



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Efecto del uso de codones en la velocidad de traducción de la región codificante de la cápside en poblaciones del virus de la hepatitis A

Lucía D'Andrea Hirschy

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Programa de Doctorado Microbiología Ambiental y Biotecnología
Departamento de Microbiología
Facultad de Biología

Efecto del uso de codones en la velocidad de traducción de la región codificante de la cápside en poblaciones del virus de la hepatitis A

Memoria presentada por Lucía D'Andrea Hirschy para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Tesis realizada bajo la dirección de
Dra. Rosa M. Pintó Solé y Dr. Albert Bosch Navarro

Visto bueno de la directora y tutora

Visto bueno del director

Rosa M. Pintó Solé

Albert Bosch Navarro

La Doctoranda

Lucía D'Andrea Hirschy

Barcelona, Junio 2015

A mis padres...

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación de España, a través de una beca MAEC-AECID concedida por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, durante los años 2011-2014.

AGRADECIMIENTOS

Me parece mentira que esta linda experiencia de vivir en la hermosa Barcelona vaya llegando a su fin. Han sido casi 6 años donde he crecido muchísimo en lo personal ya que no fue fácil dejar mi paísito, mis afectos, mis costumbres e incluso el idioma, para embarcarme en la aventura de cruzar el océano y venir a Europa, un mundo totalmente desconocido para mí y a tan solo unos 12000 km de distancia de mi Uruguay. También he crecido en lo académico ya que he aprendido mucho y he realizado una Maestría conjunta entre Montevideo y Barcelona, un Master en Barcelona y ahora casi terminando un Doctorado. Sin embargo, este crecimiento no lo conseguí en solitario, sino que muchas personas han participado para que pudiera alcanzar mis metas y hacer mi vida lejos de casa más amena.

En primer lugar quisiera agradecer a Rosa y Albert, mis directores de tesis, el permitirme que me incorporara en su laboratorio en el 2009 cuando iniciaba mi aventura europea. También por todos los consejos y el apoyo tanto a nivel personal, como en el trabajo de laboratorio que me han dado, así como el permitirme que me fuera de vacaciones a casa en Diciembre y no en Agosto como todos en el laboratorio, ya que para nosotros los sudamericanos, es muy importante volver a casa por Navidad. A ti Rosa también agradecerte por las muchas caminatas hasta Francesc Macià, las charlas y por las innumerables horas que hemos pasado juntas estos últimos meses.

También quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio 6, alguno ya se ha ido como Unai y a los que todavía están, Anna, Cristina, Aurora, Nerea, Susana, Noemí y Albert Jr. por los buenos momentos compartidos, las comidas y pica-pica compartidos, así como la ayuda que recibí cuando la necesitaba. Asimismo, quiero agradecer a mis otros compañeros, los del laboratorio 3, donde me la pasaba todo el día. A Mari que ya no está, gracias por las charlas y la ayuda que me proporcionaste con protocolos y los consejos de laboratorio. Montse, gracias por el compañerismo, por los arreglos de los horarios de la cabina vertical para que ambas pudiéramos trabajar sin interferir una con la otra, por las muchas charlas y momentos de cotilleo y por estar dispuesta a ayudar en lo que fuera necesario. Ceci, la yankee-argentina, una pena que sólo hayamos coincidido pocos meses, gracias por tu trato para conmigo y por las charlas de fútbol y en rioplatense, que para mí son impagables; seguramente nos volveremos a ver por el sur.

Fran, vos a pesar de ser del lab 3, te merecés un párrafo aparte. Desde el minuto 0 que llegué al lab estuviste dispuesto a ayudarme y me diste una mano en todo lo que has podido e incluso más. Han sido innumerables horas trabajando juntos y aprendiendo juntos, incluso llegamos un día a dejar de trabajar y cerrar el laboratorio a las 4 de la mañana. También han sido innumerables las actividades que hemos hecho fuera del lab, en la mayoría de los buenos recuerdos que tengo en Barcelona estás vos, sin mencionar el gran proyecto! jeje. Gracias por las emisiones día tras día ininterrumpidas de radio Salmonella y

por poder hablar en uruguayo avanzado contigo, sos la única persona del hemisferio norte con la que puedo hablar con normalidad, utilizando mis palabras sin tener que andar buscando sinónimos. Ojalá pueda estar en la defensa de tu tesis y que algún día te puedas dar una vuelta por mi querido Uruguay del cual tanto te he hablado a lo largo de estos años y creo que ya te lo conoces sin haber ido jeje. Te extrañaré!

Alejandro y Oscar (o más conocidos como Chino y Chano), incorporaciones recientes de la otra mitad del lab 3, muchas gracias por su alegría, simpatía, amabilidad, buena onda y por ayudarme con problemas informáticos!! Sin lugar a duda son incorporaciones muy positivas para el lab 3 y lo han sido para mí personalmente en esta última y difícil tarea de escribir la tesis. Oscar a ti también agradecerte por los riquísimos crepes que haces y por el dibujito del TRES! Si van al sur, ya saben donde encontrarme!

También quiero agradecer a la gente del laboratorio 4, Tania, Marta, Paytu, Youssef, Carla y Llorenç por los consejos que me dieron cuando necesitaba trabajar con bacterias y por permitirme utilizar el electroporador un gran número de veces. A ti Tania, también por las charlas y la amistad fuera del lab, muchos ánimos para lo que te queda y seguro nos volveremos a ver por nuestras tierras. Mario, vos ya no pertenecés más al lab 4, pero yo te conocí ahí, así que para mí seguís siendo del lab 4; muchas gracias por los consejos de laboratorio y personales, así como las charlas cada vez que coincidíamos, fue un gusto haberte conocido y seguro nos veremos por nuestra querida Sudamérica.

Quiero agradecer a la gente del laboratorio 2 por permitirme utilizar el nanodrop y el lector de ELISA cada vez que lo necesitaba, y en especial a ti Lily por tu calidez como persona, por tu amabilidad, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por tu amistad, eres una gran persona, seguro nos volveremos a ver, en tu Ecuador, en mi Uruguay o en algún lugar del mundo. Te extrañaré!

También quiero agradecer a los compañeros de otros laboratorios como Jesús, Byron, Ayalke, Alex, que con charlas y consejos en el pasillo, así como con alguna cervecita en algún bar, hicieron mi estancia en el Departamento más agradable.

A las secretarías y secretario del Departamento de Microbiología, que siempre con buena disposición intentaban solucionar mis problemas, y en especial a Manolo por el papeleo y los trámites del depósito de la tesis a contrarreloj.

Al Departamento de Bioquímica quiero agradecer por permitirme utilizar el luminómetro para las medidas de bioluminiscencias durante horas, días e incluso semanas.

Patxi, un vasco que quiere volverse uruguayo jeje, mil gracias por el trato que me has dado, por tu amistad, por tu sentido del humor, por las comidas compartidas, por todo lo que me has enseñado de cultura general y de cine, por interesarte por mi país y por mi cultura, por dejarme utilizar el despatxi, por todos los recortes de periódico que me traías. Es un placer

haberte conocido, sos una GRAN persona!! Ojalá algún día salgas de tu madriguera y me vayas a visitar, o sino tendré que sacrificarme e ir yo. Te voy a extrañar...

También quiero agradecer a todas las personas que he conocido en Barcelona a lo largo de estos años, así como a mis diferentes compañeros de piso que han aportado su granito de arena para que mi paso por Barcelona fuese más divertido y enriquecedor, y colaborar para extrañar menos mi tierra. Principalmente agradecer a Marllyryn, por ser una amiga incondicional, siempre dispuesta a ayudarme y a darme ánimos. Eres una gran persona, sin tí mi paso por Barcelona no hubiese sido el mismo. Estoy segura que nuestra amistad durará por años y que nos volveremos a ver en México, Uruguay o donde sea.

A mis amigos de Uruguay, esos que a pesar de no entender lo que hago, con un mensaje, un e-mail, una llamada o un Skype se hacían presentes y siempre estaban para darme ánimo en los momentos difíciles y alegrarse por mis logros, así como hacerse un tiempito para verme cuando yo iba de vacaciones.

A mis abuelos, tíos, padrinos y primos, agradecerles por todo el cariño que me dan, por las charlas compartidas, por las palabras de ánimo, por los asaditos compartidos cuando nos reuníamos todos y por formar parte de mi vida.

A mis padres, mis hermanos y Luca, agradecerles por todo el amor que me dan, por el apoyo que han sido para mí estando tan lejos y que lo son desde siempre, por nunca cuestionar mi decisión de cruzar el océano, por perdonarme el tiempo que les quité de compartir todos juntos y por todas las cosas que me perdí una y otra vez por estar lejos. Los quiero mucho, y en pocos meses todo volverá a ser como antes.

Por último pero no menos importante, Matí, el gran compañero que me ha dado la vida, sólo vos y yo sabemos lo difíciles que han sido estos 6 años de distancia. Siempre te estaré agradecida por todo lo que me has ayudado, por todo el apoyo que me has dado, por tu amor, por tu amistad, por ser mi compañero de viaje, por resolver mis dudas informáticas, por los análisis estadísticos, por soportar mis locuras y mis malos humores. Por suerte en pocos meses comenzará una nueva etapa para nosotros.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Abreviaturas | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1 Hepatitis A: La enfermedad | 5 |
| 1.1.1 Historia | 5 |
| 1.1.2 Concepto de Hepatitis | 6 |
| 1.1.3 Características clínicas | 6 |
| 1.1.4 Epidemiología | 11 |
| 1.1.5 Vacunas anti-VHA | 14 |
| 1.2 Hepatitis A: El virus | 17 |
| 1.2.1 Características generales | 17 |
| 1.2.2 Organización genómica | 18 |
| 1.2.3 Estructura del virión | 21 |
| 1.2.4 Diversidad genética y antigénica | 23 |
| 1.2.5 Ciclo del VHA en el hospedador | 27 |
| 1.2.6 Ciclo celular del VHA | 28 |
| 1.2.7 Modo de evolución | 31 |
| 1.2.8 Características únicas del VHA | 33 |
| 2. OBJETIVOS | 41 |
| 3. CAPÍTULO 1: Efecto del uso de codones en la velocidad de traducción en regiones de la cápside de poblaciones del virus de la hepatitis A | 45 |
| 3.1 Antecedentes | 47 |
| 3.2 Materiales y Métodos | 55 |
| 3.2.1 Línea celular | 55 |
| 3.2.2 Poblaciones virales | 56 |
| 3.2.3 Extracción de ARN de las cuatro poblaciones en estudio | 59 |
| 3.2.4 Amplificación por RT-PCR de dos fragmentos de las regiones de VP1 y VP3 de las cuatro poblaciones en estudio | 60 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.4.1 Procedimiento de Transcripción Reversa | 60 |
| 3.2.4.2 Procedimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa | 61 |
| 3.2.5 Electroforesis en gel de agarosa y purificación de productos de PCR | 63 |
| 3.2.6 Clonación de los fragmentos de VP1 y VP3 de cada una de las cuatro poblaciones en estudio en vectores bicistrónicos | 64 |
| 3.2.7 Análisis de las cuasiespecies para cada uno de los fragmentos de VP1 y VP3 de cada una de las cuatro poblaciones en estudio | 69 |
| 3.2.8 Análisis de la velocidad de traducción de los diferentes clones obtenidos de los fragmentos de VP1 y VP3: traducción a nivel de cuasiespecies | 72 |
| 3.2.8.1 Transfección de células FRhK-4 | 73 |
| 3.2.8.2 Medición de las actividades bioluminiscentes de <i>Firefly luciferase</i> y <i>Renilla luciferase</i> | 75 |
| 3.2.9 Secuenciación masiva de los fragmentos de VP1 y VP3 | 76 |
| 3.2.10 Análisis estadístico | 77 |
| 3.3 Resultados | 79 |
| 3.3.1 Uso de codones del VHA en las regiones de VP1 y VP3 estudiadas | 79 |
| 3.3.2 Estudio de la velocidad de traducción a nivel de cuasiespecies en dos regiones de la cápside de cuatro poblaciones del VHA | 83 |
| 3.3.2.1 Traducción de las cuasiespecies de VP1 | 83 |
| 3.3.2.2 Traducción de las cuasiespecies de VP3 | 99 |
| 3.3.3 Efecto del uso de codones en la modulación de la velocidad de traducción | 114 |
| 3.3.3.1 Deoptimización de codones: efecto de frenar o disminuir la tasa de traducción | 118 |
| 3.3.3.2 Optimización u optimización/deoptimización concomitante de codones: efecto de aumento de la tasa de traducción | 121 |
| 3.3.3.3 Deoptimización/optimización concomitante de codones: efecto de recuperación/ganancia de la tasa de traducción perdida | 125 |
| 3.3.3.4 Efecto rampa | 129 |

| | |
|---|------------|
| 3.3.3.5 Efecto de la estructura secundaria del ARN | 132 |
| 3.3.3.5.1 Efecto de los cambios del uso de codones en la estructura secundaria del ARN del fragmento de VP1 | 132 |
| 3.3.3.5.2 Efecto de los cambios del uso de codones en la estructura secundaria del ARN del fragmento de VP3 | 134 |
| 3.4 Discusión | 137 |
| 3.5 Conclusiones | 151 |
| 4. CAPÍTULO 2: Efecto de tres mutaciones del IRES sobre la velocidad de traducción en regiones de la cápside de poblaciones del virus de la hepatitis A | 153 |
| 4.1 Antecedentes | 155 |
| 4.2 Materiales y Métodos | 161 |
| 4.2.1 Introducción de las mutaciones U359C, U590C y U726C en el IRES del VHA, de los haplotipos de VP1 y VP3 | 161 |
| 4.2.1.1 Introducción de la mutación U359C | 161 |
| 4.2.1.2 Introducción de la mutación U590C | 163 |
| 4.2.1.3 Introducción de la mutación U726C | 164 |
| 4.2.2 Medidas de la velocidad de traducción de los diferentes haplotipos obtenidos para VP1 y VP3 con las mutaciones U359 (T359C), U590C (T590C) y U726C (T726C) del IRES | 165 |
| 4.2.3 Análisis estadístico | 165 |
| 4.3 Resultados | 167 |
| 4.3.1 Estudio del efecto de tres mutaciones del IRES en la velocidad de traducción a nivel de cuasiespecies en dos regiones de la cápside de cuatro poblaciones del VHA | 167 |
| 4.3.1.1 Traducción de las cuasiespecies de VP1 | 167 |
| 4.3.1.2 Traducción de las cuasiespecies de VP3 | 178 |
| 4.3.2 Efecto de las tres mutaciones del IRES sobre la modulación de la velocidad de traducción llevada a cabo por el uso de codones | 189 |
| 4.3.2.1 Efecto de las mutaciones del IRES sobre haplotipos con traducción disminuida por deoptimización de codones: compensación del descenso de la tasa de traducción | 189 |
| 4.3.2.2 Efecto de las mutaciones del IRES sobre haplotipos que incrementan la tasa de traducción por efecto del uso de codones: mayor incremento de la tasa de traducción | 193 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.2.3 Efecto de las mutaciones del IRES sobre haplotipos con traducción aumentada por optimización de codones: disminución de la tasa de traducción | 194 |
| 4.3.2.4 Efecto de las mutaciones del IRES sobre haplotipos que deoptimizan y optimizan concomitantemente su uso de codones obteniendo un efecto compensatorio de la tasa de traducción: disminución de la tasa de traducción | 196 |
| 4.3.2.5 Efecto de las mutaciones del IRES cuando existe un efecto rampa en las tasas de traducción: neutralidad o bajada de la tasa de traducción | 198 |
| 4.4 Discusión | 203 |
| 4.5 Conclusiones | 211 |
| 5. CAPÍTULO 3: Estudio de las características biológicas de una población de rápido crecimiento del VHA en relación a su uso de codones | 213 |
| 5.1 Antecedentes | 215 |
| 5.2 Materiales y Métodos | 219 |
| 5.2.1 Línea celular | 219 |
| 5.2.2 Población de estudio | 219 |
| 5.2.3 Cuantificación del título infeccioso de las suspensiones del VHA: cálculo de la TCID ₅₀ /ml | 219 |
| 5.2.4 Obtención de suspensiones concentradas del VHA | 220 |
| 5.2.5 Análisis de la productividad vírica mediante una curva <i>one-step growth</i> | 222 |
| 5.2.6 Análisis del reconocimiento de la población HM175-HP por anticuerpos monoclonales | 223 |
| 5.2.7 Análisis de las propiedades físicas de la cápside | 225 |
| 5.2.8 Análisis de la eficiencia de unión al receptor | 225 |
| 5.2.9 Análisis de la cinética de desencapsidación | 226 |
| 5.2.10 Análisis de la infectividad específica | 228 |
| 5.2.11 Análisis de la morfología de las calvas | 230 |
| 5.2.12 Análisis estadístico | 232 |
| 5.3 Resultados | 233 |

| | |
|---|------------|
| 5.3.1 Origen de la población de rápido crecimiento HM175-HP | 233 |
| 5.3.2 Características biológicas de la población de rápido crecimiento del VHA en relación a su uso de codones | 236 |
| 5.4 Discusión | 245 |
| 5.5 Conclusiones | 251 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 253 |
| 7. ANEXO: Artículos relacionados con el trabajo de tesis | 273 |

