura R.2.3: Detalle ordenado de las autoradiografías de electroforesis del gel de poliacrilamida en condiciones nativas de los acoplamientos VHC1-542-miR122 γ -P³²ATP. Banda producto de unión de 2 ng/ μ L de miR122 γ -P³²ATP con las diferentes poblaciones de VHC1-542 (sin marcar), a diferentes proporciones. Los carriles 1, 2 y 3 son el control del ARN VHC-wt en proporción 1: 1, 1:0.3 y 1:0.1. Los carriles 4,5 y 6 son la población del mutante 1, los carriles 7,8 y 9 son la población del mutante 2, los carriles 10,11 y 12 son la población del mutante 3, los carriles 13,14 y 15 son la población del mutante 4, todos a similares proporciones.

En la imagen ampliada en detalle, de las bandas ordenadas correspondientes a la unión, se puede apreciar una clara disminución de la intensidad con el aumento del ratio de mutaciones. Esto apunta hacia una acusada dependencia de la formación del complejo con respecto el ratio de mutaciones, de manera similar en las tres relaciones de miR122:VHC1-542 empleadas.

Los resultados de los acoplamientos VHC1-542-miR122 γ -P³²ATP se cuantificaron y fueron representados por la media estadística normalizada respecto a la población wt, de la extensión de *la unión* para cada población de mutantes, como se presenta en la figura R.2.4:

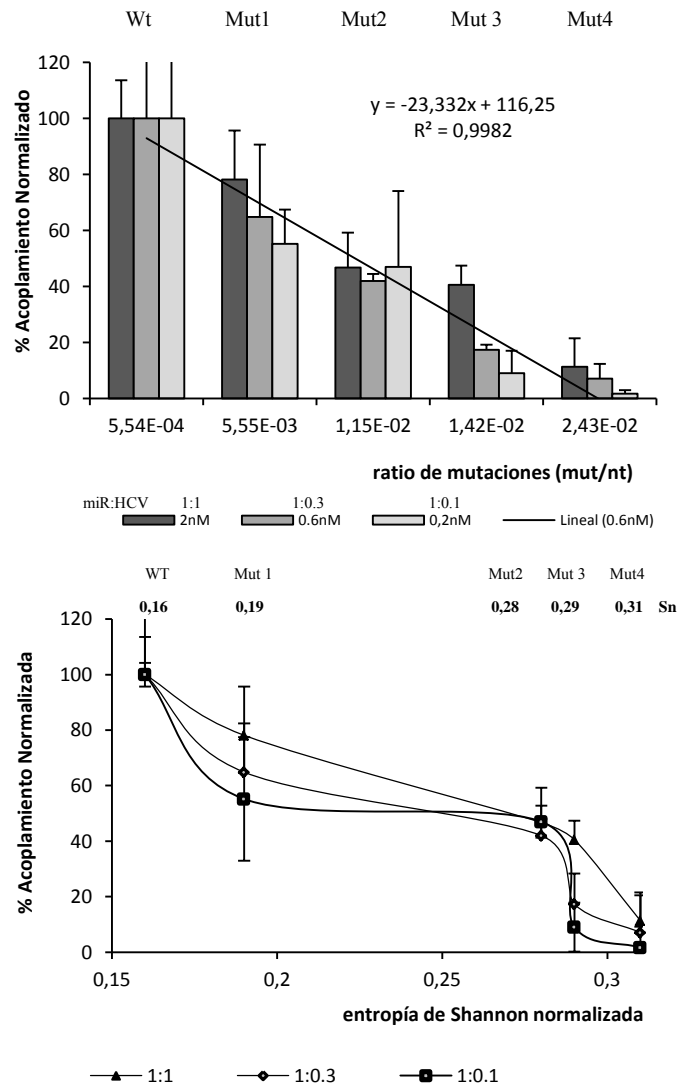


Figura R.2.3: Representación de la extensión de la unión del miR122 (2ng/ μ L) con el VHC1-542 *in vitro*: Representamos la media de tres experimentos independientes, con su desviación estándar, normalizada respecto a la población wt (100%) y para cada una de las poblaciones mutantes 1, 2, 3 y 4: Arriba representación vs ratio de mutación (mut/nt). Abajo representación vs entropía de Shannon normalizada.

Los resultados de la unión entre el miR122 y el VHC1-542, indican una caída superior al 90% con el aumento del ratio de mutaciones, desde la población Wt a la población más mutada, similares en las tres relaciones molares: en la saturación de la unión 1:1, en una relación intermedia 1:0.3 y en el límite de la detección 1:0,1 por debajo del cual no se alcanza a obtener señal de la unión. La representación gráfica obtenida corresponde a una dependencia lineal de la unión respecto al ratio de mutaciones y pone de manifiesto una caída brusca de la unión, en función de la entropía de Shannon normalizada entre las poblaciones de mutantes 2 y 3. Estos resultados indican en su conjunto, que la interacción con la secuencia del VHC es muy dependiente del ratio de mutaciones en la población y también de su complejidad poblacional, en especial entre las poblaciones de mutantes 2 y 3.

R.3.- Efecto de la variabilidad sobre la estructura secundaria de la región VHC1-542.

Se llevó a cabo el estudio sobre la estructura secundaria de la región del VHC1-542, empleando la actividad RNAsa III de *E. coli* que reconoce ARN de doble cadena. La actividad RNAsa III procesa los motivos de doble cadena presentes en la región del VHC1-542 de una longitud mínima de pares de bases. La actividad RNAsa III presenta un patrón de digestión, específico, ya caracterizado, sobre la estructura secundaria del VHC1-542 (figura R3.3). Para evaluar el efecto que ejerce la variabilidad sobre la integridad de estas estructuras secundarias, se ha comparado el efecto sobre el patrón de la digestión de las cuatro poblaciones de ARN, mutantes 1, 2, 3 y 4, con ratios de mutación creciente, respecto a la población wt.

R.3.1.- Control de la actividad RNAsa III de *Escherichia coli*.

En primer lugar, se probó la actividad de la RNAsa III de *E. coli* sobre un sustrato natural, el fragmento R1.1. Se trata de un ARN pequeño de doble hélice procedente de un transcrito del bacteriófago T7. Se empleó para ello las poblaciones de ARN, wt y mutantes con ratios de mutación crecientes, obtenidas previamente para el ARN R1.1 del fago (ver apartado R.1.4.b).

Se calibró la actividad RNAsa III de *E. coli* con las poblaciones análogas de mutantes de ratios de mutación creciente del ARN R1.1 (0.6 nM). Se obtuvo el patrón de corte previsto para la población wt que ha sido usado como control positivo (figura R3.1 panel A). El patrón de digestión como se presenta en el panel C de la figura R3.1, ofrece una caída de la intensidad de la banda producto con el aumento de ratio de mutación, y que sugiere que la actividad de la RNAsa III decrece con el aumento del ratio de mutación en la población.

En los carriles del 3 al 7 de la figura R3.1 panel C, se aprecia como decae la intensidad de la banda producto de corte para cada una de las poblaciones de mutantes 4, 3, 2 y 1 respecto a la población wt. La relación encontrada entre las cantidades de las respuestas de las diferentes poblaciones, corresponde al efecto que ejercen las mutaciones sobre la integridad de la estructura. Estos resultados permiten considerar el porcentaje de producto de la digestión como una medida del reconocimiento de la estructura secundaria del sustrato VHC1-542 por parte de la RNAsa III. El resultado que hemos obtenido indica una dependencia de las respuestas frente al ratio de mutaciones creciente.

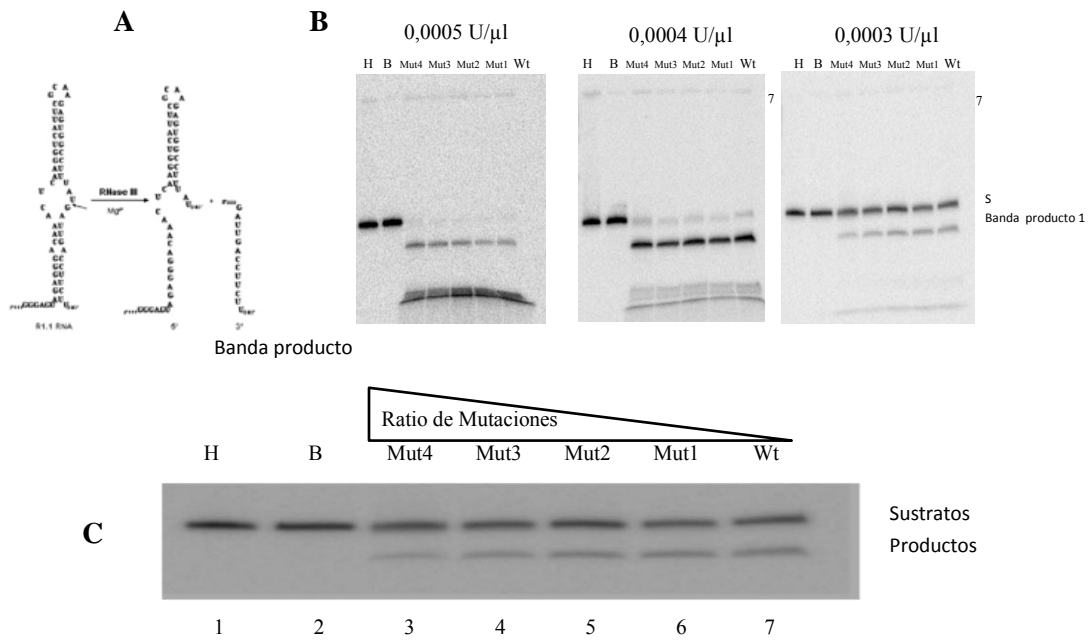


Figura R.3.1: Actividad RNAsa III sobre las poblaciones de ARN R.1.1 α -P³²GTP. Panel A: Esquema de la digestión de la actividad RNAsa III sobre el ARN R1.1. Panel B: Autoradiografías de las digestiones de la Ec-RNAsa III a 0,0005, 0,0004 y 0,0003 U/μL. Carril 1: población wt en agua e incubado en hielo. Carril 2: población wt incubada en buffer. Carriles 3-7: digestiones de Ec-RNAsa III sobre 0,6 nM final de las poblaciones de mutantes del ARN R1.1, en orden decreciente de ratio de mutaciones: 4, 3, 2, 1 y Wt. Panel C) Detalle de la autoradiografía del gel de electroforesis de acrilamida desnaturizante al 10%, que muestra la digestión de la Ec-RNAsa III sobre cada una de las poblaciones de R1.1 α -P³²GTP. Carril 1: transcrito en agua e incubado en hielo. Carril 2: transcrito incubado en buffer. Carriles 3-7: digestiones de 0,003 U/μL de Ec-RNAsa III sobre 0,6 nM final de las poblaciones de mutantes del ARN R1.1, en orden decreciente de ratio de mutaciones: 4, 3, 2, 1 y wt.

Los resultados de los experimentos por triplicado, se han cuantificado y se han representado gráficamente en la figura R3.2, en forma de las medias normalizadas respecto a la población Wt con su desviación estándar, del % de digestión de la Ec-RNAsa III, en función de los ratios de mutación y las entropías de Shannon normalizadas de cada población de ARN R1.1.

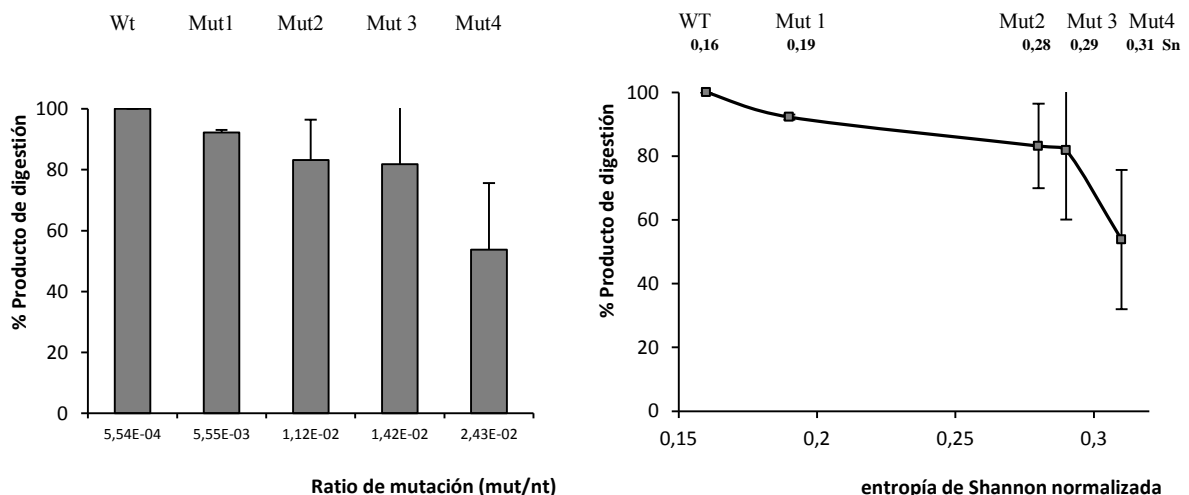


Figura R3.2: Representación gráfica del % de digestión de la Ec-RNAsa III sobre las poblaciones de R1.1. Representamos los resultados cuantificados de las digestiones de la Ec-RNAsa III sobre cada una de las poblaciones de ARN de R1.1, en función de sus ratios de mutación creciente. Los resultados son representados con la media normalizada de tres experimentos, respecto a la población wt y con su desviación estándar.

Se aprecia en la gráfica R3.2, que a medida que aumenta el ratio de mutación y la complejidad de la cuasiespecie con cada población, la cantidad de productos de la digestión disminuye aproximadamente un 10%, hasta la población de mutantes 2. Luego se mantiene constante, entre las poblaciones de mutantes 2 y 3, y se acentúa la caída de la digestión, más de un 30%, hacia la población de mutantes 4. La caída global observada es de hasta el 50% de aparición del producto de la digestión con el incremento del ratio de mutaciones

R.3.2.- Digestión con Ec-RNAsa III sobre el VHC1-542.

R.3.2.a.- Patrón de corte de la Ec-RNAsa III sobre el VHC1-542.

Se confirmó el patrón de la digestión *in vitro*, descrito para la actividad RNAsa III de *E.coli* (0,0001U/μL), sobre la población Wt del VHC1-542-³²P (0,6 nM) (Materiales y Métodos M.7.2.a). En la figura R3.3, se presenta el esquema del patrón de corte (wt) que constituye el control positivo para la interpretación de las digestiones de cada población de ratios de mutación creciente:

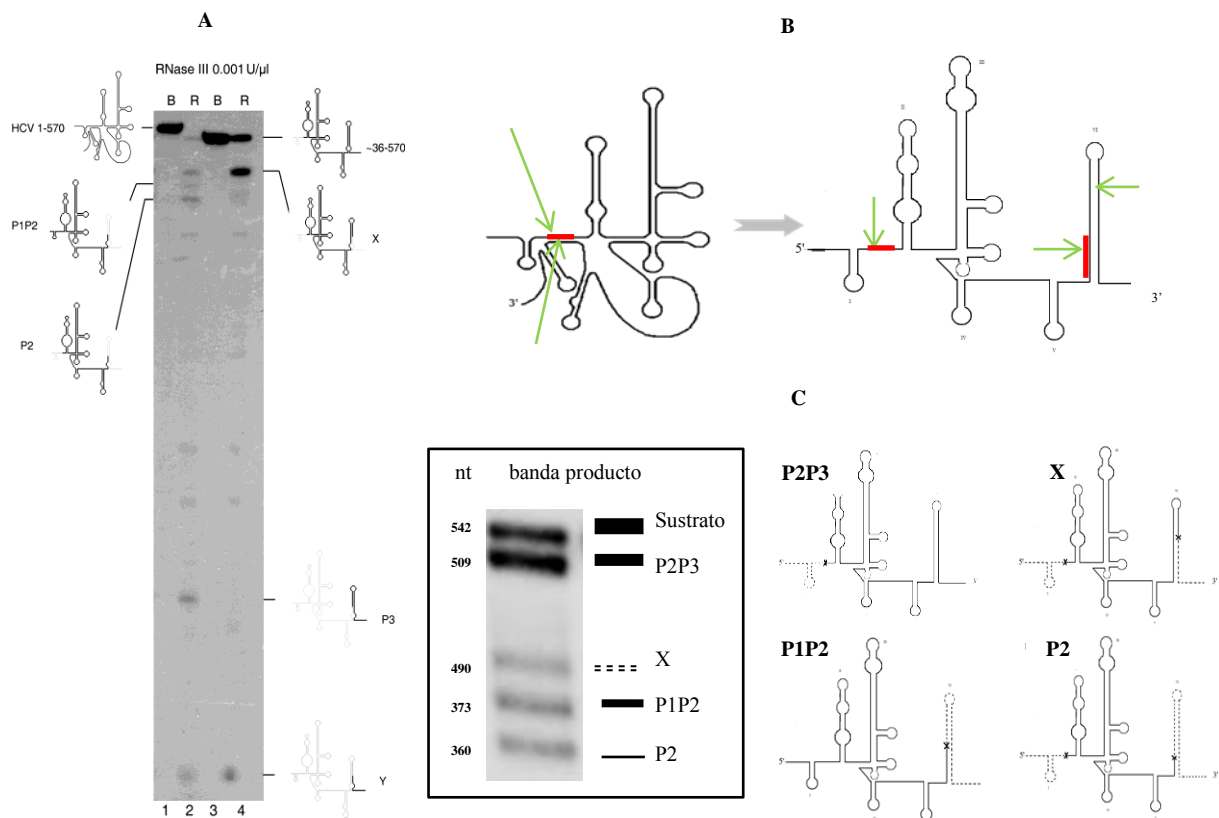


Figura 3.3: Esquema del patrón de digestión de la actividad Ec-RNAsa III sobre el VHC1-542. Panel A) Autorradiografía del gel con el patrón de digestión de la RNAsa III sobre el VHC1-570. Carriles: 1 ARN en buffer, 2 y 4 reacción, 3 banda producto P2P3. Publicado en *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 16. Panel B) Esquema de la estructura del VHC1-542 con la conformación cerrada y compatible con la situación de los puntos de corte producidos por la actividad EC-RNAsa III e indicados en verde. El rojo indica la zona complementaria que acopla y forma la *switch*. Panel C) Esquema detallado del patrón de productos de digestión resultante de los cortes primarios con Ec-RNAsa III, con el nucleótido identificado del corte y la denominación de la banda, junto a las estructuras de cada una de las bandas producto del corte primario con Ec-RNAsa III.

Las zonas flanqueantes del IRES se unen por complementariedad de bases formando una región de doble cadena. El *switch* intramolecular que forman estas interacciones a larga distancia LRA entre las zonas flanqueantes de la región y las estructuras implicadas en favorecerla, justifican las bandas producto del corte, dadas por la digestión de la RNasa III. El patrón de corte, por tanto va a depender de la integridad de esta interacción intramolecular. En la bibliografía está descrito el patrón de corte de la actividad Ec-RNasa III sobre la región VHC1-542. Este se explica por la presencia de dos formas conformacionales, una abierta y otra cerrada debida a la formación del switch, descritas previamente en el apartado de la Introducción (Beguiristain, Robertson et al. 2005, Diaz-Toledano, Ariza-Mateos et al. 2009)(Beguiristain, Robertson et al. 2005, Diaz-Toledano, Ariza-Mateos et al. 2009).

R.3.2.b.- Digestión de la Ec-RNasa III sobre las poblaciones del VHC1-542.

Se incubó la actividad calibrada de RNasa III de *E. coli*, sobre las cinco poblaciones *in vitro*, del ARN del VHC1-542 (wt, Mut 1, Mut 2, Mut 3 y Mut 4) marcadas internamente con P³². Se obtuvo el patrón de corte previsto para la población wild type junto a los de cada una de las poblaciones de ratios de mutación creciente. En la figura R3.5 se presentan los resultados:

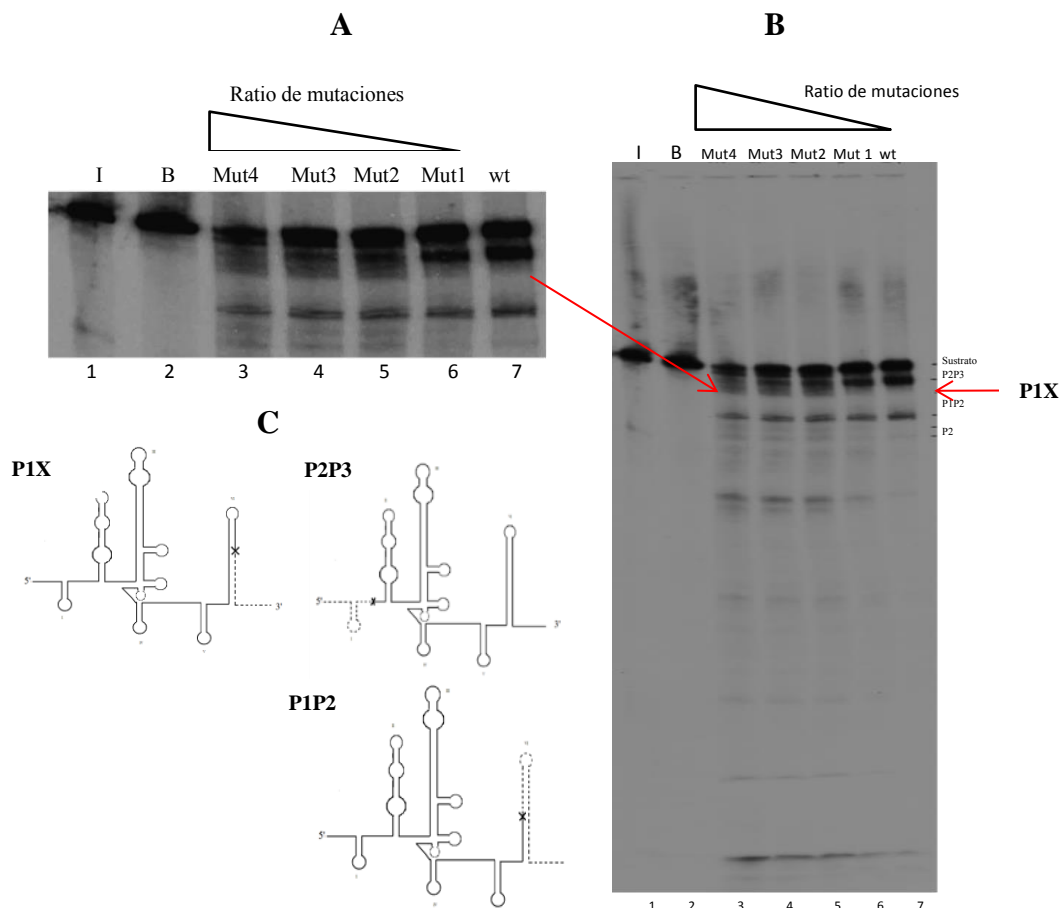


Figura R3.5: Actividad Ec-RNasa III sobre las poblaciones de VHC1-542. Panel A) Ampliación en detalle de la visualización de la autoradiografía de gel de electroforesis de poliacrilamida desnaturalizante al 4%, que muestra la digestión de la Ec-RNasa III sobre cada población de VHC1-542α-P³²GTP. Carril 1: I transcrito en agua incubado en hielo. Carril 2: B transcrito incubado en buffer. Carriles 3-7: digestiones de 0,0001 U/μL de Ec-RNasa III sobre 0,6 nM final de las poblaciones mutantes de VHC1-542 en orden decreciente de ratio de mutaciones: 4, 3, 2 y 1. Panel B) Radiografía del gel completo. Panel C) esquema de los principales productos de digestión del VHC1-542: bandas producto P2P3, P1X y P1P2.

En la figura R.3.5, se observa en el carril 7, que el producto mayoritario (P2P3) para la población wt corresponde al corte de la RNAsa III sobre la configuración cerrada. Se puede apreciar como esta banda producto disminuye con el aumento de mutaciones. Se aprecia también que con el aumento de mutaciones aumenta la digestión de la actividad enzimática, disminuye el sustrato sin digerir y se ven más bandas producto (cortes secundarios). Aparece una heterogeneidad de productos de digestión alternativos y la posible banda producto de corte P1X, que corresponde con la conformación abierta. Para verificar si este producto era la P1X, se marcaron los transcritos de la población de mutantes 1, en 5', a lo largo de toda la cadena y en 3' (ver Material y Métodos), y se incubaron con RNAsa III. Los productos de la digestión, se resolvieron en paralelo por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante. El resultado es presentado en la figura 3.6:

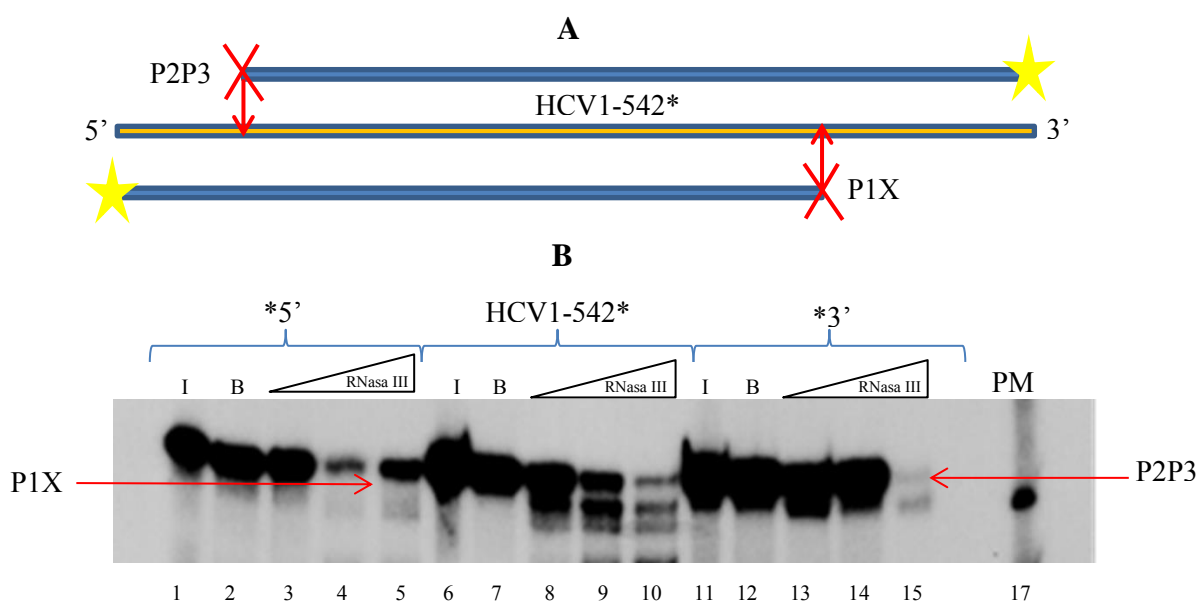


Figura R3.6: Radiografía del gel de electroforesis de la actividad Ec-RNasa III sobre la población de VHC1-542a/γ - P³²GTP/PCP mutantes 1. Autoradiografía de gel de electroforesis de poliacrilamida desnaturalizante al 4%, que muestra la digestión de la Ec-RNasa III sobre la población de VHC1-542 mutante 1 marcada en 5' (Carriles del 1 al 5), marcada internamente (Carriles del 6 al 10) y marcadas en 3' (carriles del 11 al 15). Los carriles 1, 6 y 11 son el transcrito en agua e incubado en hielo I. Los carriles 2, 7 y 12 son el transcrito incubado en buffer B. Los Carriles (3, 8 y 13), (4, 9 y 14) y (5, 10 y 15) muestran el patrón de digestión de (0,0001-0,0002-0,0003) U/μL de Ec-RNasa III respectivamente, sobre 0,6 nM final de las poblaciones mutantes de VHC1-542 (marcados en 5', internamente y en 3' respectivamente).

Como se esquematiza en el panel A, la banda producto de P1X, aparecía en la digestión de los transcritos marcados en 5' y la de la banda producto P2P3 en la digestión de los transcritos marcados en 3'. Esto significa que la digestión que produce la banda P1X está en el extremo 3', que es la que permite su visualización con el marcaje en 5', y la banda producto P2P3 que se visualiza con el marcaje en 3', ha de producirse por una digestión en el extremo 5'.

La banda producto que se supuso P1X, se obtuvo en mayor cantidad a través de una digestión en condiciones preparativas, se secuenció empleando técnicas de RACE (Material y Métodos M.8), confirmándose en el 100% de las lecturas (5/5), como la banda P1X correspondiente a la digestión en el nt G490, y que se explica por la digestión de la Ec-RNasa III, sobre la configuración abierta del VHC1-542. La aparición de esta banda con el aumento del ratio de mutaciones implica la pérdida de las interacciones LRA intramoleculares que forman el *switch* y señala a la coexistencia de los patrones de corte de la configuración cerrada y una serie de formas abiertas alternativas.

Los datos anteriores se han cuantificado y representado, como medias normalizadas respecto a la población wt, con su desviación estándar del % de digestión total (figura R3.8). Se han presentado respecto a los ratios de mutación y a la entropía de Shannon normalizada. También se representó el % de banda producto P2P3 (configuración cerrada) y banda producto P1X (configuración abierta).

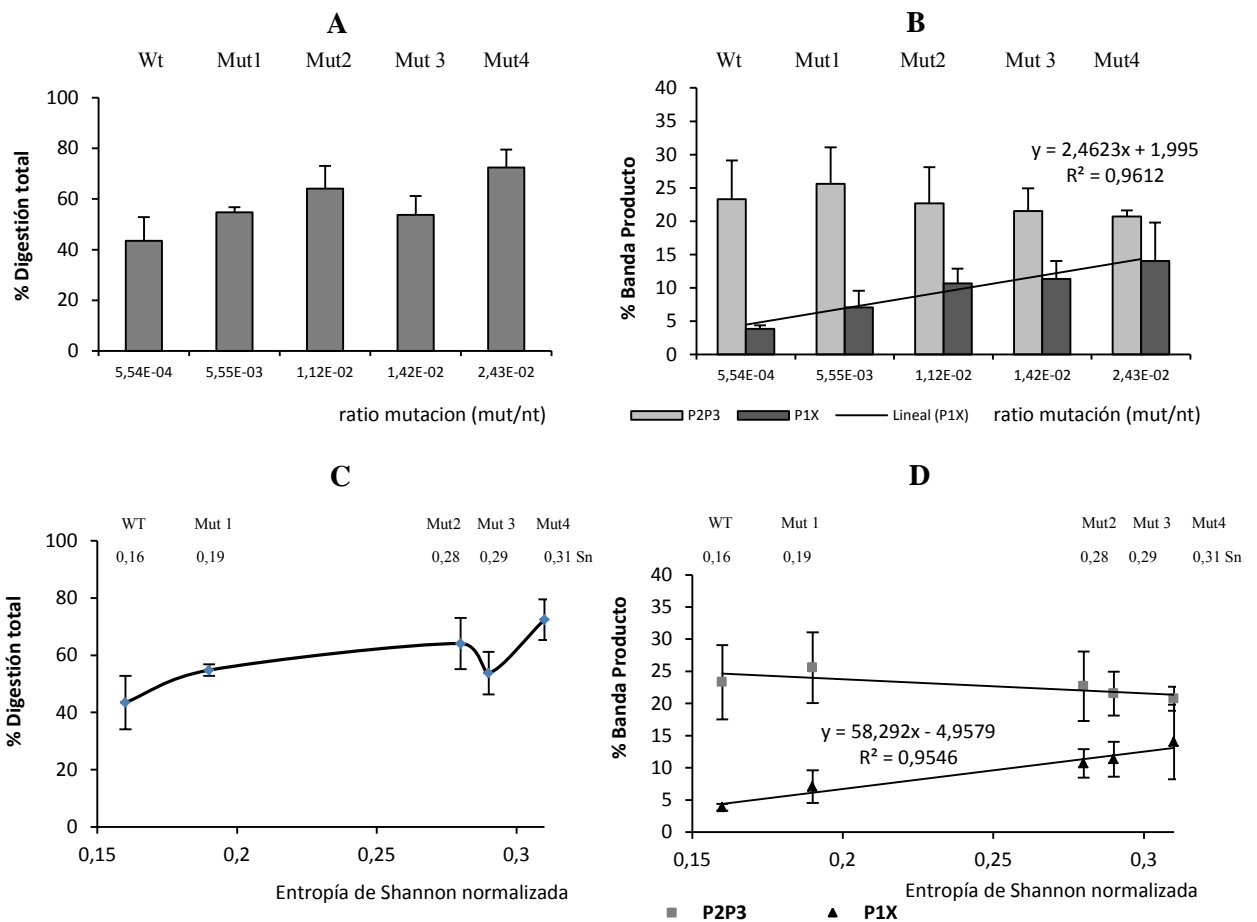


Figura R3.8: Gráficas de la actividad Ec-RNasa III frente las poblaciones de VHC1-542. En las dos gráficas superiores A y B, se representan los resultados en función de los ratios de mutación de cada una de las poblaciones de mutantes y abajo en las gráficas C y D, frente a las entropías de Shannon normalizada de las poblaciones. En las dos gráficas a la izquierda: % normalizado de la digestión total de la actividad Ec-RNasa III sobre región IRES-VHC1-542. En las dos gráficas de la derecha: % de las bandas producto P2P3 y P1X.