ABREVIATURAS

3'NCR: Región 3' no codificante

5'NCR: Región 5' no codificante

aa: Aminoácidos

Abs: Anticuerpos

ADNc: ADN copia

ALT: Alanina amino-transferasa

AMD: Actinomicina D

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN de transferencia

CRE: Elemento de replicación que actúa en cis

C-terminal: Carboxilo terminal

dNTP's: Desoxinucleótidos trifosfato

ECP: Efecto citopático

eIF4E: Factor de iniciación eucariótico de la traducción 4E

eIF4F: Factor de iniciación eucariótico de la traducción 4F

eIF4G: Factor de iniciación eucariótico de la traducción 4G

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EMCV: Virus de la encefalomiocarditis

IC: Intervalo de confianza

IgA: Inmunoglobulina A

IgG-anti VHA: Inmunoglobulina G anti-virus de la hepatitis A

IgM-anti VHA: Inmunoglobulina M anti-virus de la hepatitis A

INF- β : Interferón beta

INF- γ : Interferón gamma

IRES: Sitio interno de entrada del ribosoma

FRhK-4: Células de riñón fetal de mono Rhesus

FLuc: *Firefly luciferase*

FMDV: Virus de la fiebre aftosa

HAVCR1: Receptor celular para el virus de la hepatitis A 1

Kb: Kilobases

MAbs: Anticuerpos monoclonales

MEM: Medio esencial mínimo

m.o.i.: Multiplicidad de infección
MSM: Hombres homosexuales con prácticas sexuales de riesgo
Nc: Número efectivo de codones
NEAA: aminoácidos no esenciales
N-terminal: Amino terminal
nts: Nucleótidos
OMS: Organización Mundial de la Salud
pb: Pares de bases
Poli-A: Poli adeninas
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
RCDi: Índice Relativo de Deoptimización de Codones
RLuc: *Renilla luciferase*
RT: Transcripción reversa
SFBi: Suero fetal bovino inactivado
TCID₅₀/ml: Dosis Infecciosa que provoca la destrucción del 50% de las monocapas celulares por mililitro
U: Unidades de enzima
UT₅₀: Tiempo necesario para la desencapsidación del 50% de los virus
V: Voltios
VHA: Virus de la hepatitis A
VHAe: Virus de la hepatitis A envuelto
VHC: Virus de la hepatitis C

1. INTRODUCCIÓN

1.1 HEPATITIS A: LA ENFERMEDAD

1.1.1 Historia

Las primeras referencias registradas de lo que hoy conocemos como hepatitis datan del siglo V Antes de Cristo (A.C.). Durante esta época eran conocidas las epidemias de ictericia en la región mediterránea, tal y como describe Hipócrates (460 a 350 A.C.) en sus tratados médicos [Pintó *et al.*, 2012]. No obstante, para ser históricamente precisos, la primera referencia que se encuentra de ictericia epidémica podría ser la que recoge Cleghorn en *Epidemic Diseases of Minorca 1744 a 1749* [Cockayne, 1912]. Sin embargo, la ausencia de una definición de su etiología va a provocar que desde el siglo XVIII hasta finales del siglo XIX, la hepatitis se relacionase con una obstrucción mecánica del conducto biliar, en lugar de asociarse a una inflamación y daño hepático. Por otra parte, la enfermedad descrita como “ictericia” en la literatura antigua China, Griega y Romana, posiblemente hacía referencia a la hepatitis de origen viral. Un agente etiológico de origen viral fue postulado en 1912 como el causal de ciertas formas de ictericia, y el término “hepatitis infecciosa” fue utilizado ya que la enfermedad ocurría a menudo en forma de epidemias [Nainan *et al.*, 2006].

Estudios epidemiológicos iniciales basados en los patrones de transmisión de la enfermedad permitieron caracterizar a la hepatitis en dos formas: infecciosa y sérica [Nainan *et al.*, 2006]. La forma “infecciosa” corresponde a las hepatitis transmitidas a través de la ruta fecal-oral, o hepatitis entéricas, e incluye a las hepatitis A y E; mientras que la forma “sérica” corresponde a aquellas hepatitis que son transmitidas parenteralmente e incluyen a las hepatitis B, C y D [Pintó *et al.*, 2012]. Desde 1965 los principales agentes etiológicos de hepatitis virales, que son los virus de las hepatitis A, B, C, D y E han sido todos bien identificados.

El término Hepatitis A fue introducido por primera vez por Krugman y colaboradores [Krugman *et al.*, 1967], y hoy en día se sabe que esta enfermedad es causada por una infección con el virus de la hepatitis A (VHA), que es un agente hepatotrópico, cuyo sitio principal de replicación es el hígado.

En 1973, el VHA fue identificado en materias fecales de personas infectadas, lo cual finalmente llevó al desarrollo de test diagnósticos, propagación en cultivo celular, caracterización molecular y desarrollo de vacunas [Feinstone *et al.*, 1973; Provost *et al.*, 1979]. Muchos de estos estudios fueron llevados a cabo con la cepa HM175 del VHA, la cual fue aislada a partir de un brote que tuvo lugar en Melbourne, Australia, en el año 1976 [Gust *et al.*, 1985], y también con las variantes de esta cepa adaptadas a replicar en cultivo celular [Cohen *et al.*, 1989].

1.1.2 Concepto de Hepatitis

El término “hepatitis” significa inflamación del hígado. Una persona con hepatitis puede padecer uno ó varios trastornos, incluyendo una infección vírica ó bacteriana del hígado; presentar lesiones hepáticas provocadas por una toxina; la interrupción de la irrigación sanguínea normal del hígado; padecer un trastorno auto-inmunitario que afecte al hígado ó haber sufrido un traumatismo abdominal en la zona del mismo. No obstante, lo más habitual es que la hepatitis sea provocada por un agente infeccioso viral, los cuales se pueden clasificar en dos grupos. Por un lado los que la producen como consecuencia de su diseminación en el organismo, como por ejemplo el citomegalovirus, Epstein-Barr, entre otros; y por otro lado, aquellos virus que tienen como órgano diana el hígado (hepatotrópicos), entre los cuales encontramos principalmente a los virus de las hepatitis A, B y C, en menor medida al D y al E y finalmente a los F y G, que son los que se han descrito últimos y son de momento menos estudiados.

1.1.3 Características clínicas

La hepatitis A es una infección aguda del hígado causada por el VHA, es generalmente autolimitada y puede producir efectos que van desde formas asintomáticas, hasta casos en los que se deriva en la muerte, conocidos estos últimos como hepatitis fulminantes, debido a una necrosis masiva de las células hepáticas o hepatocitos. La probabilidad de una enfermedad clínica asociada a la infección por el VHA se incrementa con la edad. En niños menores de 6

años, la mayoría de las infecciones (más del 70% de los casos), son asintomáticas o subclínicas, y si ocurre la enfermedad, es usualmente sin ictericia (hace referencia a la coloración amarillenta de la piel y las mucosas). En el caso de los jóvenes y adultos, la infección es usualmente sintomática, con ocurrencia de ictericia en un número de casos superior al 70% de los pacientes [Nainan *et al.*, 2006; Pintó *et al.*, 2012]. Luego de un período de incubación promedio de 30 días (dentro de un rango de 15 a 50 días), la mayoría de las personas infectadas presentan signos y síntomas no específicos e indistinguibles de otros tipos de hepatitis virales agudas, seguidos de síntomas gastrointestinales. Entre los síntomas se incluye fiebre, malestar, anorexia, náuseas, dolor abdominal e ictericia; todos los cuales suelen durar un período de tiempo inferior a los 2 meses [Cuthbert, 2001].

No existe evidencia de una enfermedad crónica del hígado o de una infección persistente luego de una infección por el VHA. Sin embargo, entre 1.5 a 15% de los pacientes pueden presentar una enfermedad prolongada o una recidiva de signos y síntomas por un tiempo de hasta 6 meses [Sjogren *et al.*, 1987; Glikson *et al.*, 1992]. También se ha detectado el VHA en suero por un tiempo de entre 6 y 12 meses luego de la infección [Bower *et al.*, 2000].

En cuanto a las hepatitis fulminantes, es importante destacar que son una complicación poco frecuente de la hepatitis A. El riesgo de una insuficiencia hepática aguda está entre el 0.015 a 0.5%, y la mayoría de esos casos ocurren en niños pequeños y adultos mayores que poseen una enfermedad crónica del hígado. Otros factores del hospedador, aparte de edad avanzada y enfermedad crónica del hígado, no han sido identificados como predisponentes a padecer una hepatitis A fulminante [Vento *et al.*, 1998].

Los diferentes eventos virológicos, inmunológicos y bioquímicos, que tienen lugar durante una infección con el VHA han sido determinados en infecciones experimentales en primates no-humanos e infecciones naturales en humanos (ver Figura 1).

El VHA es primariamente un virus hepatotrópico, replica en el hígado, produce una viremia, luego es excretado a la bilis y finalmente se disemina en la materia fecal de personas infectadas. La infección con el VHA ocurre principalmente por la ruta de transmisión fecal-oral, a través del consumo de agua o alimentos contaminados, y por contacto persona-persona. Las heces

pueden contener hasta 10^9 viriones infecciosos por gramo, constituyendo así la fuente primaria de infección con el VHA, e incluso llegar a 10^{12} en pacientes HIV positivos [Nainan *et al.*, 2006]. La lenta velocidad de traducción y la baja tasa de replicación, podrían explicar las grandes diferencias de título viral en heces en comparación con otros virus entéricos, como astrovirus y norovirus, los cuales son excretados en títulos superiores al VHA [Caballero *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2006]. El pico máximo de excreción fecal, y por tanto de infectividad, ocurre antes del inicio de la ictericia. La elevación de enzimas hepáticas (Alanina Amino-Transferasa, -ALT-), pueden alcanzar valores de hasta 10 veces su valor normal; y descienden luego de la aparición de la ictericia [Skinhoj *et al.*, 1981; Tassopoulos *et al.*, 1986] (ver Figura 1). El inicio de los síntomas comienza usualmente 2 semanas después de la exposición con el VHA y los signos clínicos pueden durar más de 5 semanas. Los niños y bebés, en comparación con los adultos, pueden transmitir el VHA por períodos de tiempo más largos, es decir, hasta varios meses luego de la aparición de la enfermedad clínica [Guadalupi *et al.*, 1986].

La presencia de viremia o virus en sangre ocurre dentro de las primeras 2 semanas luego de la exposición al VHA, y persiste durante el período de elevación de las enzimas hepáticas [Lemon, 1994; Asher *et al.*, 1995] (ver Figura 1). La concentración del VHA en suero es de 2 a 3 unidades logarítmicas más baja que las que se encuentra en las heces. Un análisis de muestras de suero colectadas durante una infección por el VHA en humanos y chimpancés, mostró que el ARN del VHA estaba presente de 3 a 4 semanas aproximadamente antes del comienzo de la ictericia, y que la concentración de virus alcanzó el pico máximo durante el período que precede al comienzo de la elevación de las enzimas hepáticas [Bower *et al.*, 2000]. El VHA también es diseminado en la saliva en la mayoría de los pacientes con hepatitis A; pero la carga viral sería de 1 a 3 unidades de logaritmo menor que la que se encuentra en suero. Sin embargo, no hay datos epidemiológicos que sugieran que la saliva sea una fuente significativa de transmisión [Mackiewicz *et al.*, 2004].

En cuanto a la respuesta inmune humoral (ver Figura 1), la aparición de anticuerpos ocurre previo a la aparición de los síntomas. Las inmunoglobulinas M contra el VHA (IgM anti-VHA) son detectables previo a la aparición de la enfermedad clínica, disminuyendo aproximadamente alrededor de los 3 a 6

meses, volviéndose indetectables por tests comerciales de diagnóstico [Nainan *et al.*, 2006]. Por otra parte, las inmunoglobulinas G contra el VHA (IgG anti-VHA), aparecen un poco después de las IgM, pero persisten por años luego de la infección y le confieren a la persona que ha estado infectada, inmunidad de por vida [Chiparelli, 2002]. Al contrario de lo que ocurre con el virus de la hepatitis C (VHC), la respuesta inmune adaptativa contra el VHA es robusta y extremadamente efectiva en la eliminación del virus. Una re-exposición de individuos seropositivos para el VHA puede conducir a un incremento en el título de anticuerpos anti-VHA, pero no está asociado con una enfermedad del hígado. En parte esto refleja la ausencia de diferencias antigénicas significativas entre cepas colectadas en diferentes regiones del mundo [Martin & Lemon, 2006].

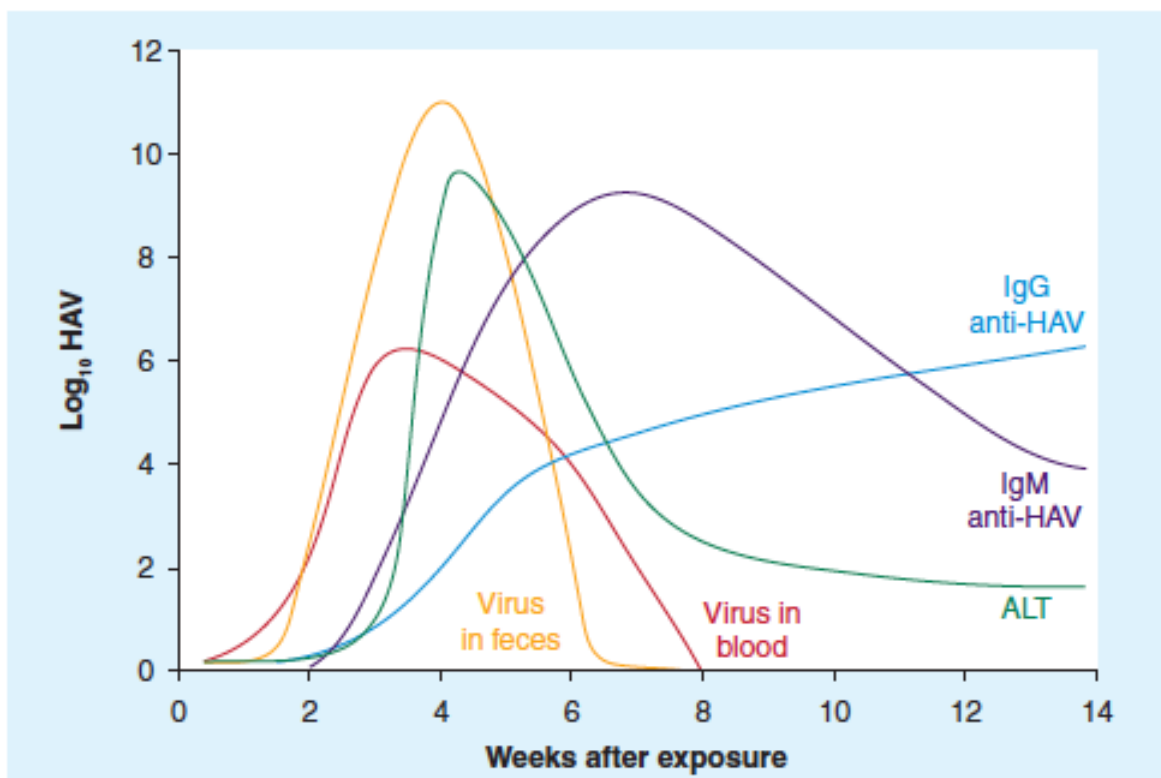


Figura 1. Eventos virológicos, inmunológicos y bioquímicos que tienen lugar como consecuencia de una infección con el virus de la hepatitis A (VHA). ALT es la Alanina Amino-Transferasa (enzima hepática); IgM anti-HAV e IgG anti-HAV hacen referencia a las Inmunoglobulinas M y G respectivamente, generadas contra el VHA. En pacientes HIV positivos, el valor de virus infecciosos por gramo de heces puede llegar a valores de 10^{12} . Imagen extraída de Pintó *et al.*, 2012.

Las inmunoglobulinas A (IgA) son también producidas durante la infección con el VHA por un tiempo limitado, pero el rol de las IgA en la respuesta contra el VHA todavía se desconoce. A diferencia de otros miembros de la familia *Picornaviridae*, el VHA no parece provocar una respuesta inmune intestinal efectiva [Martin & Lemon, 2006; Nainan *et al.*, 2006]. Anticuerpos contra proteínas no estructurales son también producidos, aunque su rol en el mantenimiento de la inmunidad es probablemente menos importante que el de aquellos anticuerpos que reconocen antígenos en la cápside, debido a su baja concentración y a la falta de capacidad neutralizadora. Estos tipos de anticuerpos han sido detectados en humanos y en chimpancés infectados experimentalmente, pero están ausentes en individuos vacunados [Robertson *et al.*, 1993; Kabrane-Lazizi *et al.*, 2001]. Sin embargo, a causa de la variabilidad en la respuesta contra las proteínas no estructurales no han sido desarrollados tests diagnósticos para la detección de anticuerpos contra dichas proteínas, a pesar de que podrían ser utilizados como complemento de los test anti-VHA existentes, y diferenciar previamente entre personas infectadas y personas vacunadas [Robertson *et al.*, 1992a].

Por otra parte, la destrucción de los hepatocitos infectados está mediada por linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y por células *Natural Killer* (NK) no específicas, en un proceso estimulado por interferón γ (INF- γ) [Siegl & Lemon, 1990]. Además en chimpancés infectados con el VHA, se ha observado que los linfocitos T CD4⁺ tienen también un rol predominante en el control de la hepatitis aguda [Zhou *et al.*, 2012]. La acción de los linfocitos es precisamente lo que provoca la necrosis hepatocelular propia de la infección aguda por el VHA. Como se comentó anteriormente y se retomará más adelante, el VHA presenta una baja síntesis proteica durante su ciclo replicativo, hecho que podría aportarle una ventaja a nivel de respuesta celular, evitando las defensas de la célula hospedadora. De hecho, se ha demostrado que las cepas no citopatógenicas del VHA no inducen apoptosis ni síntesis de interferón β (INF- β), probablemente gracias a la baja eficiencia de replicación y por tanto, a la baja concentración de intermediarios de ARN de doble cadena debido a la baja tasa de replicación [Brack *et al.*, 2002]. De ser así, la baja eficiencia de replicación del VHA permitiría explicar la elevada infectividad específica de

estos virus en comparación con otros picornavirus, los cuales presentan infectividades específicas más bajas debidas en parte a ciclos infecciosos abortados por las defensas antivíricas de la célula hospedadora [Mueller *et al.*, 2006].

1.1.4 Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que hay 1.5 millón de casos clínicos de hepatitis A que ocurren anualmente en el mundo. Sin embargo, datos de seroprevalencia indican que son varios millones las infecciones que ocurren a causa del VHA cada año, pero al ser la mayoría de ellas asintomáticas pasan desapercibidas. Por tanto, la hepatitis A es la más importante de las hepatitis agudas respecto al número de casos a nivel mundial [Wasley *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2012; Página web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/es/> actualizada Junio 2014].

A pesar de que la hepatitis A es una enfermedad que ocurre a nivel mundial, existen diferencias en la endemidad, las cuales se correlacionan con las condiciones sanitarias, higiénicas, económicas y otros indicadores del nivel de desarrollo (ver Figura 2). Así pues se clasifican en áreas de alta, intermedia y baja endemidad. En áreas de alta endemidad, incluyendo África, Asia, América Central y del Sur, el VHA se transmite fácilmente como resultado de las pobres condiciones socio-económicas. La mayoría de las infecciones en estas áreas ocurren en la etapa de la niñez, donde las infecciones asintomáticas son las predominantes y esencialmente la totalidad de la población ha sido infectada antes de llegar a la adolescencia. Los adultos susceptibles en estas regiones poseen un alto riesgo de ser infectados y de adquirir la enfermedad, pero las tasas de enfermedad clínica son generalmente bajas y los brotes son episodios raros, debido a la alta prevalencia de inmunidad en la población [Wasley *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2012].

En las áreas de endemidad moderada, incluyendo Europa del Este, ciertas regiones de África, Asia y América, el VHA no es transmitido tan rápidamente debido a las mejores condiciones sanitarias y de vida, siendo el promedio de edad de infección más alto en estas áreas que en aquellas de endemidad alta. La transmisión entre niños pequeños permanece

relativamente común, pero paradójicamente la ocurrencia de brotes de hepatitis A puede verse incrementada, en comparación con las áreas altamente endémicas, debido a que existe un *pool* mayor de adultos y de jóvenes susceptibles, los cuales presentan un riesgo mayor de ser infectados con el VHA, y probablemente desarrollen una enfermedad sintomática [Cianciara, 2000].

Por otra parte, en Estados Unidos, Canadá, Europa del Oeste, Australia, Japón y otras áreas desarrolladas, la endemicidad de la infección por el VHA es moderada-baja. El número de niños infectados, así como la incidencia de la enfermedad es generalmente baja. La frecuencia de la presencia de anticuerpos anti-VHA en la población se incrementa gradualmente con la edad, principalmente reflejado en la disminución de incidencias, cambios de endemismos y las resultantes menores tasas de infección infantil con el tiempo. Algunas regiones, como por ejemplo Escandinavia, posee una baja endemicidad, donde la mayoría de los casos ocurren en grupos de riesgo definidos, como los viajeros que retornan de áreas donde el VHA es endémico y usuarios de drogas inyectables [Wasley *et al.*, 2006].

Un cambio epidemiológico de prevalencia intermedia a baja, se ha notado en las décadas recientes en muchos países, particularmente en el Sur de Europa, incluyendo España, Italia y Grecia. Consecuentemente, aunque la primera hepatitis epidémica bien documentada ocurrió en la isla Mediterránea de Menorca hace 250 años, la cuenca Mediterránea en su totalidad no debería ser considerada un área endémica en la actualidad. A su vez, en otros países de Europa del Este se ha descrito también en las últimas décadas un descenso significativo en la incidencia de hepatitis A. Del mismo modo, en algunos países de Asia y América Latina, se ha descrito un cambio de endemicidad de alta a moderada [Pintó *et al.*, 2012].

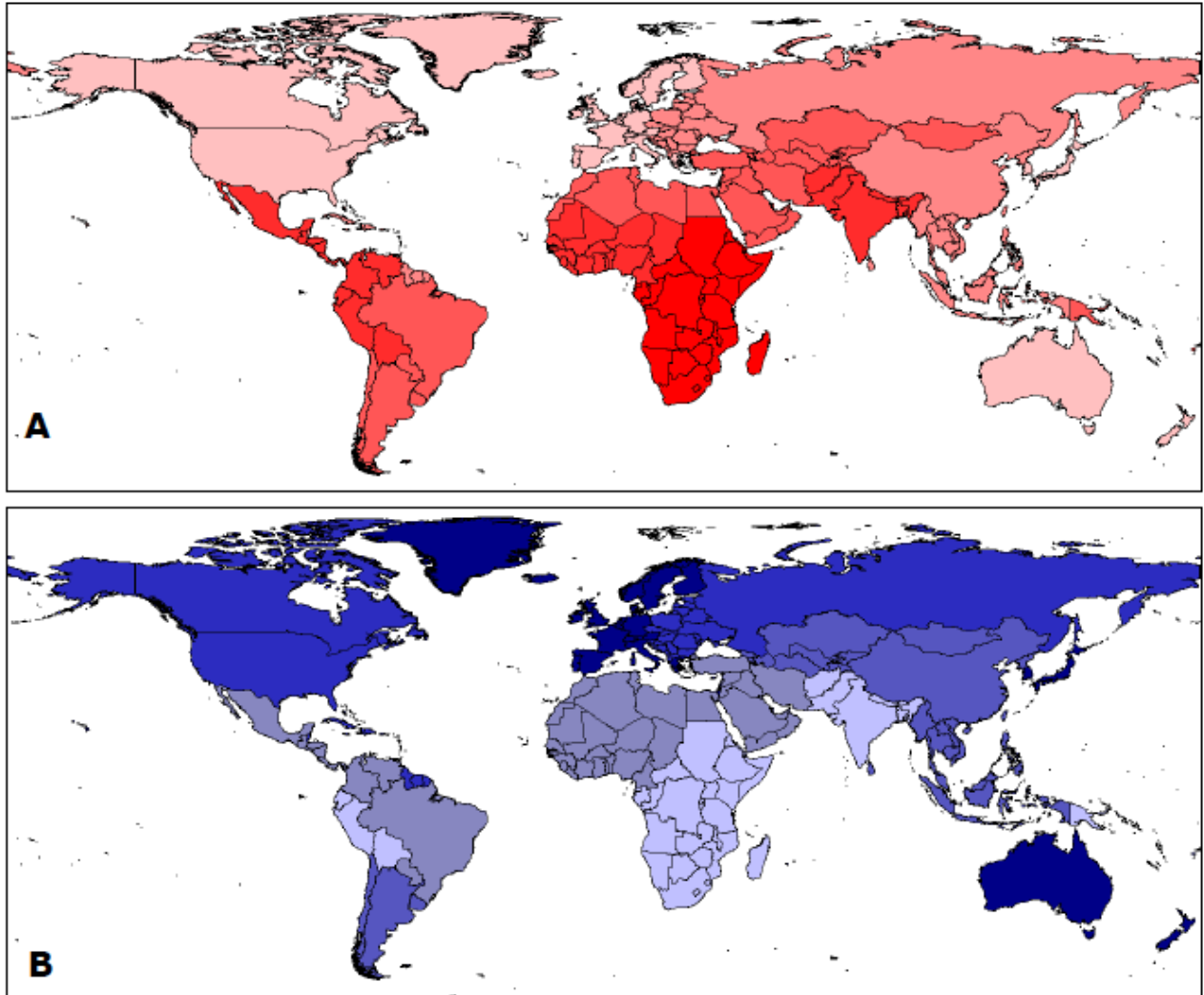


Figura 2_(A) Distribución geográfica de seroprevalencia anti-VHA. Nivel de inmunidad estimado en niños: cuanto más oscuras son las áreas, más alto es el nivel de exposición al VHA. (B) Nivel de susceptibilidad estimado en adultos: cuanto más oscuras son las áreas, más susceptible es la población de adultos a una infección por el VHA. Imagen extraída de WHO/IVB/10.01, 2010.

En cuanto a los modos de transmisión del VHA, la fuente de infección más comúnmente reportada es la persona-persona, es decir, entre integrantes de una familia u otros contactos cercanos con una persona infectada. Otras fuentes potenciales de infección incluyen a hombres homosexuales (MSM) con prácticas sexuales de riesgo, viajeros a países donde el VHA es endémico y usuarios de drogas. El consumo de agua y alimentos contaminados son fuentes menos frecuentes de infección, aunque han sido asociados con grandes brotes debido al consumo de mejillones, almejas, ostras crudas, bebidas con hielo picado, fresas, arándanos, frambuesas, lechuga contaminada, cebollas verdes y otros alimentos de ensalada [Nainan *et al.*,

2006]. En raras ocasiones, la infección por el VHA ha sido transmitida por transfusión de sangre o de productos sanguíneos [Lemon, 1994].

1.1.5 Vacunas anti-VHA

Todavía es una práctica en uso la administración de inmunoglobulinas en la prevención de la hepatitis A, particularmente cuando individuos han sido expuestos al VHA dentro de las 2 semanas previas [Martin & Lemon, 2006]. Sin embargo, su uso en profilaxis con pre-exposición ha sido suplantado en gran parte por vacunas inactivadas de hepatitis A suministradas en 2 o 3 dosis. Estas vacunas contienen partículas virales producidas en cultivo de células, purificadas, inactivadas con formalina y adsorbidas con un adyuvante de hidróxido de aluminio. Son altamente inmunogénicas y protegen contra la infección y la enfermedad a largo plazo, pero su coste es muy elevado debido a las dificultades de propagar el VHA en cultivo celular, por su baja tasa de replicación y traducción [Werzberger *et al.*, 1992; Innis *et al.*, 1994]. Esta protección está ampliamente relacionada con la inducción de altos títulos de anticuerpos específicos contra el VHA, y está dirigida contra todas las cepas del VHA, lo cual es consistente con la identificación de un único serotipo entre cepas humanas [Lemon *et al.*, 1997].

Actualmente existen en el mercado 4 vacunas de diferentes formulaciones, todas basadas en virus inactivados: HAVRIX[®] (GlaxoSmithKline) está basada en la cepa HM175 [Ashur *et al.*, 1999]; VAQTA[®] (Merck) en la cepa CR326 [Ashur *et al.*, 1999]; AVAXIM[®] (Aventis Pasteur) en la cepa GBM [Castillo de Febres *et al.*, 1999], y EPAXAL[®] (Berna Biotech.) en la cepa RG-SB incorporada en un virosoma formado por fosfolípidos y glicoproteínas del virus de la gripe [Ambrosch *et al.*, 1997]. Además, también existe la vacuna TWINRIX[®] (GlaxoSmithKline), la cual combina HAVRIX[®] y la vacuna de antígeno recombinante del virus de la hepatitis B. Es importante destacar que con todas las vacunas se ha observado una eficiencia de protección superior al 94% [Ambrosch *et al.*, 1997; Ashur *et al.*, 1999].

En el pasado, en países industrializados la vacuna contra la hepatitis A era recomendada para aquellas personas cuyo riesgo de adquirir dicha enfermedad era mayor, entre las cuales se incluía a las personas que viajaban

a sitios de alta endemicidad de hepatitis A, usuarios de drogas, MSM, y pacientes con trastornos del factor de coagulación, que recibían concentrados de ese factor [Martin & Lemon, 2006]. La inmunización también era recomendada para personas que tuvieran un riesgo elevado de desarrollar una enfermedad fulminante luego de haber sido infectados con el VHA, como por ejemplo, aquellas personas con infección crónica con el VHC. En los últimos años, siguiendo recomendaciones de una inmunización más amplia de niños en ciertas regiones de los Estados Unidos con una mayor incidencia global de hepatitis A, se detectó un descenso del 88% en los casos de hepatitis A reportados en esas regiones [Wasley *et al.*, 2005]. Similarmente en Israel, un país con endemicidad intermedia del VHA se vio que una política de inmunización universal en niños de toda la nación era médica y económicamente justificada. La incidencia de hepatitis A entre niños menores de 14 años descendió en un número superior al 95% luego de la introducción de la inmunización universal, e incluso las tasas de enfermedad en los ancianos, quienes son más propensos a padecer hepatitis severas o fulminantes, descendieron substancialmente [Dagan *et al.*, 2005]. Por otra parte en Catalunya, España, desde el año 1999 se ha implementado un programa de vacunación contra el VHA en preadolescentes de 12 años. Un estudio del *attack rate*, definido como el número de casos clínicos de hepatitis A cada 100000 habitantes o el número de casos clínicos en un grupo de edad específico cada 100000 habitantes de ese grupo, ha sido llevado a cabo desde los años 2004-2013. Los resultados de este estudio muestran que la efectividad de la campaña de vacunación fue buena, obteniendo un promedio de *attack rate* de 2.98 ± 1.61 , durante la década de estudio [D'Andrea *et al.*, 2015].

Por otra parte, análisis de coste-beneficio llevados a cabo por países con alta endemicidad como Tailandia, sugirieron que los beneficios de la inmunización no justifican los gastos incurridos [Teppakdee *et al.*, 2002]. Esto refleja ampliamente el alto costo de la vacuna. No obstante, cambios en la epidemiología de la hepatitis A podrían modificar la perspectiva futura de inmunización, en países donde las condiciones sanitarias están sufriendo rápidas mejoras.

En cuanto a la utilización de virus vivos, vacunas atenuadas anti-VHA han sido desarrolladas utilizando virus que habían sido adaptados a crecer en

cultivo celular. En las etapas tempranas de este proceso había gran entusiasmo por dichas vacunas, pero estas fueron pobremente inmunogénicas [Midthun *et al.*, 1991]. Sin embargo, una vacuna atenuada con virus vivos ha recibido un uso relativamente amplio en China y parece capaz de inducir niveles protectores de anticuerpos. Un estudio realizado en niños, sugirió que una simple dosis de esta vacuna era efectiva en aproximadamente un 95% en prevenir la manifestación de la enfermedad, pero era menos efectiva en prevenir la infección asintomática durante un brote de hepatitis A [Wang *et al.*, 2004]. Por tanto, mientras las vacunas atenuadas pueden tener algunas ventajas, las vacunas inactivadas constituyen la primera elección.

La opción de utilizar péptidos sintéticos en la fabricación de vacunas anti-VHA es compleja debido al carácter conformacional de la mayoría de los epítomos [D'Hondt, 1992]. No obstante, se han podido obtener péptidos sintéticos inmunogénicos de 2 epítomos continuos [Pintó *et al.*, 1998], que son capaces de inducir la síntesis de anticuerpos neutralizantes de la infectividad vírica *in vitro*, pero su eficacia *in vivo* no se ha comprobado.

Otra aproximación diferente es expresar las regiones codificantes de la cápside en sistemas de expresión heterólogos, ya sea en *Escherichia coli* [Powdrill & Johnston, 1991], o en baculovirus [Harmon *et al.*, 1988], pero se necesitan grandes cantidades de antígeno para producir una respuesta inmune leve. También se ha probado expresar cápsides vacías (*virus-like particles*, VLPs) en sistemas de expresión heterólogos como *Escherichia coli* [Sánchez *et al.*, 2003a], baculovirus [Rosen *et al.*, 1993] y mediante el uso de vectores derivados del virus vaccinia [Winokur *et al.*, 1991], pero la producción es baja en todos los casos. En el último caso, la mayoría de antígeno se produce en forma de pentámeros que no conservan las características inmunológicas de la cápside entera.

Teniendo en cuenta todas las aproximaciones realizadas y los resultados obtenidos, todo indicaría que el desarrollo futuro de una vacuna más económica pasa por la optimización de la producción de VLPs en sistemas de expresión heteróloga, o por un incremento de la producción del VHA en cultivo celular.

1.2 HEPATITIS A: EL VIRUS

1.2.1 Características generales

El VHA pertenece al género *Hepatitisvirus*, de la familia *Picornaviridae*, y del orden *Picornavirales*. Dicha familia comprende 12 géneros: *Aphthovirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Hepatitisvirus*, *Kobuvirus*, *Parechovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* y *Tremovirus* [Sanfaçon *et al.*, 2012], donde todos ellos tienen a los vertebrados como organismos hospedadores.