Los resultados obtenidos muestran un aumento en la digestión de la Ec-RNAsa III con el aumento del ratio de mutaciones hasta población de mutantes 2, bajan en la población de mutantes 3 y vuelve de nuevo a subir en la población de mutantes 4, alcanzando una digestión superior al 70% . Esto supone un incremento de la digestión aproximadamente de un 30% de la población más mutada respecto a la wt. La gráfica respecto de la entropía de Shannon, presenta un perfil similar, que resalta de una manera más brusca, la caída de la digestión entre las entropías de las poblaciones de mutantes 2 y 3. Respecto a las bandas producto, la P2P3 (conformación cerrada) se mantiene constante en torno al 20% con el incremento de las mutaciones. Mientras que la banda producto PIX (conformación abierta) crece de manera lineal en torno al 15% con la población de mutantes 4, respecto al ratio de mutaciones y también respecto a la entropía de Shannon.

Estos resultados en su conjunto señalan un cambio conformacional de la estructura cerrada hacia formas abiertas alternativas, como consecuencia del incremento del ratio de mutaciones. Se aprecia la coexistencia de las dos conformaciones y por tanto de los dos patrones de digestión, a partir de la población mut 1. Esto podría explicar el hecho de que la digestión total aumente al aumentar el número de formas variantes de las conformaciones, cerradas y abiertas. En resumen, con el aumento de las mutaciones ha de aumentar el número de sustratos reconocidos por la RNasa III y por tanto las posibilidades de digestión en la población de transcritos del VHC1-542.

R.4.- Estudio Conformacional del VHC vs el ratio de mutaciones.

La región del VHC1-542, presenta un equilibrio conformacional ya caracterizado (Beguiristain, Robertson et al. 2005). Se ha descrito este cambio conformacional inducido por la actividad del micro ARN miR122, al unirse por complementariedad de secuencia, en la zona de formación del *switch* (Diaz-Toledano, Ariza-Mateos et al. 2009). Los resultados experimentales anteriores, obtenidos en los ensayos con la actividad RNAsa III pusieron de manifiesto un desplazamiento del equilibrio conformacional debido al efecto de la variabilidad.

Para estudiar el efecto que tiene el incremento del ratio de mutaciones sobre este equilibrio conformacional, se ha empleado la actividad RNAsa III sobre la región del VHC1-542 incubada con el micro ARN miR122, que compite con la formación del *switch* y promueve la apertura de la conformación cerrada. Estos experimentos se llevaron a cabo de manera análoga a los anteriores, sobre todas las poblaciones de mutantes con ratios de mutación creciente frente a la Wt. Los resultados que obtuvimos al incubar con el miR122 y digerir con la actividad RNAsa III, se han comparado con los que habíamos obtenido anteriormente sin incubar con el miR122 (apartado de los resultados R.3). Los resultados previos nos indican que la región del VHC1-542 presenta un patrón diferente de digestión con la Ec-RNAsa III, en conformación cerrada o en conformación abierta (Diaz-Toledano, Ariza-Mateos et al. 2009). Como vimos en la sección R.3 de los resultados de este trabajo, la banda mayoritaria obtenida de la

digestión con Ec-RNasa III sobre la conformación cerrada, corresponde a la banda identificada P2P3 y que sitúa la digestión en la zona de formación del *switch* (zona de interacciones a larga distancia, *long range ARN interactions LRA*) entre los flancos de la región. Cuando incubamos la región VHC1-542 con el miR122, este compete para unirse por complementariedad en la misma zona donde se forma el *switch*, rompiendo las *LRA* y promoviendo una conformación abierta. La actividad de la Ec-RNasa III, con la conformación abierta va a ofrecer un patrón diferente, pues la banda P2P3 ya no se puede producir y la banda producto mayoritario aparece con una digestión situada en la posición G-490, que se corresponde con la banda P1X. Este esquema de equilibrio se presenta en la figura R4.1:

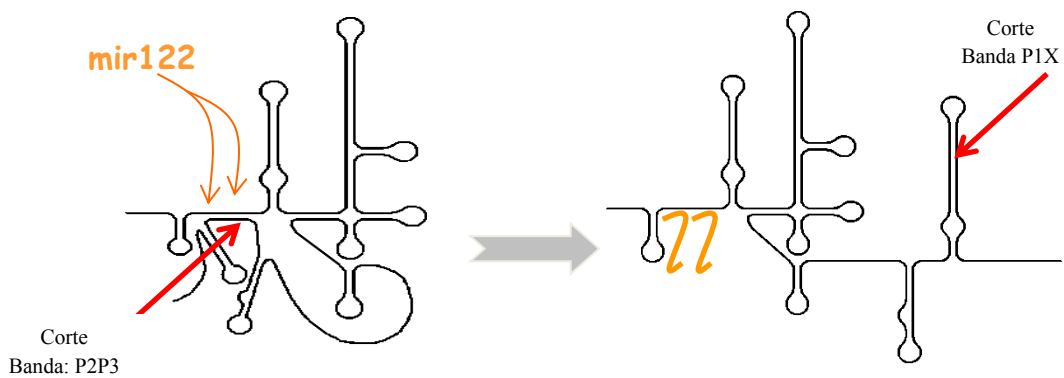


Figura 4.1: Conformación del IRES del VHC1-542 con los cortes principales de la Ec-RNasa III. Esquema de la estructura del VHC1-542 con la conformación compatible con la situación de los puntos de corte producidos por la actividad EC-RNasa III e indicados en rojo, en la zona complementaria que se acopla y forma el *switch* y en la situación de la conformación abierta, inducida por el miR122.

El patrón de la digestión con Ec-RNasa III sobre la región VHC1-542 sin incubarse con el miR122, en conformación cerrada, se presenta en detalle en el punto R.3.2.b del apartado de resultados de este trabajo. El patrón de la digestión con Ec-RNasa III sobre la estructura VHC1-542 incubado con el miR122, en conformación abierta se presenta a continuación en la figura R4.2:

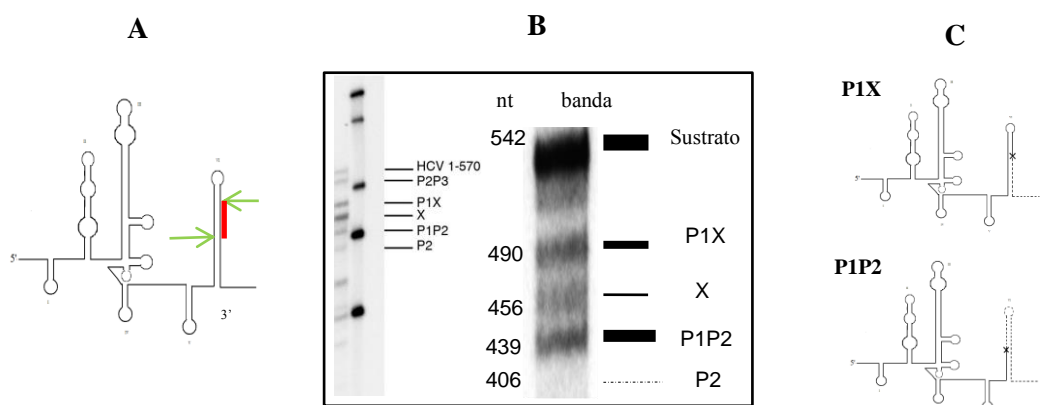


Figura 4.2: Patrón de cortes primarios de la Actividad Ec-RNasa III sobre el IRES del VHC1-542. A) Esquema de la estructura del VHC1-542, con la situación de los puntos de corte producidos por la actividad EC-RNasa III, en conformación abierta. B) Esquema del patrón de bandas electroforéticas resultante de los cortes primarios con Ec-RNasa III, con el nucleótido identificado del corte y la denominación de la banda. C) Esquema de las estructuras de las principales bandas producto del corte primario con Ec-RNasa III sobre la conformación abierta.

Se repitieron los experimentos de digestión con Ec-RNAsa III, tal y como se han presentado en el punto R.3.2, sobre las poblaciones del VHC1-542 de ratios de mutación creciente, con exceso molar de miR122 (ver Material y Métodos M.7.2). A continuación en la figura R6.3 se presentan autorradiografías de los geles de poliacrilamida donde se han resuelto los productos de digestión. En el panel A podemos ver el resultado de los experimentos sin incubar con el miR122 y en el panel B el resultado de los experimentos incubados con miR122:

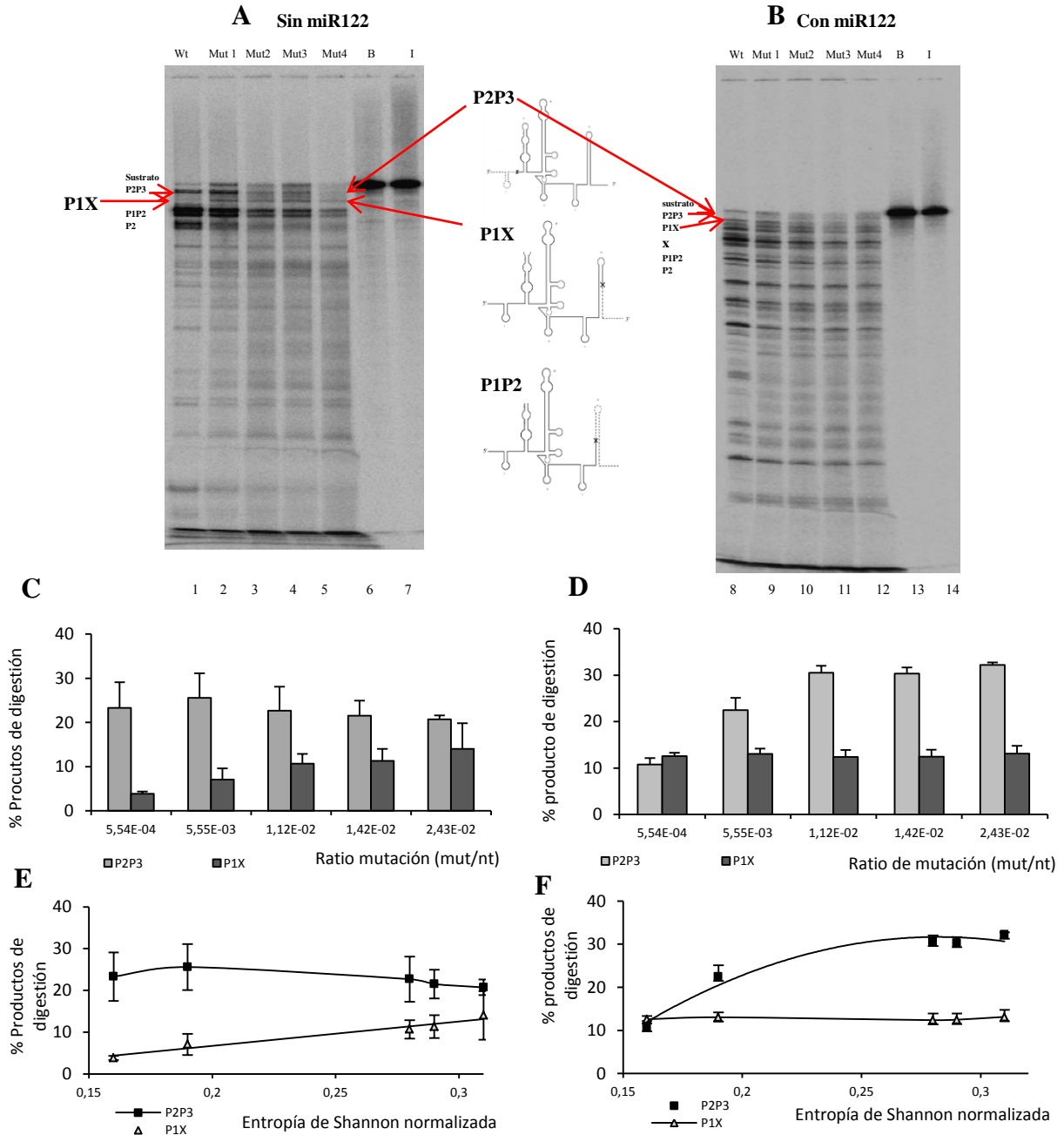


Figura R.4.3: Resultados de los experimentos de la actividad Ec-RNAsa III sobre las poblaciones de VHC1-542 con y sin miR122: Autorradiografías de los geles de poliacrilamida desnaturalizante al 4%, que muestra la digestión de la Ec-RNAsa III sobre cada población de VHC1-542a-P³²GTP. **A) e Izquierda:** Sin incubar con el miR122. **B) y Derecha:** Incubados con miR122. Carriles 1-5 y 6-10 (sin y con miR122): muestran los productos de digestión de 0,0001 U/μL de Ec-RNAsa III sobre 0,6 nM final de las poblaciones mutantes de VHC1-542 en orden creciente de ratio de mutaciones. En ambos casos se sitúan a la izquierda del panel de la autorradiografía las principales bandas producto, con el nombre empleado en su caracterización. **Gráficas C y D:** representación de las medias de tres experimentos con su desviación estándar de los productos de la digestión, P2P3 y P1X frente al ratio de mutaciones **Gráficas E y F:** representación frente a la entropía de Shannon normalizada.

En las autoradiografías de los geles de la figura R4.3 se aprecia como evolucionan las principales bandas producto de la digestión con Ec-RNAsa III, correspondientes a las formas abierta y cerrada del VHC1-542 en función del ratio de mutaciones. La banda producto P2P3 (forma cerrada), mayoritaria cuando el VHC1-542 no está incubado con miR122 (a la izquierda) tiende a disminuir al aumentar el ratio de mutaciones, pero sin embargo se incrementa cuando se ha incubado con el miR122 (a la derecha). La banda producto P1X (forma abierta) responde de forma contraria a la P2P3, sugiriendo un desplazamiento del equilibrio conformacional debido al efecto de la variabilidad sobre las estructuras.

Los resultados de los experimentos se han cuantificado y representado de la misma forma que en las series anteriores, frente al ratio de mutación y frente a la entropía de Shannon normalizada de la población. Los resultados de la digestión con RNAsa III sin incubarse con miR122 (a la izquierda), muestran que la banda producto P1X aumenta de manera lineal con cada población hasta alcanzar aproximadamente un 13%, mientras la banda producto P2P3 decrece pero manteniéndose en una proporción constante en torno al 20%. Los resultados de las digestiones cuando las poblaciones del VHC1-542 se incuban con el miR122 (a la derecha), muestran que la banda producto mayoritario P1X, mantiene una proporción constante en torno al 13% y la banda producto P2P3 aumenta hasta un 30% desde la población wt a la más mutada.

A continuación, en la figura R4.4 se presentan los valores de digestión total de la Ec-RNAsa III sobre el VHC1-542, con y sin incubarse con el mir122. La extensión de la digestión se comporta en ambos casos de forma similar, señalando un aumento de la cantidad de sustratos reconocibles con el incremento del ratio de mutaciones, y sugiriendo que la capacidad de la actividad RNAsa III no se ve afectada por el cambio conformacional que induce el miR122 en el sustrato. La representación frente a la entropía de Shannon resalta la caída en la digestión entre las poblaciones de mutantes 2 y 3, señalando el punto de viraje del equilibrio.

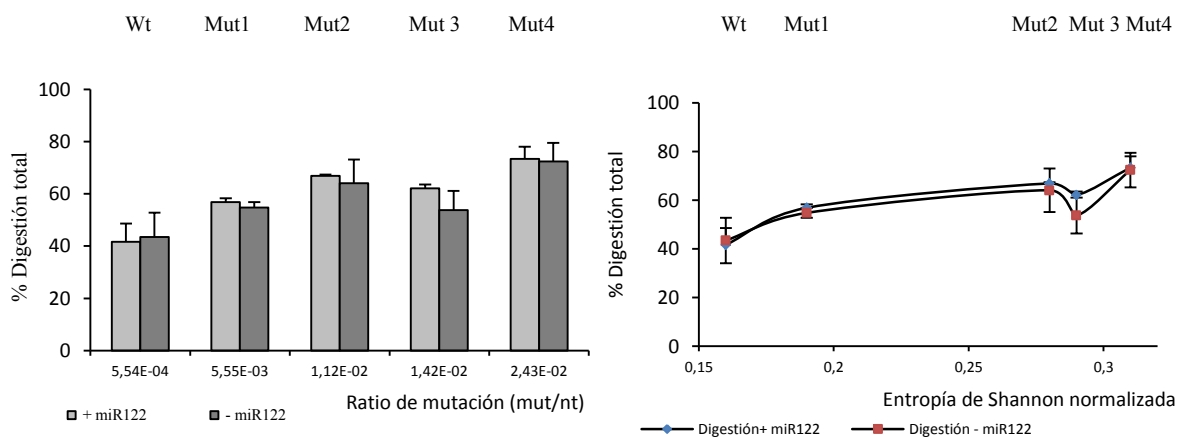


Figura R4.4: Digestión total de las poblaciones de VHC1-542 con y sin miR122 con la actividad Ec-RNAsa III. Media de tres experimentos con su desviación estándar del % de la digestión total de la región VHC1-542 marcada internamente con ³²P, con la actividad Ec-RNAsa III (0,0001 U/μL). Representadas a la izquierda frente al ratio de mutación creciente y a la derecha frente a la entropía de Shannon normalizada de cada una de las poblaciones de mutantes. En las dos gráficas la comparativa muestra los resultados sin miR122 y con miR122.

R.5.- Efecto de la variabilidad sobre las fracciones de cadena sencilla y doble en el VHC1-542.

Se realizaron experimentos de evaluación de las fracciones de la cadena sencilla y doble presentes en la región del VHC1-542, frente a la variabilidad de las poblaciones de mutantes. Para ello se han utilizado las actividades de las endorribonucleasas T1 y V1 (ver Material y Métodos M.7.2). La actividad RNasa T1 corta simple cadena, catalizando la hidrólisis en 3' del enlace fosfodiéster en las posiciones del esqueleto que presentan guaninas desapareadas y en menor medida de adeninas. Por su parte la actividad RNasa V1 que corta motivos de doble cadena de ARN de hasta dos pares de bases consecutivas. Los resultados obtenidos de ambas actividades RNasa T1 y V1 previamente calibradas, sobre las poblaciones mutantes, se cuantificaron y representaron. Las gráficas se presentan en la figura R5.1:

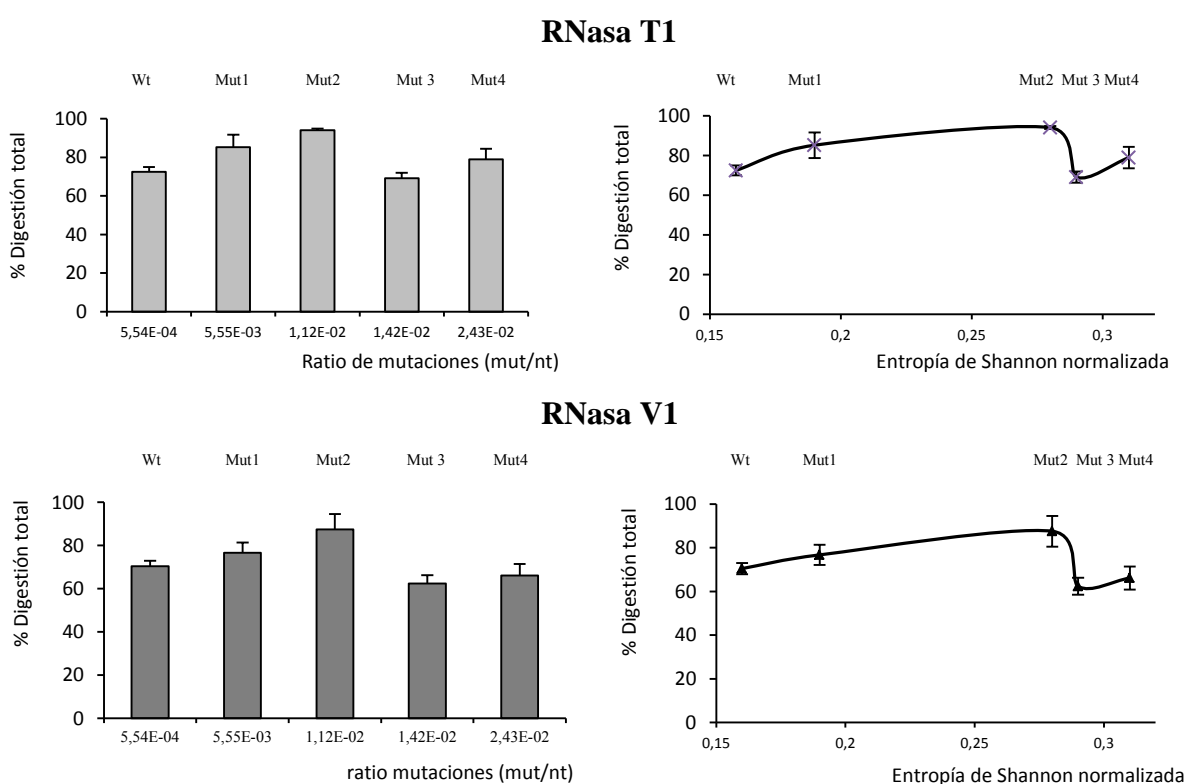


Figura R5.1: Digestión total de las actividades RNasa T1 y V1 frente a las poblaciones de VHC1-542. Arriba: Resultados de la RNasa T1 (0,0003 U/ μ L). Abajo de la RNasa V1 (0,0003 U/ μ L). Media de tres repeticiones con su desviación estandar del porcentaje de la digestión total de la actividad sobre la región VHC1-542. Representada en función de los ratios de mutación (a la izquierda) y frente a los valores de entropía de Shannon normalizada (a la derecha) de las poblaciones de mutantes.

Los resultados de ambas actividades fueron análogos, mostrando un incremento de digestión total de hasta un 20% para la RNasa T1 y de un 15% para la RNasa V1, hacia la población de mutaciones 2. Luego baja, como se muestra claramente respecto a los valores de entropía de Shannon. Se observa una disminución de aproximadamente un 25% en la población de mutantes 3, tras la que vuelve a subir un 10% para la población de mutantes 4, pero quedando por debajo del tercer punto de mutaciones para la RNasaT1 y quedando igual que en la población wt para la RNasa V1. Estos resultados se analizarán en profundidad en la discusión de esta Tesis Doctoral.

R.6.- Estudio Conformacional del VHC1-542.

En primer lugar, se analizó la dependencia de las dos conformaciones de la región del VHC1-542 con el ion Mg^{2+} . Se han empleado concentraciones crecientes de ion Mg^{2+} de 0 a 10 mM en el buffer de trabajo (Buffer de la RNasa P humana 10 mM Mg^{2+}), con la población wt y resolviendo los productos por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. En la figura R6.1 se presenta la autorradiografía de los experimentos, donde se observa que la concentración de ion Mg^{2+} favorece la conformación cerrada, hasta constituir más de un 60% a 10 mM Mg^{2+} .

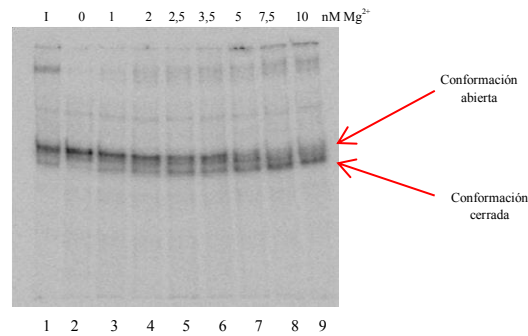


Figura R6.1: Autorradiografía de gel de poliacrilamida en condiciones nativas: Resolución de las dos conformaciones de la región VHC1-542 para la población wt en función de la concentración de Mg^{2+} . El carril 1: I es el transcrito en agua incubado en hielo. Desde el carril 2 hasta el carril 9: se muestra la resolución de las conformaciones presentes con la concentración de Mg^{2+} desde 0 mM (con EDTA) a 10 mM Mg^{2+} en el buffer, respectivamente.

Se analizaron las dos conformaciones de la región del VHC1-542 (cerrada y abierta) a 10 mM Mg^{2+} de las poblaciones de mutantes. Los resultados se cuantificaron, se han representado, y se presentan en la figura R6.2:

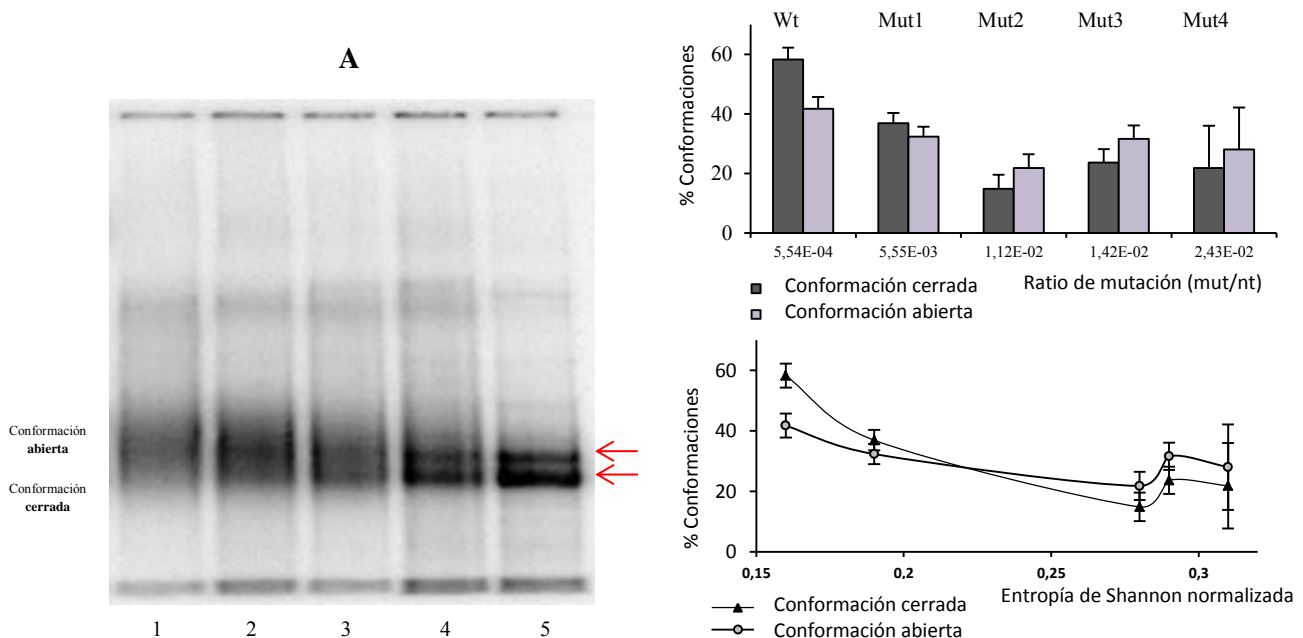


Figura R6.2: Resolución de las conformaciones de las poblaciones de VHC1-542 en gel de poliacrilamida en condiciones nativas. A) Autorradiografía del gel de poliacrilamida en condiciones nativas de las poblaciones de mutantes del VHC1-542. Del Carril 1 al carril 5, se muestran los resultados de la población wt a la más mutada. Gráficas a la derecha: Arriba representación de los % de cada conformación de la región VHC1-542, como medias de tres experimentos con su desviación estándar, representadas en función de los ratios de mutación y abajo en función de la entropía de Shannon, de cada una de las poblaciones de mutantes.

Los resultados muestran que la fracción de conformación, cerrada, decrece del 60% en la población wt (carril 5 del gel), hasta el 15% en la población de mutantes 2 (carril 3 del gel). La fracción de conformación abierta cae del 40% en la población wt al 25% hacia el tercer punto (población de mutantes 2).

En la representación frente a la entropía de Shannon, se aprecia como entre las poblaciones de mutantes 2 y 3 se invierte el equilibrio conformacional de la cuasiespecie. En el tercer punto correspondiente a la población de mutantes 2, la fracción de conformación abierta en la población está por encima de la fracción de conformación cerrada. A partir de este punto, y observando la autorradiografía, podemos asumir que existe una heterogeneidad conformacional ya que no se aprecia ninguna banda producto bien definida.

R.7- Estudio del efecto de la geneticina en la región VHC1-542 sobre la actividad RNAsa III.

Se ha estudiado el efecto de la variabilidad sobre la integridad de las estructuras de la región de ARN del virus de la hepatitis C (VHC1-542) y cómo se ve afectada la interacción que ésta región presenta con la geneticina (Ariza-Mateos, Diaz-Toledano et al. 2015). Se ha tratado de determinar si las perturbaciones que la variabilidad produce sobre el plegamiento de esta región, presentan algún tipo de efecto sobre la actividad del antibiótico. Para ello, se han ensayado las estructuras conocidas de doble cadena, que son digeridas específicamente con la RNasa III de *E. coli* (0,0003 U/l) sobre las poblaciones de mutantes del VHC1-542 con el ratio de variabilidad creciente, en presencia o ausencia de la geneticina (500 mg/ml). También se han estudiado con y sin incubar el ARN con el micro ARN miR-122 (15 nM), modificando el equilibrio conformacional del sitio de entrada interna al ribosoma (IRES) de una conformación cerrada (C) a una abierta (O).

Primero se descartó un posible efecto de la geneticina sobre la actividad de la RNasa III, ensayando la actividad sobre un sustrato estándar, un dsARN obtenido a partir del virus de la levadura LA, que presenta un genoma de doble cadena perfecta, en presencia y ausencia de la geneticina para evaluar si ésta droga interacciona con los motivos de dsARN, interfiriendo su reconocimiento por la RNAsa III. Se comprobó que no hubo ninguna diferencia sobre la actividad de la RNAsa III confirmando que la droga no produce ningún efecto directo sobre la actividad (figura R7.1).

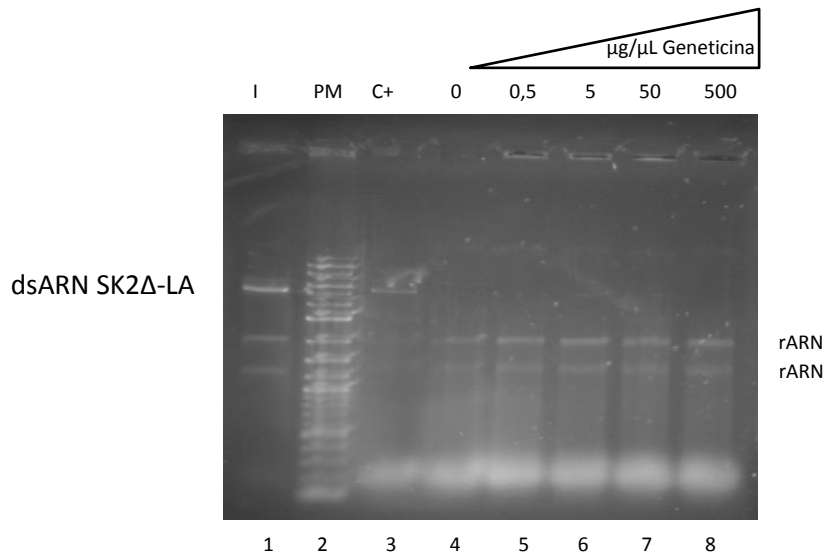


Figura R7.1: Digestión de la Ec-RNasa III sobre dsARN SK2Δ-LA: Imagen del gel de agarosa al 1%, de resolución de los productos de digestión de la actividad Ec-RNasa III sobre el dsARN SK2Δ-LA (130ng/ µL). En el gel se muestra el control de digestión sin antibiótico en el carril 1. En el carril 2 se colocó un patrón de pesos moleculares. En el carril 3 el dsARN de SK2 Δ-LA incubado en buffer. Y en los carriles del 4 al 8 se muestra la reacción con cantidades crecientes de geneticina de 0 a 500 µg/µL.