En la década temprana de los 80, el VHA fue provisionalmente clasificado como un enterovirus debido a que poseía características biofísicas y bioquímicas que lo asemejaban a ellos. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que el VHA poseía características particulares que lo distinguían del resto de los picornavirus, como veremos más adelante [Hollinger & Emerson, 2001]. Nuestro entendimiento del VHA se ha beneficiado de estudios realizados con el prototipo de picornavirus, el virus de la poliomielitis. Mucha de la información que conocemos sobre la partícula del VHA, la función de su genoma y sus medios de replicación se han obtenido indirectamente. En los últimos años ha aumentado el conocimiento de un número de características que son únicas de los hepatitisvirus, incluyendo importantes detalles sobre el procesamiento de la poliproteína viral, la morfogénesis del virión y las interacciones del virus con la célula hospedadora. Estos atributos únicos del VHA tienen probablemente particular relevancia en la patobiología del virus [Martin & Lemon, 2002].

El VHA es un virus que posee una cápside de estructura icosaédrica desnuda, es decir, carece de una envoltura lipídica y tiene una medida de entre 27 y 32 nanómetros (nm). Dicha cápside está formada por 60 copias idénticas de las proteínas víricas VP2, VP3 y VP1, y en su interior posee un genoma de ARN de cadena simple y de polaridad positiva, el cual presenta una longitud de aproximadamente 7.5 kilobases (kb), y un coeficiente de sedimentación 33S [Hollinger & Emerson, 2001]. Una de las principales características del VHA es la elevada resistencia que esta cápside le proporciona en condiciones extremas de pH y temperatura.

1.2.2 Organización genómica

Al igual que todos los picornavirus, el genoma puede ser definido en 3 regiones distintas (ver Figura 3). Por un lado, la región 5' no codificante (5'NCR), que representa aproximadamente el 10% del genoma, está formada por unos 700 nucleótidos (nts) y es la región más conservada del genoma. Esta región alberga a su vez un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) de tipo III, el cual es una estructura secundaria extensa, compleja y rica en pirimidinas, que es reconocido por los ribosomas y otros factores celulares para iniciar una traducción independiente de la proteína cap, a partir de uno de los 2 codones de inicio, normalmente el segundo [Tesar *et al.*, 1992]. Además, en el extremo 5' de esta región se encuentra covalentemente unida la proteína viral VPg.

Otra región es el único marco de lectura abierto que presenta y que codifica para una poliproteína de 2227 aminoácidos (aa) en el caso de la cepa HM175. Esta poliproteína va a sufrir sucesivos clivajes para dar lugar a las proteínas estructurales y no estructurales que forman parte de la partícula viral madura. Las proteínas estructurales de la cápside: VP1, VP2, VP3 y la pequeña VP4 (llamadas en conjunto segmento P1), se encuentran en el tercio amino-terminal (N-terminal). En el resto de la poliproteína se encuentran las proteínas no estructurales requeridas para la replicación del ARN del VHA: 2B, 2C, 3A y 3B (también conocida como VPg, que probablemente sirve como proteína cebadora para la síntesis de ARN), 3C^{pro} (una cisteín proteasa, responsable de la mayoría de los eventos de clivaje post traduccional dentro de la poliproteína), y 3D^{pol} (la ARN polimerasa-ARN dependiente propia del virus) (ver Figura 3) [Martin & Lemon, 2002].

Finalmente hay una región corta 3' no codificante (3' NCR), que tiene una longitud de 40 a 80 nts, que termina en una cola de poli-adeninas (cola poli-A), la cual se cree que está involucrada en la replicación y traducción del ARN (ver Figura 3). El rol de la región 3'NCR en la replicación del ARN no se conoce completamente, aunque podría tener un rol en incrementar la eficiencia de la replicación viral y en el tropismo celular [Bedard & Semler, 2004].

El procesamiento proteolítico de la poliproteína ocurre simultáneamente con la traducción y es llevado a cabo principalmente por la proteasa viral 3C^{pro}, como fue mencionado anteriormente. La síntesis del ARN resulta luego del

ensamblaje de un gran complejo de replicasa macromolecular, conteniendo las proteínas virales no estructurales que se extienden en el segmento 2B-3D^{pol}, y ocurre en las membranas que son tomadas para este propósito del retículo endoplasmático celular [Gosert *et al.*, 2000]. El primer evento de clivaje de la poliproteína ocurre en la unión 2A/2B, y difiere de otros picornavirus en que este clivaje es mediado por la proteasa 3C^{pro} [Martin *et al.*, 1995]. El precursor estructural resultante P1-2A es clivado por la proteasa viral para generar 2 precursores proteicos de la cápside: VP0 (VP4-VP2) y VP1-2A (también conocido como pX) [Anderson & Ross, 1990], así como también la proteína madura de la cápside VP3. VP1-2A es un intermediario estructural en la morfogénesis del virión [Cohen *et al.*, 2002]. El clivaje en la unión VP1-2A ocurre tarde en el proceso de la morfogénesis del virión y resulta de la acción de una proteasa celular desconocida [Graff *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1999], y durante el ensamblaje del virión VP0 es clivada en VP4 y VP2 [Anderson & Ross, 1990]. La replicación del ARN del VHA no se ve perjudicada por deleciones de la secuencia 2A. Por tanto, la proteína 2A no es requerida para la síntesis de ARN, lo cual es un aspecto de la biología del VHA muy diferente al de los otros miembros bien estudiados de la familia *Picornaviridae*, como poliovirus [Martin & Lemon, 2006]. A la inversa, la falta del 40% de la región N-terminal de la secuencia que codifica para la proteína 2A en el ARN del VHA, ocasiona que no sea capaz de producir partículas virales infecciosas, indicando un rol de la región 2A en el ensamblaje de la cápside. Esta deleción no permite el ensamblaje de precursores estructurales en pentámeros, que son importantes intermediarios en la morfogénesis de la cápside y que contienen 5 copias de cada uno de los precursores proteicos: VP4-VP2 (VP0), VP3 y VP1-2A [Cohen *et al.*, 2002].

La mayoría de los picornavirus tienen 4 polipéptidos en sus cápsides, incluyendo una pequeña proteína VP4 localizada en el extremo N-terminal de la poliproteína. La poliproteína del VHA posee aparentemente un segmento peptídico muy pequeño de VP4 en su extremo N-terminal, pero esta presunta VP4 no ha sido demostrada directamente en preparaciones de virus purificados. Además, mientras la miristilación de la región N-terminal de la proteína VP4 de otros picornavirus es importante para la morfogénesis del virión, la secuencia de VP4 del VHA carece de dicha señal similarmente

ubicada. El por qué el ensamblaje de la cápside del VHA es diferente al de otros picornavirus se desconoce; pero una posible hipótesis es que podría estar relacionado con el estilo de vida intrahepático único que posee el VHA [Cristina & Costa-Mattioli, 2007].

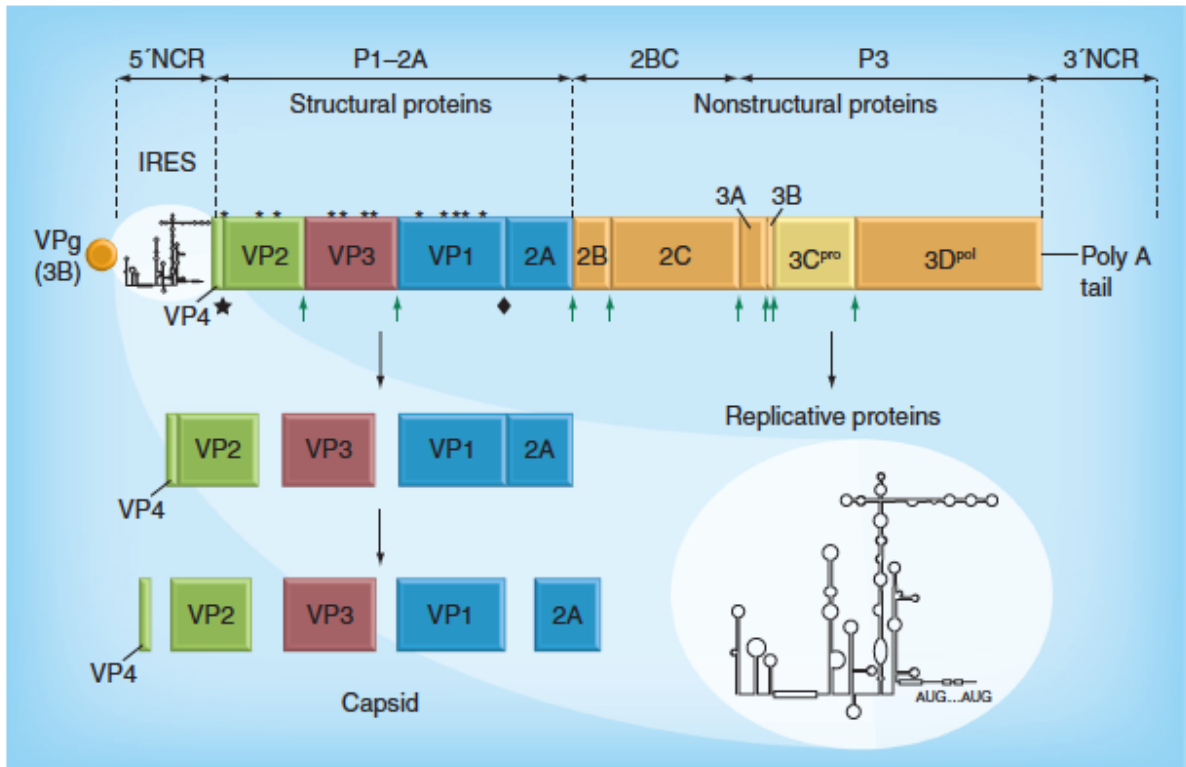


Figura 3. Esquema de la organización del genoma del VHA y los sitios en donde es clivada la poliproteína. Se observan las 3 regiones del genoma: la porción 5' no codificante (5'NCR), que alberga un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) y está unida covalentemente a la proteína VPg o 3B; el único marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína, la cual sufre sucesivos clivajes para dar lugar a las proteínas estructurales y no estructurales del VHA; y la región 3' no codificante (3'NCR), que posee una cola de poli adeninas (cola poli-A). Las flechas verdes indican los sitios de clivaje llevados a cabo por la proteasa viral (3C^{pro}); el diamante negro corresponde a un clivaje llevado a cabo por una proteasa celular, todavía no identificada; y la estrella negra representa una actividad proteolítica desconocida. Los asteriscos indican la ubicación de *clusters* de codones raros en la región codificante de la cápside, y se ha propuesto que tienen un rol esencial en el plegamiento de la cápside, controlando la velocidad de traducción.

Similar a lo que ocurre con otros miembros de la familia *Picornaviridae*, y con otros virus hepáticos, como puede ser el VHC, la región 5'NCR del ARN genómico alberga un IRES, el cual se encarga directamente de unir el ribosoma al ARN viral. Por tanto, la traducción ocurre de un modo cap-independiente [Weitz *et al.*, 1986; Glass *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1994]. En

una traducción mediada por IRES, están involucrados un subconjunto de factores de iniciación de la traducción, pero entre ellos no se encuentra la proteína de unión a cap, que es el factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E) [Belsham & Sonenberg, 2000]. Sin embargo, estudios realizados en los últimos años sugieren que el VHA a pesar de poseer un IRES, dependería del factor eIF4E, indicando que no es claro que el VHA sobrelleve un mecanismo de iniciación de la traducción como se ha descrito para otros virus de esta familia [Ali *et al.*, 2001; Borman *et al.*, 2001].

1.2.3 Estructura del virión

La cápside del VHA, de simetría icosaédrica, está formada por 60 copias idénticas de las proteínas VP2, VP3 y VP1 como fue mencionado anteriormente. La unidad básica de la cápside es el protómero, con un coeficiente de sedimentación 5S, el cual presenta una copia de cada una de las 3 proteínas (ver Figura 4A). Los protómeros se unen de 5 en 5 para dar lugar a los pentámeros, que presentan un coeficiente de sedimentación 14S y la unión de 12 pentámeros da lugar a la cápside vacía, con un coeficiente de sedimentación 70S. Finalmente, la cápside vacía incorpora el ácido nucleico y se convierte en un virus infeccioso, con un coeficiente de sedimentación 150S, una vez que se ha dado el clivaje de VP0 en VP2 y VP4 (ver Figura 4A).

Recientemente Feng & Lemon (2014), han observado que al propagar el VHA en células de hepatoma Huh-7 se producen 2 poblaciones de virus infecciosos que se diferencian según sus densidades en gradientes de iodixanol, pero ambas presentarían una infectividad equivalente. Por un lado, una población minoritaria que corresponde a las partículas víricas desnudas con una densidad de 1.22 g/cm^3 , y por otro lado, una población mayoritaria con una densidad inferior de 1.08 g/cm^3 , que posee cápsides envueltas en una única y amorfa bicapa lipídica. Muchas de estas estructuras tipo vesículas contienen 1 o 2 cápsides, pero algunas pueden llegar a contener hasta 4, sugiriendo que la membrana es adquirida luego del ensamblaje de la cápside. Las partículas con una menor densidad son resistentes a anticuerpos neutralizantes, lo cual es consistente con el hecho de estar completamente envueltos en membrana [Feng & Lemon, 2014].

La estructura tridimensional del VHA durante muchos años se ha basado en extrapolaciones de las informaciones obtenidos con las cristalizaciones de otros picornavirus, debido a que no se conseguía cristalizar el VHA. Recientemente, Wang y colaboradores (2015) han conseguido finalmente cristalizar la partícula del VHA, y han observado que la superficie externa de este virus es lisa y sin presencia de un cañón como sí se encuentra en otros picornavirus (ver Figura 4B). Las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 presentan una estructura conformada por 8 barriles β antiparalelos que se organizan en una cápside con número de triangulación de 3 ($T=3$) (ver Figura 4C), y abarcan el espesor de la cápside. Estos barriles β (clasificados de la B hasta la I) están conectados a través de *loops*, que son las regiones más superficiales de la cápside y contienen los sitios antigénicos [Wang *et al.*, 2015]. La partícula completa del VHA está bien ordenada; sin embargo, aunque la proteína VP4 está presente, no es visible. Las partículas del VHA vacía y completa son muy similares, donde las superficies externas son antigénicamente indistinguibles, hecho que fue confirmado utilizando 6 anticuerpos (Abs) diferentes.

También observaron que la superficie de la partícula está extraordinariamente cargada de forma negativa, y que tal vez la ausencia de un cañón hace que el VHA no posea un bolsillo hidrofóbico contiguo en los barriles β de la proteína VP1. Estos barriles β están comprimidos en comparación con los enterovirus y en el espacio que queda disponible se encuentran las cadenas hidrofóbicas, como ocurre en aftovirus y cardiovirus [Wang *et al.*, 2015].

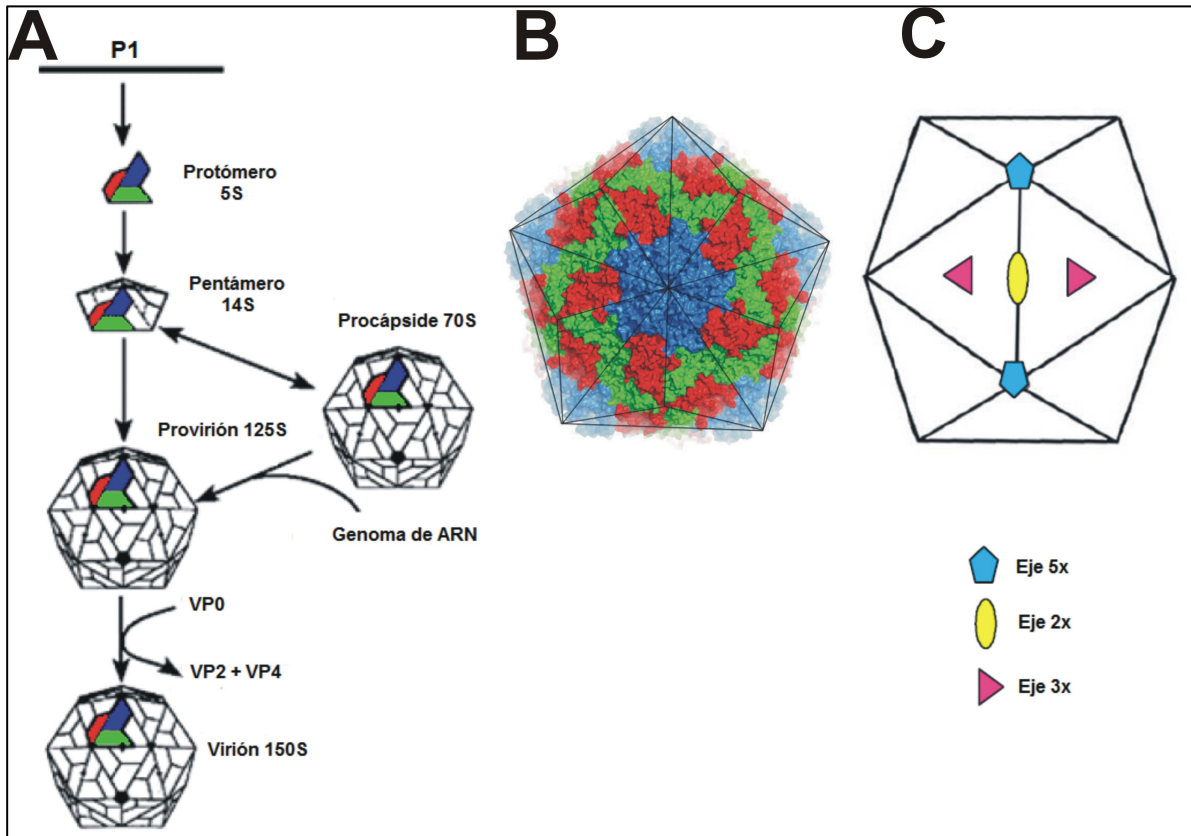


Figura 4. Estructura icosaédrica de la cápside del VHA. (A) Morfogénesis de la cápside vírica a partir de un protómero formado por una copia de cada una de las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3. Imagen adaptada de Racaniello, 2007. (B) Superficie accesible del VHA. Las líneas negras representan los diferentes lados del icosaedro. Imagen extraída de Wang *et al.*, 2015. (C) Representación esquemática de una partícula vírica con los diferentes ejes de simetría. En las imágenes A y B los colores azul, verde y rojo representan a las proteínas VP1, VP2 y VP3, respectivamente.

1.2.4 Diversidad Genética y Antigénica

La diversidad nucleotídica del VHA es similar a la encontrada en otros picornavirus [Sánchez *et al.*, 2003b], y permite una diferenciación en varios genotipos y subgenotipos. Los trabajos pioneros de variabilidad genética se basaron en el estudio de regiones discretas del genoma del VHA, como la región carboxilo terminal (C-terminal) de VP3 [Jansen *et al.*, 1990]; la región N-terminal de VP1 [Robertson *et al.*, 1991], y la región de la unión VP1-2A [Jansen *et al.*, 1990; Robertson *et al.*, 1992b]. Debido a que el VHA y poliovirus comparten algunas características genómicas, en un primer momento las diferentes cepas del VHA fueron agrupadas comparando la unión VP1-2A, usando el método de Rico-Hesse y colaboradores, un criterio utilizado en ese tiempo para la clasificación genética de cepas de poliovirus [Rico-Hesse *et al.*,

1987]. En 1992 usando esta aproximación, se llegó a la conclusión de la existencia de 7 genotipos del VHA (I-VII) [Robertson *et al.*, 1992b].

Posteriormente, en 2002 Costa-Mattioli y colaboradores realizaron estudios utilizando secuencias completas de la proteína VP1 (900 nts), que es la región más variable del VHA, como un método alternativo a la región VP1-2A (168 nts). Esta región fue elegida porque VP1 es la proteína más larga accesible en la superficie de la partícula madura de los picornavirus, y porque mutantes de escape del VHA obtenidos al multiplicar el virus en presencia de anticuerpos monoclonales (MAbs), permitieron observar que un determinado número de aa dentro de la proteína VP1 contribuyen al principal sitio inmunodominante del VHA. Además, estudios de evolución molecular han mostrado que la determinación de la secuencia completa de VP1 era requerida para la correcta caracterización de cepas de picornavirus de simio y humanos, y como la secuencia de VP1 de enterovirus correlaciona en cierta medida con el serotipo, la secuencia de VP1 podría ser utilizada como sustituto molecular para la tipificación antigénica [Costa-Mattioli *et al.*, 2003].

Los estudios utilizando la secuencia completa de VP1 revelaron la presencia de 5 grupos genéticos distintos, todos ellos con un fuerte apoyo estadístico debido a los elevados valores de *bootstrap*. Es importante destacar que en este estudio no se incluyó la cepa JM-55 (genotipo VI) y aquellas secuencias representantes del genotipo IIIb, porque en ese momento no se encontraban disponibles en una base de datos de secuencias de acceso público. Por tanto, una nueva clasificación de genotipos del VHA fue propuesta e incluía 6 genotipos diferentes (I a VI), cuya distancia genética entre ellos es superior al 15% [Costa-Mattioli *et al.*, 2003]. Un grado de relación genética superior al esperado se observó entre los previamente descritos genotipos II y VII [Costa-Mattioli *et al.*, 2002], sugiriendo que serían uno o dos sub-genotipos del mismo tipo. Un estudio posterior realizado por Lu y colaboradores, confirmaron la hipótesis de que los genotipos II y VII son 2 sub-genotipos del genotipo II [Lu *et al.*, 2004]. De esta forma, se concluye que el VHA posee 6 genotipos diferentes: 3 aislados en humanos (I a III) y 3 de origen simio (IV a VI). Los genotipos I y III son los más frecuentemente aislados a partir de humanos, y contienen sub-genotipos que son IA, IB y IC, en el caso del genotipo I, y IIIA y IIIB en el genotipo III, los cuales son definidos por una

divergencia nucleotídica del 7 a 7.5%. El genotipo II, también tiene sub-genotipos que son IIA y IIB. Los 3 genotipos de origen simio fueron definidos cada uno por una única secuencia nucleotídica de la región P1 del genoma, extraída de cepas aisladas de especies de monos del viejo mundo. Además, es importante destacar que todas las cepas de origen simio poseen una secuencia firma o característica en la región de unión VP3/VP1, la cual permite diferenciarlas de las cepas de origen humano [Cristina & Costa-Mattioli, 2007].

A pesar del grado de variabilidad nucleotídica que posee el VHA, la diversidad es limitada a nivel aminoacídico, y sólo pocas variantes antigénicas naturales han sido aisladas [Sánchez *et al.*, 2002; Pérez-Sautu *et al.*, 2011], sugiriendo que existen severas restricciones estructurales y biológicas en la cápside, que no permitirían la emergencia de nuevos serotipos. Estas restricciones podrían estar relacionadas con la elevada estabilidad de la cápside frente a condiciones extremas de pH, temperatura y desecación. La complejidad del ciclo biológico del virus explicaría la elevada resistencia del virus a una gran variedad de condiciones. Como consecuencia de esto, el VHA posee un único serotipo, lo cual representa una diferencia llamativa en comparación con otros picornavirus [Hollinger & Emerson, 2007]. Por tanto, una infección con el VHA va a proporcionar posiblemente una inmunidad de por vida, que protege contra una re-infección, e individuos infectados con el VHA en una parte del mundo van a estar protegidos contra una re-infección por dicho virus en otras regiones del mundo [Nainan *et al.*, 2006].

Estudios genéticos utilizando la secuencia completa de VP1 y secuencias de la cápside entera, han mostrado la ausencia de patrones de distribución intragénica de sustituciones sinónimas en la proteína VP1, sugiriendo que la divergencia de estas sustituciones podría ser al azar en el gen de VP1. No obstante, la distribución de sustituciones no sinónimas a lo largo de la proteína VP1 muestra una situación completamente diferente, con tasas extremadamente bajas de sustituciones en comparación con las sustituciones sinónimas [Cristina & Costa-Mattioli, 2007]. De esta forma, el patrón de divergencia observado en la región de VP1 del VHA es probablemente debido a fuerzas selectivas, que no permiten un reemplazo de aa, a pesar de las altas tasas relativas de sustituciones sinónimas observadas a lo largo de todo el gen. Esto contrasta con la situación encontrada en

miembros de la familia *Picornaviridae* que poseen múltiples serotipos, como por ejemplo el virus de la fiebre aftosa, que está sujeto a selección positiva [Haydon *et al.*, 2001]. Por lo tanto, el modo de evolución junto a las restricciones estructurales y biológicas del VHA también podría explicar en parte, la presencia de un único serotipo.

A través de los mutantes de escape a Abs y los ensayos de competencia entre los diferentes MAb para la neutralización del virus, se ha conseguido definir 3 epítomos antigénicos discontinuos. Uno de ellos es el epítomo inmunodominante, definido como tal porque se unen la mayoría de Abs. Los virus que pierden una parte o la totalidad del reconocimiento por los Abs dirigidos contra el epítomo inmunodominante muestran cambios en los aa Pro-65, Asp-70, Ser-71 o Gln-74 de VP3; o Ser-102, Asn-104, Lys-105, Val-171, Ala-176 o Gln-232 de VP1 [Nainan *et al.*, 1992; Ping & Lemon, 1992;], que en los modelos de estructura de la cápside quedan muy alejados entre sí (ver Figura 5), pero dada la alta conformacionalidad del epítomo estas regiones se influyen mutuamente a pesar de estar localizados distantemente [Nainan *et al.*, 2006].

Un segundo epítomo antigénico es el que coincide con el sitio de unión a la glicoforina A [Sánchez *et al.*, 2004], tal y como lo demuestra la competencia que se establece entre el MAb que reconoce este epítomo, el H7C27, y la glicoforina A por unirse al virus. Se han obtenido diferentes virus que pierden el reconocimiento por parte del MAb H7C27, uno con cambio en la Lys-221 de VP1 [Ping & Lemon, 1992], otro con cambio en la Gly-217 de VP1 [Aragonès *et al.*, 2008], y otro con cambio en la Ser-114 de VP1 [Cox *et al.*, 1991], teniendo este último mutante sólo una resistencia parcial al MAb.

Por último, está el tercer epítomo, al cual se une el MAb 4E7, y no se ha obtenido ningún mutante de escape, por tanto no se conoce la localización exacta de este epítomo [Ping & Lemon, 1992].

Por otra parte, además de las restricciones estructurales esperadas debido a los aa que tienen roles críticos en el plegamiento de la cápside, se ha sugerido también una cierta contribución del uso de codones a la baja variabilidad antigénica de la cápside del VHA. Aproximadamente un 15% de los residuos de la superficie de la cápside son codificados por codones raros. Estos codones raros son altamente conservados entre las diferentes cepas del

VHA y sus sustituciones son seleccionadas negativamente incluso bajo presión inmune específica [Aragonès *et al.*, 2008]. Muchos de estos residuos de la cápside codificados por codones raros expuestos en la superficie están localizados cerca o en regiones de los epítomos, y la selección negativa podría impedir la emergencia de variantes antigénicas. La necesidad de mantener los *clusters* de codones raros está relacionado con los requerimientos de un correcto plegamiento de la cápside, el cual es controlado a través de cinéticas de traducción, y es bastante improbable que una sustitución nucleotídica genere un nuevo codón de rareza similar y un aa compatible [Pintó *et al.*, 2007].

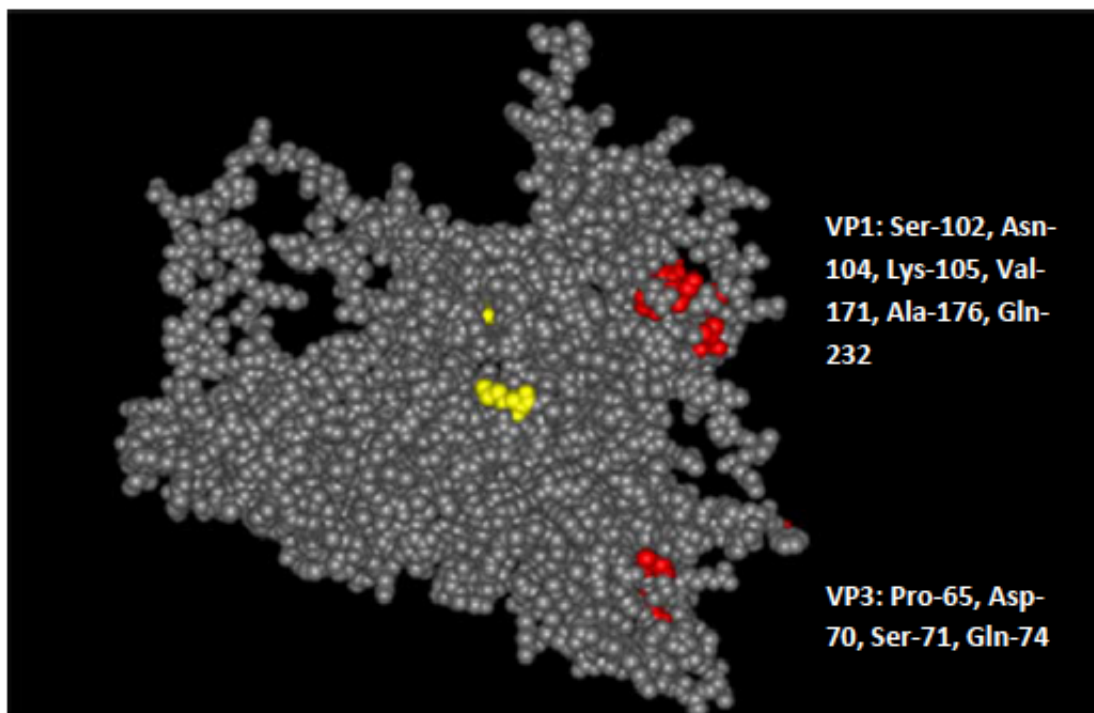


Figura 5. Representación de un modelo de protómero del VHA cedido por Ming Luo (Universidad de Alabama, Birmingham, Estados Unidos). Los residuos representados en rojo corresponden al epítipo inmunodominante, reconocido por los MAbs K24F2 y K34C8, y en amarillo los del epítipo al que se unen el MAb H7C27 y la glicoforina A.

1.2.5 Ciclo del VHA en el hospedador

Los únicos modelos animales disponibles para la replicación del VHA y la inducción de la enfermedad son los simios [Martin & Lemon, 2006]. En infecciones orales experimentales llevadas a cabo en monos, antígeno del VHA fue detectado tempranamente luego de una inoculación en células del

estómago, de los intestinos delgado y grueso y obviamente en el hígado, bilis y materia fecal; lo cual llevó a postular la existencia de un ciclo entero-hepático del virus [Cuthbert, 2001].

Este ciclo se compone de una ingesta inicial por vía oral del VHA, seguida por una absorción desde el estómago y/o intestino hacia el flujo sanguíneo, para finalmente llegar al órgano blanco o diana que es el hígado. Luego de la replicación en el hígado, el virus es liberado a través de los canalículos biliares hacia el intestino y luego sale al exterior del cuerpo por medio de la materia fecal; o alternativamente, el ciclo entero-hepático puede volver a repetirse. No obstante, el mecanismo exacto por el cual los virus ingresan al torrente sanguíneo, aún no ha sido completamente determinado.

Para llevar a cabo un ciclo infeccioso, el VHA tiene que superar ciertas condiciones poco favorables a lo largo de las diferentes etapas de su ciclo. Estas serían el pH ácido que se encuentra en el estómago y la acción de proteasas intestinales y detergentes (particularmente las sales biliares) durante la fase de entrada, su eliminación durante la fase de viremia, y de nuevo la acción de proteasas y detergentes durante la fase de salida del organismo hospedador. La presión selectiva ejercida por el pH, las proteasas y las sales biliares, trae como consecuencia la necesidad por parte del virus de tener una cápside altamente cohesiva y estable. A su vez, la replicación del VHA en hepatocitos polarizados, con diferentes membranas de entrada y de salida, donde se requiere de la conexión del flujo sanguíneo del ciclo entero-hepático para iniciar una infección en nuevas células, exige una cápside que sea capaz de escapar en la mayor medida posible de la depuración sanguínea por parte de los mecanismos propios del hospedador. De esta forma, la cápside del VHA ha evolucionado para evitar su interacción con la glicoforina A presente en la membrana de los eritrocitos, que podrían actuar eliminando el virus del torrente sanguíneo [Pintó *et al.*, 2012].

1.2.6 Ciclo celular del VHA

Las células diana para la replicación del VHA son los hepatocitos, aunque en las células de la cripta en el intestino y las células de Kupffer en el hígado, también se ha encontrado antígeno del VHA [Asher *et al.*, 1995].

Se han propuesto 2 mecanismos diferentes de entrada a la célula por parte del VHA para iniciar su ciclo celular. Por un lado está el receptor celular para el VHA 1 (HAVCR1), el cual pertenece a la familia de las inmunoglobulinas de células T (TIM), que se ha visto que funciona como receptor del VHA [Kaplan *et al.*, 1996]. Por otra parte, está el receptor de asialoglicoproteína, el cual une e internaliza moléculas de IgA, y se ha propuesto como receptor de complejos infecciosos del VHA recubiertos de IgA [Dotzauer *et al.*, 2000]. Asimismo, la cadena IgA λ es un ligando específico de HAVCR1, y la unión de la cadena IgA λ del complejo VHA-IgA tiene un efecto sinérgico en la interacción con el receptor del VHA [Tami *et al.*, 2007]. Por lo tanto, las partículas del VHA libres pueden utilizar el receptor HAVCR1, y las partículas del VHA en la forma de complejo con IgA, pueden utilizar tanto HAVCR1 como el receptor de asialoglicoproteína, demostrando la necesidad de los virus de adaptarse lo más posible a diferentes circunstancias.