Después se ha ensayado la actividad RNasa III con las poblaciones de mutantes del ARN del VHC1-542, en presencia y ausencia de la geneticina. La comparación de los resultados en ausencia o presencia de la droga, ha permitido evaluar el efecto de la interacción de la geneticina con la integridad de los motivos estructurales de doble cadena. En la figura R7.2 se muestran las autorradiografías de los experimentos de la RNasa III vs mutantes con y sin miR-122, en ambos casos, con y sin el tratamiento con geneticina. Los experimentos se han representado como las medias de tres réplicas con su desviación estándar, de los productos de la digestión con RNasa III vs el ratio de mutaciones en cada población. En las autorradiografías de los experimentos sin incubar con el miR-122, se observa que el incremento del ratio de mutaciones provoca la aparición del patrón de digestión específico de la conformación abierta, apareciendo la banda producto de digestión P1X (nt490). Al comparar las digestiones con RNasa III sin tratar con las tratadas con geneticina, se observa un aumento de la intensidad de los sustratos y una disminución de la intensidad del resto de bandas, efecto de una clara inhibición sobre la digestión en todas las poblaciones. En las radiografías de los experimentos incubados con el miR-122, se observa también un claro incremento de la intensidad de las bandas de los sustratos que señala el efecto de inhibición de la geneticina sobre la actividad RNasa III. Este incremento del sustrato es más acentuado en las reacciones sin incubar con miR-122, donde la conformación mayoritaria es la cerrada. El efecto inhibitorio de la geneticina se mantiene con el aumento del ratio de mutaciones. Las gráficas inferiores de la figura R7.2 muestran que el tratamiento con geneticina hace aumentar la concentración de la banda producto P2P3, especialmente en las reacciones sin miR-122, y sobre todo en la población wt. En las poblaciones de mutantes se mantiene constante este efecto de la droga sobre la banda producto P2P3 en todas por igual pero en menor cantidad. En los experimentos con miR-122 la diferencia en la cantidad de banda producto P2P3 es de un ligero incremento con el tratamiento

con geneticina. La banda producto P1X presenta un pequeño incremento con el tratamiento con geneticina en las poblaciones wt, sobre todo en la incubada con miR-122, después las diferencias son mínimas.

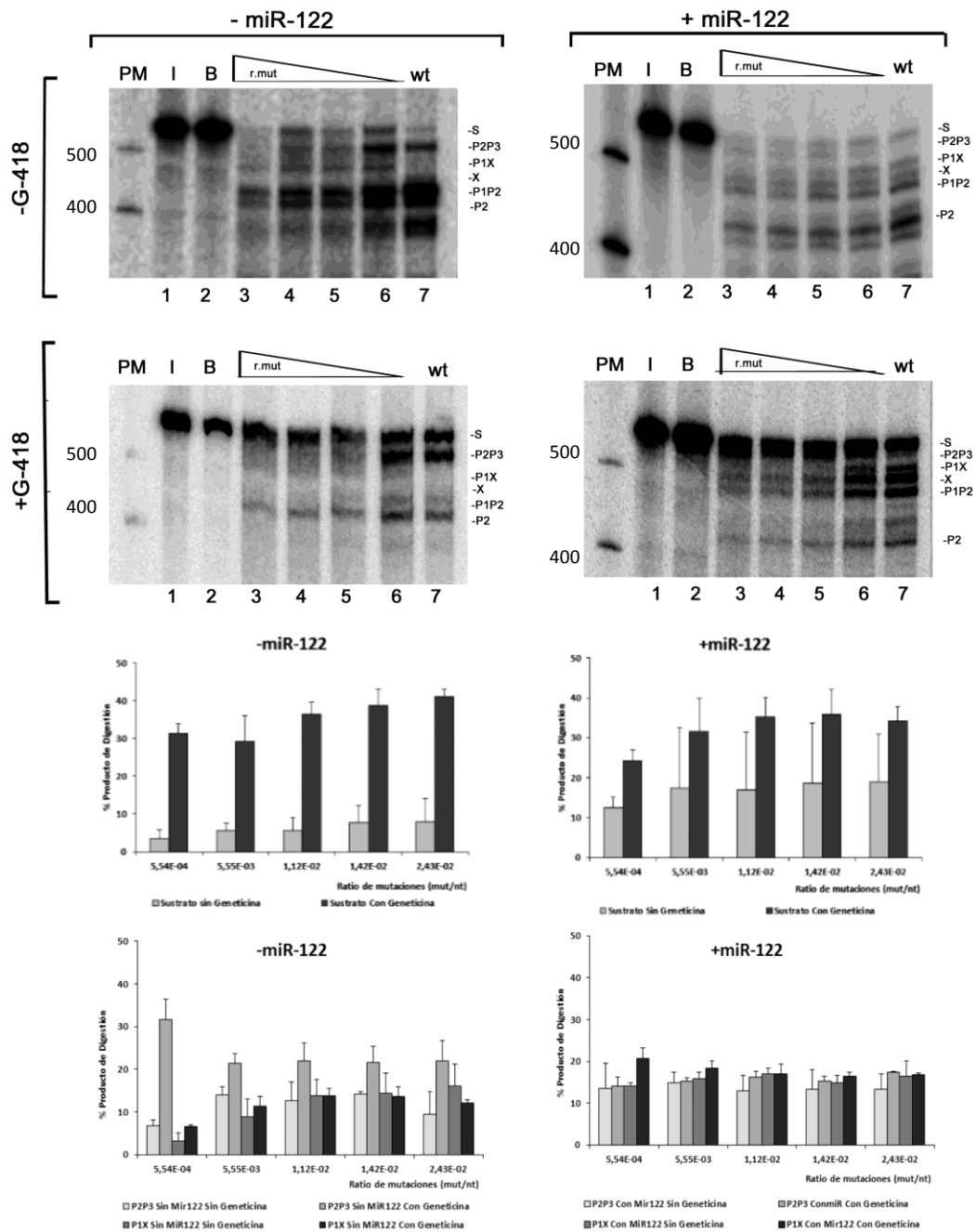


Figura R7.2. Efecto de inhibición de la geneticina sobre la digestión específica de la actividad RNasa III sobre las poblaciones de mutantes del HCV1-542 (+/-miR-122). Resultados de los experimentos de inhibición con geneticina, de la digestión de la RNasa III en el ARN viral en función de su grado de variabilidad, sobre las conformaciones abierta y cerrada del ARN viral. Las dos autoradiografías superiores sin geneticina y abajo con geneticina. El marcador de peso molecular está a la izquierda. Carril 1, la transcripción incubada en hielo; carril 2, transcripción incubada en tampón; del carril 3 a 7 la reacción de digestión de la RNasa III (0.001U/ μ l) sobre cada una de las poblaciones de mutantes en orden decreciente de ratio de mutaciones y en el carril 7 sobre la población wt. (B) Representaciones gráficas comparativas del sustrato restante (gráficas superiores) y los principales productos de digestión (gráficas inferiores) de la RNasa III (-/+miR-122 izquierda/derecha) en la ausencia o presencia de geneticina.

R.8.- Efecto de la variabilidad sobre el reconocimiento de la estructura terciaria tipo ARNt del VHC1-542 con la actividad RNAsa P.

Con el fin de analizar el efecto de la variabilidad sobre las estructuras terciarias, se ha empleado la actividad RNAsa P humana (extraída de células HeLa) y la actividad ribozima de la RNAsa P de *Synechocystis* sobre la estructura ARNt descrita en la región VHC1-542 (Nadal, Martell et al. 2002, Sabariego, Nadal et al. 2004).

Dado que ambas actividades digieren los precursores de ARNt esta actividad permite identificar estructuras tipo ARNt, como la descrita en esta región del VHC. Se caracterizó el patrón que originan los productos de digestión de la actividad RNAsa P, sobre la estructura tipo ARNt en la población wt del VHC1-542 y se compararon con las respuestas de las cuatro poblaciones de mutantes, con ratios de mutación creciente.

R.8.1.- Control de la actividad RNAsa P humana y de Rz de *Synechocystis*:

Se puso a prueba la actividad de la RNAsa P humana y de *Synechocystis*, sobre las poblaciones de un sustrato estándar, el *pre-ARNt^{tyr}*, con ratios de mutación creciente. Se obtuvo el patrón de corte previsto, para la población wt y se comparó con la respuesta obtenida para cada población de mutantes.

En la figura R.8.1, se puede observar como el producto de la digestión disminuye su proporción con el aumento del ratio de mutaciones, con ambas actividades. En las autoradiografías de los geles se aprecia que las bandas producto de las digestiones de las dos actividades RNAsa P, decrecen con cada una de las poblaciones de sustrato, a medida que se incrementa su ratio de mutaciones. En las gráficas se presentan las cuantificaciones de las digestiones representadas como medias de tres replicas experimentales con su desviación estandar, frente al ratio de mutaciones y frente a la entropía de Shannon de cada población. Se aprecia el descenso en la digestión total de ambas actividades de RNAsa P: alcanzando una caída alrededor del 60% para la actividad *humana*, y algo más acentuada, superior al 70%, para la ribozima de *Synechocystis*. Ambas presentaron un perfil muy similar, con una mayor pendiente de caída para la actividad de la ribozima demostrando más dependencia respecto al incremento del ratio de mutaciones. Los perfiles de digestión respecto a la entropía de Shannon presentan unos tramos bien definidos y un comportamiento de caída desde la población wt a la primera población de mutantes, análogo en ambas actividades, si bien esta es más acusada para la actividad bacteriana. Luego se mantiene constante con la población de mutantes 2 pese al incremento de S_n (de 0,19 a 0,28). Después, con un ligero incremento de 0,01 de S_n en la población de mutantes 3, hay un pronunciado descenso de la digestión, que continúa hasta la población 4. En resumen, la digestión disminuye más para la actividad de la ribozima que para la *humana* lo que significa que es más dependiente con el aumento de la complejidad poblacional. La caída pronunciada desde la población de mutantes 2 pone de manifiesto la existencia de un punto significativo de caída de las actividades en función de la complejidad de la población.

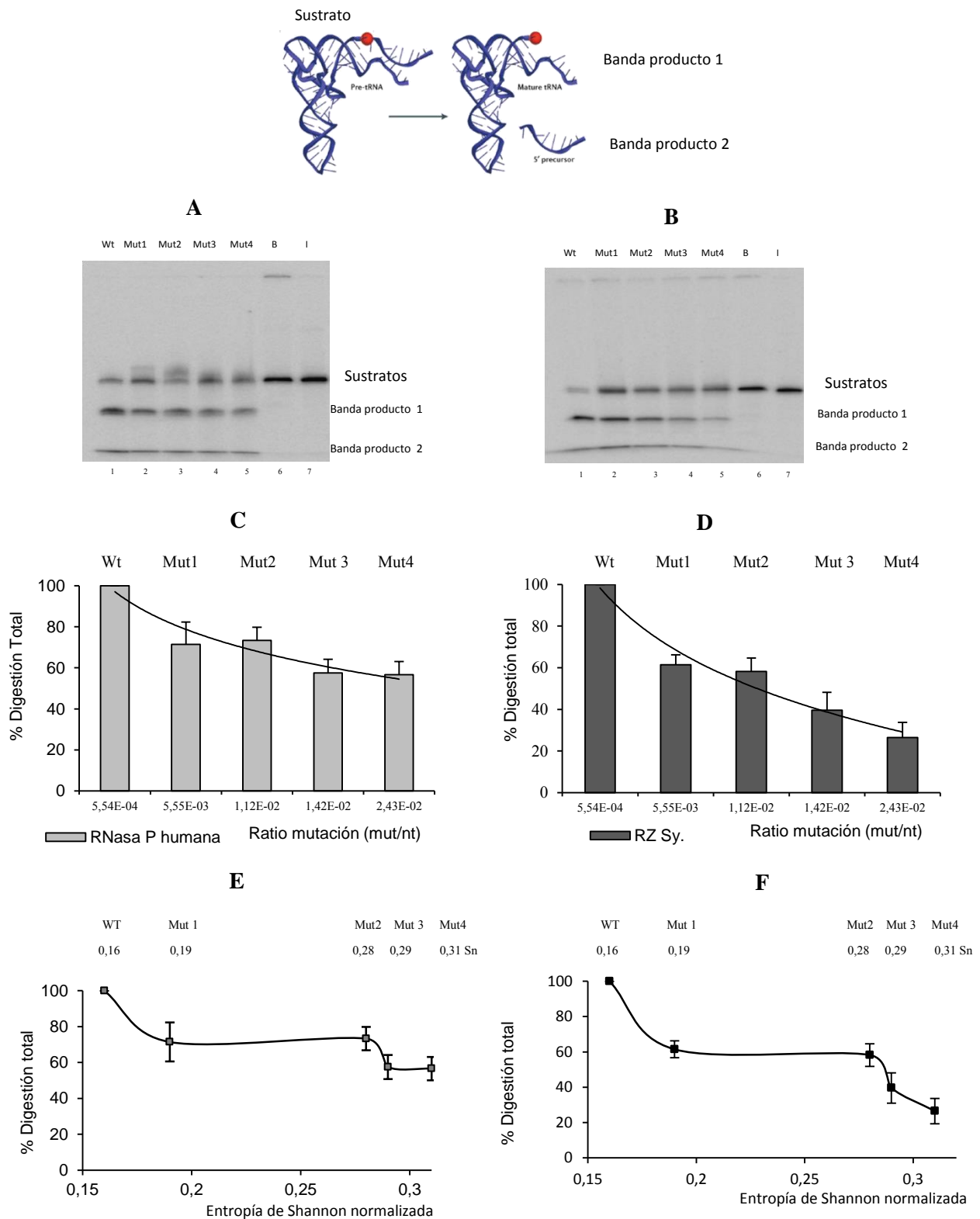


Figura R.8.1: Digestión de la actividad RNasa P sobre el *pre-ARNt^{tyr}*. Imagen superior: esquema de la digestión de la actividad RNasa P sobre un *pre-ARNt*. Autorradiografías de los geles de poliacrilamida desnaturalizante al 6%, que muestran la digestión de la RNasa P humana (panel A) y RZ (panel B), sobre cada una de las poblaciones de *pre-ARNt^{tyr} α-P³²GTP*. Los Carriles 1-5: muestran los productos de digestión de 0,05 U/μL de actividad RNasa P sobre 0,9 nM final de las poblaciones de mutantes del *pre-ARNt^{tyr}*, en orden creciente de ratio de mutaciones del wt, al mut4. Carril 6: B transcrito incubado en buffer. Carril 7: I transcrito en agua incubado en hielo. **Representaciones gráficas del % de digestión de las RNAsas P humana (paneles C/E) y RZ (paneles D/F).** Resultados de las medias de tres experimentos con su desviación estándar, en función de los ratios de mutación (paneles C y D) y frente a la entropía de Shannon normalizada (en los paneles E y F) de cada una de las poblaciones de mutantes.

R.8.3.- Digestión de la actividad RNAsa P sobre el VHC1-542.

Se obtuvo el patrón de digestión de la RNAsa P sobre la población wt del VHC1-542 marcada internamente con ^{32}P *in vitro* (ver Material y Métodos M.8.2):

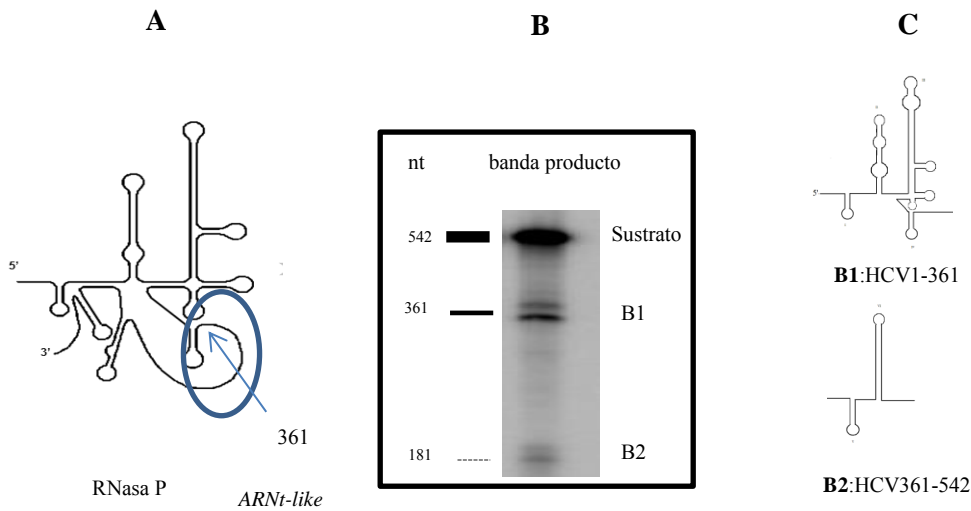


Figura R8.2: Patrón de corte de la actividad RNAsa P sobre la región del VHC1-542. A) Esquema de la estructura de a región VHC1-542, con la situación de los puntos de corte producidos por la actividad RNAsa P, en azul, con la estructura terciaria tARN-like. B) Esquema del patrón de bandas electroforéticas resultante del corte con la actividad RNAsa P, con la situación del nucleótido identificado del corte y la denominación de la banda. C) Esquema de las bandas producto de la digestión.

Se procedió a los ensayos *in vitro*, de las actividad RNAsa P humana y Rz de *Synechocystis*, con las poblaciones de ARN del VHC1-542, con ratios de mutación creciente (M.7.2). En la figura R7.3 se presentan los resultados.

En las autoradiografías obtenidas de los experimentos se aprecia como disminuye claramente la intensidad de las bandas producto de la digestión con el incremento del ratio de mutaciones hasta casi desaparecer, para las dos actividades. Los resultados de los experimentos de digestión se han cuantificado y se han representado como las medias de tres experimentos con su desviación estándar, del porcentaje de digestión total normalizado frente al resultado de la población wt, y en función de los ratios de mutación o de la entropía de Shannon normalizada.

Las gráficas muestran como la actividad RNAsa P humana cae más de un 90% y la actividad para la ribozima de *Synechocystis* cae algo menos, alrededor de un 70%, con el incremento del ratio de mutaciones. Estos perfiles similares de caída en la digestión de ambas actividades RNAsa P con respecto al ratio de mutaciones, apuntan hacia una importante dependencia de la actividad RNAsa P con la variabilidad.

Por otra parte, las representaciones de los resultados, en función de la entropía de Shannon normalizada, también demuestran una dependencia similar a la obtenida respecto al ratio de mutaciones, aunque resaltan una acentuación del efecto a partir de la población de mutantes 2 a la 3 y que continúa hasta la población 4.

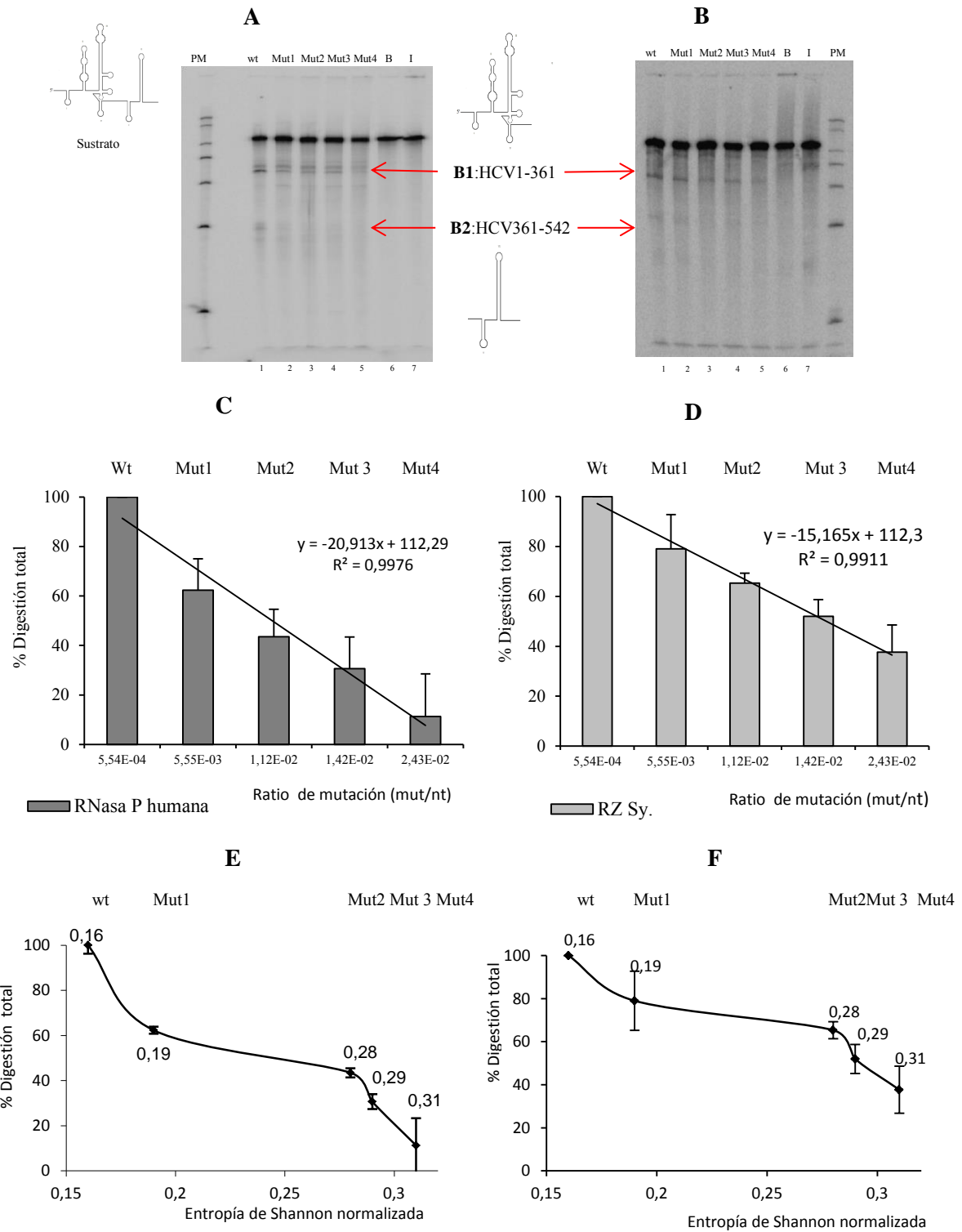


Figura R.8.3: Digestión de la actividad RNAsa P sobre las poblaciones de VHC1-542. Arriba: Autorradiografías de los geles de poliacrilamida desnaturalizante al 4%, que muestran la digestión de la RNAsa P humana (panel A) y RZ (panel B), sobre cada una de las poblaciones de VHC1-542 α -P³²GTP. Los Carriles 1-5: muestran los productos de digestión de 0,05 U/ μ L de actividad RNAsa P sobre 0,9 nM final de las poblaciones de mutantes, en orden creciente de ratio de mutaciones del wt, al mut4. Carril 6: B transcrito incubado en buffer. Carril 7: I transcrito en agua incubado en hielo. Representaciones gráficas del % de digestión total de las RNAsas P humana (paneles C/E) y RZ (paneles D/F). Resultados de las medias de tres experimentos con su desviación estándar, en función de los ratios de mutación (paneles C y D) y frente a la entropía de Shannon normalizada (en los paneles E y F) de cada una de las poblaciones de mutantes.

R.9.- Efecto de la variabilidad sobre la estructura terciaria local E-loop del VHC.

Se ha estudiado el efecto de la variabilidad sobre la integridad de la estructura terciaria local E-loop, identificada en la región VHC1-542 (Ariza-Mateos, Prieto-Vega et al. 2012). Se han estudiado las dos respuestas descritas de este motivo E-loop a la radiación ultravioleta: la formación de enlaces *crosslink* y su auto digestión específica. Se han analizado las respuestas a esta actividad sobre la población wt y se han comparado con las obtenidas con cada una de las poblaciones de ratios de mutación creciente. Se partió del patrón de autocorte y *crosslink* originado por la radiación UV sobre la región del VHC1-130 (fragmento mínimo) en la población wt:

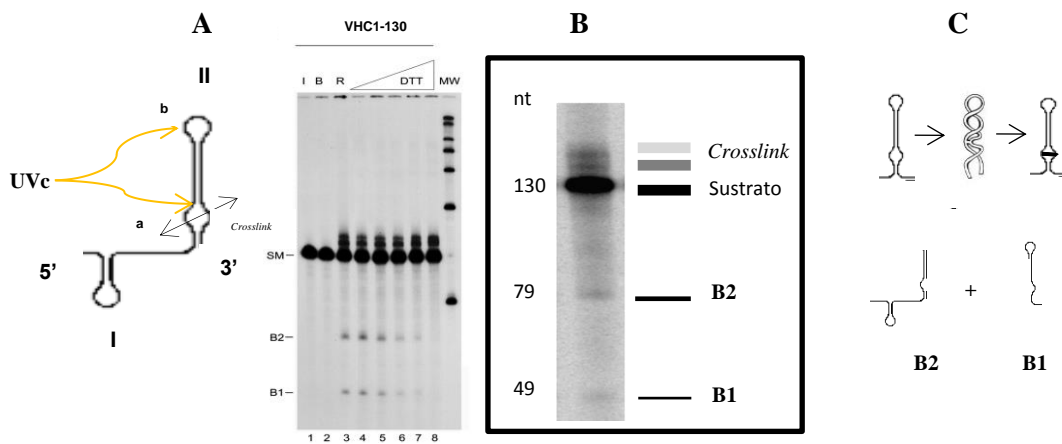


Figura 9.1: Patrón de auto digestión de la actividad R-UVc sobre el VHC1-130. A) Esquema de la estructura del VHC1-130, con la situación de los puntos donde responde a la luz UVc: **a** localización de la formación de *crosslink*, **b** auto corte. B) Gel y esquema del patrón de bandas electroforéticas resultante de la exposición a la R-UVc y la denominación de las bandas y los *crosslink*. C) Esquema de las estructuras de cada una de las bandas producto del auto corte y *crosslink* inducidas por la R-UVc.

Debido a los bajos rendimientos de ambas respuestas, de auto corte y de *crosslink*, se empleó el fragmento mínimo que responde a la radiación ultravioleta de la región genómica del VHC que va del nt 1 al 130. Usando este fragmento se mejora la resolución de la lectura electroforética de los productos de corte y *crosslink*. Para ello se emplearon poblaciones análogas del fragmento VHC1-130 con índices de mutación creciente que se irradiaron con radiación UVc a 235nm, (ver Material y Métodos M.7.3). Se obtuvo el patrón de digestión previsto para la población wt y se comparó con las respuestas de las poblaciones de ratios de mutación creciente. Los resultados obtenidos se presentan a continuación en la figura R9.2:

En las autoradiografías del gel de los experimentos de exposición a la radiación UVc sobre las poblaciones de mutantes del VHC1-130, se aprecia como las bandas producto de ambas respuestas decrecen con el aumento del ratio de mutación. Se han cuantificado y representado las medias de tres réplicas, con su desviación estándar, en función de los ratios de mutación creciente y en función de la entropía de Shannon normalizada de cada población de mutantes.

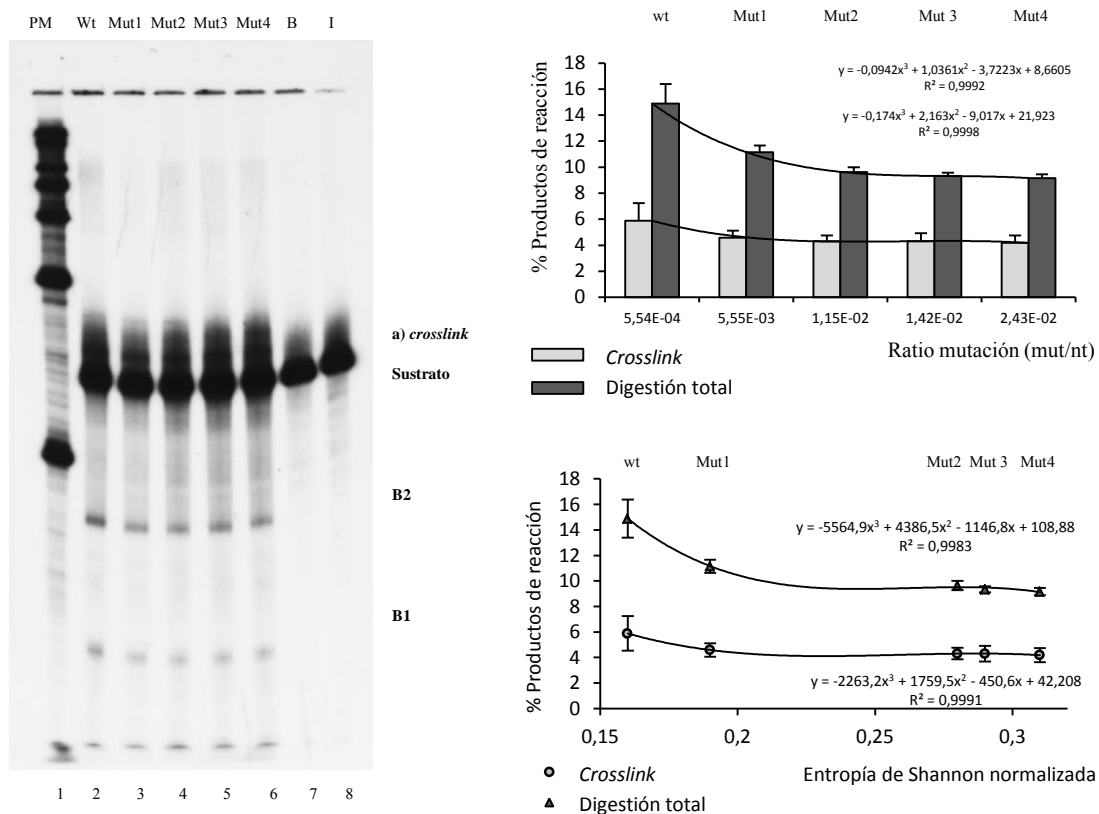


Figura R9.2: Autocorte y crosslink, inducidos por la R-UVc sobre las poblaciones de VHC1-130: A la izquierda: Autoradiografía del gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6%, que muestran el autocorte inducido por la R-UVc sobre cada población de VHC1-130 α -P³²GTP (bandas B1 y B2) y los *crosslink*. Carril 8: I, transcrito en agua incubado en hielo. Carril 7: B, transcrito en buffer. Carriles 2-6: muestra los productos de reacciones de la actividad R-UVc sobre cada una de las poblaciones de mutantes del VHC1-130 a 6nM y 300dpm final, en orden creciente de ratio de mutaciones. A la derecha: Graficas de los resultados de los efectos inducidos por la radiación UVc, autodigestión y formación de *crosslink*, sobre región VHC1-130: arriba representada en función de los ratios de mutación de cada una de las poblaciones de mutantes y abajo en función de la entropía de Shannon normalizada de cada una de ellas.