Por otra parte, recientemente Feng y colaboradores (2014), han propuesto un modelo de entrada a las células para las partículas del VHA envueltas (VHAe), o más correctamente denominadas cuasi-envueltas ya que carecen de glicoproteínas codificadas por el virus incrustadas en la membrana celular o envuelta. Este modelo consiste en la entrada a la célula del VHAe a través de una vía endocítica, que luego se convierte en endosomas acidificados tardíos o lisosomas. Posteriormente, las membranas de las envueltas van a ser degradadas dentro del ambiente ácido de los lisosomas a través de una serie de procesos muy sofisticados, donde varias enzimas lisosomales pueden contribuir a este proceso degradativo. Una vez degradadas las membranas de las envueltas, la cápside del VHA es muy estable y puede tener acceso e interactuar con su receptor TIM-1 presente en las membranas lisosomales. Por tanto, esto podría iniciar entonces el proceso de desencapsidación, que conduciría a la liberación del ARN del VHA en el citoplasma [Feng *et al.*, 2014].

El esquema general del ciclo replicativo del VHA es muy similar al del resto de los picornavirus [Racaniello, 2007] (ver Figura 6).

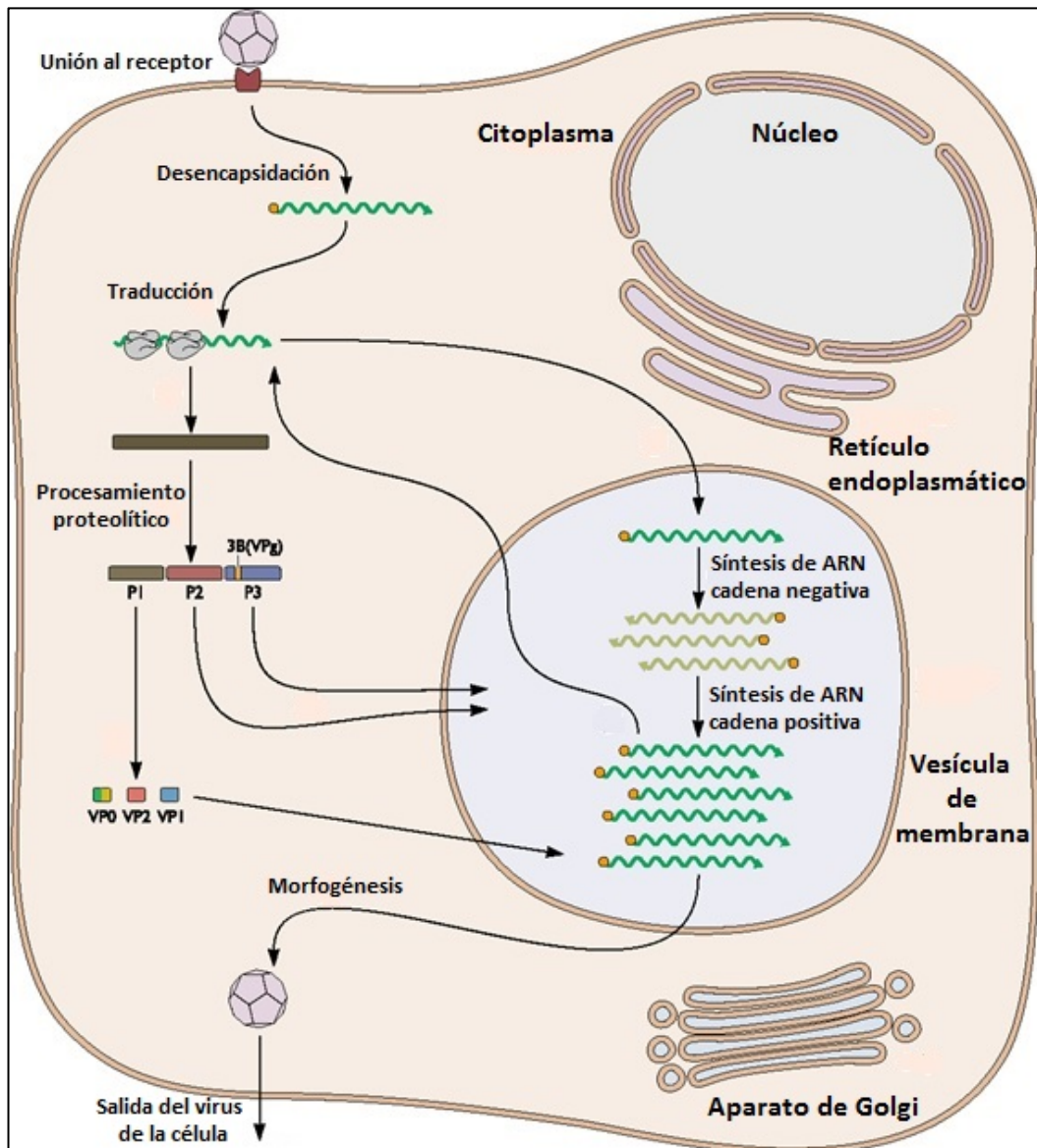


Figura 6. Esquema del ciclo replicativo celular del VHA. Imagen adaptada de Hollinger & Emerson, 2007.

Luego de la interacción con él o los receptores, se produce la desencapsidación del genoma viral, un ARN de cadena simple de polaridad positiva que se encontraba contenido dentro de la cápside. Este proceso es extremadamente lento en el VHA, con tiempos de varias horas comparado con los aproximadamente 30 minutos en la mayoría de los picornavirus [Bishop & Anderson, 2000; Costafreda *et al.*, 2014]. Una vez que el ARN se encuentra en el citoplasma, se lleva a cabo la traducción del genoma viral de una forma independiente de cap, y a través de un IRES que se encuentra dentro de la región 5'NCR. La poliproteína resultante de la traducción del genoma viral es co- y post-traduccionalmente procesada principalmente por la proteasa viral, tal

y como fue explicado en apartados anteriores. La ARN polimerasa-ARN dependiente recién producida, así como varias proteínas que interactúan con membranas, se van a ensamblar con el extremo 3' del ARN genómico, para comenzar la síntesis de una copia del genoma viral de polaridad negativa. Esta copia de polaridad negativa va a ser usada como molde para la síntesis de múltiples copias nuevas de ARN genómico de polaridad positiva, las cuales a su vez van a ser utilizadas para la síntesis de más ARN o traducidas en nuevas proteínas, y así sucesivamente. Luego del ensamblaje de las proteínas estructurales para formar la cápside, las moléculas de ARN de polaridad positiva son empaquetadas y los nuevos viriones sintetizados van a ser secretados a través de la membrana apical del hepatocito hacia los canaliculos biliares, desde los cuales pasan a la bilis y al intestino delgado [Pintó *et al.*, 2012].

1.2.7 Modo de Evolución

Los virus de ARN explotan todos los mecanismos conocidos de variabilidad genética para asegurar su supervivencia [Domingo & Holland, 1997], incluido la mutación, la recombinación genética, y el reordenamiento de segmentos de genoma, siendo este último en el caso de los virus segmentados.

Todos estos mecanismos son dependientes de la existencia de replicación, y teniendo en cuenta que las poblaciones de virus replican a tasas extremadamente elevadas, estas poblaciones pueden llegar a ser muy variables. Además, la ausencia de una actividad correctora de errores en las ARN polimerasas-ARN dependientes de los virus de ARN, trae como consecuencia la existencia de complejas poblaciones de genomas mutantes o cuasiespecies [Domingo *et al.*, 2006].

Por lo tanto, como otros virus de ARN, el VHA existe *in vivo* como distribuciones dinámicas de variantes no idénticas pero cercanamente relacionadas, conocidas como cuasiespecies [Sánchez *et al.*, 2003c; Costa-Mattioli *et al.*, 2006]. La dinámica de cuasiespecies está caracterizada por la generación continua de variantes de genomas virales, donde existe competencia, cooperación e interferencia entre ellos, y posterior selección de él

o los mutantes más adaptados a un ambiente particular. La comprensión de los principios que le dan forma a la evolución de las cuasiespecies virales, se vuelve cada vez más importante para modelar la progresión de la enfermedad, y para designar estrategias preventivas y terapéuticas para el control de enfermedades virales [Domingo, 2005; Domingo *et al.*, 2005].

Con el tiempo, la evolución de los virus de ARN está condicionada por perturbaciones del equilibrio poblacional, los cuales pueden no ser iguales entre diferentes individuos hospedadores. Por esta razón, múltiples sub-linajes virales que difieren en el número de rondas de replicación y en historias de perturbaciones ambientales, pueden establecerse rápidamente y co-circular en una misma área geográfica [Cristina & Costa-Mattioli, 2007]. La coexistencia de diferentes sub-poblaciones es consistente con la presencia de un espectro de mutantes en cada aislado del VHA [Sánchez *et al.*, 2003c], el cual provee un repertorio de variantes que mientras constituyen una minoría en un individuo infectado, pueden volverse dominantes cuando son transmitidas a otro individuo hospedador. Estos resultados se adaptan al esquema general de una dinámica de cuasiespecies [Domingo, 2005; Domingo *et al.*, 2005].

Las altas tasas de mutación y de replicación le permiten a los virus tener la capacidad de explorar rápidamente el espacio de secuencias, a una tasa que a veces hace que la evolución del ADN del organismo hospedador parezca estática en comparación con los virus [Worobey *et al.*, 1999].

Las primeras estimaciones de la tasa de mutación del VHA fueron realizadas por Sánchez y colaboradores, 2003c, quienes determinaron una tasa de 1×10^{-3} a 1×10^{-4} sustituciones totales por sitio. Estos valores son más bajos que los encontrados en otros miembros de la familia *Picornaviridae*, entre ellos el virus de la fiebre aftosa (FMDV, 2.7×10^{-2}) [Gurumurthy *et al.*, 2002]; poliovirus tipo 1 (3.36×10^{-2}) [Kew *et al.*, 1998]; y enterovirus 70 (2.2×10^{-2}) [Takeda *et al.*, 1994]. Luego, utilizando secuencias parciales del gen VP1, Hanada y colaboradores en el 2004 estimaron la tasa de sustituciones sinónimas del VHA en 1.30×10^{-3} sustituciones por sitio por año. No obstante, un estudio realizado con secuencias completas del gen VP1 de cepas del genotipo I, aisladas en Francia entre los años 1984 a 2001 y con un origen monofilético, registró una tasa de 4×10^{-3} sustituciones sinónimas por sitio por año, mediante

la utilización de una aproximación bayesiana basada en el empleo de cadenas de Markov y Monte Carlo [Moratorio *et al.*, 2007].

No obstante, a pesar de la variabilidad nucleotídica encontrada en el VHA, la diversidad a nivel de aa es limitada, sugiriendo la existencia de fuertes limitaciones estructurales y biológicas en la cápside, que impedirían la emergencia de nuevos serotipos, existiendo así un único serotipo [Pintó *et al.*, 2012].

1.2.8 Características únicas del VHA

El VHA posee una serie de características únicas que lo diferencian del resto de los miembros de la familia *Picornaviridae*. En primer lugar, el VHA posee un IRES de tipo III en su extremo 5'NCR, el cual es una extensa estructura secundaria altamente compleja, que posee una eficiencia muy baja en dirigir la traducción, en comparación con los IRES tipo I y II de otros picornavirus [Brown *et al.*, 1994; Whetter *et al.*, 1994]. Por otra parte, el elemento de replicación que actúa en cis (CRE) del VHA se sitúa cerca del extremo 5' de la región que codifica para la polimerasa, a diferencia de otros picornavirus donde se sitúa en VP1, y además, tiene un tamaño mayor en comparación con los CRE de los otros miembros de la familia [Yang *et al.*, 2008].

Como se ha comentado en apartados previos, otra característica única a destacar de este virus es que posee un único serotipo [Hollinger & Emerson, 2007], a pesar de que presenta una variabilidad nucleotídica similar a la del resto de los picornavirus [Sánchez *et al.*, 2003b].

Otra diferencia es que el VHA codifica para una única proteasa, la 3C, mientras que otros picornavirus codifican para proteasas adicionales como la L proteasa en el género *Aphthovirus*, o la proteasa 2A en el género *Enterovirus*. Las proteasas L y 2A cuando están presentes cumplen un rol crucial en los primeros clivajes de la poliproteína viral, mientras que aquellos géneros que carecen de estas proteasas, como en *Hepatovirus* y *Paraechovirus*, la mayoría de los clivajes son llevados a cabo por la proteasa 3C. Sin embargo, algo más importante es que estas proteasas adicionales están involucradas en la inducción del *shut-off* o silenciamiento de la síntesis proteica celular [Leong *et*

al., 2002]. El mecanismo de traducción utilizado por los picornavirus, el cual es independiente de cap y dependiente de IRES, se vería beneficiado de la inhibición de la traducción celular dependiente de cap, ya que la maquinaria de traducción celular y los recursos serían utilizados casi exclusivamente para la producción de proteínas virales. Un evento que precede al *shut-off* de la síntesis proteica celular es el clivaje de un factor de iniciación de la traducción celular, el eIF4G, que forma parte del complejo eIF4F, y actúa como una especie de andamio que va a interactuar con otros factores de traducción para reclutar la subunidad menor del ribosoma. Existe evidencia de que las enzimas responsables de dicho clivaje son las proteasas 2A y L, presentes en determinados picornavirus, como fue mencionado anteriormente [Kuechler *et al.*, 2002]. De esta forma, una consecuencia de la carencia de alguna de estas actividades proteolíticas en el VHA, es la incapacidad de inducir *shut-off* celular, lo cual a su vez está directamente relacionado con el requerimiento del factor eIF4G intacto, es decir sin clivar, para la formación del complejo de iniciación de la traducción [Borman & Kean, 1997].

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, indicaría que el VHA debe competir de manera ineficiente con la célula por los recursos y la maquinaria traduccional de la misma, lo cual podría relacionarse con otra diferencia entre el VHA y otros picornavirus: su especial uso de codones. El VHA presenta un mayor sesgo en el uso de codones, entendiendo por sesgo a la preferencia de un codón sobre otro codón sinónimo, en comparación con otros miembros de la familia *Picornaviridae*. Dicho de otra forma, el VHA no usa los codones sinónimos al azar sino que usa unos de forma abundante y otros de forma rara [Sánchez *et al.*, 2003b]. Una observación importante a destacar es que el uso de codones del VHA ha evolucionado de manera natural para ser complementario, y en algunos casos incluso opuesto al de las células humanas: nunca adopta como codones abundantes aquellos que son altamente utilizados por la célula hospedadora. Este uso de codones altamente deoptimizado con respecto al de la célula hospedadora, que es único para el VHA, ha sido interpretado como una estrategia sutil para evitar en la medida de lo posible, la competencia por los ARN de transferencia (ARNt), en ausencia de un mecanismo preciso de inducción de *shut-off* de la síntesis proteica celular [Sánchez *et al.*, 2003b].

Una consecuencia de este alto y especial sesgo en el uso de codones es el incremento en el uso de codones raros por parte del VHA, que serían por un lado, aquellos que la célula no utiliza o utiliza en baja frecuencia, y por otro, codones raros por competencia, que son aquellos altamente utilizados por la célula. Este uso de codones podría contribuir a la lenta replicación, así como a la baja producción viral [Pintó *et al.*, 2007], ya que afectaría la tasa de tráfico de ribosomas en el ARN mensajero (ARNm), debido al mayor tiempo requerido para incorporar en el sitio A del ribosoma a aquellos ARNt que se unen a los codones raros. De esta forma, las acumulaciones de codones raros inducen paradas transitorias del complejo traduccional, mientras éste busca el ARNt apropiado, el cual se encuentra en bajas concentraciones dentro del *pool* de ARNt. A pesar de que estas pausas del ribosoma pueden tener algunos efectos negativos en la síntesis proteica, como la degradación de la cadena de ARN [Hoekema *et al.*, 1987]; la terminación prematura de la cadena polipeptídica que se está sintetizando [Parker, 1989]; o la incorporación de aa incorrectos [Parker, 1989]; también pueden tener la función de asegurar el correcto plegamiento de la proteína que se está sintetizando [Adzhubei *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2005].

El VHA utiliza un total de 27 codones raros, definidos según sus frecuencias, los cuales se encuentran repartidos entre 15 aa (ver Tabla 1). Teniendo en cuenta que el 15% de los residuos de la superficie de la cápside del VHA están codificados por codones raros, y que estos se encuentran en regiones altamente conservadas y situados estratégicamente en los extremos C-terminal de las proteínas estructurales [Sánchez *et al.*, 2003b], las paradas transitorias del complejo traduccional debidas a los codones raros, serían responsables de garantizar el correcto plegamiento de las proteínas estructurales del VHA. De hecho, mientras muchos picornavirus dependen de chaperonas para el plegamiento de la cápside, el VHA no dependería de ellas [Aragonès *et al.*, 2010]. De este modo, mantener los codones raros sería importante para asegurar el correcto plegamiento de las proteínas, y explicaría cómo el uso de codones deoptimizado podría contribuir a la baja variabilidad del VHA.

Estudios en los que se adaptaba al VHA a replicar en condiciones de silenciamiento celular o *shut-off* de la transcripción celular inducida

artificialmente con la droga Actinomicina D (AMD), que tiene un efecto sobre las ARN polimerasas-ADN dependientes de la célula, sin efecto aparente sobre las ARN polimerasas-ARN dependientes de los virus, permitió comprobar la importancia del papel de los codones en la región de la cápside [Aragonès *et al.*, 2010]. La caída del *fitness* que el virus experimenta al principio de ser cultivado en presencia de AMD, va seguida de la recuperación del *fitness* durante el proceso de adaptación, el cual se asocia a un cambio en el uso de codones de la región de la cápside, lo cual implica una re-deoptimización respecto al uso de codones de la célula [Aragonès *et al.*, 2010]. Este mecanismo de adaptación al *shut-off* celular artificial, demuestra que la cinética de traducción es la que determinaría el sesgo en el uso de codones del VHA en la región de la cápside, ya que es la correcta combinación de codones raros y frecuentes lo que permite un tráfico de ribosomas adecuado para el correcto plegamiento de las proteínas que se están sintetizando (ver Figura 7). Por el contrario, cambios en el uso de codones que generen cambios en el plegamiento de las proteínas de la cápside podrían ser seleccionados de forma negativa, lo cual explicaría la baja variabilidad antigénica del virus y la existencia de un único serotipo. De hecho, el análisis de cuasiespecies de poblaciones víricas obtenidas a partir de la cepa pHM175 43c del VHA bajo la presión selectiva de 2 MAbs diferentes, el K34C8 y el H7C27, demostraron que los aa de la cápside codificados por codones raros y próximos a los epítomos reconocidos por estos anticuerpos, eran prácticamente invariables [Aragonès *et al.*, 2008].

El correcto plegamiento de la cápside contribuye probablemente al fenotipo altamente resistente que posee el VHA a altas temperaturas, pH ácido y presencia de detergentes [Aragonès *et al.*, 2010]; así como también a su alta persistencia en el ambiente, que consecuentemente permite su transmisión a través de alimentos y agua de bebida [Reid & Robinson, 1987; Roseblum *et al.*, 1990; Bosch *et al.*, 1991; Dentinger *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2002]. De hecho, las poblaciones adaptadas a replicar en presencia de AMD, las cuales habían sufrido una re-deoptimización de su uso de codones, muestran un importante descenso en la resistencia a los factores mencionados anteriormente [Costafreda *et al.*, 2014].

Tabla 1. Porcentajes del uso de codones con respecto al codón sinónimo más abundante dentro de cada aminoácido, en el VHA y en la célula humana. En azul se muestran los codones que el VHA utiliza como raros. Tabla adaptada de Sánchez *et al.*, 2003b.

| Aminoácido | Codón | VHA | Célula humana |
|------------|-------|-----|---------------|
| ARG | AGA | 100 | 88 |
| | AGG | 29 | 98 |
| | CGC | 3 | 100 |
| | CGU | 4 | 42 |
| | CGA | 3 | 48 |
| | CGG | 1 | 92 |
| LEU | UUG | 100 | 26 |
| | UUA | 52 | 12 |
| | CUU | 46 | 25 |
| | CUG | 25 | 100 |
| | CUA | 9 | 15 |
| | CUC | 7 | 47 |
| SER | UCU | 100 | 71 |
| | UCA | 85 | 50 |
| | AGU | 32 | 50 |
| | UCC | 28 | 95 |
| | UCG | 5 | 22 |
| | AGC | 5 | 100 |
| THR | ACU | 100 | 55 |
| | ACA | 91 | 63 |
| | ACC | 18 | 100 |
| | ACG | 5 | 29 |
| PRO | CCU | 100 | 78 |
| | CCA | 90 | 73 |
| | CCC | 20 | 100 |
| | CCG | 2 | 33 |
| ALA | GCU | 100 | 67 |
| | GCA | 61 | 48 |
| | GCC | 31 | 100 |
| | GCG | 1 | 25 |
| GLY | GGA | 100 | 67 |
| | GGU | 58 | 44 |
| | GGG | 34 | 68 |
| | GGC | 28 | 100 |
| VAL | GUU | 100 | 34 |
| | GUG | 46 | 100 |
| | GUA | 18 | 19 |
| | GUC | 13 | 53 |
| LYS | AAA | 100 | 64 |
| | AAG | 59 | 100 |
| ASN | AAU | 100 | 73 |
| | AAC | 19 | 100 |
| GLN | CAA | 88 | 33 |
| | CAG | 100 | 100 |
| HIS | CAU | 100 | 65 |
| | CAC | 22 | 100 |
| GLU | GAA | 100 | 65 |
| | GAG | 77 | 100 |
| ASP | GAU | 100 | 75 |
| | GAC | 19 | 100 |
| TYR | UAU | 100 | 66 |
| | UAC | 27 | 100 |
| CYS | UGU | 100 | 68 |
| | UGC | 27 | 100 |
| PHE | UUU | 100 | 70 |
| | UUC | 27 | 100 |
| ILE | AUU | 100 | 61 |
| | AUA | 32 | 24 |
| | AUC | 16 | 100 |

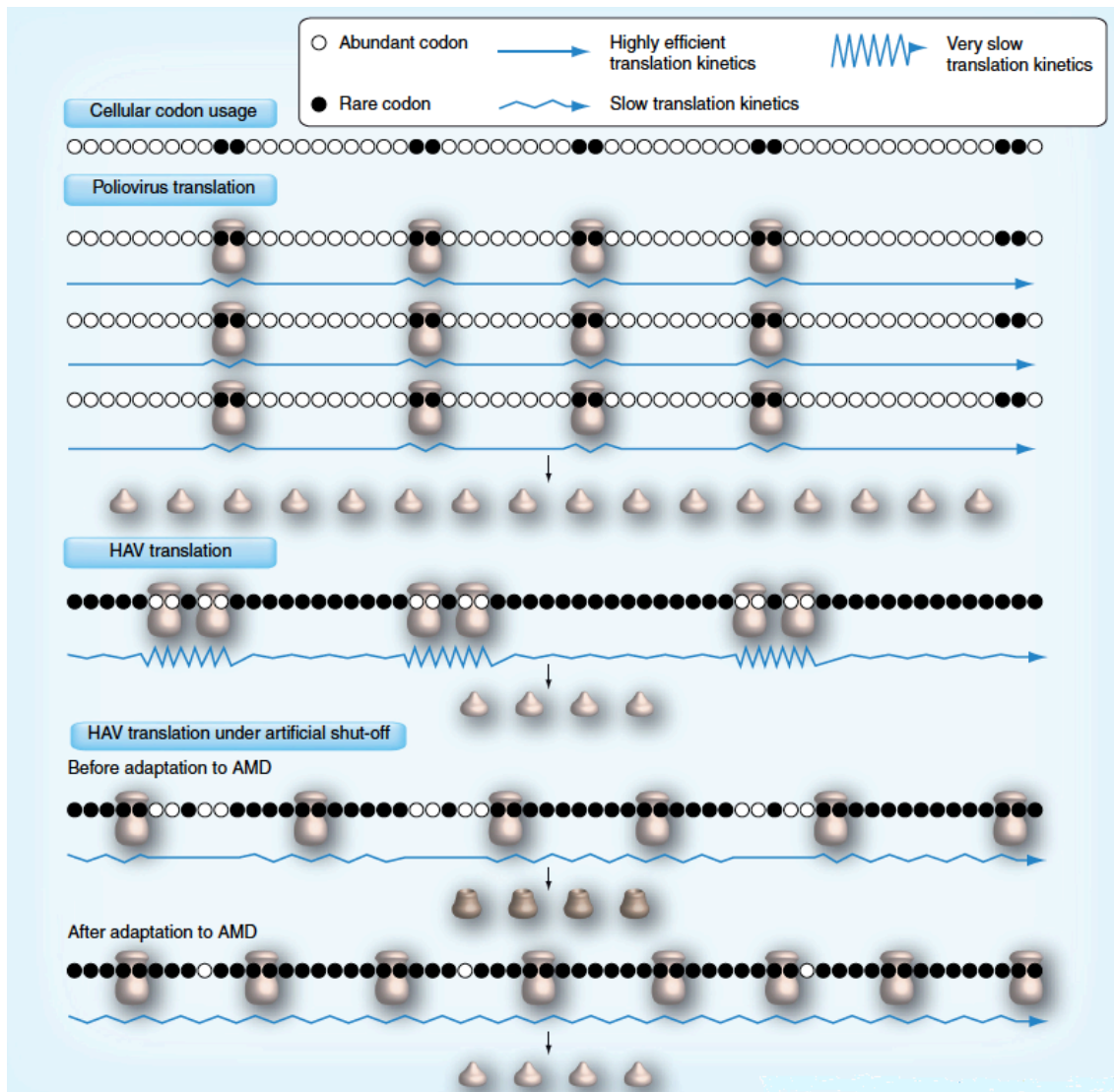


Figura 7. Combinación de codones raros y abundantes, o regulación fina de la cinética de traducción, para controlar el tráfico de los ribosomas y permitir así el correcto plegamiento de las proteínas de la cápside del VHA. Imagen extraída de Pintó *et al.*, 2012.

Finalmente, el uso de codones tan particular del VHA podría explicar el por qué este virus ha evolucionado para tener un IRES altamente ineficiente. Tener una maquinaria de traducción eficiente en el reclutamiento de ribosomas hacia el IRES, combinado con varias pausas de los ribosomas en la región codificante, no sería conveniente debido a que se secuestrarían muchos ribosomas en pocas moléculas de ARN. Sin embargo, la influencia directa de la combinación de codones abundantes y raros, en la velocidad de traducción del ARN en la región de la cápside del VHA no ha sido demostrada. Por tanto, en este trabajo se pretende estudiar *in vivo* el efecto del uso de codones en la

velocidad de traducción, en regiones de la cápside de diferentes poblaciones del VHA.

2. OBJETIVOS

(1) Estudiar el efecto del uso de codones en la velocidad de traducción en regiones de la secuencia codificante de la cápside, de cuatro poblaciones del Virus de la Hepatitis A adaptadas a replicar en diferentes condiciones de silenciamiento celular. Una de ellas adaptada a replicar en ausencia de silenciamiento, una a niveles moderados, una a niveles altos, y la última es una población de crecimiento rápido obtenida como resultado de un evento de *molecular breeding* y que está adaptada a replicar a niveles moderados de silenciamiento celular. Para ello se seguirán los siguientes pasos:

- Clonación de dos regiones de las proteínas VP1 y VP3 en vectores bicistrónicos que contienen el IRES del VHA, y obtención de las correspondientes cuasiespecies para cada población.
- Estudio de la cinética de traducción en las cuasiespecies a través de la medición de las actividades bioluminiscentes de los vectores bicistrónicos, conteniendo las regiones de VP1 y VP3.
- Ajuste de los datos obtenidos experimentalmente, con la composición de la cuasiespecie obtenida por técnicas de secuenciación masiva.

(2) Analizar si la presencia de tres mutaciones en el IRES del VHA, que se ha visto previamente que ocasionan un aumento en la actividad del mismo, modifican el efecto del uso de codones en la velocidad de traducción. Para ello se llevaran a cabo los pasos detallados a continuación:

- Incorporación de las tres mutaciones en el IRES de los vectores bicistrónicos con los diferentes haplotipos de las cuasiespecies de VP1 y VP3, obtenidos previamente para las cuatro poblaciones en estudio.
- Estudio de la cinética de traducción en las cuasiespecies a través de la medición de las actividades bioluminiscentes de los vectores bicistrónicos, conteniendo las regiones de VP1 y VP3, y las tres mutaciones en el IRES.

- Ajuste de los datos obtenidos experimentalmente con la composición de la cuasiespecie obtenida por técnicas de secuenciación masiva.

(3) Estudiar las características biológicas de una población de rápido crecimiento del VHA, en relación a su uso de codones mediante:

- El estudio de la velocidad de replicación realizando una curva *one-step growth* y el análisis del tamaño de las calvas.
- El reconocimiento de la cápside por diferentes anticuerpos monoclonales y determinación de la estructura antigénica.
- El análisis de las propiedades físicas de la cápside a través de la resistencia a altas temperaturas, pH ácido y sales biliares.
- El estudio del tiempo de desencapsidación y la eficiencia de unión al receptor.
- El cálculo de su infectividad específica.

**3. CAPÍTULO 1:
Efecto del uso de codones en la
velocidad de traducción en
regiones de la cápside de
poblaciones del virus de la
hepatitis A**

3.1 ANTECEDENTES

La degeneración o redundancia del código genético, en el cual la mayoría de los aa pueden ser traducidos por más de un codón, permite ajustar la eficiencia y precisión de la producción de una proteína a varios niveles, aún manteniendo la misma secuencia aminoacídica. Los codones que codifican para un mismo aa son denominados sinónimos, a pesar de que los ARNt que los reconocen pueden diferir en la concentración en la que se encuentran presentes en el citoplasma celular, y en consecuencia la velocidad a la cual van a ser reconocidos por los ribosomas [Gingold & Pilpel, 2011].

Las secuencias de nts alternativas debido a las diversas opciones de codones para una proteína particular, podrían dar lugar a transcritos con diferente estructura secundaria y estabilidad, que podrían afectar la traducción e incluso el plegamiento de la proteína [Gingold & Pilpel, 2011].

El número de secuencias nucleotídicas alternativas que pueden codificar para una misma proteína es astronómica. En el caso particular de la región de la poliproteína correspondiente a la cápside del VHA, la cual tiene una longitud de 791 aa, puede ser codificada por 3.8×10^{395} diferentes secuencias de ARN, todas ellas traduciendo exactamente la misma secuencia proteica. A su vez, el número de secuencias de ARN dentro de la “nube” de mutantes o cuasiespecie del VHA puede ser incluso más alto, ya que ciertas posiciones de aa permiten varias alternativas [Costafreda *et al.*, 2014]. La dinámica de cuasiespecie típica, con la generación continua de genomas virales, competencia, cooperación e interferencia entre ellos, y selección de él o los mutantes más adaptados a un ambiente particular, contribuyen a moldear dinámicamente el espacio de secuencias [Domingo *et al.*, 2005].

El uso de codones sinónimos no es al azar, y constituye un fenómeno altamente expandido y observado en genomas de muchas especies en todos los dominios de la vida, desde procariotas a eucariotas, donde los codones sinónimos no son igualmente utilizados en diferentes genomas, y a veces ni entre genes de un mismo genoma. Se ha propuesto que cada genoma tiene un uso de codones específico que refleja las fuerzas evolutivas particulares que actúan dentro de ese genoma y que contribuyen a reducir drásticamente el espacio de secuencias posible [Grantham *et al.*, 1980].

En el mundo de los virus, al menos 4 mecanismos serían los responsables del uso de codones particular o sesgo de codones existente: sesgo mutacional o la composición nucleotídica específica [Jenkins & Holmes, 2003]; selección traduccional o la óptima adaptación de los codones al *pool* de ARNt con el fin de obtener una mayor eficiencia y precisión de traducción [Cladel *et al.*, 2013]; la selección por una sintonización fina de la cinética de traducción, o lo que es lo mismo la correcta combinación de codones abundantes y raros para permitir una tasa de tráfico de ribosomas regulada, que separa temporalmente los eventos de plegamiento de la proteína, asegurando interacciones beneficiosas y evitando interacciones no deseadas dentro de la proteína en crecimiento [Aragonès *et al.*, 2010]; y por último, la selección de mecanismos de escape a las respuestas antivirales de la célula [Sugiyama *et al.*, 2005]. En referencia al último punto se ha propuesto que la célula podría detectar los dinucleótidos CpG en los genomas víricos por falta de metilación de C, a diferencia de los dinucleótidos propios, y así reconocerlos como extraños y desencadenar la respuesta inmunológica innata en la célula. Con la excepción del último mecanismo, el resto son compartidos en todos los organismos, y es muy probable que una combinación de todos ellos sea la fuerza evolutiva que da forma al uso de codones del VHA. Recientemente, Tulloch y colaboradores (2014) han propuesto que la atenuación de virus ARN por deoptimización del uso de codones [Coleman *et al.*, 2008; Wimmer *et al.*, 2009; Martrus *et al.*, 2013; Ni *et al.*, 2014], sería un artefacto, y en realidad sería el incremento en las frecuencias de los dinucleótidos CpG la base de la atenuación [Tulloch *et al.*, 2014]. Sin embargo, esto no se aplicaría para el VHA ya que este virus posee una muy baja frecuencia del dinucleótido CpG [D'Andrea *et al.*, 2011].

En otros miembros de la familia *Picornaviridae*, como los poliovirus y el virus de la fiebre aftosa, el uso de codones es similar al de sus hospedadores, lo cual implica que existe competencia por los ARNt entre los virus y el hospedador. Sin embargo, en estos casos la competencia es evitada por la inducción del *shut-off* de la síntesis proteica celular a través del clivaje del extremo C-terminal del factor eIF4G por parte de las proteasas 2A y L, respectivamente [Racaniello, 2007]. El factor eIF4G clivado es aún activo para la iniciación de la traducción IRES-dependiente de la mayoría de los

picornavirus, pero no para el VHA, ya que requiere del factor eIF4G intacto para poder iniciar la traducción, lo cual sería una posible explicación de por qué el *shut-off* de la síntesis proteica celular no se da en células infectadas con el VHA [Borman & Kean, 1997].