En las gráficas, se observa un perfil de caída de las actividades inducidas por la radiación UV-c, que se ajusta a una ecuación polinómica de tercer grado. Se observa una caída rápida de la aparición de productos hasta el tercer punto de mutaciones, a partir del cual se mantiene constante. Por otra parte el efecto de las mutaciones es más acentuado sobre la inducción del autocorte, que decae más de un tercio, que sobre la formación de los *crosslink*. Las respuestas observadas son similares representadas frente al ratio de mutaciones que frente a la entropía de Shannon. Aunque los efectos inducidos por la radiación UVc son de menor magnitud que los de las otras actividades utilizadas, los resultados demuestran una dependencia de la integridad de la estructura terciaria local *E-loop* presente en la región VHC1-130, frente a la variabilidad introducida en su población.

R.10.- Estudio del reclutamiento de la subunidad 40S por el IRES del VHC *in vitro* vs ratio de mutaciones.

La región del VHC1-542, contiene el elemento estructural IRES, responsable del reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S (Kieft, Zhou et al. 1999, Kieft, Zhou et al. 2001, Lytle, Wu et al. 2001, Filbin and Kieft 2011, Filbin, Vollmar et al. 2013). Este reclutamiento es el resultado de la participación de los distintos motivos estructurales de la región y que incluye las secuencias que forman estructuras secundarias y terciarias. Se ha estudiado el reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal humana, extraída de células HeLa, por parte de la región VHC1-542 (IRES). Para analizar el efecto de la variabilidad, se ha comparado la respuesta del reclutamiento de la población wt frente a las de las poblaciones de ratio de mutación creciente.

R.10.1.- Control del reclutamiento de 40S con el IRES CrPV1-198.

Como control del reclutamiento de la subunidad 40S, se utilizó el elemento IRES del virus de la parálisis del grillo CrPV1-198, que no requiere ningún factor proteico de inicio de la traducción (Landry, Hertz et al. 2009, Thompson 2012). Se llevaron a cabo los experimentos con poblaciones *in vitro*, de CrPV1-198 de ratios de mutación creciente frente a la subunidad 40S (en concentraciones de 0 a 200 nM). Los acoplamientos se resolvieron y visualizaron en geles de electroforesis en condiciones nativas, y se cuantificaron las bandas de retardo correspondientes a la unión. También se visualizaron y cuantificaron las uniones de todos los experimentos mediante filtros de nitrocelulosa (*binding-filter*) (ver Material y Métodos M.8.3.b).

En la figura R10.1 se presentan los resultados de los experimentos de reclutamiento, la autoradiografía del gel de poliacrilamida y el *binding-filter*, donde se visualizan la banda retardada que corresponde al acoplamiento de la subunidad ribosomal 40S con la poblaciones del CrPV1-198 wt. Los experimentos se repitieron para todas las poblaciones del IRES del CrPV1-198 de ratio variabilidad creciente. Los resultados se cuantificaron y representaron frente a los ratio de mutación y la entropía de Shannon normalizada de las poblaciones.

Los resultados experimentales obtenidos de las uniones y resueltos por los dos métodos (geles nativos y *binding-filter*) se cuantificaron y se calculó el valor de KD (contante de disociación) para cada población. Las KD son la relación, en su punto de equilibrio, entre la cantidad de compuesto de la unión y las cantidades de 40S y ARN disociadas, sin unir. La KD constituye una medida inversa de la fortaleza o la afinidad de unión del compuesto.

Se han representado las KD calculadas sobre tres experimentos de unión de la subunidad 40S, con cada población de CrPV1-198 con su desviación estándar, en función de los ratios de mutación y en función de la entropía de Shannon normalizada, de cada población (figura R10.1).

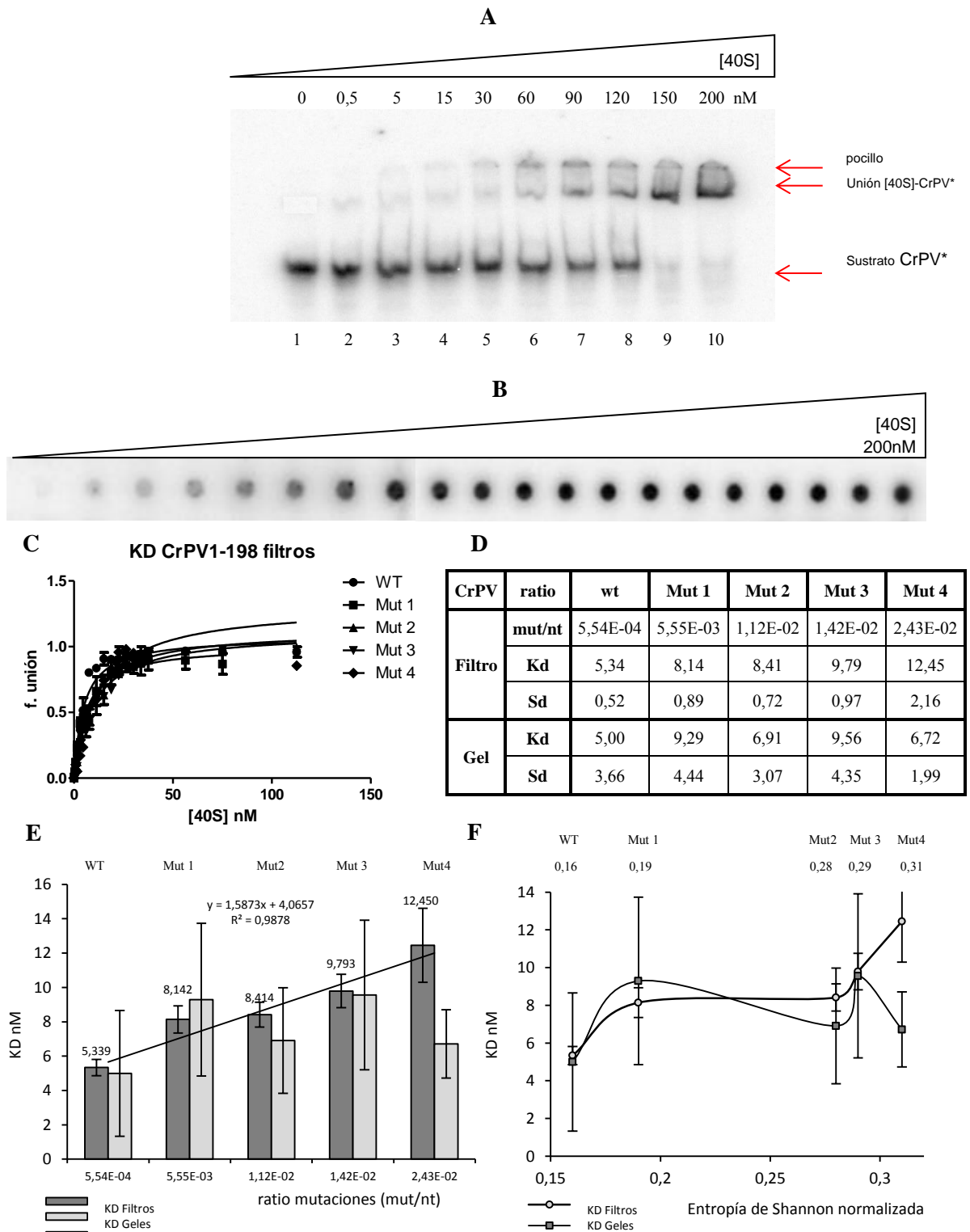


Figura R10.1: Reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal por el IRES del CrPV. **A):** Autoradiografía de gel de poliacrilamida en condiciones nativas del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, en cantidades crecientes, por el IRES del CrPV1-198 wt. Los carriles corresponden a cantidades crecientes de 40S ribosomal de 0 a 200nM, con una cantidad constante de 0.6nM de CrPVwt. **B):** Autoradiografía de filtro del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, en cantidades crecientes, por el IRES del CrPV1-198wt. Los puntos presentan lo filtrado (la unión) a las cantidades crecientes de 40S ribosomal de 0 a 200nM, con cantidad constante de 0.6nM de CrPVwt. **C):** Curvas de unión obtenidas de los filtros, donde se muestra la fracción de unión de cada población del CrPV frente a la concentración de 40S. **D)** Tabla de valores calculados de KD correspondientes a las curvas de unión. **E)** Gráfica que representa las KD, del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, por las poblaciones de variabilidad creciente del IRES del CrPV1-198 wt frente a los ratio de mutación de las poblaciones **F)** Gráfica que representa las KD, del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, por las poblaciones de variabilidad creciente del IRES del CrPV1-198 frente a la entropía de Shannon normalizada de las poblaciones.

Los resultados presentados en el panel E, muestran un incremento lineal de la KD con el aumento del ratio de mutaciones. En la gráfica del panel F se muestra como evoluciona la KD respecto de la complejidad poblacional S_n de las poblaciones, aumentando desde la población wt a la de mutantes 1, luego parece mantenerse constante con la población de mutantes 2 y a partir de ahí crece hasta la población 4.

R.10.2.- Reclutamiento 40S-IRES VHC vs ratio de mutaciones.

Se procedió a analizar el reclutamiento de la subunidad 40S, sobre las poblaciones del VHC1-542 (IRES) de ratios de mutación creciente (ver Material y Métodos M.8.3.b). Los resultados de los experimentos se resolvieron en geles de acrilamida en condiciones nativas y por *binding-filter*.

A continuación en la figura R10.2 se presentan los resultados experimentales de las uniones 40S-IRES-VHC1-542. Se muestra la autoradiografía de gel de poliacrilamida en condiciones nativas de resolución de los productos de la unión de la población wt y la autoradiografía del filtro de la población wt. Se pueden identificar dos bandas producto que corresponden a las dos conformaciones del sustrato, y dos bandas retardadas correspondientes a las uniones de las dos conformaciones con la subunidad 40S. Las bandas producto de las uniones aumentan de intensidad con el aumento de la concentración de 40S, el resto de marca que queda está en el pocillo. Los experimentos se repitieron por triplicado para cada población in vitro del HCV1-542 y los productos de unión se resolvieron por geles de retardo y retención en filtros.

Para evaluar el efecto de la variabilidad sobre el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S, se han calculado las KD que corresponden a las curvas de reclutamiento para cada una de las poblaciones del HCV1-542 wt y mutantes. Se calcularon las KD total del reclutamiento, dadas por la fracción de unión de las dos bandas de retardo que corresponden a los reclutamientos de las dos conformaciones. También se han calculado las KD por separado correspondientes a las uniones de las dos conformaciones del HCV1-542 (abierta y cerrada). Se han representado las KD de reclutamiento de cada población frente a su ratio de mutaciones o su grado de complejidad poblacional dado por su S_n (Anexo 3).

Los resultados, que se presentan en la figura R10.2, muestran que la KD total crece linealmente hasta la tercera población. Después cae bruscamente en la población de mutantes 3, lo que se pone de manifiesto especialmente frente a la entropía de Shannon. Y vuelve a subir con la población de mutantes 4, quedando por encima de la KD de la población wt. La KD de la unión con la conformación cerrada corresponde a la banda retardada 1, que aumenta con la población de mutantes 1 igual que la KD total, pero decae bruscamente con la población de mutantes 2 hasta la mitad de la KD de la población wt, para luego crecer linealmente hasta la población de mutantes 4 y terminar con el mismo valor de la KD total. La KD de la unión con la conformación abierta corresponde a la banda retardada 2, sin embargo parece presentar un comportamiento constante en todas las poblaciones.

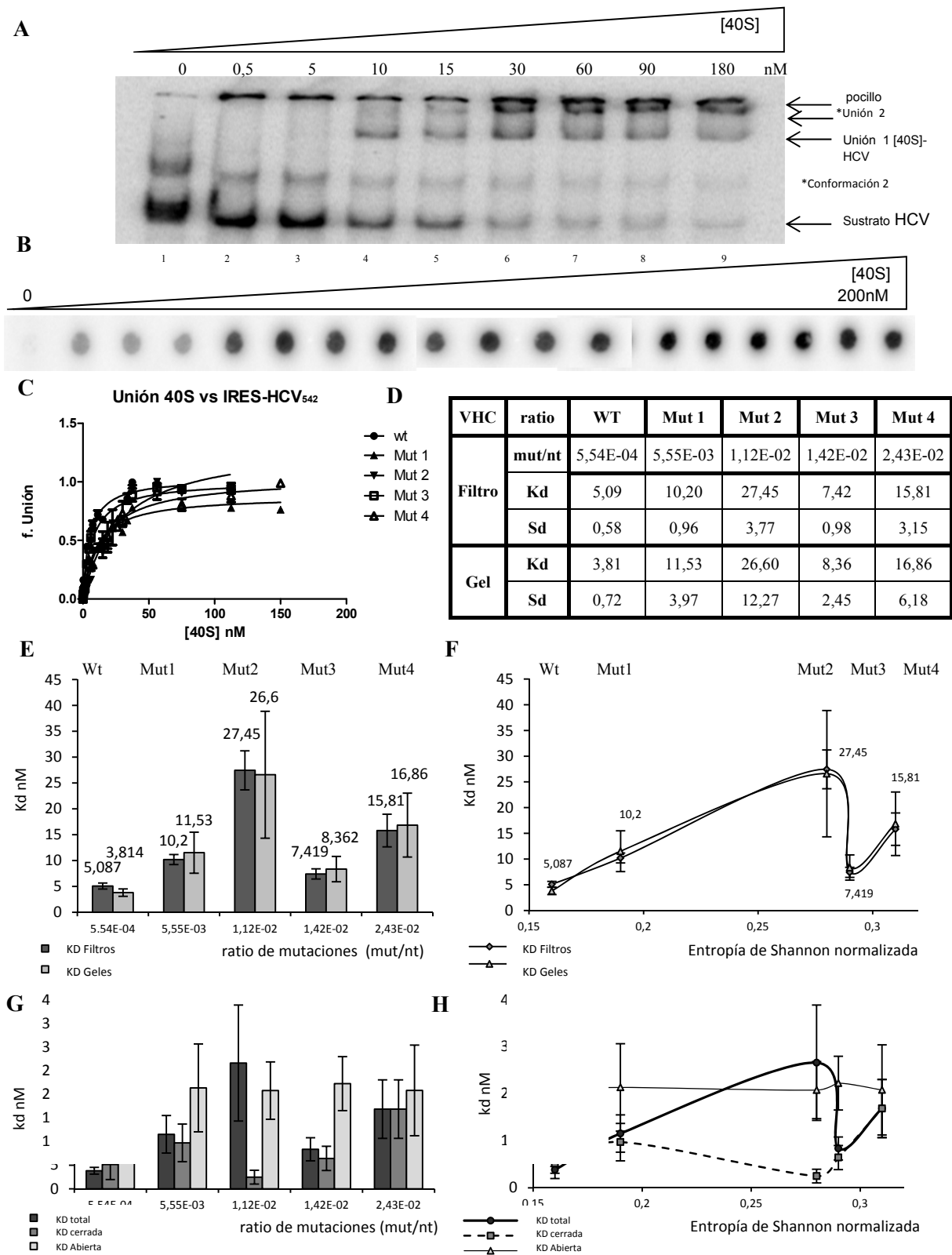


Figura 10.2: Reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal por el IRES del VHC1-542 α P³²GTP. A): Autoradiografía de gel de poliacrilamida en condiciones nativas del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, en cantidades crecientes de 0 a 180nM, por el IRES del VHC1-542Wt a 0.6nM. B): Autoradiografía de filtro del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, en cantidades crecientes de 0 a 200nM, por el IRES del VHC1-542wt a 0.6nM. C): Curvas de unión obtenidas de la fracción de unión de cada población del VHC frente a la concentración de 40S. D) Tabla de valores calculados de KD correspondientes a las curvas de unión. E) Gráfica que representa las KD, del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, por las poblaciones de variabilidad creciente del IRES del HCV1-542 frente a los ratio de mutación de las poblaciones F) Gráfica que representa las KD, del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, por las poblaciones de variabilidad creciente del IRES del VHC1-542 frente a la Sn de las poblaciones. G) Representación de las KD total y las parciales de cada conformación frente al ratio de mutaciones. H) Representación de las KD total y las parciales de cada conformación frente a la Sn.

Las gráficas han sido similares por ambas técnicas, confirmando que los resultados obtenidos de la resolución de los productos de los reclutamientos han sido de un incremento de la KD con el incremento de la variabilidad y la complejidad en las poblaciones. El valor obtenido de la KD del VHC1-542 Wt fue de 5 nM, consistente con los valores publicados. La KD crece linealmente más de cinco veces hasta la tercera población, de mutantes 2 y cae bruscamente en el cuarto punto para volver a subir al triple del valor de KD de partida en la población de mutantes 4.

Dado que la KD es una medida inversa de la afinidad entre la subunidad 40S y la región IRES del VHC1-542, podemos decir que los resultados apuntan a que un incremento de las mutaciones en la población hace disminuir la afinidad entre el IRES del VHC1-542 y la subunidad 40S, más de cinco veces hacia la población de mutantes 2 y más de tres veces hacia la población de mutantes 4. Acorde con otros resultados presentados anteriormente, es destacable lo obtenido en la población de mutantes 3, donde parece producirse una recuperación de la afinidad (no completa) que vuelve a perderse en la siguiente población.

R.11- Estudio del reclutamiento de la subunidad 40S por el VHC en cultivos (tratados y sin tratar con ribavirina).

Se estudió el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S humana, extraída de células HeLa, por parte de la región IRES del VHC1-570, genotipo 2a, provenientes de cultivos de células Huh 7.5, a pase 0, a pase 4 y a pase 4 tratados con ribavirina (100 mM). Se compararon las respuestas obtenidas del reclutamiento de la población a pase 0 frente a las poblaciones a pase 4, tratadas y sin tratar con ribavirina. Se llevaron a cabo experimentos de acoplamiento de la subunidad ribosomal 40S, sobre las tres poblaciones de ARN del IRES del VHC1-570(2a) y sobre los dos clones resistentes a IFN tras pases largos (Clon 2 y Clon 6). Los resultados de los experimentos de unión se resolvieron en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y por filtros, se cuantificaron y se calcularon los valores de KD corespondientes a las curvas de unión obtenidas. En la figura R10.1 se presentan los resultados sobre la autoradiografía de uno de los experimentos de la población a pase 0, donde se pueden visualizar las dos bandas producto correspondientes a las dos conformaciones, así como las dos bandas retardadas de las uniones de las subunidades 40S con las dos conformaciones. También se presenta la visualización de la autoradiografía de un filtro, donde se ve como se incrementa y satura la unión con la concentración de 40S.

Todos los resultados experimentales de los acoplamientos de la subunidad 40S ribosomal, sobre las poblaciones extraídas de cultivo del IRES del VHC1-570(2a) y los dos clones, se cuantificaron y trataron matemáticamente para expresarlos como valores de KD de la unión. Los resultados de las KD medias de tres experimentos con su desviación estándar, se han representado en función de los ratios de mutación de las poblaciones extraídas de los cultivos de VHC1-570(2a), a pase 0, a pase 4 y tras 4 pases tratados con ribavirina.

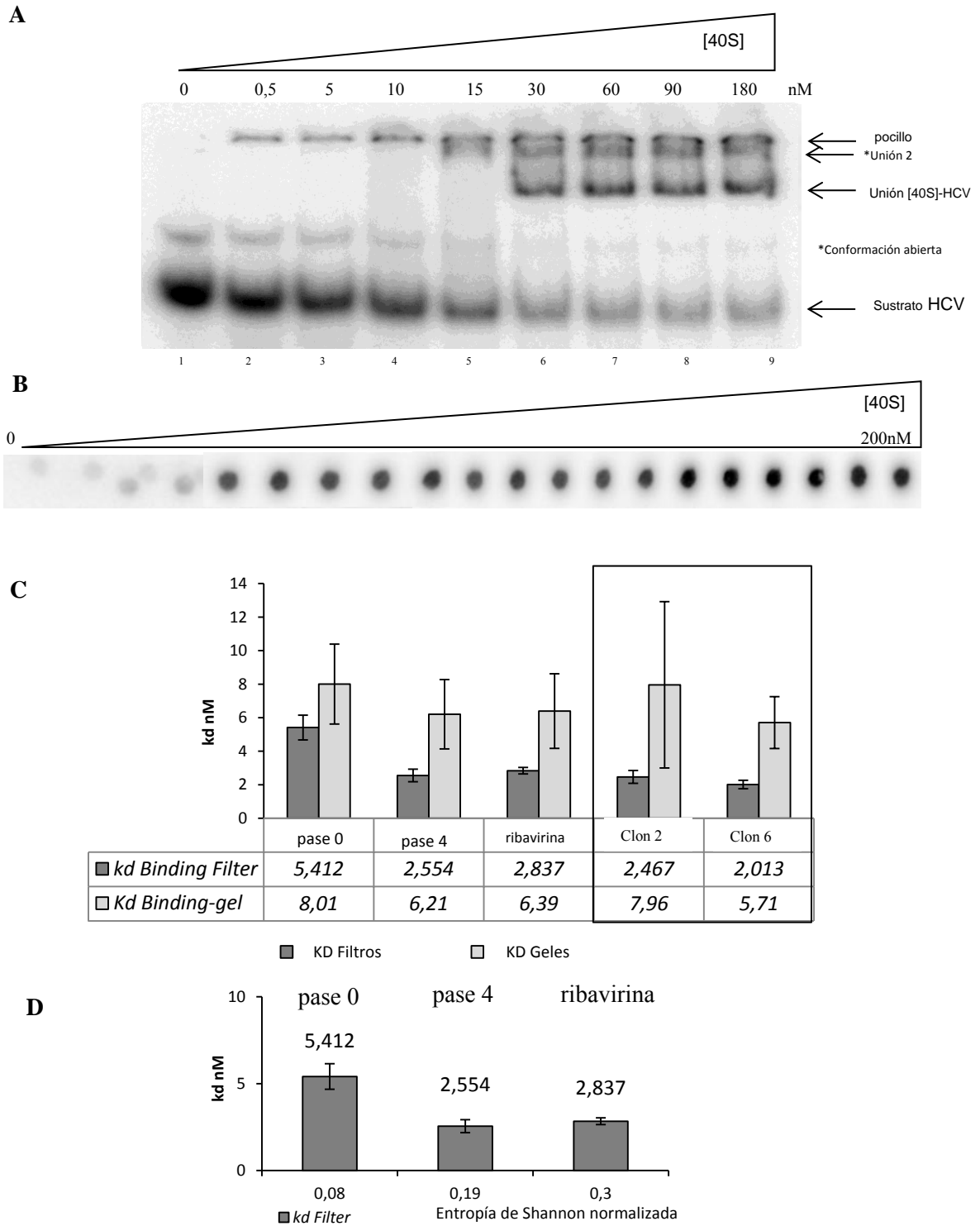


Figura 11.1: Reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal por el IRES del VHC1-570(2a) extraído de cultivos: A) Autoradiografía de gel de poliacrilamida en condiciones nativas donde se muestra la resolución de los productos del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, en cantidades crecientes de 0 a 180nM, por el IRES del VHC1-572 (2a) de la población a pase 0 (a 6nM). **B):** Autoradiografía de filtro del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, en cantidades crecientes de 0 a 200nM, por el IRES del VHC1-542 de la población a pase 0 (a 6nM). **C):** Gráfica que representa las KD, del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, por las poblaciones a pase 0, a pase 4 y a pase 4 tratadas con ribavirina, del IRES del HCV1-542 (2a) frente a los ratio de mutación de las poblaciones. También se presentan los valores de KD de los clones 2 y 6. **D):** Gráfica que representa las KD, del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, por las poblaciones a pase 0, a pase 4 y a pase 4 tratadas con ribavirina, del IRES del VHC1-570 (2a) frente a la Sn de las poblaciones.

En la figura R11.1 se presentan los valores de KD calculados a través de los resultados obtenidos por las dos técnicas de resolución de los productos de unión, con geles de poliacrilamida en condiciones nativas y con filtros (*binding-filter*), frente a los valores del ratio de mutaciones, para las tres poblaciones extraídas de los cultivos y para los dos clones. Estos valores muestran una disminución de la KD a la mitad tras cuatro pases. Las KD obtenidas tras cuatro pases con tratamiento con ribavirina fueron de una ligera subida respecto de la población tras cuatro pases pero sin tratar. Los resultados obtenidos para los clones persistentes Clon2 y Clon6 fueron los valores mínimos de KD obtenidos, es decir, de máxima afinidad.

En resumen los resultados ponen de manifiesto un efecto de la variabilidad, dada por la selección natural tras cuatro pases, sobre el reclutamiento de la subunidad 40S. También señalan un efecto moderado de la ribavirina sobre el reclutamiento. Y por último los clones resistentes 2 y 6, han demostrado tener las mayores afinidades por la subunidad ribosomal 40S. En su conjunto podríamos aventurar que el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S es un importante factor limitante de la viabilidad biológica del virus y por *ende*, una posible diana terapéutica frente su capacidad infectiva. Todo lo cual será analizado en profundidad en el apartado de Discusión de este Trabajo de Tesis Doctoral.

DISCUSIÓN

D.- Discusión

En la actualidad, las estrategias basadas en la *mutagénesis letal*, representan una magnífica herramienta para la extinción de virus ARN, demostrada y con unas evidentes aplicaciones terapéuticas. Pero aún no se ha demostrado de una manera concluyente que la *defección letal* esté relacionada con la entrada de la cuasiespecie viral en una teórica *catástrofe de error*. La pérdida de viabilidad, por encima del umbral de error, no parece ser un fenómeno catastrófico asociado al incremento de la variabilidad o a una pérdida de la información genética, sino más bien, una consecuencia de otros fenómenos más complejos asociados a la integridad funcional y estructural de los fenotipos mutantes. Evaluar los efectos que puede ejercer la variabilidad sobre la integridad estructural y funcional de los genomas víricos ha condicionado los Objetivos impuestos en este trabajo de Tesis Doctoral, con la intención de dar respuesta, en la medida de lo posible, a la pregunta planteada en la Introducción: *En un genoma ARN viral ¿Qué grado de distorsión mutacional puede asumir un elemento estructural antes de perder su identidad y sus propiedades funcionales?*

D.1.- Análisis del modelo de estudio. Caracterización de la variabilidad.

Para afrontar este trabajo, se ha empleado un modelo de estudio sobre el virus de la hepatitis C, fragmento VHC1-542/570, que cuyas estructuras constituyen un elemento IRES que contiene un dominio RBS capaz de reclutar la subunidad ribosomal 40S (Anexo 1). Para poder abarcar los Objetivos marcados, se construyeron, caracterizaron y verificaron dos versiones del modelo, una *in vitro* y otra extraída de cultivos:

- a) Un modelo *in vitro* formado por cinco poblaciones, de secuencias del fragmento de ARN VHC1-542 genotipo 1b (M.3.6.c), obtenidas por técnicas de PCR mutagénica (Martínez, Vartanian et al. 1994), con un ratio creciente de mutaciones.
- b) Un modelo extraído de cultivos de células Huh7.5 transfectadas con VHC genotipo 2a, formado por tres poblaciones del fragmento ARN VHC1-570 genotipo (2a). Una a pase 0 y dos tras 4 pases, una tratada con ribavirina y otra sin tratar.

D.1.1.- Caracterización de la variabilidad sobre las poblaciones *in vitro*.

Se caracterizaron las cinco poblaciones *in vitro*, a través del ratio de mutación obtenido de su secuenciación. Los resultados nos ofrecen un esperado aumento del ratio de mutaciones en cada una de las poblaciones con el incremento del potencial mutagénico de las condiciones de reacción empleadas (Tabla R1.1). El valor obtenido para la población WT fue de 5,5E-04 mutaciones/nucleótido, respecto a la secuencia consenso de la región VHC1-542 del genotipo 1b existente en las bases de datos, y que está en concordancia con los valores descritos en la bibliografía (Gago, Elena et al.

2009). Los resultados del ratio de mutaciones, para las cuatro poblaciones de mutantes *in vitro*, aumentan progresivamente, desde el valor de partida, de la población Wt, hasta un valor de $2,5E-02$ mut/nts, validando la técnica empleada para obtener poblaciones de VHC con un incremento del ratio de mutaciones en sus secuencias. En la tabla R1.3 de los resultados, se puede comprobar que el incremento de mutaciones de las cinco poblaciones *in vitro*, está acompañado de un coherente aumento del número de mutaciones totales, de las mutaciones por secuencia (de 1 hasta 8 mut/sec) y de haplotipos (de 8 a 17), coherente con descripciones *in vitro* (Martinez, Vartanian et al. 1994) y comparable con los resultados de cuasiespecies víricas mutagenizadas obtenidos *in cultivo* (Holland, Domingo et al. 1990).

El aumento de la diversidad y de la complejidad poblacional observado a través de los valores de su entropía de Shannon normalizada, resulta consistente con el aumento de subtipos en las proximidades de la catástrofe de error que propone Eigen en la teoría de cuasiespecies (San Juan, Cuevas et al. 2007, Ortega-Prieto, Sheldon et al. 2013, Sheldon, Beach et al. 2014). El aumento del ratio de mutaciones estuvo acompañado por una caída en el número de lecturas obtenidas, que podría estar relacionada con el efecto del aumento de mutaciones, en las poblaciones de cPCR, sobre las regiones promotoras.

D.1.1.a.- Efecto de la variabilidad en el reconocimiento de la secuencia promotora por la T7-ARN Polimerasa.

Los productos de ADN de partida se amplificaron introduciendo en ellos la región del promotor de la T7 ARN polimerasa para facilitar su posterior transcripción. El incremento de mutaciones que se ha inducido en las poblaciones, ha de afectar por igual a todas las secuencias, incluidas las regiones del promotor introducidas. Las técnicas seguidas para la obtención de los transcritos de estudio *in vitro*, pusieron de manifiesto una caída en la cantidad de productos obtenidos de las transcripciones superior al 90%, frente al ratio de mutaciones o al valor de entropía, introducido en cada una de las poblaciones. Como se presentó en la gráfica de la figura R1.18, esta dependencia, de la eficacia de las reacciones de transcripción con la variabilidad es polinómica cúbica. La pérdida de complementariedad con las secuencias promotoras de la población justificaría la caída de productos obtenida de la transcripción. El incremento de variabilidad que hemos introducido en la población de secuencias, debe afectar a la integridad de las secuencias promotoras y a su identidad poblacional, distorsionando, estadísticamente, su reconocimiento por parte de la T7 ARN polimerasa, que es dependiente de su complementariedad de secuencia. Esta explicación sugiere, que el rendimiento de la transcripción depende del grado de integridad de la secuencia promotora reconocida por la polimerasa, dentro de la población, y apunta hacia una importante dependencia del reconocimiento de secuencia (estructura 1^a) con el ratio de mutaciones, especialmente de aquellas actividades dependientes de complementariedad de secuencia.

D.1.1.b.- Naturaleza de la variabilidad introducida en las poblaciones *in vitro*.

Los resultados obtenidos de la caracterización de las mutaciones generadas en las poblaciones *in vitro*, que se presentan en la tabla R1.5, no parecen señalar ninguna tendencia o dirección, que pueda estar relacionada con el ratio de mutaciones o con la complejidad de la población. La distribución, aparentemente azarosa de la naturaleza de las mutaciones en las poblaciones, parece apuntar hacia una naturaleza *aleatoria* de la variabilidad introducida. La naturaleza randomizada de las mutaciones y su ratio creciente, junto al incremento de la complejidad del conjunto de secuencias, convierten estas poblaciones *in vitro*, en un buen modelo para estudiar el efecto de la variabilidad generada por las mutaciones, por si mismas, sobre las estructuras dentro de una cuasiespecie y al margen de otros procesos evolutivos o de presión selectiva.

D.1.2.- Caracterización de la variabilidad sobre las poblaciones *in cultivo*.

Las tres poblaciones extraídas de cultivos, a pase 0, a pase 4 y a pase 4 tratado con ribavirina (100 μ M), se caracterizaron también por su ratio de mutaciones, que se obtuvieron mediante clonaje y secuenciación Sanger, y mediante secuenciación masiva. Ambos métodos mostraron un aumento similar del ratio de mutaciones a los cuatro pases, y un incremento significativo al tratar con ribavirina, acorde a lo descrito en la bibliografía (Domingo, Sheldon et al. 2012, Perales, Iranzo et al. 2012, Ortega-Prieto, Sheldon et al. 2013, Sheldon, Beach et al. 2014).

D.1.2.a.- Caracterización de la variabilidad mediante técnicas clásicas y UPDS.

En las tablas R1.7 y R1.8 se presentaron los resultados de la caracterización obtenida mediante técnicas de secuenciación Sanger. El ratio de mutaciones observado de 1,8E-05 mut/nt para la población a pase 0 respecto a la secuencia consenso de la región VHC1-570 del genotipo 2a existente en la base de datos, es del mismo orden de los valores publicados (Gago, Elena et al. 2009). El incremento del ratio de mutaciones en las poblaciones tras 4 pases, fue de dos órdenes de magnitud respecto al pase 0, y casi del doble de la población tratada con ribavirina respecto a la sin tratar. El número de haplotipos, aumentó tres veces, en la población tras los cuatro pases, y trece veces en la población tratada con ribavirina, saturando el número de secuencias leídas. Las mutaciones por secuencia se incrementaron seis veces tras cuatro pases, y más del doble al tratar con ribavirina respecto a la no tratada, 16 veces más que a pase 0. Este incremento de la variabilidad se corresponde con el que está descrito en la bibliografía (Holland, Domingo et al. 1990) y que refuerza la idea propuesta, de una posible actividad mutagénica de la ribavirina (Ortega-Prieto, Sheldon et al. 2013, Sheldon, Beach et al. 2014).

Mediante **secuenciación masiva**, el ratio de mutación a pase 0 fue del mismo orden de magnitud, y el incremento a los cuatro pases resultó menor que el valor que el obtenido anteriormente (solo de un orden de magnitud mayor), claramente debido a la baja resolución de las técnicas clásicas. El resto de parámetros, obtenidos por UPDS, señalaron incrementos similares a los obtenidos por técnicas Sanger. En definitiva, de la

comparando los datos presentados en las tablas R1.8 y R1.11, podemos confirmar que los resultados obtenidos mediante **secuenciación masiva**, son similares a los obtenidos por técnicas Sanger, salvando las distancias en cuanto al enorme rango de lecturas y por tanto de resolución, que permite la UPDS (10,5 MM nts vs 15.282 nts secuenciados).

Los valores de entropía de Shannon normalizada obtenidos mediante secuenciación masiva, son de un incremento de más del doble tras cuatro pases, y casi cuatro veces más, en los cuatro pases tratados con ribavirina, consistente con su efecto mutagénico. Los valores de entropía de Shannon de las poblaciones extraídas de los *cultivos* están en el mismo rango que los que presentan las poblaciones de mutantes generadas *in vitro* (de 0,16 para la población wt a 0,31 para la más mutada), validando el tramo de variabilidad generada por el incremento de mutaciones de ambos modelos, y dentro del rango cuyo título viral ha caído hasta valores próximos a la extinción viral. Estos valores de entropía que son una medida normalizada entre 0 y 1, del grado de complejidad de la población, sitúan el límite de viabilidad de la cuasiespecie de VHC1-542 muy por debajo de la mitad de la complejidad máxima, accesible en la población. Es significativo que el valor de entropía de la población wt *in vitro*, sea el doble de la población de *cultivo* a pase 0, indicando que la fidelidad de copia del proceso de PCR introduce variabilidad y complejidad en la población original, de similar magnitud que la que los procesos de selección natural a los cuatro pases en cultivo. El aumento de la complejidad, se correspondió con un aumento del número de haplotipos respecto a la población a pase 0. La población a pase 4 aumentó su número de haplotipos en más de 10 veces, y el de la población a pase 4 tratada con ribavirina 27 veces, o lo que es lo mismo, más del doble respecto a la población sin tratar. Este resultado señala directamente a la actividad mutagénica de la ribavirina como responsable del aumento de variabilidad en la población.

D.1.2.b.- Naturaleza de la variabilidad de las poblaciones extraídas *in cultivo*.

De los resultados presentados en la tabla R1.9, pudimos analizar la naturaleza de las mutaciones identificadas en las tres poblaciones, *in cultivo*, concordante por ambas metodologías. La técnica de UPDS puso de manifiesto en la población a pase 0, una situación próxima al equilibrio de las mutaciones, entre transiciones de T/C (Py/Py) y transversiones de C/A (Py/Pu) sin más variabilidad aparente. La población tras 4 pases, presentó una distribución más amplia, alrededor de las transiciones, si bien los datos de UPDS mostraron una mayor concentración de Pu→Pu frente a Py→Py, y una caída de diez veces en la aparición de transversiones. La población tras cuatro pases con el tratamiento con ribavirina presentó un aumento mayor de la distribución de las mutaciones entre las transiciones y un crecimiento de las transversiones, aunque la mayor resolución de los datos de UPDS puso de manifiesto la concentración de más de un 70% de las mutaciones en transiciones de C/T y situó el aumento de las transversiones en alrededor del doble, respecto a la población sin tratar. El incremento de la distribución de mutaciones aparecidas tras los cuatro pases es consistente con los valores de incremento en el ratio de mutaciones y de entropía de Shannon normalizada, y corresponden con la variabilidad generada por la selección natural en los cuatro pases.

El incremento en la distribución, la concentración de las transiciones sobre las mutaciones C/T (Py/Py) y el aumento de transversiones, existentes en la población tratada con ribavirina respecto a la sin tratar, apunta directamente a la capacidad mutagénica de la ribavirina.

En la tabla R1.10, se presentaron los valores de los índices calculados de las mutaciones $[G \rightarrow A+C \rightarrow T]$ y $[A \rightarrow G+T \rightarrow C]$, para las tres poblaciones y por ambas metodologías. El aumento de la proporción de mutaciones $[G \rightarrow A+C \rightarrow U]$, la disminución de la proporción de las mutaciones inversas $[A \rightarrow G+U \rightarrow C]$ y el crecimiento de la relación de ambos parámetros, son indicadores empleados para reflejar la actividad mutagénica de la ribavirina (Ortega-Prieto, Sheldon et al. 2013, Sheldon, Beach et al. 2014). Podemos asegurar por tanto a raíz de los valores obtenidos, que la variabilidad que encontramos es un resultado de los procesos evolutivos y de selección natural, que actúan sobre los cultivos tras los cuatro pases. El incremento que se produce en la población tratada con ribavirina, tras los cuatro pases, respecto a la no tratada, es resultado del tratamiento con ribavirina, sujeto a los mismos procesos de presión y selección. La situación que presentan estos resultados concuerda con las descripciones de situaciones de *mutagénesis letal* próximas a la extinción viral y descritas en cultivos con VHC, (Ortega-Prieto, Sheldon et al. 2013, Perales, Beach et al. 2013).

D.2.- Efecto de la variabilidad en el reconocimiento estructural *in vitro*:

D.2.1.- Efecto sobre la unión del VHC1-542 con el miR122. Reconocimiento de estructura 1^a (secuencia).

Los resultados del sondeo, dirigido por complementariedad de bases con el micro ARN hepático miR122, sobre la estructura primaria de la región del VHC1-542 (genotipo 1b) revelaron una caída de más de un 90% de la unión, con el aumento del ratio de mutaciones en la población. Como podemos comprobar en la figura R2.3, este resultado confirmó una dependencia lineal de la unión, y por tanto de la integridad de la secuencia receptora de la región VHC1-542 dentro de la población, en función de su ratio de mutaciones.

La representación de los resultados en función de la entropía de Shannon normalizada de las poblaciones, reprodujo la caída de la unión, identificando dos tramos de pérdida de afinidad bien diferenciados. La mayor pérdida de complementariedad, se produce de la población Wt a la primera población de mutantes con un ligero aumento, de 0,03 unidades, de la complejidad en el conjunto de secuencias del VHC. Sin embargo, el mayor incremento de entropía de Shannon que se produce entre las poblaciones de mutantes 1 y 2, de 0,09 unidades, no parece afectar a la extensión del binding. Por el contrario, a partir de la población de mutantes 2 vuelve a caer bruscamente, con un cambio de solo 0,01 unidades de entropía de Shannon, señalando un cambio muy significativo en la afinidad por el miR122, sin apenas modificarse la

complejidad de la población. Estos resultados indican que los cambios de la complejidad poblacional que ocurren como consecuencia del incremento de mutaciones, no son responsables directos de la pérdida de afinidad de la población por el miR122. Por el contrario, señalan que la pérdida de afinidad, por complementariedad entre ambas secuencias, es directamente dependiente del ratio de mutaciones introducido en la población de secuencias receptoras del VHC1-542.

En resumen, los resultados obtenidos de las respuestas dependientes de la estructura primaria, en su conjunto, ponen de manifiesto el acusado efecto que ejerce el ratio de mutaciones, a nivel poblacional, sobre el reconocimiento de las secuencias. Cuando este efecto se ejerce sobre el reconocimiento de las estructuras primarias dentro de una cuasiespecie, que replica *in vivo*, ha de afectar estadísticamente a las actividades dependientes de la identificación de las secuencias, como las actividades de polimerasas o las interacciones dirigidas por una complementariedad de bases. La magnitud cúbica, de la dependencia obtenida del reconocimiento de las secuencias promotoras, pone de manifiesto su importancia y su sensibilidad, frente a la variabilidad, y es consistente con el grado de conservación genómica de estas secuencias.

D.2.2.- Reconocimiento de las estructuras 2^{as} con la actividad RNAsa III:

Los efectos que se han observado en los ensayos de la actividad Ec-RNAsa III con el incremento de la variabilidad, han sido, aparentemente diferentes, entre las poblaciones control (fragmento R1.1), y las poblaciones del modelo de estudio (la región VHC1-542). Dado que el control está constituido por una única estructura secundaria reconocida por la actividad RNAsa III, los resultados obtenidos de su digestión son una medida directa del efecto de la variabilidad sobre la integridad de un solo elemento de doble cadena. Los resultados obtenidos con el modelo de VHC, por el contrario, al estar éste formado por un conjunto complejo de elementos de estructura secundaria en equilibrio conformacional, demuestran el efecto de la variabilidad sobre un sistema dinámico de estructuras secundarias dentro de una cuasiespecie de ARN viral.

En su conjunto, las respuestas determinadas de los experimentos de digestión, han disminuido menos que las caídas de afinidad obtenidas por la secuencia del miR122, con el aumento de la variabilidad, confirmando la mayor robustez de los motivos *dsARN* de doble cadena (estructuras secundarias), frente a la variabilidad y la clara influencia de los cambios conformacionales. Estas conclusiones concuerdan con resultados publicados, que demuestran que la evolución de los genomas virales de ARN se llevó a cabo a través de la robustez de sus elementos funcionales de doble cadena (Wagner and Stadler 1999), y que ha quedado de manifiesto en el grado de conservación de sus secuencias dentro de los genomas virales y su presencia en elementos estructurales responsables de importantes funciones reguladoras de los ciclos virales.

D.2.2.a.- Efectos sobre el reconocimiento de la RNAsa III en las poblaciones del control.

Los ensayos de la actividad de la RNAsa III de *E. coli* sobre las cinco poblaciones de ratio de mutación creciente del fragmento R1.1, uno de sus sustratos naturales, con una única estructura de doble cadena digerible, presentó una caída de la digestión total respecto a la población wt, de hasta el 50%. La disminución de la digestión ha de ser un efecto directo del incremento del ratio de mutaciones y de su complejidad poblacional, sobre la integridad de la estructura dsARN y que la hace reconocible por la actividad RNAsa III. El perfil obtenido de la dependencia del reconocimiento de la estructura secundaria, con respecto al incremento de variabilidad (en función del ratio de mutaciones o de entropía de Shannon normalizada), como se comprobó en las gráficas de la figura R3.2, sugiere una dependencia compleja, no lineal, con una pendiente menor que la obtenida en la estructura primaria, consistente con una mayor robustez estructural y que apunta a la influencia de otros fenómenos de reorganización estructural.

D.2.2.b.- Efecto de la variabilidad sobre el reconocimiento del VHC1-542 con RNAsa III.

Los experimentos de digestión de la *Ec*-RNAsa III sobre las poblaciones de mutantes del VHC1-542, ofrecieron un aumento de la cantidad de productos de digestión con el aumento del ratio de mutaciones, en más de un 30% respecto a la población Wt, como se presenta en la gráfica de la figura R3.8. Este resultado es aparentemente contrario al que se obtuvo con el sustrato R1.1, la diferencia radica en que el fragmento VHC1-542, está muy estructurado: contiene un elemento IRES, un pseudoknot, el codón de inicio de la traducción, otros motivos de doble cadena e interacciones intramoleculares LRA que forman un *switch* (Beguiristain, Robertson et al. 2005). El análisis de los resultados en el marco de esta complejidad estructural, debe explicar el aumento de la digestión de la actividad RNAsa III que se ha obtenido.

Que aumente la cantidad de productos de la digestión con el incremento del ratio de mutaciones, exige un incremento de la cantidad de sustratos de doble cadena reconocibles por la actividad RNAsa III. Además del aumento del rendimiento de la digestión, también se identificaron bandas producto, que corresponden a digestiones de la RNAsa III sobre una conformación alteARNtiva incompatible. Concretamente se identificó la banda producto PIX, que corresponde a la conformación abierta de la región VHC1-542, alteARNtiva a la banda P2P3 correspondiente a la conformación cerrada. También se observó, en las visualizaciones de los resultados, un aumento del ruido de fondo, que sugiere un aumento de la degradación o la aparición de digestiones inespecíficas. Los resultados obtenidos de la cantidad de ambas bandas producto, se presentó en las gráficas de la figura R3.8, y ponen de manifiesto que el aumento del ratio de mutaciones, debe afectar a las secuencias, debilitando las interacciones intramoleculares LRA, lo que explicaría la aparición y crecimiento de la banda producto PIX, que solo se puede justificar con el aumento de la cantidad de sustratos en conformación abierta.

Un aumento de sustratos alternativos es coherente con el aumento de la complejidad que dan los valores de entropía de 0,08 a 0,28. Por tanto, entre las tres primeras poblaciones, ha de producirse un movimiento del equilibrio conformacional, hacia la forma abierta, lo que también explicaría el aumento de digestiones inespecíficas debidas a las posibles formas abiertas diferentes y alternativas que surgen con la apertura y justifican el aumento de la complejidad poblacional. Por otra parte, la banda producto P2P3, se mantiene más o menos constante en torno al 25%, poniendo de manifiesto una resistencia de la estructura 2ª dentro de la población, para mantener su fracción de conformación cerrada en contra el aumento de estructuras en conformaciones abiertas. Los resultados obtenidos sugieren que, con el aumento de las mutaciones, la cantidad de sustrato en conformación cerrada de la región VHC1-542 tiende a mantenerse constante, mientras aumenta la proporción de diferentes sustratos en conformación abierta. La pérdida de complementariedad entre las secciones flanqueantes del VHC1-542, por efecto del aumento de mutaciones en sus secuencias, explica el aumento de la cantidad y diversidad de la conformación abierta. Esto justifica el aumento de la cantidad de sustratos de estructuras secundarias (de ambas conformaciones) identificadas por la RNAsa III, dando explicación al incremento de la cantidad de sustratos reconocibles para la actividad RNAsa III y justificaría el aumento de la cantidad de productos de la digestión.

Entre las poblaciones de mutantes 2 y 3, se produce una caída abrupta de la cantidad de productos de la digestión, mientras las cantidades de las bandas producto P2P3 y P1X se mantienen constantes, en una situación de equilibrio conformacional. El hecho de que la digestión total disminuya, implica una disminución de la cantidad de sustratos digeribles, lo que implica que ha disminuido la fracción total de dsARN dentro de las secuencias, aunque la población mantiene constante su equilibrio conformacional, con un cambio mínimo de entropía (de 0,28 a 0,29). Lo que parece señalar este resultado, es que entre este rango de ratio de mutaciones, y apenas sin cambiar la entropía de la población, las secuencias que no adoptan una de las dos conformaciones se desestructuran, pierden interacciones intramoleculares y adoptan formas que no son identificables para la actividad RNAsa III. Después de la tercera población, vuelve a aumentar la banda producto P1X, junto a otras bandas producto de digestión y del ruido de fondo (debido a degradación o digestiones inespecíficas), lo que sugiere que continúa el incremento de la heterogeneidad conformacional y la degradación de la identidad estructural.

En su conjunto, los resultados indican que el aumento del ratio de mutaciones afecta directamente a la integridad de las secuencias, debilitando las interacciones intramoleculares, especialmente las LRA, lo que afecta a la formación del *switch* que mantiene la conformación cerrada, provocando un aumento de secuencias con conformaciones abiertas y un aumento de la entropía. La población presentó la capacidad de mantener constante su fracción de conformación cerrada, demostrando que la robustez de su estructura secundaria es debida a factores de reorganización estructural y a su naturaleza estadística de cuasiespecie. El aumento de secuencias con

conformación abierta hace coexistir ambos patrones de respuesta, justificando el incremento de sustratos de dsARN inespecíficos y reconocibles por la RNAsa III.

D.2.3.- Reconocimiento de las estructuras 3^{as} con la actividad RNAsa P.

Se procedió sistemáticamente a continuar el estudio del efecto de la variabilidad, sobre las estructuras terciarias, empleando la actividad topológica RNAsa P, (humana y la ribozima de *Synechocystis*), capaz de digerir estructuras tipo ARNt presentes en el ARN. Se dirigió la actividad RNAsa P sobre la estructura *tARN-like*, descrita en la región VHC1-542, y se estudió el efecto de la variabilidad comparando las respuestas sobre las poblaciones de ratio de mutación y complejidad poblacional creciente.

D.2.3.a.- Efectos de la variabilidad en el reconocimiento de la RNAsa P sobre un control.

Los resultados de los experimentos control, llevados a cabo sobre las cinco poblaciones de ratio de mutación creciente del sustrato *pre-tARN^{Tyr}*, con las dos actividades de la RNAsa P, (humana y Rz. de *Sy.*), presentaron una caída lineal del 50% para la actividad de la RNAsa P humana, y del 30% para la Rz. de *Sy.* como se presentó en las graficas de la figura R4.4.

Estas caídas sugieren una dependencia lineal del reconocimiento de las estructuras terciarias, y por tanto de su integridad, frente al incremento de mutaciones y de complejidad poblacional. El hecho de que la pendiente sea algo mayor para la actividad de la Rz de *Sy.*, apunta a una mayor sensibilidad de la actividad bacteriana frente a la integridad de su sustrato, que la actividad RNAsa P humana.

D.2.3.b.- Efecto de la variabilidad en el reconocimiento de la RNAsa P sobre el VHC1-542.

Los resultados experimentales de la actividad de la RNAsa P, sobre las poblaciones de mutantes del VHC1-542, ofrecieron una caída lineal del 90% para la actividad de la RNAsa P humana, y del 70% para la Rz. *Sy.* (Gráficas de la figura R8.2). Las caídas observadas de las respuestas son coherentes con las obtenidas con los controles *pre-tARN^{Tyr}* y sugieren una importante dependencia de la integridad de las estructuras terciarias frente al incremento del ratio mutaciones y de la complejidad estadística en la población. El hecho de que la dependencia sea mayor para la actividad de la RNAsa P humana sugiere una mayor especificidad de la actividad humana frente a la bacteriana. Por otra parte, que la dependencia lineal frente a las mutaciones, de la actividad RNAsa P sea análoga a la dependencia encontrada en la estructura primaria respecto al ratio de mutaciones, revela una clara dependencia de la integridad de la estructura terciaria respecto de sus secuencias. Esto es coherente con resultados publicados sobre mutantes del pseudoknot del IRES del VHC, que sugieren que las secuencias canónicas Wt de la estructura terciaria son más más importantes para el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S, que la estructura por si misma (Kieft, Zhou et al. 2001).

D.2.4.- Respuestas de las estructuras 3^a locales tipo *E-Loop* frente a la variabilidad:

Para completar el estudio sobre las estructuras terciarias, se llevaron a cabo ensayos sobre dos estructuras terciarias locales, tipo *E-loop*, que responden a la acción de la luz ultravioleta c y que han sido descritas por nuestro laboratorio en el tallo lazo 2 (ver Anexo1), de la región del VHC1-542, (Ariza-Mateos, Prieto-Vega et al. 2012). Se han estudiado las dos respuestas diferentes a la luz UV-c, el autocorte y la formación del enlace *crosslink*, y el efecto que ejerce la variabilidad, comparando ambas respuestas a esta actividad, obtenidas de las cinco poblaciones de ratio de mutación y complejidad poblacional creciente. Los resultados obtenidos sobre el producto del autocorte inducido por la radiación UV, presentan un perfil de caída de la respuesta (cantidad de productos de la reacción), que se ajusta perfectamente a una ecuación cúbica, como se presenta en la gráfica de la figura R9.1. La disminución de la reacción fue de aproximadamente de un 33% final sobre la respuesta de la población Wt, y sugieren una significativa dependencia del autocorte frente al incremento de mutaciones. Lo que quiere decir que el aumento de las mutaciones en la población genómica del VHC1-128, disminuye la integridad de sus estructuras *E-loop*, y su capacidad de autocortarse por acción de la luz UV-c. Los resultados de la formación del enlace *crosslink*, obtenidos de estos experimentos, dieron una respuesta similar a la del autocorte. También se observa una caída que se ajusta perfectamente a una ecuación polinómica de tercer grado, alcanzado una disminución final de la formación de la banda de *crosslink*, superior al 30%. En definitiva ambos resultados ponen de manifiesto una relación cubica entre el ratio de mutaciones y la integridad de las estructuras tipo *E-loop*.

D.2.5.- Respuestas conformacionales frente a la variabilidad:

Los resultados obtenidos de los experimentos con la actividad RNAsa III apuntaron a la existencia de un equilibrio conformacional, regulado por la formación de estructuras secundarias de la región VHC1-542 por LRA intramoleculares. Trabajos previos de nuestro grupo han descrito la formación de un *switch* en la región del VHC1-542 y caracterizado por un equilibrio conformacional (Beguiristain, Robertson et al. 2005). Otros resultados han descrito un cambio conformacional, inducido por la actividad del micro ARN 122, al unirse por complementariedad de secuencia, compitiendo con la hibridación intramolecular en la misma zona de formación del *switch* (Diaz-Toledano, Ariza-Mateos et al. 2009).

Para completar este trabajo estructural *in vitro*, se han llevado a cabo experimentos para estudiar el efecto de la variabilidad sobre el equilibrio conformacional. Se han empleado los patrones diferentes de respuesta a la actividad RNAsa III, sobre las conformaciones, abierta y cerrada. Para ello, se han comparado los resultados que se obtienen cuando se incuban las poblaciones de VHC con el miR122, que libera el *switch*, frente a los resultados obtenidos sin incubarse con el miR122. También se han empleado actividades enzimáticas dependientes de simple y doble cadena, para estudiar los posibles cambios de proporción estructural en ambas

situaciones conformacionales. En todos los experimentos se ha evaluado el efecto de la variabilidad comparando los resultados obtenidos en las poblaciones de mutantes frente a la población wt respecto a sus ratios de mutación o su entropía de Shannon normalizada.

D.2.5.a.- Efectos de la variabilidad sobre el equilibrio conformacional.

Los resultados obtenidos de las electroforesis en geles de acrilamida en condiciones nativas sobre la población del VHC1-542Wt, confirmaron la existencia de las dos formas, en equilibrio conformacional, que estaban descritas en la bibliografía. Este equilibrio entre las dos conformaciones, demostró depender de la concentración de ion Mg^{2+} , que favorece la conformación cerrada, hasta una proporción 60/40 a 10mM Mg^{2+} , que es a la concentración de trabajo que usamos en el buffer P humana. En la figura gráfica R7.1, se presentaron los resultados obtenidos del equilibrio conformacional, donde se puede comprobar la evolución que experimenta la proporción de las dos conformaciones, la 1 cerrada y la 2 abierta, frente al ratio de mutaciones y frente a la complejidad poblacional. Los resultados indican una importante caída de ambas conformaciones con el aumento del ratio de mutaciones, hasta la tercera población. La disminución es más acusada en la conformación cerrada que invierte su fracción, y que sugiere un desplazamiento del equilibrio hacia la conformación abierta. Esto queda de manifiesto en la representación frente a la entropía de Shannon entre las poblaciones de mutantes 1 y 2. El aumento de la proporción de la conformación abierta está acompañado de un aumento del ruido de fondo y una difuminación de la banda, consistente con un aumento de variantes conformacionales abiertas. Desde el tercer punto, las dos bandas correspondientes a ambas conformaciones, se diluyen como se pudo observar en las radiografías de los geles electroforéticos. Se observa un aumento del ruido de fondo a la vez que se desplaza la señal de las digestiones hacia arriba, lo que apunta al incremento de una heterogeneidad conformacional de secuencias con estructuras variantes abiertas, que es consistente con el aumento de mutaciones y el incremento de subtipos que conlleva, aumentando la complejidad de la población tal y como pronostica la teoría de cuasiespecies en los límites de la catástrofe de error.

D.2.5.b.- Efectos de la variabilidad sobre la competición entre, el binding del miR122 y el switch intramolecular en el VHC1-542, a través de la actividad RNAsa III.

La interacción con el miR122 puede ser responsable del desplazamiento del equilibrio conformacional, al competir por unirse con la misma zona donde se forman las LRA que dan lugar al *switch*, que origina la conformación cerrada (Diaz-Toledano, Ariza-Mateos et al. 2009). Se ha analizado el efecto de la variabilidad sobre la unión con el miR122, y como se ve afectado el equilibrio conformacional a través de la proporción de ambas conformaciones dada por la respuesta a la actividad RNAsa III. Los resultados obtenidos para las digestiones de la actividad RNAsa III fueron, en primer lugar, idénticos en los ensayos incubados con miR122 y sin miR122, para cada población. Este resultado indica que el cambio conformacional no afecta

significativamente la cantidad de sustrato reconocible por la actividad enzimática, como podemos observar en la gráfica de la figura R6.1.

Los resultados obtenidos de la digestión de la actividad RNAsa III (sin incubar con miR122) junto con los extraídos de la electroforesis en condiciones nativas, demuestran un equilibrio conformacional, desplazado hacia la forma cerrada (60/40), en la población Wt. El análisis de los resultados sobre las bandas producto mayoritario de la digestión, confirmó una digestión mayoritaria en la posición de corte que va a producir la banda producto P2P3 y que se justifica por la formación del *switch*. Al incubar con miR122 la población Wt, este equilibrio conformacional ha de desplazarse hacia una proporción mayoritaria de la conformación abierta, produciéndose una proporción mayor de la banda producto P1X que de la P2P3.

En la gráfica de la figura R6.1 se presentaron comparativamente los resultados de la digestión con RNAsa III, de los experimentos sin incubar con el miR122, que ya se analizaron en el transcurso de esta discusión, en el apartado D.2.2b, y los resultados de los experimentos de digestión sobre las poblaciones incubadas con el miR122. La evolución significativa de las bandas producto de corte P1X y P2P3, corresponden a la proporción de cada una de las conformaciones en cada situación, con respecto al incremento del ratio de mutaciones y el valor de la entropía de Shannon. Las poblaciones incubadas con miR122, mantuvieron constante el % de la banda producto P1X (conformación abierta) en torno al 13%, con todas las poblaciones y la banda producto de digestión P2P3 (conformación cerrada), aumentó por encima del 25% con el incremento del ratio de mutaciones y el índice de Shannon. En este equilibrio están compitiendo dos interacciones por complementariedad de secuencia, unas intramoleculares implicadas en la formación del *Switch* y otras intermoleculares de unión con el miR122, y que provoca su apertura. Este resultado pone de manifiesto una mayor robustez de las interacciones intramoleculares que las intermoleculares, y revela una mayor dependencia de la integridad de la secuencia (estructura primaria) con la variabilidad. Esta dependencia de la integridad de secuencia es más sensible en las interacciones en CIS que en TRANS, y es similar respecto del ratio de mutaciones como frente a la complejidad poblacional en términos de entropía de Shannon. Por otra parte, el aumento del ruido de fondo en las digestiones con RNAsa III, además de un aumento de la degradación dependiente del ratio mutacional y del incremento del valor de entropía de Shannon, sugiere un aumento de las digestiones alteARNtivas con el aumento de mutaciones. En las digestiones sin incubar con el miR122, se hace especialmente patente un aumento de digestiones inespecíficas, de secuencias en conformación abierta, alternativas a la digestión “canónica” sobre el punto de corte correspondiente a la posición 490 que produce el producto de corte P1X. Esta explicación es consistente con el aumento de mutaciones en las secuencias del ARN y con el aumento de complejidad poblacional coherente con la teoría de cuasiespecies.

D.2.5.c.- Efectos de la variabilidad sobre el reconocimiento de RNAsas dependientes de estructura V1 y T1.

Se ha completado el estudio conformacional, analizando la respuesta a las actividades RNAsas T1 y V1 que, como se expuso en la Introducción, responden de manera inespecífica a simple y doble cadena de ARN, al digerir las G desapareadas o las apareadas, respectivamente. En las figuras de las gráficas de la figura R6 pudimos comprobar los resultados de los ensayos llevados a cabo empleando ambas actividades sobre la población Wt, en comparación con las respuestas de las poblaciones de mutantes. Los resultados obtenidos, para ambas actividades, fueron de un incremento en el porcentaje de productos de digestión con las primeras tres poblaciones. También demostraban una caída brusca en la tercera población que rompía la tendencia, volviendo a aumentar con la población de mutantes 4.

Este resultado fue análogo en ambas endoribonucleasas T1 y V1, y también similar al obtenido con la RNAsa III. El resultado parece aparentemente contradictorio, ya que no parece lógico que aumente la proporción de simple y doble cadena a la vez en la población. Pero se puede explicar con el aumento de la heterogeneidad conformacional que hemos confirmado en nuestros resultados y que explicaría el aumento de la cantidad de sustratos, con mayor diversidad de fragmentos de simple y doble cadena, con el aumento del ratio de mutaciones. Esto indica que el aumento de la variabilidad origina un aumento del número de variantes de las estructuras, que es consistente con su incremento de entropía de Shannon normalizada, creando mayor número de sustratos potenciales para ambas RNAsas. Esta explicación estaría en sintonía con la respuesta que hemos dado al aumento de sustratos de digestión de la RNAsa III sobre las poblaciones del VHC1-542, aunque disminuya la digestión para un único sustrato (R1.1), con el ratio de mutaciones, y que es coherente con todo lo expuesto en esta discusión (D.2.2.).

D.2.5.d.- Efectos de la geneticina sobre el reconocimiento de la actividad RNasa III vs variabilidad.

Los estudios llevados a cabo sobre las poblaciones de mutantes del HCV1-542, indican que la geneticina inhibe específicamente la actividad RNasa III sobre motivos de dsARN de esta región del VHC.

Los experimentos de digestión con RNasa III sobre las poblaciones de mutantes sin incubar con el miR-122, cuyo equilibrio conformacional se encuentra desplazado mayoritariamente a la conformación cerrada, muestran que el sustrato y el producto parcial de digestión (P2P3) característico de la forma (C), se incrementan con el tratamiento con la geneticina de forma muy acusada.

Con el aumento del ratio de mutaciones el efecto inducido por el tratamiento con geneticina que se observa sobre los sustratos aumenta. Sobre las bandas producto P2P3, disminuye con la primera población de mutantes y después se mantiene e incluso se incrementa ligeramente. Estos resultados indican que el incremento de la variabilidad mantiene o incrementa ligeramente la acción del fármaco.

Después de la primera digestión del sustrato se liberan las bandas producto parcial P1 y P2P3, y este último producto cambia su conformación de una forma cerrada a una forma abierta proporcionando a la actividad RNasa III la oportunidad de una nueva digestión en el tallo lazo VI del VHC1-542, en la posición 490, que dan lugar a productos banda caracterizada como X. Vemos claramente que el aumento de la variabilidad y la acción de la droga desplazan las intensidades de las bandas producto de corte, hacia los productos de mayor tamaño o de menor movilidad electroforética. Este resultado apunta claramente a un efecto de inhibición de la digestión.

Al incubar el ARN del VHC1-542 con el miR-122, se desplaza el equilibrio de una conformación mayoritaria en posición cerrada a una conformación abierta. En esta situación, los resultados muestran que la droga inhibe la digestión de la RNasa III, si bien, ligeramente menos que en los experimentos sin incubar con el miR-122. Se sabe que la interacción de la geneticina se produce en la zona dsARN, responsable de la formación del switch. Esto resultados son consistentes con los resultados obtenidos con los experimentos de la actividad RNasa III sobre las poblaciones de mutantes incubadas con miR-122 que señalan un desplazamiento del equilibrio conformacional hacia formas abiertas y una disminución del grado de inhibición de la droga.

Estos resultados, en su conjunto, indican que el incremento de la variabilidad refuerza el efecto inhibitor que demuestra la geneticina sobre la actividad de la RNasa III en la población del ARN del VHC1-542. Dado el importante papel que tiene el riboswitch del elemento IRES del VHC, estos resultados refuerzan el potencial terapéutico combinado de antivirales como la geneticina con mutágenos como la ribavirina dirigidos a ARN virales, y en especial al IRES como diana terapéutica.

D.3.- Efecto de la variabilidad sobre el reclutamiento de la subunidad 40S:

Analizados los efectos de la variabilidad sobre la integridad de los distintos niveles estructurales, se ha pretendido evaluar cuál es el efecto sobre la contribución conjunta de todos los niveles estructurales dentro de la población de la cuasiespecie. Está descrito que los elementos estructurales responsables del reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S están altamente conservados, en términos de secuencia (Smith, Mellor et al. 1995) y de estructura secundaria (Brown, Zhang et al. 1992). Aunque no se ha demostrado que todos los elementos contribuyan directamente con el reclutamiento o sean esenciales para este, si se han identificado las interacciones del reclutamiento (Pestova, Shatsky et al. 1998, Lytle, Wu et al. 2001, Lytle, Wu et al. 2002). Se ha sugerido que la unión 40S: (IRES) VHC es crítica en la formación del complejo pre inicio de la traducción, y que éste se debe a un reconocimiento tridimensional de los diferentes dominios estructurales involucrados que actúan sinérgicamente y forman una serie múltiple de contactos con la subunidad 40S en diferentes localizaciones (Kieft, Zhou et al. 2001). Para perseguir este objetivo marcado, se ha estudiado la actividad del reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S, que es fruto de la contribución global de todo el contexto estructural de la región VHC1-542, que constituye el elemento IRES y que contiene el dominio RBD, responsable último del reclutamiento. Se estudió el efecto de la variabilidad, a través de los ensayos del reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S, por la región VHC1-542 (IRES), y comparando la respuesta del reclutamiento de la población Wt, frente a las poblaciones de ratio de mutación y complejidad poblacional creciente.

D.3.1.- Efecto de la variabilidad sobre el binding del control CrPV-40S *in vitro*:

Para poner a punto el método, calibrar los experimentos y tener valores de referencia, se llevaron a cabo ensayos control del reclutamiento de la subunidad 40S, con poblaciones análogas del elemento IRES del virus de la parálisis del grillo (CrPV1-198).

En las gráficas y tabla, presentadas en la figura R10.1, se presentaron los resultados obtenidos de estos experimentos, que ofrecieron un aumento del valor de la KD del complejo CrPV1-198:40S de casi tres veces respecto al valor de KD de la población Wt ($4,9 \pm 0,5$ nM) que coincide con el publicado en la bibliografía (Landry, Hertz et al. 2009). Este aumento del valor de las KD significa una pérdida lineal de la afinidad de la unión entre la subunidad ribosomal 40S y el IRES del CrPV1-198, de más de 2,5 veces, con el aumento del ratio de mutaciones en la población.

Estas caídas de la afinidad ponen de manifiesto la importante dependencia de la integridad del contexto estructural frente al incremento de mutaciones para el mantenimiento funcional del elemento IRES. Es decir, 2 mutaciones cada 100 nucleótidos en una población del IRES del CrPV, le hacen perder 2,5 veces su capacidad de reclutar el ribosoma.

D.3.2.- Efecto de la variabilidad sobre el binding IRES del VHC1-542:40S *in vitro*:

En la gráfica de la figura R10.2 se representaron los valores de KD, obtenidos del reclutamiento de la subunidad 40S con las poblaciones de ratio de mutación y complejidad poblacional creciente, del elemento IRES del VHC1-542.

Los resultados de formación del complejo, presentan un aumento del valor de la KD respecto al valor de la población Wt ($5,1 \pm 0,6$), valor que coincide con el publicado para el IRES del VHC (Landry, Hertz et al. 2009) hasta ($27,5 \pm 3,8$) de la población de mutantes 2. Este importante aumento del valor de las KD significa una pérdida de la afinidad por la unión con la subunidad ribosomal 40S, de hasta el 80%, con la población de mutantes 2 y más del 70% con la población de mutantes 4. Estas caídas de la afinidad por la subunidad 40S del IRES del VHC sugieren una importante dependencia de la integridad del contexto estructural frente al incremento de mutaciones y el aumento de la complejidad estadística en la población, y que va a ser crítica para el mantenimiento funcional del conjunto estructural que constituye el elemento IRES.

Los resultados de todas las series de experimentos han puesto de manifiesto una significativa anomalía en la población de mutantes 3, que se confirma con una bajada muy acentuada de la KD, sobre todo respecto de los valores de entropía de Shannon normalizada. Esta caída representa un aumento de la afinidad del reclutamiento en esta población, con un aumento mínimo de entropía y pese al aumento del ratio de mutaciones. Después vuelve a subir con la población 4, a los valores de la población de mutantes 2. Este resultado es coincidente con los perfiles observados en los resultados aportados en este trabajo de Tesis con las RNAsas III, T1 y V1 y que podrían justificarse por una reorganización estructural de la población, en torno a un cambio del equilibrio conformacional.

En su conjunto estos resultados entre la población 2 y 3, sugieren que entre este rango de mutaciones se produce un viraje en el equilibrio conformacional, entre las formas cerradas y abiertas, que confirmaron los patrones de digestión alteARNtivos con la RNAsa III, y que es coherente con el hecho de que dichos equilibrios presenten diferentes valores de KD. El equilibrio regido por la conformación cerrada en la población Wt es el que presenta mayor afinidad entre el IRES del VHC y la subunidad ribosomal 40S con un valor de KD de ($5,1 \pm 0,6$ nM). La KD aumenta hasta la población de mutantes 2 con la caída de la proporción de la forma cerrada y disminuyendo más de 5 veces la afinidad. La bajada de KD a ($7,4 \pm 0,9$ nM) en la población de mutantes 3, sugiere la formación de un nuevo equilibrio, invertido estadísticamente hacia la conformación abierta, responsable del producto P1X de digestión de la RNAsa III. Esto apunta directamente al ratio de mutaciones como responsable directo de la pérdida de las LRA que mantienen la forma cerrada forzando un viraje del equilibrio conformacional hacia formas abiertas sin apenas aumentar la complejidad en la población.

En los gels nativos de resolución de los experimentos de binding, se observó la aparición de dos bandas correspondientes al binding y cuya explicación no está del todo clara. Los resultados de KD correspondientes al binding 1 de la población de mutantes 2, son los menores, lo que sugiere que la menor proporción de conformación cerrada coincidiría con la fracción de mayor afinidad por la subunidad ribosomal. Y los valores de KD del binding 2 se mantienen constantes en todas las poblaciones, y son los que determinan estadísticamente la menor afinidad del reclutamiento por la población de mutantes 2. Por tanto esto podría ser consistente con la idea de que cada conformación presenta una afinidad diferente por la subunidad ribosomal 40S, y que la afinidad del conjunto de la población, va a ser el resultado de la aportación de la fracción e integridad de cada conformación. Pese a la influencia de este equilibrio, el aumento de mutaciones arrastra a una pérdida de afinidad por la subunidad ribosomal 40S y de su reclutamiento de un 70% en la población de mutantes 4. Los resultados conformacionales aportados en este trabajo señalan directamente a la disminución del resto de forma cerrada y al aumento de la proporción de formaciones abiertas, como responsables de la pérdida de afinidad por la subunidad ribosomal 40S. Hasta que se produce el cambio en el equilibrio conformacional, el comportamiento de la KD se ajusta exactamente a una ecuación de segundo grado, cuya tendencia parece repetir tras el nuevo equilibrio:

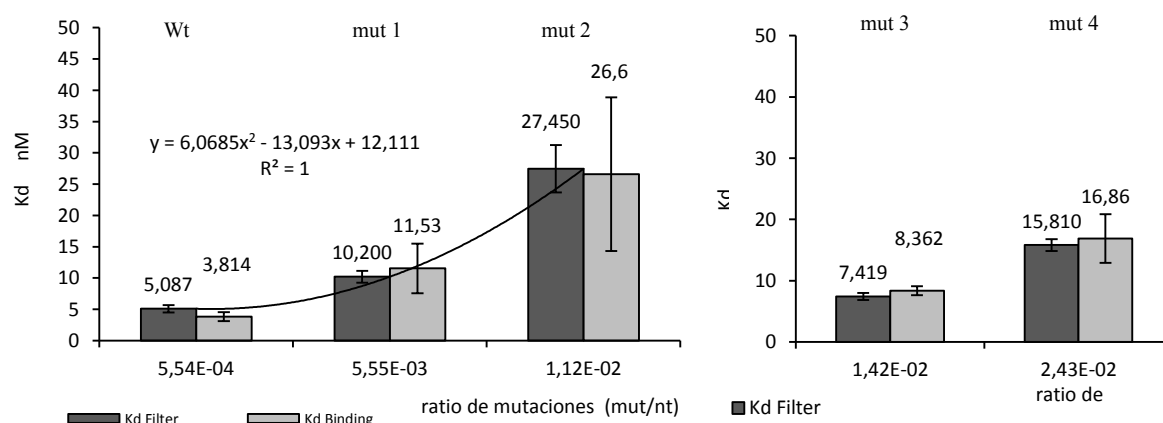


Figura gráfica D1

La comparativa de los resultados de KD del *Binding-Filter* entre las poblaciones de IRES del VHC y las del CrPV, confirman la pérdida lineal de afinidad del reclutamiento con el aumento de la variabilidad, dada por el aumento del ratio de mutaciones. También confirman la existencia e influencia del equilibrio conformacional sobre la afinidad del reclutamiento por parte del IRES del VHC y que parece no influir en las poblaciones del IRES del CrPV, donde no hay descrito ningún cambio conformacional y donde la pérdida de afinidad es claramente lineal sin discontinuidad aparente.

D.3.3.- Efecto de la variabilidad sobre el binding IRES: 40S del VHC *in cultivos*:

Para completar los objetivos marcados, se ha tratado de trasladar los resultados del estudio del efecto de la variabilidad sobre las estructuras en las cuasiespecies virales obtenidos *in vitro*, al modelo *in cultivo*, para poder analizar los resultados extraídos a un contexto celular *in vivo*. Ambos modelos han demostrado representar el mismo rango de variabilidad, tanto en ratio de mutaciones como en la complejidad poblacional, evaluada por los valores de entropía de Shannon normalizada. Los análisis sobre la naturaleza de sus mutaciones respaldan el carácter *randomizado* de las mutaciones provocadas en las poblaciones *in vitro* y el carácter selectivo de las identificadas en las poblaciones extraídas *in cultivo*. Todo esto, hace posible analizar el efecto que ejercen las mutaciones aleatorias en la cuasiespecie frente al que ejerce la selección natural y la acción mutagénica de la ribavirina, en las proximidades de la extinción viral inducida por mutagénesis.

Este estudio final, se ha centrado sobre la actividad de todo el contexto estructural del elemento IRES, evaluando la acción de la variabilidad natural y el efecto mutagénico de la ribavirina, sobre el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S en el marco poblacional de cuasiespecie. Para ello, se llevaron a cabo los ensayos del reclutamiento de la subunidad 40S por las poblaciones del elemento IRES del VHC1-570 genotipo 2a extraídas de cultivos, a pase 0, a pase 4 y a pase 4 tratadas con ribavirina.

Los resultados, que se presentaron en la gráfica de la figura R10.1, indicaron una disminución aproximadamente a la mitad del valor de la *KD* del complejo tras cuatro pases, respecto al valor de *KD* de la población a pase 0 ($5,4 \pm 0,7$). Una vez más, el valor obtenido de *KD* para la población a pase 0 coincidía con los valores obtenidos para la población Wt *in vitro* y era coherente con los publicados en la bibliografía (Landry, Hertz et al. 2009). La bajada de *KD* significa un aumento de la afinidad por la subunidad ribosomal 40S en la población, al doble, tras cuatro pases. Esto quiere decir que las secuencias descendientes de la población original de los cultivos a pase 0, presenta un fenómeno de selección natural sobre aquellos IRES que mantienen o disminuyen el valor de *KD* en la población y por tanto mantienen o mejoran la afinidad de la población por el reclutamiento del ribosoma. Esta selección justificaría la mejora estadística del valor de la *KD* de la población tras cuatro pases, señalando el reclutamiento del ribosoma como un factor crítico en la viabilidad de la cuasiespecie, un valor selectivo de la evolución y una diana terapéutica frente a cuasiespecies virales.

El ratio de mutaciones se incrementó cuatro veces y al doble la entropía de Shannon normalizada, en los cuatro pases tratados con ribavirina respecto a los no tratados señalando el efecto mutagénico de la ribavirina descrito en la bibliografía. La población tras cuatro pases y tratada con ribavirina (100 μ M) presentó una ligera pérdida de afinidad por las subunidades ribosomales 40S, aunque su valor de *KD* continuó manteniendo un valor muy por debajo del valor de *KD* de la población a pase 0. Este

resultado pone de manifiesto que la actividad mutagénica de la ribavirina va a ampliar las variantes dentro de la población, como señala el aumento del valor de entropía de Shannon, y la presión generada por los pases va a seleccionar solo aquellas variantes capaces de mantener o mejorar el reclutamiento del ribosoma. La ligera pérdida de afinidad puede que esté relacionada con la desaparición de la población de subtipos óptimos o la aparición de formas interferentes en las poblaciones tratadas con ribavirina, y que analizaremos a continuación.

D.3.4.- Análisis del *binding* IRES-40S del VHC en clones INF resistentes tras pases largos.

El efecto de la presión selectiva ha demostrado su acción sobre la variabilidad natural, e inducida con ribavirina, a título estadístico dentro de la población de la cuasiespecie. Pero se desconoce cómo actúa la mutagénesis sobre la cuasiespecie respecto a la entrada de ésta en catástrofe de error, y si tiene relación con su pérdida de viabilidad y extinción viral (mutagénesis letal).

Para tratar de arrojar luz sobre el papel que juega la mutagénesis respecto a la extinción viral, se analizaron los valores de *KD* de dos clones que demostraron resistencia al tratamiento con INF tras pases largos (100), el Clon2 y Clon6 (Anexo 2). Estos dos clones presentaron mutaciones adaptativas concretas que se relacionan directamente con su persistencia evolutiva. Como se observó en la gráfica de la figura R11.1, sus valores de *KD* fueron más bajos que los obtenidos por las poblaciones a pase 0, y a pase 4. Estos resultados confirman un efecto selectivo de la evolución sobre aquellos elementos IRES del VHC 1-570-2a que presentan una mayor afinidad, de casi el triple, por la subunidad ribosomal 40S.

Analizando en detalle las mutaciones que presentan estos clones, es significativo que la mutación 301U presente en el Clon 6, esté enriquecida en la población a los 4 pases, que presenta un aumento superior al doble de afinidad por la subunidad ribosomal 40S. Esta posición aparece descrita en la bibliografía como de interacción directa entre el IRES del VHC y la subunidad 40S, apareciendo protegida por la unión frente la acción degradativa del Iodo (Kieft, Zhou et al. 2001), lo que la señala como una posible posición crítica para la estabilidad de la estructura loop IIIe y el pseudoknot en el loop IIIf. En la población a los 4 pases con tratamiento con ribavirina desaparece completamente la mutación 301U del Clon 6, acompañado de una ligera disminución de la afinidad. Estos resultados, revelan la responsabilidad del efecto mutagénico de la ribavirina en la desaparición, al menos, de una mutación óptima en la secuencia que confería un aumento en la afinidad por el ribosoma, mejorando funcionalmente la *KD* de la población y posiblemente del proceso de traducción. Esta pérdida confirmada de mutantes óptimos, se puede entender estadísticamente, como un aumento en la proporción de mutantes defectivos, relacionándola directamente con el efecto mutagénico de la ribavirina.

El resultado obtenido de estos ensayos parece consistente con los datos previos publicados y con la teoría de cuasiespecies, revelando que la acción mutagénica de la ribavirina induce un proceso de mutagénesis letal en la población genómica del VHC1-570 (2a), que provoca la desaparición de genotipos óptimos y aumentando la concentración de variantes defectivas alrededor de las especies más resistentes. En los límites de la catástrofe de error, la pérdida de la viabilidad de la cuasiespecie va a estar relacionada con la relación estadística entre la proporción de formas defectivas interferentes y de formas más robustas que han de mantener la capacidad infectiva de la población. Los resultados sugieren que cuando la extinción viral va a llegar cuando las formas más robustas son incapaces de mantener la actividad viral por el efecto de las defectivas. En definitiva, nuestras conclusiones van a respaldar la estrategia de mutagénesis letal como vía terapéutica frente a patologías generadas por cuasiespecies virales.

CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN I:

Las secuencias promotoras han presentado una dependencia significativa con respecto al incremento de mutaciones, lo que refuerza la importancia de su reconocimiento y su conservación. Las estructuras primarias y terciarias analizadas, en los ARN del elemento IRES de la región del VHC1-542, han demostrado una dependencia lineal con el incremento del ratio de mutaciones. El hecho de que ambas dependencias lineales fueran análogas, sugiere una dependencia lineal de la integridad de la estructura terciaria respecto de su secuencia.

CONCLUSIÓN II:

Las estructuras secundarias analizadas, en los ARN del elemento IRES de la región del VHC1-542, han demostrado una importante dependencia frente al incremento del ratio de mutaciones, pero con mayor robustez que las estructuras primarias y terciarias, así como una clara dependencia conformacional y del contexto estructural.

CONCLUSIÓN III:

La región VHC1-542 ha demostrado modular la integridad de su conjunto estructural, a través de un equilibrio conformacional dinámico, cuya robustez viene dada por la propia naturaleza estadística de cuasiespecie.

CONCLUSIÓN IV:

La afinidad por el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S de los ARN, generados *in vitro*, del elemento IRES de la región del VHC1-542(1b), han demostrado una importante dependencia frente al incremento del ratio de mutaciones, junto a una clara influencia conformacional.

CONCLUSIÓN V:

La afinidad por el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S de los ARN, extraídas de cultivos, del elemento IRES de la región del VHC1-542(2a), han demostrado una importante influencia de la selección natural, desplazando el conjunto de la población sobre los subtipos de menor *KD*, por tanto, que confieran a la población un aumento de la afinidad funcional por la subunidad ribosomal 40S.

CONCLUSIÓN VI:

El empleo de la ribavirina ha demostrado ejercer un efecto mutagénico sobre las poblaciones de ARN del elemento IRES de la región del VHC1-542(2a) extraídas de cultivo. Este efecto mutagénico fue acompañado de una desaparición de mutaciones adaptativas sensibles para la población y de una pérdida ligera de afinidad por la subunidad ribosomal 40S, que apoya el uso terapéutico de la ribavirina y a la estrategia de mutagénesis letal frente a cuasiespecies virales, dentro de una hipótesis de catástrofe de error.

ANEXOS

ANEXO 1

Un Mundo de ARN:

Caja 1: ARN World

	Datos Experimentales	Demostración
Origen del ARN⁵	Sobre superficies minerales ⁶ para cubrir las necesidades catalíticas ⁷ requeridas para la activación de nucleótidos.	Huang y Ferris generaron secuencias aleatorias reproduciendo las condiciones experimentalmente.
Sustrato de las actividades enzimáticas del ARN	Normalmente moléculas de ARN	Incluso la propia ribozima catalizando la hidrólisis de sus propios enlaces fosfodiéster
Reconocimiento del sustrato	Por interacciones de apareamiento de bases para alinear el sustrato	Complementariedad de secuencia
Actividad catalítica	Reacciones de transesterificación o hidrólisis de un enlace fosfodiéster	Ivanov et al. ⁸ en 2005 obtuvieron una molécula de ARN por unión de dos horquillas a través de su actividad ribozima ligasa y manteniendo su actividad intacta.
Función	Corte ⁹ y Ligación ¹⁰ de moléculas ARN Splicing - Editing	T. Cech ¹¹ sugiere, que las actividades de corte y ligación en los procesos de splicing debieron de relacionarse muy pronto en la evolución.
Actividad replicativa en el ARN: Especialización Intrones	Especialización funcional de las cadenas de ARN: Las secuencias con las estructuras más robustas son las más limitadas funcionalmente aunque serían las más estables y por tanto las mejores para almacenar la información.	Nikola et al. ¹² proponen una solución a esta paradoja evolutiva: Las cadenas de menor estabilidad y más posibilidades conformacionales, presentarán mayores posibilidades funcionales. Las secuencias de mayor estabilidad perpetuarán un almacenamiento génico implícito.
Genomas víricos	Estructuras y almacenamiento funcional	Confiere de contenido a la secuencia de bases: Información Genética.
información genética	Las actividades del ARN correlacionan secuencias o motivos estructurales capaces de contener información funcional específica.	Bartell, Szostack ¹³ , Ecland. Las cadenas de ARN responsables del mantenimiento y transporte de la información, constituirán la base del genotipo.

⁵ Orgel, L. E. (2004). "Prebiotic Chemistry and the Origin of the RNA World." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39: 99-123

⁶ Ferris, J. P. (2002). "Montmorillonite catalysis of 30-50 mer oligonucleotides: laboratory demonstration of potential steps in the origin of the RNA world." *Orig Life Evol Biosph* 32: 311-332

⁷ Huang, Y. and J. P. Ferris (2003). "Synthesis of 35-40 mers of RNA oligomers from unblocked monomers. A simple approach to the RNA World." *Chem Biodivers Commun. (Camb.)* 12: 1458-1459

⁸ Ivanov, S. A., et al. (2005). "Efficient RNA ligation by reverse-joined hairpin ribozymes and engineering of twin ribozymes consisting of conventional and reverse-joined hairpin ribozyme units." *FEBS Journal* 272: 4464-4474.

⁹ Uhlenbeck, O. C. (1987). "A small catalytic oligoribonucleotide." *Nature* 328: 596-600

¹⁰ Ecland, E. H., et al. (1995). "Structurally complex and highly active RNA ligases derived from random RNA sequences." *Science* 269 364-370.

¹¹ Cech, T. R. (1983). "RNA Splicing: Three Themes with Variations." *Cell* 34: 713-716

¹² Nikola, A. I., et al. (2013). "The Paradox of Dual Roles in the RNA World: Resolving the Conflict Between Stable Folding and Templating Ability." *J Mol Evol* 77: 55-63

¹³ Carothers, J. M., et al. (2004). "Informational Complexity and Functional Activity of RNA Structures." *J. Am. Chem. Soc.* 126 (16): 5130-5137.

Caja 2: Ejemplos de virus en función de su secuencia

VIRUS ARN			
Tipo de Molécula	Tipo de Hélice	Tipo de virus según huésped	Familia de virus
Lineal	Sencilla	Fago	<i>MS2, f2, Qβ</i>
		Animal	<i>PicoARNvirus (polio)</i> <i>Togavirus</i> <i>Rhabdovirus</i> (estomatitis, rabia) <i>Myxovirus</i> (gripe) <i>Paramyxovirus</i> (Sendai, paperas)
		Vegetal	Virus mosaico tabaco (TMV)
	Doble	Fago	$\phi 6$
		Animal	<i>Reovirus</i>
		Vegetal	Tumor de las heridas
Circular	Sencilla	Vegetal	Viroide (PSTV)
VIRUS ADN			
Tipo de Molécula	Tipo de Hélice	Tipo de virus según huésped	Familia de virus
Circular	Sencilla	Fago	$\phi X174$ <i>M13</i>
		Animal	<i>Parvovirus</i>
	Doble	Animal	<i>Papovavirus</i> (SV40, polioma) <i>Adenovirus</i> <i>Herpetovirus</i> (Herpes) <i>Poxvirus</i> (viruela) <i>Iridovirus</i> (peste porcina)
Lineal	Doble	Fago	Extremos cohesivos: Fago λ ($\phi 80, 434, P2, 186$) Redundancia terminal: serie <i>T-par, T3 y T7</i>
VIRUS ARN-ADN			
Lineal	Sencilla	Animal	<i>Retrovirus</i> (<i>Ribodesoxivirus</i>) - Sarcoma de Rous (Pollo) - Leucemia de Rauscher (ratón) - HIV (virus de inmunodeficiencia humana: SIDA)


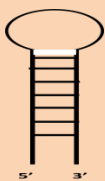
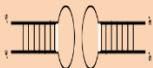
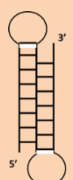
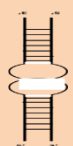
Caja 3: Factores que influyen en el plegamiento terciario del ARN¹⁴

<p>Papel de la ribosa: el grupo 2' hidroxilo es capaz de actuar como donador y aceptor de protones, posibilitando la formación de puentes de hidrógeno y la formación de motivos más estables morfológicamente.</p>
<p>Los motivos estructurales secundarios proporcionan un conjunto rígido de subunidades de montaje, y que pueden conducir a plegamientos más estables o alternativos.</p>
<p>La Estabilización electrostática: Los plegamientos inherentes a la carga negativa de su esqueleto fosfodiéster, tienden a ser neutralizados para compensar así los grandes potenciales electrostáticos a través de interacciones con iones. La presencia de iones mono y divalentes, abundantes en el medio celular, ayudan a vencer las barreras electrostáticas convirtiéndose en requerimientos estructurales integrales.</p>
<p>Iones metálicos: Los iones metálicos monovalentes quelatados en la estructura para apantallar las cargas y los divalentes van a estabilizar las estructuras de ARN, compensando la carga negativa de los esqueletos fosfodiéster. Los iones divalentes presentan opciones menos rígidas y difusas, también relacionadas con la estabilización de las estructuras. En el 2011 Ramesh et al.¹⁵ Identificaron bolsillos para iones metálicos en riboswitches con Mg^{2+} sensibles a cationes divalentes.</p>
<p>Interacciones específicas de secuencia: La complementariedad de bases entre distintas zonas de la molécula que aportan ventajas sustanciales de estabilidad estructural, son seleccionadas y conservadas genéticamente.</p>
<p>Optimización del apilamiento: Reagrupa la molécula mejorando su estabilidad por interacciones conformacionales entre estructuras secundarias locales a través de puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals, hacia mínimos de energía libre, similar al efecto hidrofóbico en los plegamientos proteicos.</p>

¹⁴ Butcher, S. E. and P. A. Pyle (2011). "The Molecular Interactions That Stabilize RNA Tertiary Structure: RNA Motifs, Patterns, and Networks." *Acc Chem Res* Vol. 44, No. 12: 1302-1311.

¹⁵ Ramesh, A., et al. (2011). "Insights into metalloregulation by M-box riboswitch RNAs via structural analysis of manganese-bound complexes." *J Mol Biol* 407(4): 556-570.




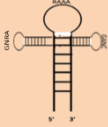
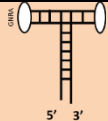
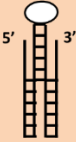
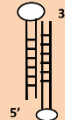
Caja 4: Motivos estructurales en el ARN

Motivo Estructural	Descripción	Ejemplo	Esquema
Horquilla de ARN (hairpin shARN)	Es una secuencia de ARN que se curva y cierra firmemente por la complementariedad entre las bases de su secuencia (sus brazos).	Descrito por primera vez en 1983 por Woese ¹⁶ y sus colaboradores en el ARN ribosomal 16S, y es el más común de los motivos de estructura secundaria en el ARN ¹⁷ .	
Tallo-lazo (stem loop)	Es una secuencia con un apareamiento de bases intramoleculares en doble hélice, algo más larga que una horquilla que termina en un bucle no apareado.	Es un elemento clave en muchas de las construcciones moleculares de ARN. Se han descrito Tallos-lazos en estructuras de pre-micro ARN, en los lazos en forma de cruz de los ARNt, en la ribozima cabeza de martillo requerida para la actividad de auto-división de intrones tipo I. Los tallos-lazo son elementos relacionados con fenómenos de regulación.	
Apilamiento coaxial de dos hélices:	Dos hélices próximas apilan los anillos aromáticos de sus bases terminales adoptando una conformación colineal favorable termodinámicamente, limitada por la orientación de las hélices y la flexibilidad de la estructura.		
Pseudoknot (PSK)	Son dos estructuras de tallo-bucle, con parte de un tallo intercalado entre las dos mitades del otro tallo, como un pliegue conformacional tridimensional con forma aparente de nudo. Puede formarse como el apilamiento coaxial de dos hélices.	El pseudonudo fue descubierto en 1982 en el <i>virus del mosaico amarillo del nabo</i> por Staple DW, (PBD ID2K96). Las estructuras pseudoknot son posibles dianas terapéuticas al estar involucradas en procesos biológicos importantes relacionados con el inicio de la traducción, replicación, dimerización o la selección del marco de lectura de la proteína y son necesarios para la replicación y proliferación de todos los retrovirus.	
Kissing-loop ¹⁸	Son enlaces muy estables formados entre los bucles de dos horquillas por dos o más bases complementarias. Estas interacciones pueden ser intra e intermoleculares, y tener una existencia de equilibrio conformacional o fundirse en una estructura terciaria estable.		

¹⁶ Woese CR, et al. (1983). "Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids." *Microbiol Rev* 47: 621-669.

¹⁷ Woese CR, et al. (1990). "Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops" ". *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8467-8471.

¹⁸ BUTCHER, S. E. and P. P.A. (2011). "The Molecular Interactions That Stabilize RNA Tertiary Structure: RNA Motifs, Patterns, and Networks." *Acc Chem Res* Vol. 44, No. 12: 1302-1311.

Triples cadenas	Son interacciones formadas entre tres hélices próximas por apareamientos de bases (Watson y Crick o por puentes de hidrógeno), aumentando la compactación de la estructura..	DouADN et al. ¹⁹ han comprobado la tendencia de las Adeninas a formar contactos terciarios entre hélices cercanas, los más habituales identificados son U-A.U, como en la enzima “hammerhead” o en intrones tipo I y II	
Giros de cadena	Son curvas de aproximadamente 120° en el eje de las hélices,	Identificadas en el 2001 por Klein D.J. et al. en los plegamientos de ARNs. Son iniciados por 3 nucleótidos ricos en purinas y ayudados por pares G-A provocando cruces y plegamientos entre las cadenas	
Anzuelos de ARN	Son motivos caracterizados por un giro y un lazo	Previstos por los algoritmos computacionales e identificados en el Lazo E de la subunidad 5S del ARNr de una bacteria sulfurosa por Szep, S et. al. ²⁰	
Tetraloops	Son motivos con un tallo lazo que termina en una horquilla en forma de tres lazos, con unas secuencias características tipo GNRA y GANC.	Muy común en ARNs virales, como ha sido descrito por Martínez-Salas y su grupo en la región 5' no traducible IRES de PicoARNvirus ²¹ .	
T-lazo	Son estructuras terciarias similares a los tetraloops, originadas por las secuencias GNRA-lazo en forma de T.		
Cuádruples estructuras	Se dan en tramos de la secuencia ricos en guaninas que permiten apilarse los pares de bases.	Luke, B. et al. en el 2009 la describieron en el ARN de telómeros (TERRA, telomeric repeat-containing ARN) implicada con la regulación de la longitud del telómero	
Cremalleras de Ribosa	Son el intercalado de los esqueletos de ribosa de dos hélices a través de sus hidroxilos	Descritos por Cate, J.H. et al. ²² en 1996. Su contribución a la estabilización de las estructuras terciarias fue establecida por Pyle ²³ relacionando estos motivos de cremallera con secuencias o contextos estructurales concretos.	

¹⁹ Cate, J. H., et al. (1996). "Crystal Structure of a Group I Ribozyme Domain: Principles of RNA Packing." *Science* 273:1678-1685.

²⁰ SZÉP, S., et al. (2003). "The crystal structure of a 26-nucleotide RNA containing a hook-turn." *RNA* 9: 44-51.

²¹ Fernandez, N., et al. (2011). "Structural analysis provides insights into the modular organization of picornavirus IRES." *Virology* 409(2): 251-261.

²² Cate, J. H., et al. (1996). "Crystal Structure of a Group I Ribozyme Domain: Principles of RNA Packing." *Science* 273 1678-1685.

²³ BUTCHER, S. E. and P. P.A. (2011). "The Molecular Interactions That Stabilize RNA Tertiary Structure: RNA Motifs, Patterns, and Networks." *Acc Chem Res* Vol. 44, No. 12: 1302-1311.

Caja 5: Principales algoritmos de bioquímica computacional

<p>Algoritmo Nussinov</p>	<p>Es el primer algoritmo para predecir estructuras en el ARN diseñado en 1978 por medio de alineamientos, empleando una estrategia de programación dinámica para maximizar el número de puentes de hidrógeno que se pueden formar dentro de una secuencia (palíndromos y estructuras energéticamente estables).</p>	<p>Presenta algunas limitaciones como por ejemplo, no considera la posibilidad de predecir pseudonudos ni el apilamiento de bases. No necesariamente permite obtener la estructura más estable ya que solo da una opción.</p>
<p>Algoritmo de Zuker²⁴</p>	<p>Trata de minimizar la energía libre empleando principios termodinámicos, buscando la estructura secundaria más estable, optimizando la energía libre, relacionando la Entalpía con el apareamiento de bases y la Entropía con las bases no apareadas.</p>	<p>Cada tipo de estructuras tiene una contribución de energía diferente (lazos, lazo interno, pseudoknot etc...) y se determina la energía que se asocia a cada posibilidad estructural. Cada contribución estructural se va a asociar con una matriz y un mínimo de energía</p>
<p>Algoritmo Turner MFold (PFold)</p>	<p>“The Mfold Web Server” (http://mfold.ARN.albany.edu/?q=mfold), es la herramienta más empleada para el modelado virtual de las secuencias de ARN. Emplea criterios de minimización de energía para predecir estructuras secundarias óptimas y subóptimas en molécula de ARN.</p>	<p>Calcula matrices energéticas que determinan todas las posibles estructuras secundarias de una molécula de ARN.</p>
	<p>La aplicación PlotFold, representa un conjunto representativo de estructuras secundarias para la secuencia. Podemos elegir cualquiera de las diversas representaciones gráficas diferentes para la visualización de las estructuras secundarias de PlotFold.</p>	<p>Es posible predecir estructuras presentes en la secuencia como <i>Pseudoknot o Kissing-loop</i> etc...</p>
	<p>MOLMOL Proponen los nudos posibles más estables en las secuencias de ARN.</p>	<p>Estos modelos virtuales se pueden utilizar para determinar con fiabilidad las regiones de estructura secundaria del ARN y muchos motivos y detalles topográficos.</p>

²⁴ Schuster, P., et al. (1994). "From sequences to shapes and back: a case study in RNA secondary structures." *Proc Biol Sci.* **22**;255(1344): 279-284.

Caja 6: Características descriptivas del espacio de secuencias, Genotipo

Distancia de Hamming	Es la distancia entre dos espacios de secuencias de ARN, susceptibles de contener información genética, y relacionados entre sí por un mínimo de mutaciones.	Las posibles variaciones ²⁵ de la secuencia van a ser 4^n , para n igual al número de nucleótidos de la secuencia, o sea, para una longitud del genoma n. Aunque no todas serán viables o tendrán existencia real al sufrir la presión de la selección y la evolución.
Distribución ancestral (lastre mutacional)	El valor promedio y la desviación estándar de las distancias de Hamming respecto a la secuencia consenso. Hermisson et al. ²⁶	
Estadística geométrica	Un modelado geométrico de las relaciones existentes entre las secuencias del genotipo de un virus.	En 1988 Mandred Eigen y colaboradores ²⁷ comparando las distancias entre secuencias como nodos en espacio de posibles secuencias, desarrollando un hipercubo con las interrelaciones posibles entre todas las posibles variaciones de los 4 bases en tres posiciones mutadas.
Almacenamiento de información: entropía de Shannon²⁸	Mide la incertidumbre de la fuente de información genética de un genoma, que está contenida en el conjunto de todas y cada una de las secuencias que forman su genotipo,	Si todas las secuencias de un genoma son diferentes, tendrán la misma probabilidad y contendrán la misma cantidad de información del genoma completo (distribución de probabilidad plana), sería el máximo de entropía de Shannon. Cuando existen diferencias de probabilidad en las secuencias, aquellas con mayor peso en la población, son las que aportan proporcionalmente menos información a su conjunto genómico, porque su desaparición afecta en menor medida a la integridad total de la información (es información repetida).

²⁵ Eigen, M. and P. Schuster (1977). "The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle." *Ibid.* 64(11): 541-565.

²⁶ Visser, J. A., et al. (2003). "Perspective: Evolution and detection of genetic robustness." *Evolution* 57(9): 1959-1972.

²⁷ Eigen, M., et al. (1988). "Statistical geometry in sequence space: A method of quantitative comparative sequence analysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5913-5917.

²⁸ E. Shannon (1948). "La Teoría Matemática de la Comunicación" *Bell System Technical Journal* 27: 379-423.

Caja 7: Modelos experimentales de estudio de Cuasiespecies

MODELO	DESCRIPCIÓN	EJEMPLO
Viroides²⁹:	Son las entidades biológicas auto replicativas más pequeñas. Son esencialmente secuencias cíclicas cortas de ARN que causan infección al huésped, pero que a diferencia de los virus, no codifican en su genoma proteínas ni lípidos propios y ante su incapacidad de producir una polimerasa propia emplea la del hospedador. Replican por sistema de círculo rodante.	Diener describió el primer viroide en 1978, en la enfermedad del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd). Se sospecha que su patogenicidad es debida a la interferencia en la regulación génica de la célula, particularmente en los procesos de splicing. Otro ejemplo muy empleado como modelo de estudio fue el virus de la hepatitis delta
Fago: Bacteriófago Qβ	Es un virus de cubierta icosaédrica que infecta a la bacteria <i>Escherichia Coli</i> , con una frecuencia de mutación en su secuencia de entre 10 ⁻³ a 10 ⁻⁵ mutaciones por nucleótido, característica antigénica de las poblaciones de cuasiespecies.	El fago Q β ha sido una de las herramientas y modelos más empleados. Spiegelman lo utilizó en su modelo de evolución in vitro y es significativo el hito que constituyó el mutante viable obtenido por el Doctor Domingo ³⁰ del bacteriófago, al ser éste el primer ser vivo viable modificado genéticamente en un laboratorio.
Virus de la fiebre Aftosa (FMDV)	Es un virus de la familia de los <i>PicoARNvirus</i> , género <i>Aftovirus</i> , que causa ampollas en la boca y los pies de los bóvidos y otros ungulados, altamente infeccioso y una auténtica plaga de la ganadería. Con un genoma de hebra sencilla positiva de ARN sin envoltura, traduce sus proteínas virales en los ribosomas celulares, con un mecanismo mediado por IRES .	Este virus ha sido objeto de estudio por el grupo del Doctor Domingo en el CBM. Ha sido un buen modelo por su enorme facilidad de proliferación.
Virus de la estomatitis vesicular de Indiana (VSIV o VSV)	Es un virus de la familia <i>Rhabdoviridae</i> (tipo rabia), puede infectar insectos, ganado, caballos y cerdos. Su sintomatología es idéntica a la del virus de la fiebre aftosa y produce una enfermedad similar a la gripe en los seres humanos.	Es un virus muy usado para estudiar la evolución viral y las propiedades de los virus en laboratorio. Ha sido un modelo empleado por John Holland ³¹ y su grupo para el estudio de la evolución viral (mutación, competición, y selección).
VIH³²	Es un lentivirus de la familia Retroviridae, causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Fue descubierto por el equipo de Luc Montagnier en 1983. El virión es esférico, dotado de envoltura y con una cápside proteica.	Su genoma es una cadena de ARN monocatenario que debe copiarse provisionalmente al ADN para poder multiplicarse e integrarse en el genoma de la célula que infecta. Presenta dos tipos de memoria génica de acuerdo con la dinámica de cuasiespecies.
VHC³³	Es un virus de la familia Flaviviridae, pequeño (30 a 38 nm), con envoltura y con una sola cadena de ARN (+). Se replica principalmente en los hepatocitos del hígado causando la hepatitis C.	Presenta una dinámica de cuasiespecies. Y en el transcurso de este trabajo trataremos de exponer una serie de mecanismos estructurales analizados en este modelo, con énfasis en sus implicaciones médicas frente al virus de la hepatitis.

²⁹ Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, E., Daròs, J. A., & Di Serio, F. (2005). "Viroids and Viroid-Host Interactions" *Annual Review of Phytopathology*, 43: 117-139.

³⁰ Domingo, E., et al. (1978). "Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population." *Cell* 13(4): 735-744.

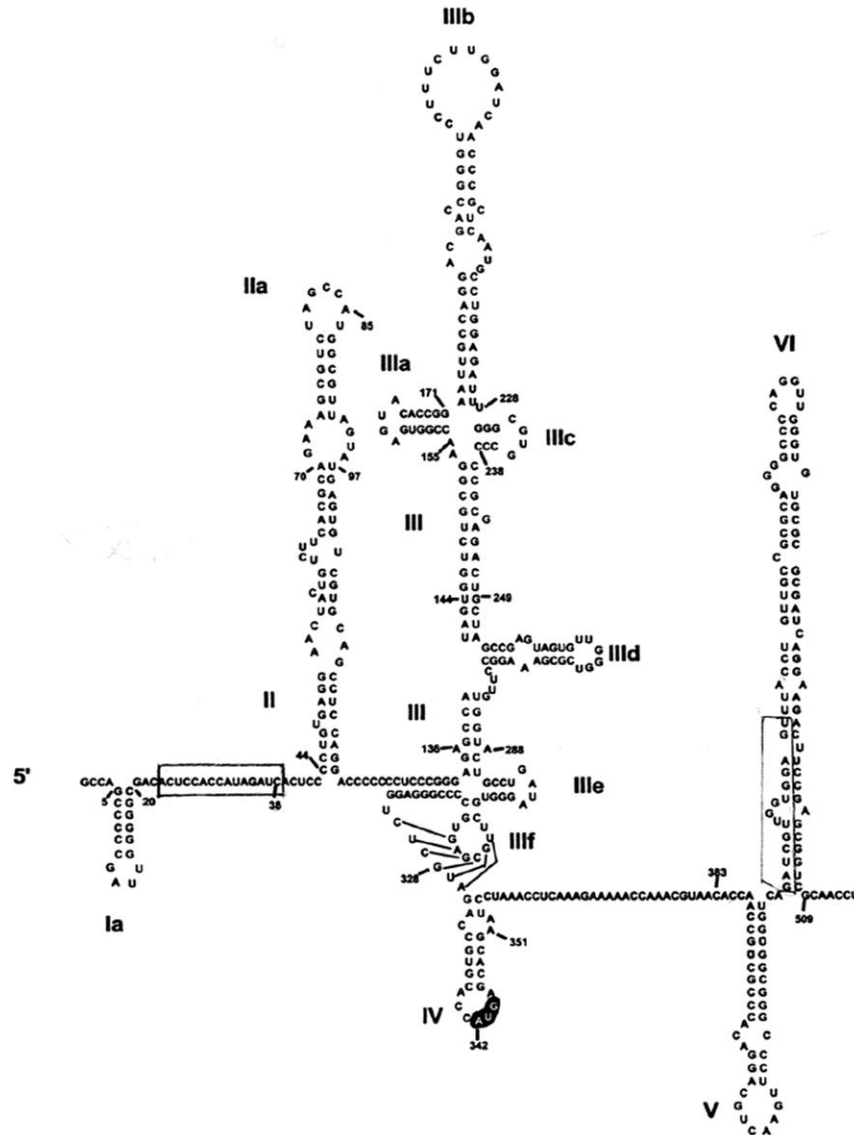
³¹ de la Torre, J. C. and J. J. Holland (1990). "RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny." *J Virology* 64(12): 6278-6281.

³² Briones, C., et al. (2006). "Minority memory genomes can influence the evolution of HIV-1 quasispecies in vivo." *Gene* 384: 129-138.

³³ Domingo, E. and J. Gomez (2007). "Quasispecies and its impact on viral hepatitis." *Virus Res* 127(2): 131-150.

ANEXO 2

Figura 1: Modelo de la región VHC1-542 (genotipo 1b)



Secuencia T7-GGG-C-Eco RI-VHC1-542(1b)-Hind III:

TAATACGACT CACTATA^{T7} GGG **CGAATTC**^{Eco RI} CAG CCCCCGATTG GGGGCGACAC TCCACCATAG ATCACTCCCC
 TGTGAGGAAC TACTGTCTTC ACGCAGAAAG CGTCTAGCCA TGGCGTTAGT ATGAGTGTCTG TGCAGCCTCC
 AGGACCCCCC CTCCCGGGAG AGCCATAGTG GTCTGCGGAA CCGGTGAGTA CACCGGAAT GCCAGGACGA
 CCGGGTCCTT TCTTGATCA ACCCGCTCAA TGCCTGGAGA TTTGGGCGTG CCCCCGCGAG ACTGCTAGCC
 GAGTAGTGTT GGGTCGCGAA AGGCCTTGTG GTACTGCCTA ATAGGGTGCT TGCAGTGCC CCGGGAGGTC
 TCGTAGACC TGCACCATGA GCACGAATCC TAAACCTCAA AGAAAAACCA AACGTAACAC CAACCGCCGC
 CCACAGGACG TCAAGTCCC GGGCGGTGGT CAGATCGTTG GTGGAGTTA CTTGTGCC CGCAGGGGCC
 CCAGGTTGGG TGTGCGCGC ATCAGGAAGA CTTCCGAGCG GTCGCAACC CGTGGAAGGC GACAGCCTAT
 CCCCAGGCT **AAGCTT**^{Hind III}

Promotor T7 en amarillo. Enzimas de restricción ECO RI en rojo y Hind III en violeta

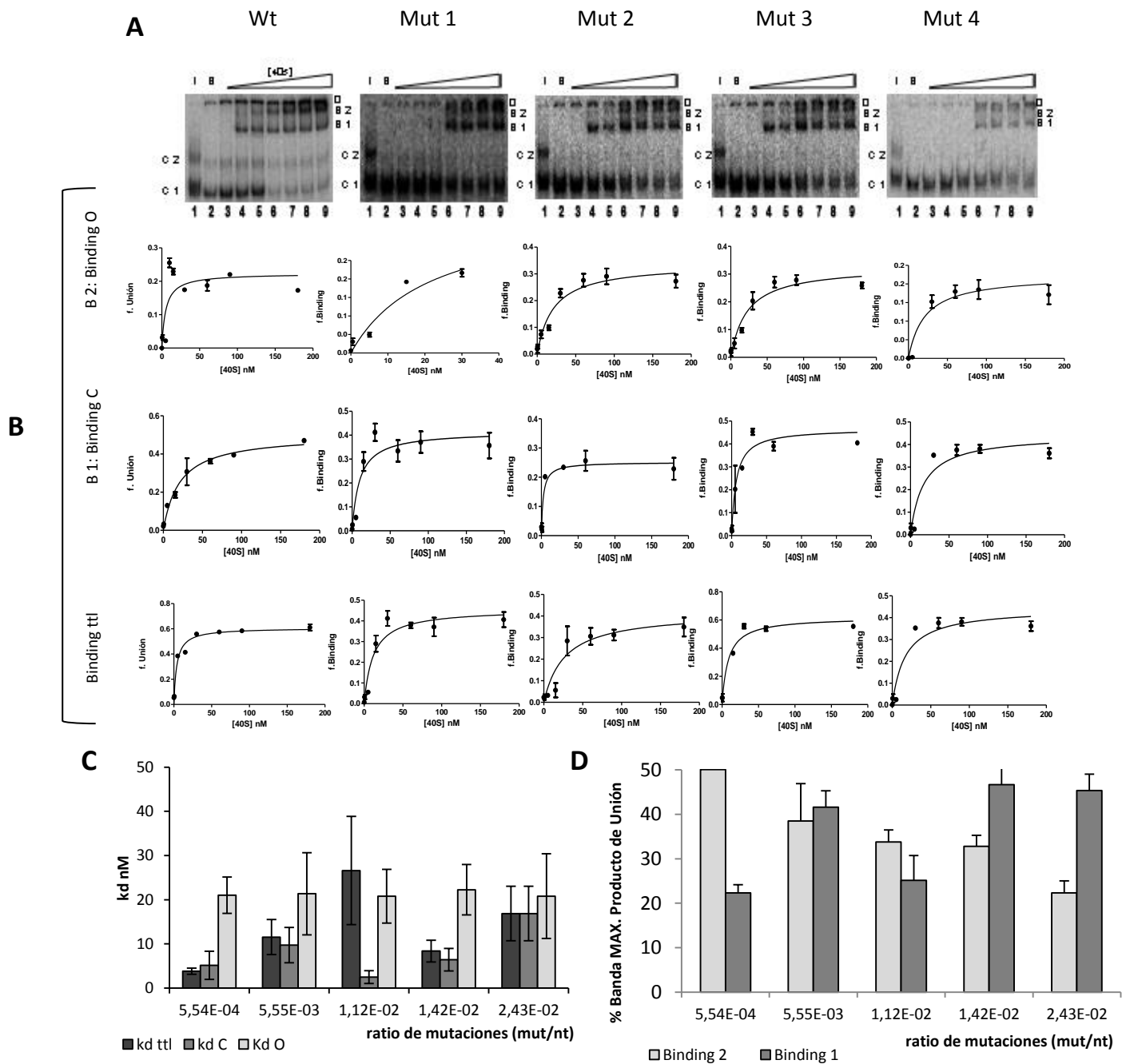
Secuencia del VHC1-570 de la cepa de Esteban domingo JC1 del genotipo 2^a:

ACCTGCCCCTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGG
AACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGCCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTC
GTACAGCCTCCAGGCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAA
CCGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGGAAGACTGGGTCCTTTCTTGGATAAA
CCCACTCTATGCCCCGGCCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAG
TAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGCGCTTGCG
AGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACAAATCCTAAAC
CTCAAAGAAAAACCAAAGAAACACCAACCGTCGCCACAAGACGTTAAG
TTCCGGGCGGCGGCCAGATCGTTGGCGGAGTATACTTGTTGCCGCGCAGG
GGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGGACAAGGAAGACTTCGGAGCGGTCCCAG
CCACGTGGAAGGCGCCAGCCATCCCTAAAGATCGGCGCTCCACTGGCAA
TCCTGGGGAAAA

Primer: VHC 570-545(-) CCCAGGATTTGCCAGTGGAGCGCC

Primer: VHC 542-518 (-) CTTTAGGGATGGGCTGGCGCCTTCC

ANEXO 3

Reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal por el IRES del VHC1-542 α P³²GTP

Reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal por el IRES del VHC1-542 α P³²GTP. A): Autoradiografías de los geles de poliacrilamida en condiciones nativas del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, en cantidades crecientes de 0 a 200nM, por el IRES del VHC1-542Wt a 0.6nM. B): Curvas de las fracciones de unión (conformación abierta, conformación cerrada y total) frente a los valores de [40S]. C) Gráfica que representa las KD (conformación abierta, conformación cerrada y total), del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal, por las poblaciones de variabilidad creciente del IRES del HCV1-542 frente a los ratio de mutación de las poblaciones D) Gráfica que representa las fracciones máximas del reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal (conformación abierta y conformación cerrada), por las poblaciones de variabilidad creciente del IRES del VHC1-542 frente al ratio de mutaciones.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abbink, T. E. and B. Berkhout (2008). "RNA structure modulates splicing efficiency at the human immunodeficiency virus type 1 major splice donor." J Virol **82**(6): 3090-3098.

Altman, S. (1989). "Ribonuclease P: an enzyme with a catalytic RNA subunit." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **62**: 1-36.

Altman, S. (1995). "RNase P in research and therapy." Biotechnology (N Y) **13**(4): 327-329.

Altman, S. and J. D. Smith (1971). "Tyrosine tRNA precursor molecule polynucleotide sequence." Nat New Biol **233**(36): 35-39.

Altman, S., et al. (2005). "RNase P cleaves transient structures in some riboswitches." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11284-11289.

Anderson, J. P., et al. (2004). "Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides." Annu Rev Microbiol **58**: 183-205.

Andreev, D. E., et al. (2012). "Glycyl-tRNA synthetase specifically binds to the poliovirus IRES to activate translation initiation." Nucleic Acids Res.

Arias, A., et al. (2004). "Fitness increase of memory genomes in a viral quasispecies." J Mol Biol **339**(2): 405-412.

Ariza-Mateos, A., et al. (2015). "Geneticin stabilizes the opened conformation of the 5' region of hepatitis C virus RNA and inhibits viral replication." Antimicrob Agents Chemother **AAC02511-15** **Waiting for Revision.**

Ariza-Mateos, A., et al. (2012). "RNA self-cleavage activated by ultraviolet light-induced oxidation." Nucleic Acids Res.

Ariza-Mateos, A., et al. (2012). "RNA self-cleavage activated by ultraviolet light-induced oxidation." Nucleic Acids Res **40**(4): 1748-1766.

Assis, R. (2014). "Strong epistatic selection on the RNA secondary structure of HIV." PLoS Pathog **10**(9): e1004363.

Babitzke, P., et al. (1993). "Analysis of mRNA decay and rRNA processing in Escherichia coli multiple mutants carrying a deletion in RNase III." J Bacteriol **175**(1): 229-239.

Baccam, P., et al. (2001). "PAQ: Partition Analysis of Quasispecies." Bioinformatics **17**(1): 16-22.

Bartkiewicz, M., et al. (1989). "Identification and characterization of an RNA molecule that copurifies with RNase P activity from HeLa cells." Genes Dev **3**(4): 488-499.

Barton-Davis, E. R., et al. (1999). "Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice." J Clin Invest **104**(4): 375-381.

Bebenek, K., et al. (1993). "Error-prone polymerization by HIV-1 reverse transcriptase. Contribution of template-primer misalignment, miscoding, and termination probability to mutational hot spots." J Biol Chem **268**(14): 10324-10334.

- Beguiristain, N., et al. (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): 5250-5261.
- Berkhout, B. (1992). "Structural features in TAR RNA of human and simian immunodeficiency viruses: a phylogenetic analysis." Nucleic Acids Res **20**(1): 27-31.
- Berry, K. E., et al. (2011). "Crystal structure of the HCV IRES central domain reveals strategy for start-codon positioning." Structure **19**(10): 1456-1466.
- Billeter, M. A., et al. (1966). "Replication of viral ribonucleic acid. X. Turnover of virus-specific double-stranded ribonucleic acid during replication of phage MS2 in Escherichia coli." J Biol Chem **241**(20): 4750-4757.
- Birk, A. V., et al. (2008). "Antiviral activity of geneticin against bovine viral diarrhoea virus." Antivir Chem Chemother **19**(1): 33-40.
- Blackard JT, et al. (2012). "Analysis of a non-structural gene reveals evidence of possible hepatitis C virus (HCV) compartmentalization." J Med Virol **84**(2): 242-252.
- Boehringer, D., et al. (2005). "Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES." Structure **13**(11): 1695-1706.
- Bougie, I. and M. Bisailon (2003). "Initial binding of the broad spectrum antiviral nucleoside ribavirin to the hepatitis C virus RNA polymerase." J Biol Chem **278**(52): 52471-52478.
- Branch AD, et al. (1989). "An ultraviolet-sensitive RNA structural element in a viroid-like domain of the hepatitis delta virus." Science(Feb 3;243(4891)): 649-652.
- Branch, A. D., et al. (1985). "Ultraviolet light-induced crosslinking reveals a unique region of local tertiary structure in potato spindle tuber viroid and HeLa 5S RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(19): 6590-6594.
- Brenner, S., et al. (1961). "An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis." Nature **190**: 576-581.
- Briones, C., et al. (2006). "Minority memory genomes can influence the evolution of HIV-1 quasispecies in vivo." Gene **384**: 129-138.
- Briones, C. and E. Domingo (2008). "Minority report: hidden memory genomes in HIV-1 quasispecies and possible clinical implications." AIDS Rev **10**(2): 93-109.
- Briones, C., et al. (2009). "The dawn of the RNA World: toward functional complexity through ligation of random RNA oligomers." Rna **15**(5): 743-749.
- Brown, E. A., et al. (1992). "Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs." Nucleic Acids Res **20**(19): 5041-5045.
- Bull, J. J., et al. (2007). "Theory of Lethal Mutagenesis for Viruses." J Virol **81**(6): 2930-2939.
- Burrill, C. P. and R. Andino (2013). "RNA structure analysis of viruses using SHAPE." Curr Protoc Microbiol **30**: Unit 15H.13.
- Burrows, C. J. and J. G. Muller (1998). "Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission." Chem Rev **98**(3): 1109-1152.

- Butcher, S. E. and P. A. Pyle (2011). "The Molecular Interactions That Stabilize RNA Tertiary Structure: RNA Motifs, Patterns, and Networks." Acc Chem Res **Vol. 44, No. 12**: 1302-1311.
- C., P., et al. (2007). "Insights into RNA virus mutant spectrum and lethal mutagenesis events: replicative interference and complementation by multiple point mutants." J Mol Biol **15;369(4)**: 985-1000.
- Cabot, B., et al. (2000). "Nucleotide and amino acid complexity of hepatitis C virus quasispecies in serum and liver." J Virol **74(2)**: 805-811.
- Caetano-Anolles, G. and M. J. Seufferheld (2013). "The coevolutionary roots of biochemistry and cellular organization challenge the RNA world paradigm." J Mol Microbiol Biotechnol **23(1-2)**: 152-177.
- Carothers, J. M., et al. (2004). "Informational Complexity and Functional Activity of RNA Structures." J. Am. Chem. Soc. **126 (16)**: 5130-5137.
- Carrara, G., et al. (1995). "Two helices plus a linker: a small model substrate for eukaryotic RNase P." Proc Natl Acad Sci U S A **92(7)**: 2627-2631.
- Casino, C., et al. (1999). "Variation of hepatitis C virus following serial transmission: multiple mechanisms of diversification of the hypervariable region and evidence for convergent genome evolution." J Gen Virol **80 (Pt 3)**: 717-725.
- Cech, T. R. (1983). "RNA as an enzyme." Science Am. **255 (5)**: 76-84.
- Clarke, D. K., et al. (1994). "The red queen reigns in the kingdom of RNA viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **91(11)**: 4821-4824.
- Coppins, R. L., et al. (2007). "The intricate world of riboswitches." Curr Opin Microbiol **10(2)**: 176-181.
- Coughlin, D. J., et al. (2008). "Genome-wide search for yeast RNase P substrates reveals role in maturation of intron-encoded box C/D small nucleolar RNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **105(34)**: 12218-12223.
- Coveney, P. V., et al. (2012). "Theory, modelling and simulation in origins of life studies." Chem Soc Rev **41**: 5430-5446.
- Crick, F. H. C. (1966). ""Of Molecules an Men". " Univ. of Washinton Press.
- Crick, F. H. C. (1970). "Central Dogma of Molecular Biology." Nature **227**: 561-563.
- Crotty, S., et al. (2001). "RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin." PNAS **98(12)**: 6895-6900.
- Culasso, A. C., et al. (2014). "Intra-host evolution of multiple genotypes of hepatitis C virus in a chronically infected patient with HIV along a 13-year follow-up period." Virology **449**: 317-327.
- Cullen, B. R. (2006). "Viruses and microRNAs." Nature Genetics **38, S25 - S30**.
- Chamberlain, J. R., et al. (1998). "Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP." Genes Dev **12(11)**: 1678-1690.

- Chang, S. E. and J. D. Smith (1973). "Structural studies on a tyrosine tRNA precursor." Nat New Biol **246(154)**: 165-168.
- Chao, L. (1990). "Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet." Nature **348(6300)**: 454-455.
- Choo, Q. L., et al. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." Science **244(4902)**: 359-362.
- Davis, G. L., et al. (1998). "Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group." N Engl J Med **339(21)**: 1493-1499.
- de la Torre, J. C. and J. J. Holland (1990). "RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny." J Virol **64(12)**: 6278-6281.
- Demeshkina, N., et al. (2012). "A new understanding of the decoding principle on the ribosome." Nature **21;484(7393)**.
- Demeshkina, N., et al. (2013). "New structural insights into the decoding mechanism: translation infidelity via a G-U pair with Watson-Crick geometry." FEBS **27;587(13)**: 1848-1857.
- Denman, R. B. (1993). "Using RNAFOLD to predict the activity of small catalytic RNAs." BioTechniques **15**: 1090-1094.
- Diaz-Toledano, R., et al. (2009). "In vitro characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA." Nucleic Acids Res **37(16)**: 5498-5510.
- Domingo, E. (2002). "Quasispecies Theory in virology." J Virol **76(1)**: 463-465.
- Domingo, E. (2007). Virus Evolution. New York, Wlaters Kluwer/Lippincott Williams&Wilkins.
- Domingo, E. (2013). "Historia y desarrollo del concepto de "Cuasiespecies" en Virología." Virology **16**: 2-13.
- Domingo, E., et al. (2000). "Cuasiespecies y evolución molecular de virus." Rev. sci. tech. **19 (1)**: 55-63.
- Domingo, E., et al. (1996). "Basic concepts in RNA virus evolution." Faseb J **10(8)**: 859-864.
- Domingo, E., et al. (1976). "In vitro site-directed mutagenesis: generation and properties of an infectious extracistronic mutant of bacteriophage Qbeta." Gene **1(1)**: 3-25.
- Domingo, E. and J. Gomez (2007). "Quasispecies and its impact on viral hepatitis." Virus Res **127(2)**: 131-150.
- Domingo, E., et al. (2005). "Population dynamics of RNA viruses: the essential contribution of mutant spectra." Arch. Virology **19**: 59-71.
- Domingo, E. and J. J. Holland (1997). "RNA virus mutations and fitness for survival." Annu Rev Microbiol **51**: 151-178.
- Domingo, E., et al. (2002). Quasi-species: the concept and the word. In: Molecular basis of virus evolution Cambridge, Cambridge University Press.

- Domingo, E., et al. (1985). "The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review." Gene **40(1)**: 1-8.
- Domingo, E., et al. (1978). "Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population." Cell **13(4)**: 735-744.
- Domingo, E., et al. (2012). "Viral Quasispecies Evolution." Microbiol Mol Biol Rev. **76(2)**: 159-216.
- Doudna, J. A. and J. R. Lorsch (2005). "Ribozyme catalysis: not different, just worse." Nat. Struct. Mol. Biol **12**: 395-402.
- Drake, J. W. and J. J. Holland (1999). "Mutation rates among RNA viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **96(24)**: 13910-13913.
- Drummer HE, et al. (2006). "A conserved Gly436-Trp-Leu-Ala-Gly-Leu-Phe-Tyr motif in hepatitis C virus glycoprotein E2 is a determinant of CD81 binding and viral entry." J Virol **80(16)**: 7844-7853.
- Dubé A, et al. (2011). "Mapping studies of the Peach latent mosaic viroid reveal novel structural features." Mol Plant Pathol. **12(7)**: 688-701.
- Dunn, J. J. (1976). "RNase III cleavage of single-stranded RNA. Effect of ionic strength on the fidelity of cleavage." J Biol Chem **251(12)**: 3807-3814.
- Duss O, et al. (2014). "Molecular basis for the wide range of affinity found in Csr/Rsm protein-RNA recognition." Nucleic Acids Res **42(8)**: 5332-5346.
- E. Shannon (1948). "La Teoria Matemàtica de la Comunicaci3n " Bell System Technical Journal **27**: 379-423.
- Ecland, E. H., et al. (1995). "Structurally complex and highly active RNA ligases derived from random RNA sequences." Science **269** 364-370.
- Echols, H. and M. F. Goodman (1991). "Fidelity mechanisms in DNA replication." Annu Rev Biochem **60**: 477-511.
- Ehresmann, C., et al. (1987). "Probing the structure of RNAs in solution." Nucleic Acids Res **15(22)**: 9109-9128.
- Eigen, M. (1971). "Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules." Naturwissenschaften **58(10)**: 465-523.
- Eigen, M. (1996). "On the nature of virus quasispecies." Microbiol **4(6)**: 216-218.
- Eigen, M. (2002). Sequence space and quasispecies distribution. Boca Raton, Florida, Domingo, E; Holland, J.J., and Ahlquist P.
- Eigen, M. and C. K. Biebricher (1988). Sequence space and quasispecies distribution. Boca Raton, CRC press.
- Eigen, M. and P. Schuster (1977). "The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle." Naturwissenschaften **64(11)**: 541-565.
- Eigen, M. and P. Schuster (1982). "Stage of Emerging Life - Five principles of early organization." Journal of Molecular Evolution **19**: 47-61.

- Ellington, A. D. and J. W. Szostak (1990). "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands." Nature **346**(6287): 818-822.
- Esakova, O., et al. (2011). "Substrate recognition by ribonucleoprotein ribonuclease MRP." Rna **17**(2): 356-364.
- Evans, D., et al. (2006). "RNase P: interface of the RNA and protein worlds." Trends Biochem Sci **31**(6): 333-341.
- Fan, H., et al. (1998). "5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human La antigen phosphoprotein." Mol Cell Biol **18**(6): 3201-3211.
- Feld, J. J., et al. (2007). "Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response." Hepatology **46**(5): 1548-1563.
- Fernandez, N., et al. (2011). "Structural basis for the biological relevance of the invariant apical stem in IRES-mediated translation." Nucleic Acids Res **39**(19): 8572-8585.
- Filbin, M. E. and J. S. Kieft (2011). "HCV IRES domain IIb affects the configuration of coding RNA in the 40S subunit's decoding groove." Rna **17**(7): 1258-1273.
- Filbin, M. E., et al. (2013). "HCV IRES manipulates the ribosome to promote the switch from translation initiation to elongation." Nat Struct Mol Biol **20**(2): 150-158.
- Fisher, R. A. (1941). "The Genetical Theory of Natural Selection. Oxford, Clarendon Press 1930. Average excess and average effect of a gene substitution. ." Annals of Eugenetics **11**: 53-63.
- Fitch, W. M. and E. Margoliash (1967). "Construction of Phylogenetic Trees." Science **155**(3760): 279-284.
- Fourmy, D., et al. (1996). "Structure of the A site of Escherichia coli 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic." Science **274**(5291): 1367-1371.
- Franch, T., et al. (1999). "Ribonuclease III Processing of Coaxially Stacked RNA Helices." J. Biol. Chem. **274**: 26572-26578.
- Friebe, P., et al. (2001). "Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication." J Virol **75**(24): 12047-12057.
- Gago, S., et al. (2009). "Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid." Science **323**(5919): 1308.
- Gevertz, J., et al. (2005). "In vitro RNA random pools are not structurally diverse: A computational analysis." Rna **11**(6): 853-863.
- Gilbert, W. (1986). "The RNA world." Nature **319**: 618.
- Goswami, B. B., et al. (1979). "The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA." Biochem Biophys Res Commun **89**(3): 830-836.
- Graci, J. D., et al. (2012). "Mutational Robustness of an RNA Virus Influences Sensitivity to Lethal Mutagenesis." J Virol **0022-538**: 2869-2873.
- Grande-Perez, A., et al. (2005). "Mutagenesis-induced, large fitness variations with an invariant arenavirus consensus genomic nucleotide sequence." J Virol **79**(16): 10451-10459.

- Grande-Perez, A., et al. (2005). "Suppression of viral infectivity through lethal defection." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(12): 4448-4452.
- Grande-Perez, A., et al. (2002). "Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 12938-12943.
- Griffiths, J. K., et al. (1998). "Paromomycin and geneticin inhibit intracellular *Cryptosporidium parvum* without trafficking through the host cell cytoplasm: implications for drug delivery." Infect Immun **66**(8): 3874-3883.
- Grimm, S. (2004). "The art and design of genetic screens: mammalian culture cells." Nat Rev Genet **5**(3): 179-189.
- Gruber, A. R., et al. (2007). "The RNAz web server: prediction of thermodynamically stable and evolutionarily conserved RNA structures." Nucleic Acids Research, **35**(W335-W338): 1093.
- Guerrier-Takada, C. and S. Altman (1984). "Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription in vitro." Science **223**(4633): 285-286.
- Guerrier-Takada, C., et al. (1983). "The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme." Cell **35**(3 Pt 2): 849-857.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., Altman, S. (1983). "The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme." Cell **35**: 849-857.
- Hadfield, C., et al. (1990). "G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet **18**(4): 303-313.
- Halder, S. and D. Bhattacharyya (2013). "RNA structure and dynamics: A base pairing perspective." Progress in Biophysics and Molecular Biology **113** 264e283.
- Hansen, A., et al. (2001). "Exploring the minimal substrate requirements for trans-cleavage by RNase P holoenzymes from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **41**(1): 131-143.
- Hartmann RK, et al. (2009). "The making of tRNAs and more-RNase P and tRNase Z." Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. **85**: 319-368.
- Heidelberger, C., et al. (1957). "Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds." Nature **179**(4561): 663-666.
- Hermisson, J., et al. (2002). "Mutation-Selection Balance: Ancestry, Load, and Maximum Principle." Theoretical Population Biology **62**(1): 9-46.
- Hofacker, I. L. (2003). "Vienna RNA secondary structure server." Nucleic Acids Research, **31**, No. 13: 3429-3431.
- Hofacker, I. L., et al. (1998). "Automatic detection of conserved RNA structure elements in complete RNA virus genomes." Nucleic Acids Res **26**(16): 3825-3836.
- Holm, P. S. and G. Krupp (1992). "The acceptor stem in pre-tRNAs determines the cleavage specificity of RNase P." Nucleic Acids Res **20**(3): 421-423.
- Holmes, E. C. (2004). "Adaptation and Immunity." PloS Biology **2**(9): 1267-1270.

- Holmes, E. C. (2009). "RNA virus genomics: a world of possibilities." JCI **119** (9): 2488-2496.
- Holland, J. J. (2006). "Transitions in understanding of RNA viruses: a historical perspective." Curr Top Microbiol Immunol **299**: 371-401.
- Holland, J. J., et al. (1990). "Mutation Frequencies at Defined Single Codon Sites in Vesicular Stomatitis Virus and Poliovirus Can Be Increased Only Slightly by Chemical Mutagenesis." JOURNAL OF VIROLOGY American Society for Microbiology **64**(8): 3960-3962.
- Homs, M., et al. (2011). "Ultra-deep pyrosequencing analysis of the hepatitis B virus preCore region and main catalytic motif of the viral polymerase in the same viral genome." Nucleic Acids Research, **Vol. 39, No. 19** 8457-8471.
- Hsu AW, et al. (2000). "Differential effects of the protein cofactor on the interactions between an RNase P ribozyme and its target mRNA substrate." Nucleic Acids Res **15;28(16)**: 3105-3116.
- Huang, X. and H. Ali (2007). "High sensitivity RNA pseudoknot prediction." Nucleic Acids Res **35**(2): 656-663.
- Huang, Y. and J. P. Ferris (2003). "Sintesis of 35-40 mers of RNA oligomers from unblocked monomers. A simple approach to the RNA World." Chem Biodivers Commun. (Camb.) **12**: 1458-1459.
- Hultgren, C., et al. (1998). "The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses." J Gen Virol **79 (Pt 10)**: 2381-2391.
- Huynen, M. A., et al. (1996). "Base pairing probabilities in a complete HIV-1 RNA." J Comput Biol **3**(2): 253-274.
- Huynen, M. A., et al. (1996). "Smoothness within ruggedness: the role of neutrality in adaptation." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 397-401.
- Innan, H. and W. Stephan (2001). "Selection intensity against deleterious mutations in RNA secondary structures and rate of compensatory nucleotide substitutions." Genetics **159**(1): 389-399.
- Iranzo, J. and S. C. Manrubia (2012). "Evolutionary dynamics of genome segmentation in multipartite viruses" Proc. R. Soc. B **279**: 3812-3819.
- Jacobs, A., et al. (2011). "Product and mechanistic analysis of the reactivity of a C6-pyrimidine radical in RNA." J Am Chem Soc **133**((13)): 5152-5159.
- Jardim, A. C., et al. (2013). "Analysis of HCV quasispecies dynamic under selective pressure of combined therapy." BMC Infect Dis **13**: 61.
- Jarrous, N. and V. Gopalan (2010). "Archaeal/eukaryal RNase P: subunits, functions and RNA diversification." Nucleic Acids Res **38**(22): 7885-7894.
- Johnston, W. K., et al. (2001). "RNA-catalyzed RNA Polymerization: Acurate and general RNA templated primer extension." Science **292**: 1319-1325.
- Jopling, C. L., et al. (2008). "Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome." Cell Host Microbe **4**(1): 77-85.

- Jopling, C. L., et al. (2005). "Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA." Science **309**(5740): 1577-1581.
- Joyce, G. F. (1996). "Ribozymes: Building the RNA World." Current Biology **6** N°8: 965-967.
- Kertesz, M., et al. (2010). "Genome-wide measurement of RNA secondary structure in yeast." Nature **467**(7311): 103-107.
- Kieft, J. S., et al. (2001). "Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA." Rna **7**(2): 194-206.
- Kieft, J. S., et al. (1999). "The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold." J Mol Biol **292**(3): 513-529.
- Kimura, M. (1983). "Rare variant alleles in the light of the neutral theory." Mol Biol Evol **1**(1): 84-93.
- Kimura, M. (1991). "Recent development of the neutral theory viewed from the Wrightian tradition of theoretical population genetics." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(14): 5969-5973.
- Kirsebom, L. A. (2007). "RNase P RNA mediated cleavage: substrate recognition and catalysis." Biochimie **89**(10): 1183-1194.
- Kirsebom, L. A. and J. Ciesiolka (2014). Pb²⁺-Induced Cleavage of RNA. Handbook of RNA Biochemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 269-284.
- Kirsebom, L. A. and S. Trobro (2009). "RNase P RNA-mediated cleavage." IUBMB Life **61**(3): 189-200.
- Knies, J. L., et al. (2008). "Compensatory evolution in RNA secondary structures increases substitution rate variation among sites." Mol Biol Evol **25**(8): 1778-1787.
- Ko, J. H. and S. Altman (2007). "OLE RNA, an RNA motif that is highly conserved in several extremophilic bacteria, is a substrate for and can be regulated by RNase P RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7815-7820.
- Kolupaeva, V. G., et al. (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): 6242-6250.
- Komine Y, et al. (1994). "A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from Escherichia coli. ." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 9223-9227.
- Korostelev, A. and H. F. Noller (2007). "The ribosome in focus: new structures bring new insights." Trends Biochem Sci. **32**: 434-441.
- Lagos-Quintana, M., et al. (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." Curr Biol **12**(9): 735-739.
- Lamballerie, S., et al. (2002). "Genome sequence analysis of Tamana bat virus and its relationship with the genus Flavivirus X." Journal of General Virology **83**: 2443-2454.
- Landry, D. M., et al. (2009). "RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs." GENES & DEVELOPMENT **23**: 2753-2764.

- Lauring, A. S., et al. (2012). "Codon usage determines the mutational robustness, evolutionary capacity, and virulence of an RNA virus." Cell Host Microbe **12**(5): 623-632.
- Lauring, A. S., et al. (2013). "The role of mutational robustness in RNA virus evolution." Nat Rev Microbiol **11**(5): 327-336.
- Lemon, S. M., et al. (2007). "Hepatitis C viruses. Fields virology." Lippincott Williams & Wilkins **1**: 1253-1304.
- Leontis, N. B. and E. Westhof (1998). "A common motif organizes the structure of multi-helix loops in 16 S and 23 S ribosomal RNAs." J Mol Biol **283**(3): 571-583.
- Lindahl, L., et al. (2000). "Functional equivalence of hairpins in the RNA subunits of RNase MRP and RNase P in *Saccharomyces cerevisiae*." Rna **6**(5): 653-658.
- Loeb, L. A., et al. (1999). "Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1492-1497.
- Loughrey, D., et al. (2014). "SHAPE-Seq 2.0: systematic optimization and extension of high-throughput chemical probing of RNA secondary structure with next generation sequencing." Nucleic Acids Res.
- Lowman, H. B. and D. E. Draper (1986). "On the recognition of helical RNA by cobra venom V1 nuclease." J Biol Chem **261**(12): 5396-5403.
- Lu, M., et al. (1995). "Analysis of hepatitis C virus quasispecies populations by temperature gradient gel electrophoresis " Journal of General Virology **76**: 881-887.
- Lucks, J. B., et al. (2011). "Multiplexed RNA structure characterization with selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension sequencing (SHAPE-Seq)." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(27): 11063-11068.
- Lyons, A. J., et al. (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): 2535-2541.
- Lyons, A. J. and H. D. Robertson (2003). "Detection of tRNA-like structure through RNase P cleavage of viral internal ribosome entry site RNAs near the AUG start triplet." J Biol Chem **278**(29): 26844-26850.
- Lytle, J. R., et al. (2001). "The ribosome binding site of hepatitis C virus mRNA." J Virol **75**(16): 7629-7636.
- Lytle, J. R., et al. (2002). "Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40S subunit binding." Rna **8**(8): 1045-1055.
- Maag, D., et al. (2001). "Antiviral Activity of Ribavirin Polymerase (NS5B) as a Mediator of the Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA." J. Biol. Chem. **276**: 46094-46098.
- Manrubia, S. C. and C. Briones (2007). "Modular evolution and increase of functional complexity in replicating RNA molecules." Rna **13**(1): 97-107.
- Manrubia, S. C., et al. (2010). "Pathways to extinction: beyond the error threshold." Phil. Trans. R. Soc. B **365**: 1943-1952.

- Manrubia, S. C., et al. (2005). "High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies." Gene **347**(2): 273-282.
- Markussen, T., et al. (2013). "Ultra-deep pyrosequencing of partial surface protein genes from infectious Salmon Anaemia virus (ISAV) suggest novel mechanisms involved in transition to virulence." PLoS One **26;8**(11).
- Marquez, S. M., et al. (2006). "Structure and function of eukaryotic Ribonuclease P RNA." Mol Cell **24**(3): 445-456.
- Martell, M., et al. (2004). "Structural analysis of hepatitis C RNA genome using DNA microarrays." Nucleic Acids Res **32**(11): e90.
- Martell, M., et al. (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): 3225-3229.
- Martinez-Salas, E. (1999). "Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors." Curr Opin Biotechnol **10**(5): 458-464.
- Martinez-Salas, E., et al. (2001). "Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements." J Gen Virol **82**(Pt 5): 973-984.
- Martinez, M. A., et al. (1994). "Hypermotagenesis of RNA using human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and biased dNTP concentrations." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 11787-11791.
- Marton, S., et al. (2012). "RNA aptamer-mediated interference of HCV replication by targeting the CRE-5BSL3.2 domain." Journal of Viral Hepatitis **20**(2): 103-112.
- Maynard Smith, J. (1998). "The units of selection." Novartis Found Symp **213**: 203-211; discussion 211-207.
- Mittler, J. E., et al. (1998). "Influence of delayed viral production on viral dynamics in HIV-1 infected patients." Math Biosci **152**(2): 143-163.
- Moazed, D. and H. F. Noller (1991). "Sites of interaction of the CCA end of peptidyl-tRNA with 23S rRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3725-3728.
- Moreno, H., et al. (2011). "Ribavirin Can Be Mutagenic for Arenaviruses." J Virol **85** No. 14: 7246-7255.
- Muller, H. J. (1964). "The Relation of Recombination to Mutational Advance." Mutat Res **106**: 2-9.
- Nadal, A., et al. (2002). "Specific cleavage of hepatitis C virus RNA genome by human RNase P." J Biol Chem **277**(34): 30606-30613.
- Nadal, A., et al. (2003). "Characterization of the structure and variability of an internal region of hepatitis C virus RNA for M1 RNA guide sequence ribozyme targeting." J Gen Virol **84**(Pt 6): 1545-1548.
- Nagel, J. H., et al. (2002). "A pH-jump approach for investigating secondary structure refolding kinetics in RNA." Nucleic Acids Res **30**(13): e63.

- Nájera, I., et al. (1995). "pol Gene Quasispecies of Human Immunodeficiency Virus: Mutations Associated with Drug Resistance in Virus from Patients Undergoing No Drug Therapy." J Virol **69**(1): 23-31
- Neumann, A. U., et al. (1998). "Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy." Science **282**(5386): 103-107.
- Nicholson, A. W. (1999). "Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases." FEMS Microbiol Rev **23**(3): 371-390.
- Nicholson, A. W. (2014). "Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage." Rna **5**(1): 31-48.
- Odreman-Macchioli, F. E., et al. (2000). "Influence of correct secondary and tertiary RNA folding on the binding of cellular factors to the HCV IRES." Nucleic Acids Res **28**(4): 875-885.
- Ortega-Prieto, A., et al. (2013). "Extinction of Hepatitis C Virus by Ribavirin in Hepatoma Cells Involves Lethal Mutagenesis." PLoS One **8**(8)(PMCID: PMC3745404): 71039.
- Ortega-Prieto, A. M., et al. (2013). "Extinction of hepatitis C virus by ribavirin in hepatoma cells involves lethal mutagenesis." PLoS One **8**(8): e71039.
- Palade, G. E. and P. Siekevitz (1956). "Liver microsomes; an integrated morphological and biochemical study." J Biophys Biochem Cytol **25**;2(2): 171-200.
- Panagiotis A. Tsonis and B. Dwivedi (2008). "Molecular mimicry: Structural camouflage of proteins and nucleic acids." BBA **1783**: 177-187.
- Pascual, A. and A. Vioque (1996). "Cloning, purification and characterization of the protein subunit of ribonuclease P from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 " FEBS **241**,: 17-24
- Pascual, A. and A. Vioque (1999). "Substrate binding and catalysis by ribonuclease P from cyanobacteria and *Escherichia coli* are affected differently by the 3' terminal CCA in tRNA precursors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6672-6677.
- Pawlotsky, J. M., et al. (1998). "Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations." J Virol **72**(4): 2795-2805.
- Peck-Miller, K. A. and S. Altman (1991). "Kinetics of the processing of the precursor to 4.5 S RNA, a naturally occurring substrate for RNase P from *Escherichia coli*." J Mol Biol **221**(1): 1-5.
- Perales, C., et al. (2009). "Counteracting quasispecies adaptability: extinction of a ribavirin-resistant virus mutant by an alternative mutagenic treatment." PLoS One **4**(5): e5554.
- Perales, C., et al. (2011). "Influence of mutagenesis and viral load on the sustained low-level replication of an RNA virus." J Mol Biol **18**;407(1): 60-78.
- Perales, C., et al. (2009). "Potential benefits of sequential inhibitor-mutagen treatments of RNA virus infections." PLoS Pathog **5**(11): e1000658.
- Perales, C., et al. (2010). "Deletion mutants of VPg reveal new cytopathology determinants in a picornavirus." PLoS One. **20**;5(5):: 1-14.
- Perales, C., et al. (2013). "Response of Hepatitis C Virus to Long-Term Passage in the Presence of Alpha Interferon: Multiple Mutations and a Common Phenotype." J Virol **87**(13): 7593-7607.

- Perales, C., et al. (2012). "The impact of quasispecies dynamics on the use of therapeutics." Trends Microbiol **20**(12): 595-603.
- Perales, C., et al. (2007). "Insights into RNA Virus Mutant Spectrum and Lethal Mutagenesis Events: Replicative Interference and Complementation by Multiple Point Mutants." Journal of Molecular Biology **369**(4): 985-1000.
- Perard, J., et al. (2013). "Structure of the full-length HCV IRES in solution." Nat Commun **4**: 1612.
- Perederina, A. and A. S. Krasilnikov (2010). "The P3 domain of eukaryotic RNases P/MRP: making a protein-rich RNA-based enzyme." RNA Biol **7**(5): 534-539.
- Pertzev, A. V. and A. W. Nicholson (2006). "Characterization of RNA sequence determinants and antideterminants of processing reactivity for a minimal substrate of Escherichia coli ribonuclease III." Nucleic Acids Research, **Vol. 34, No. 13**: 3708-3721.
- Pestova, T. V., et al. (1996). "Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry." Mol Cell Biol **16**(12): 6859-6869.
- Pestova, T. V., et al. (1998). "A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs." Genes Dev **12**(1): 67-83.
- Phillips, P. C. (2008). "Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems." Nat Rev Genet **9**(11): 855-867.
- Pinck, M., et al. (1970). "Enzymatic binding of valine to the 3' end of TYMV-RNA." Nature **226**(5249): 954-956.
- Piron, M., et al. (2005). "Characterizing the function and structural organization of the 5' tRNA-like motif within the hepatitis C virus quasispecies." Nucleic Acids Res **33**(5): 1487-1502.
- Polacek, N. and A. S. Mankin (2005). "The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition." Crit Rev Biochem Mol Biol **40**(5): 285-311.
- Quer, J., et al. (2001). "Contingent neutrality in competing viral populations." J Virol **75**(16): 7315-7320.
- Reiner, R., et al. (2006). "A role for the catalytic ribonucleoprotein RNase P in RNA polymerase III transcription." Genes Dev **20**(12): 1621-1635.
- Rico-Hesse, R., et al. (1998). "Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand." Am J Trop Med Hyg **58**(1): 96-101.
- Roberts, A. P., et al. (2011). "miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components." Nucleic Acids Res.
- Robertson, H. D. (1967). "A Nuclease Specific for Double-Stranded RNA." Virology **12**: 718-719.
- Robertson, H. D. (1982). "Escherichia coli ribonuclease III cleavage sites." Cell **30**(3): 669-672.
- Robertson, H. D., et al. (1972). "Purification and properties of a specific Escherichia coli ribonuclease which cleaves a tyrosine transfer ribonucleic acid precursor." J Biol Chem **247**(16): 5243-5251.

- Robertson, H. D. and J. J. Dunn (1975). "Ribonucleic acid processing activity of Escherichia coli ribonuclease III." J Biol Chem **250**(8): 3050-3056.
- Romero-Lopez, C., et al. (2012). "The folding of the hepatitis C virus internal ribosome entry site depends on the 3'-end of the viral genome." Nucleic Acids Res **40**(22): 11697-11713.
- Romero-Lopez, C., et al. (2014). "End-to-end crosstalk within the hepatitis C virus genome mediates the conformational switch of the 3'X-tail region." Nucleic Acids Res **42**(1): 567-582.
- Rudinger-Thirion, J., et al. (2006). "Idiosyncratic behaviour of tRNA-like structures in translation of plant viral RNA genomes." J Mol Biol **355**(5): 873-878.
- Ruiz-Jarabo, C. M., et al. (2000). "Memory in viral quasispecies." J Virol **74**(8): 3543-3547.
- Ruiz-Jarabo, C. M., et al. (2002). "Duration and fitness dependence of quasispecies memory." J Mol Biol **315**(3): 285-296.
- Rusyn I and L. SM (2014). "Mechanisms of HCV-induced liver cancer: what did we learn from in vitro and animal studies." Cancer Lett **10;345**(2): 210-215.
- Ryan KJ and R. C. (2004). "Sherris Medical Microbiology." McGraw Hill: **4th edición**: 551-552.
- Sabariegos, R., et al. (2004). "Catalytic RNase P RNA from Synechocystis sp. cleaves the hepatitis C virus RNA near the AUG start codon." FEBS Lett **577**(3): 517-522.
- San Juan, R., et al. (2007). "Selection for Robustness in Mutagenized RNA Viruses." PloS Genetics **3**(6).
- Sangkuhl, K., et al. (2004). "Aminoglycoside-mediated rescue of a disease-causing nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene in vitro and in vivo." Hum Mol Genet **13**(9): 893-903.
- Schultes, E. A. and D. P. Bartel (2000). "One sequence, two ribozymes: implications for the emergence of new ribozyme folds." Science **289**(5478): 448-452.
- Schuster, P. (1997). "Genotypes with phenotypes: adventures in an RNA toy world." Biophys Chem **66**(2-3): 75-110.
- Schuster, P., et al. (1994). "From sequences to shapes and back: a case study in RNA secondary structures." Proc Biol Sci. **22;255**(1344): 279-284.
- Schuster, P. and P. F. Stadler (1999). "Nature and Evolution of Early Replicons." Academic Press Origin and Evolution of Viruses Chaper 1.
- Schweisguth, D. C., et al. (1994). "Structural characterization of a ribonuclease III processing signal." Nucleic Acids Res **22**(4): 604-612.
- Sheldon, J., et al. (2014). "Increased replicative fitness can lead to decreased drug sensitivity of hepatitis C virus." J Virol **88**(20): 12098-12111.
- Sierra, M., et al. (2007). "Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe." J Virol **81**(4): 2012-2024.
- Simmonds, P. (2013). "The origin of hepatitis C virus." Curr Top Microbiol Immunol. **369**: 1-15.

- Simmonds, P., et al. (2005). "Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes." *Hepatology* **42(4)**: 962-973.
- Simmonds, P. and J. Welch (2006). "Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses." *J Virol* **80(1)**: 483-493.
- Smith, D. B., et al. (2014). "Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource." *Hepatology* **59, No. 1**.
- Smith, D. B., et al. (1995). "Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group." *J Gen Virol* **76 (Pt 7)**: 1749-1761.
- Spiegelman, S., et al. (1967). "Studies in the replication of viral RNA." *J Cell Biochem* **70(2)**: 35-64.
- Spiegelman, S., et al. (1967). "Studies in the replication of viral RNA." *J Cell Biochem* **70(2)**: 35-64.
- Springer, M., et al. (1989). "tRNA-like structures and gene regulation at the translational level: a case of molecular mimicry in Escherichia coli." *Embo J* **8(8)**: 2417-2424.
- Springer, M., et al. (1998). RNA Mimicry in the Translational Apparatus. *RNA Structure and Function*. R. W. S. a. M. Grunberg-Manago. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 377-413.
- Steinhauer, D. A., et al. (1992). "Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase." *Gene* **122(2)**: 281-288.
- Steinhauer, D. A. and J. J. Holland (1987). "Rapid evolution of RNA viruses." *Annu Rev Microbiol* **41**: 409-433.
- Stich, M., et al. (2007). "Collective properties of evolving molecular quasispecies." *BMC Evolutionary Biology* **10**: 1186/1471-2148.
- Stoltenburg, R., et al. (2007). "SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands." *Biomol Eng* **24(4)**: 381-403.
- Streeter, D. G., et al. (1973). "Mechanism of action of 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent." *Proc Natl Acad Sci U S A* **70(4)**: 1174-1178.
- Strobel, S. A. and J. C. Cochrane (2007). "RNA catalysis: ribozymes, ribosomes, and riboswitches." *Curr Opin Chem Biol* **11(6)**: 636-643.
- Swetina, J. and P. Schuster (1982). "Self-replication with errors. A model for polynucleotide replication." *Biophys Chem* **16(4)**: 329-345.
- Sztuba-Solinska, J. and S. F. Le Grice (2014). "Insights into secondary and tertiary interactions of dengue virus RNA by SHAPE." *Methods Mol Biol* **1138**: 225-239.
- Tapia, N., et al. (2005). "Combination of a mutagenic agent with a reverse transcriptase inhibitor results in systematic inhibition of HIV-1 infection." *Virology* **338(1)**: 1-8.

- Temin HM and M. S. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus." Nature **27:226**: 1211-1213.
- Theil, E. (1993). "The IRE (iron regulatory element) family: structures which regulate mRNA translation or stability." Biofactors **4(2)**: 87-93.
- Thompson, J. D., et al. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22(22)**: 4673-4680.
- Thompson, S. R. (2012). "Tricks an IRES uses to enslave ribosomes." Cell **912**: 1-9.
- Timothy M. Colussi, et al. (2014). "The structural basis of transfer RNA mimicry and conformational plasticity by a viral RNA." Nature **10**: 13378.
- Tucker, B. J. and R. R. Breaker (2005). "Riboswitches as versatile gene control elements." Curr Opin Struct Biol **15(3)**: 342-348.
- Tuplin, A., et al. (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)**: 3037-3047.
- Turner, P. E. and L. Chao (1999). "Prisoner's dilemma in an RNA virus." Nature **398(6726)**: 441-443.
- Uhlenbeck, O. C. (1987). "A small catalytic oligoribonucleotide." Nature **328**: 596-600.
- Vallejos, M. C., et al. (2011). "Activity of the human immunodeficiency virus type 1 cell cycle-dependent internal ribosomal entry site is modulated by IRES trans-acting factors." Nucleic Acids Res **39**: 6186–6200.
- Vicens, Q. and E. Westhof (2003). "Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide." J Mol Biol **326(4)**: 1175-1188.
- Vicens, Q. and E. Westhof (2003). "RNA as a drug target: the case of aminoglycosides." Chembiochem **4(10)**: 1018-1023.
- Vignuzzi, M., et al. (2005). "Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications." Virus Res **107(2)**: 173-181.
- Vignuzzi, M., et al. (2006). "Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population." Nature **439(7074)**: 344-348.
- Wagman, G. H., et al. (1974). "Antibiotic G-418, a new Micromonospora-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths: fermentation, isolation, and preliminary characterization." Antimicrob Agents Chemother **6(2)**: 144-149.
- Wagner, A. and P. F. Stadler (1999). "Viral RNA and evolved mutational robustness." J Exp Zool **15;285(2)**: 119-127.
- Walker, S. C. and D. R. Engelke (2006). "Ribonuclease P: the evolution of an ancient RNA enzyme." Crit Rev Biochem Mol Biol **41(2)**: 77-102.
- Wang, C., et al. (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)**: 526-537.

- Watts, J. M., et al. (2009). "Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome." Nature **460**(7256): 711-716.
- Weissman, C., et al. (1964). "Replication of viral RNA, IV. Properties of RNA Synthetase and Enzymatic Synthesis of MS2 Phage RNA." Biochemistry **51**: 890:897.
- Wilkinson, K. A., et al. (2008). "High-throughput SHAPE analysis reveals structures in HIV-1 genomic RNA strongly conserved across distinct biological states." PLoS Biol **6**(4): e96.
- Wilkinson, K. A., et al. (2006). "Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution." Nat Protoc **1**(3): 1610-1616.
- Wilson, D. S. and J. W. Szostak (1999). "In vitro selection of functional nucleic acids." Annu Rev Biochem **68**: 611-647.
- Wilson, D. S. and J. W. Szostak (1999). "In vitro selection of functional nucleic acids." Annu Rev Biochem **68**: 611-647.
- Wilusz, J. E., et al. (2008). "3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA." Cell **135**(5): 919-932.
- Wolinsky, S. M., et al. (1996). "Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection." Science **272**(5261): 537-542.
- Wurm, F. M. (2004). "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells." Nat Biotechnol **22**(11): 1393-1398.
- Yang, L. and S. Altman (2007). "A noncoding RNA in *Saccharomyces cerevisiae* is an RNase P substrate." Rna **13**(5): 682-690.
- Yuan, Y. and S. Altman (1994). "Selection of guide sequences that direct efficient cleavage of mRNA by human ribonuclease P." Science **Mar 4;263(5151)**:: 1269-1273.
- Yuan, Y., et al. (1992). "Targeted cleavage of mRNA by human RNase P." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(17): 8006-8010.
- Zhang, H., et al. (2004). "Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III." Cell **118**: 57-68.
- Zhang, X. G., et al. (2009). "Antiviral activity of geneticin against dengue virus." Antiviral Res **83**(1): 21-27.
- Zhu, J., et al. (2011). "Crystal structures of complexes containing domains from two viral internal ribosome entry site (IRES) RNAs bound to the 70S ribosome." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(5): 1839-1844.
- Zuker, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." Nucleic Acids Res **31**(13): 3406-3415.