Una consecuencia inmediata de la incapacidad por parte del VHA de provocar un *shut-off* de la síntesis proteica celular, es que este virus debe competir ineficientemente con la célula por los recursos y maquinaria traduccional de la misma. El VHA presenta un uso de codones altamente sesgado (ver Tabla 2), en comparación con otros miembros de la familia *Picornaviridae*, el cual ha evolucionado de forma natural para ser deoptimizado con respecto a la célula hospedadora, y en muchos casos incluso opuesto [Pintó *et al.*, 2007]. Este uso de codones particular hace referencia a una adaptación a utilizar codones abundantes y raros, de modo que sean complementarios a los de las células humanas, y nunca adoptando como abundantes aquellos codones que son abundantes para la célula hospedadora, y en ciertos casos utilizar estos últimos como codones raros. Esta característica única del VHA, ha sido interpretada como una estrategia sutil para evitar en la medida de lo posible, la competencia por los ARNt celulares en la ausencia de un mecanismo preciso de inducción de *shut-off* de la síntesis proteica celular [Sánchez *et al.*, 2003b].

El Número Efectivo de Codones (Nc) [Wright, 1990], es uno de los mejores estimadores del sesgo en el uso de codones, y se usó para cuantificar el sesgo en el uso de codones del VHA. Este parámetro oscila entre un rango de 20 a 61, donde cuanto mayor es el sesgo en el uso de codones de un gen, más pequeño es el Nc. Por lo tanto, en un gen extremadamente sesgado, donde sólo un codón es utilizado para cada aa, este valor sería de 20; y en un gen en ausencia de sesgo sería de 61, y se considera que existe un sesgo significativo en el uso de codones cuando se tiene un valor de Nc inferior a 40. Para el caso del VHA se ha determinado que el Nc es de 38.9 (ver Tabla 2), lo cual revela que el marco de lectura abierto del VHA está sesgado [Jenkins & Holmes, 2003; Sánchez *et al.*, 2003b; D'Andrea *et al.*, 2011].

En la Tabla 2 se pueden ver valores de Nc para diferentes virus ARN que son genética y ecológicamente muy diversos, donde se puede observar claramente que el VHA es el que posee el mayor sesgo en su uso de codones,

seguido por el virus de la rubeola y los rotavirus. El resto poseen valores de Nc claramente superiores, considerándose que hay ausencia de sesgo. Asimismo, se puede observar que los virus de ARN segmentados (como los rotavirus), tienen un mayor sesgo en comparación con los virus de ARN no segmentados, ya que uno de los efectos del reordenamiento es incrementar el sesgo en el uso de codones en segmentos determinados, facilitando así la acción de la selección natural [Jenkins & Holmes, 2003]. Por otra parte, es interesante ver que los virus de ARN transmitidos por vectores (como los virus Dengue, West Nile y encefalitis japonesa) tienen un menor sesgo que otros virus de ARN. Una posible explicación a esto sería que un bajo sesgo en el uso de codones resultaría ventajoso para los virus que necesitan replicar eficientemente en células de insecto y de vertebrado, que son dos tipos celulares muy diferentes con preferencias de codones potencialmente distintas [Jenkins & Holmes, 2003].

Tabla 2. Valores del Número Efectivo de Codones (Nc) de diferentes virus ARN. En negrita se observa el valor correspondiente al virus de la hepatitis A. Tabla adaptada de Pintó *et al.*, 2012.

| Virus | Nc |
|----------------------------------|-------------|
| Virus de la hepatitis A | 38.9 |
| Virus de la hepatitis E | 48.2 |
| Virus de la hepatitis C | 51.9 |
| Virus de la aftosa | 51.6 |
| Poliovirus tipo 3 | 54.2 |
| Coxsackievirus A9 | 55.6 |
| Enterovirus 71 | 56.6 |
| Rhinovirus tipo 89 | 45.9 |
| HIV Tipo 1 | 44 |
| Rotavirus | 40.3 |
| Virus de la rubeola | 39 |
| Virus Dengue | 50 |
| Virus de la influenza A | 52.4 |
| Astrovirus tipo 1 | 54.8 |
| Virus ébola | 55.3 |
| Virus West Nile | 53.8 |
| Virus de la encefalitis japonesa | 55.8 |

Además de tener un sesgo significativo en el uso de codones, el VHA posee un sesgo muy importante a nivel de dinucleótidos, como lo es un contenido extremadamente bajo de CpG. Estos sesgos obviamente son propios de sus restricciones composicionales [D'Andrea *et al.*, 2011], pero probablemente no de forma exclusiva. Análisis comparativos de la relación entre el Nc y el contenido de G+C en la tercera posición del genoma del VHA y otros picornavirus, virus ARN de hepatitis, y otros virus de ARN (ver Figura 8), permitió concluir que la distancia a la curva teórica (donde las limitaciones composicionales son las fuerzas exclusivas que actúan sobre el uso de codones) del VHA es la más alta entre todos los virus analizados. Esto indicaría que aunque las limitaciones composicionales cumplen un rol importante en modular el uso de codones, otras fuerzas podrían también estar involucradas [Pintó *et al.*, 2012]. El porcentaje de desviación de la curva teórica por parte del VHA es 17.2%, y solo el virus de la hepatitis E muestra un grado de desviación similar (16.7%), y es seguido luego por el HIV (16%), virus Dengue (15%), el virus de la fiebre amarilla (12%), los virus de la rabia y West Nile (11%) y poliovirus (10%). Siendo el promedio de la desviación del resto de los virus en el rango del 2 a 9% (ver Figura 8). Es difícil de definir qué tan significativas son las desviaciones de la curva teórica. Sin embargo, entre los virus con mayores desviaciones, se ha visto que la sintonización fina de la cinética de traducción y la selección traduccional, contribuyen a delinear el uso de codones en el VHA [Aragonès *et al.*, 2010] y el HIV [van Weringh *et al.*, 2011], respectivamente.

Por otra parte, también está el parámetro denominado Índice Relativo de Deoptimización de Codones (RCDI), el cual mide la adaptación del uso de codones del virus con el de la célula hospedadora. Un valor de RCDI de 1 indica que el virus sigue el uso de codones de la célula hospedadora, mientras que cuanto mayor es el valor, mayor es la desviación con respecto a la célula hospedadora. Para el VHA, el valor de RCDI es aproximadamente 1.70, lo cual pone en evidencia que este virus posee un uso de codones altamente deoptimizado en comparación con otros picornavirus, cuyos valores de RCDI están dentro del rango 1.14 a 1.39 [Aragonès *et al.*, 2010].

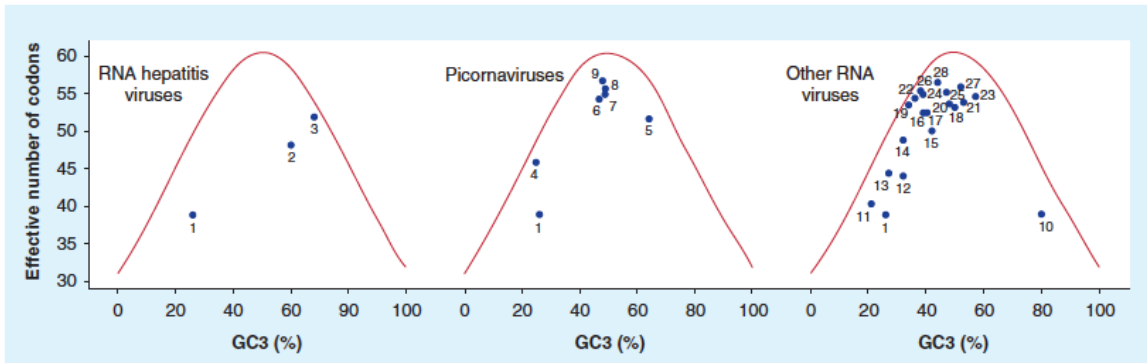


Figura 8. Influencia de las limitaciones composicionales en el sesgo del uso de codones del VHA y otros virus de ARN. *Virus ARN de hepatitis*, 1: VHA, 2: virus de la hepatitis E, 3: VHC. *Picornavirus*, 4: rinovirus, 5: virus de la fiebre aftosa, 6: poliovirus, 7: virus de la encefalomiocarditis, 8: coxsackievirus A, 9: enterovirus 71. *Otros virus ARN*, 10: virus de la rubeola, 11: rotavirus, 12: HIV, 13: virus respiratorio sincitial, 14: hantavirus, 15: virus Dengue, 16: virus de la estomatitis vesicular, 17: virus de la influenza A, 18: virus de la fiebre amarilla, 19: virus Marburg, 20: virus de la rabia, 21: West Nile, 22: virus de las paperas, 23: virus de la encefalitis equina del oeste, 24: astrovirus, 25: virus del sarampión, 26: virus ébola, 27: virus de la encefalitis japonesa y 28: norovirus. Imagen extraída de Pintó *et al.*, 2012.

Los codones abundantes aparecen con ARNt muy abundantes, lo cual contribuye tanto a la eficiencia de traducción (son rápidamente traducidos) como a la precisión de la traducción (son codones de alta fidelidad). En contraste, los codones raros son traducidos muy lentamente y son de menor fidelidad debido a incorporaciones erróneas de aa causadas por los ARNt “*near cognate*” (aquellos ARNt que tienen al menos un desajuste con el codón que van a traducir), durante la larga búsqueda del ARNt correcto [Plant *et al.*, 2007; Gingold & Pilpel, 2011].

Las cepas del VHA que replican en cultivo celular lo hacen de forma muy lenta en contraste con otros miembros de la familia *Picornaviridae* (días en vez de horas), y producen poca cantidad de antígeno, lo cual trae como consecuencia que la obtención de antígeno del VHA sea un proceso con un costo elevado, tanto para la elaboración de vacunas como para la producción de *kits* de diagnóstico. Es importante destacar que el VHA posee un IRES altamente ineficiente para dirigir la traducción (se profundizará sobre este tema en el siguiente Capítulo), un uso de codones altamente deoptimizado con respecto a la célula hospedadora y es incapaz de producir un *shut-off* de la síntesis proteica de la célula hospedadora. Estas características del VHA contribuyen a la baja tasa de replicación y a la baja producción de antígeno viral.

Muchos laboratorios han estado trabajando en esta problemática, y más concretamente en nuestro laboratorio (Laboratorio de Virus Entéricos de la Universidad de Barcelona), hace 10 años que se viene trabajando para intentar conseguir una población del VHA que replique más rápido, con el objetivo de disminuir los costes para la obtención de antígeno.

En una primera instancia lo que se hizo fue obtener diferentes poblaciones del VHA, adaptadas a replicar en cultivo celular a diferentes niveles de *shut-off* de la transcripción celular. El *shut-off* de la transcripción era inducido artificialmente utilizando diferentes concentraciones de AMD. Esta droga es un polipéptido cíclico descubierto por Vining y Waksman, que se une al ADN e inhibe la síntesis de ARN. Es altamente tóxico para organismos superiores, y tiene la capacidad de inhibir fuertemente el crecimiento de tumores naturales y experimentales, así como también una variedad de bacterias Gram-positivas [Reich *et al.*, 1962].

En 1985, Sobell propuso un modelo en el cual la AMD se une a una conformación pre-desnaturalizada del ADN, llamada β -ADN, que se encuentra dentro del complejo transcripcional. Entonces, actúa inmovilizando el complejo, impidiendo así la elongación de las cadenas de ARN que se están sintetizando. La conformación β -ADN es un intermediario estructural metaestable y obligatorio en la desnaturalización del ADN [Sobell, 1985].

La inhibición de la síntesis del ARN celular por AMD en bacterias y células de mamíferos es completa (>99%) a altas concentraciones de esta droga (>0.5 $\mu\text{g/ml}$), incluyendo todas las fracciones de ARN celular (nuclear, ribosomal y ARN soluble). No obstante, se vio que el crecimiento de mengovirus y poliovirus, ambos virus de ARN, eran completamente resistentes a la AMD [Reich *et al.*, 1962].

La AMD induce una clara inhibición dosis-dependiente de la expresión génica de las células FRhK-4 (células embrionarias de riñón de mono Rhesus), que son las células que utilizamos en el laboratorio para cultivar el VHA, con una reducción del contenido de ARN citoplasmático total de alrededor del 40% y más del 80%, a concentraciones de 0.05 y 0.20 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Además, la expresión de los genes *house-keeping* HPRT-I y GAPDH fue también significativamente reducida en un 62% y 80%, respectivamente, a 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, y en un 97% y 94%, respectivamente, a 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD

[Aragonès *et al.*, 2010]. El *shut-off* celular inducido por la AMD en las células FRhK-4 resultó en una viabilidad celular del 100% y del 10% con 0.05 µg/ml y 0.20 µg/ml de AMD, respectivamente, luego de 4 días post-tratamiento; y alrededor del 75% y 0.25%, respectivamente, después de 7 días post-tratamiento. La adaptación del VHA a replicar en células FRhK-4 en presencia de 0.05 µg/ml y posteriormente en 0.20 µg/ml de la droga, se asoció a una pérdida de *fitness* (entendida como la producción de virus infecciosos) en los primeros pasajes, pero con los sucesivos pasajes se vio una recuperación del mismo. Por otra parte, poliovirus que posee un uso de codones altamente optimizado con respecto al de la célula hospedadora (RCDI=1.14), mostró una ganancia automática de *fitness* en presencia de 0.20 µg/ml de AMD. Estos resultados sugerirían que la lenta adaptación a la AMD por parte del VHA, podría estar influenciada por su uso de codones [Aragonès *et al.*, 2010].

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Línea celular

Los virus utilizados en este estudio replicaron en las células FRhK-4 (ATCC CRL 1688), que es una línea celular epiteloide y continua derivada de células embrionarias de riñón de mono Rhesus (*Macaca mulatta*).

La línea celular FRhK-4 se cultivaba a 37°C en Medio Esencial Mínimo (MEM) suplementado con un 15% de suero fetal bovino inactivado (SFBi), aminoácidos no esenciales (NEAA), antibióticos y soluciones tamponadoras. Estas células se cultivaban cada 7 días y con una relación de multiplicación o *split ratio* de 1:3, obteniendo una monocapa confluyente luego de la incubación durante 2 a 3 días a 37°C. El soporte físico utilizado para el crecimiento de las células eran normalmente frascos planos de poliestireno de 80 y 175 cm² de superficie (T-80 y T-175, respectivamente).

SOLUCIONES NECESARIAS:

MEM 15% SFBi:

SFBi.....15% (v/v)
L-Glutamina (400 mM).....4 mM
NEAA (100X).....1X
HEPES 1 M.....15 mM
Bicarbonato (7.5% (p/v)).....2% (v/v)
Penicilina/Estreptomicina.....100 U/ml/100 µg/ml
En MEM 1X con sales de Earle autoclavado 15 minutos.
Conservar a 4°C.
Suplementar en condiciones de esterilidad.

Tripsina-EDTA:

Tripsina.....0.25% (p/v)
EDTA.....0.5 mM
En PBS.
Esterilizar por filtración.
Conservar a -20°C.

PBS:

NaCl.....8 g/l
KCl.....0.20 g/l
Na₂HPO₄.....1.15 g/l
KH₂PO₄.....0.20 g/l

En agua Milli-Q, pH 7.2.

Esterilizar por autoclave 15 minutos.

Conservar a 4°C.

3.2.2 Poblaciones virales

En este estudio se ha utilizado la cepa citopatogénica pHM175 43c (cepa parental) del VHA (cuya secuencia está disponible bajo el número de acceso M59809, en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y algunas poblaciones obtenidas luego de replicar esta cepa en presencia de AMD (Sigma®). Estas poblaciones habían sido obtenidas a partir de pasajes seriados, en intervalos de 7 días en 0.0 µg/ml, 0.05 µg/ml y 0.20 µg/ml de AMD, y utilizando una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 1. En la Figura 9 se puede ver un esquema del flujo de trabajo que se realizó en nuestro laboratorio para obtener poblaciones del VHA adaptadas a diferentes niveles de silenciamiento de la transcripción celular, inducido artificialmente gracias a la acción de la AMD.

Por un lado tenemos a la población L0 que proviene como se mencionó anteriormente de la población pHM175 43c, la cual es la cepa salvaje del VHA adaptada a replicar en cultivo celular, después de 5 pasajes replicando en ausencia de AMD. Después tenemos una serie de poblaciones del VHA replicando a bajos niveles de silenciamiento de la transcripción celular añadiendo 0.05 µg/ml de AMD: F0.05NA (No Adaptada, 5 pasajes), F0.05A (Adaptada, 65 pasajes) y F0.05LA (Largamente Adaptada, 120 pasajes). También, luego de 85 pasajes en 0.05 µg/ml de AMD, se puso esa población nuevamente a multiplicar en ausencia de la droga (R0NA y R0A, No Adaptada 5 pasajes y Adaptada 20 pasajes, respectivamente).

Por otro lado, tenemos una población del VHA replicando a altos niveles de silenciamiento de la transcripción celular añadiendo 0.20 µg/ml de AMD, que fue obtenida dejándola replicar primero 65 pasajes en 0.05 µg/ml de AMD, y posteriormente en 0.20 µg/ml de AMD. De esta forma tenemos: F0.2NA (No Adaptada, 5 pasajes), F0.2A (Adaptada, 40 pasajes) y F0.2LA (Largamente

Adaptada, 70 pasajes). La población F0.2LA se la puso a replicar nuevamente en un ambiente de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD (R0.05NA y R0.05A, No Adaptada 5 pasajes y Adaptada 20 pasajes, respectivamente).

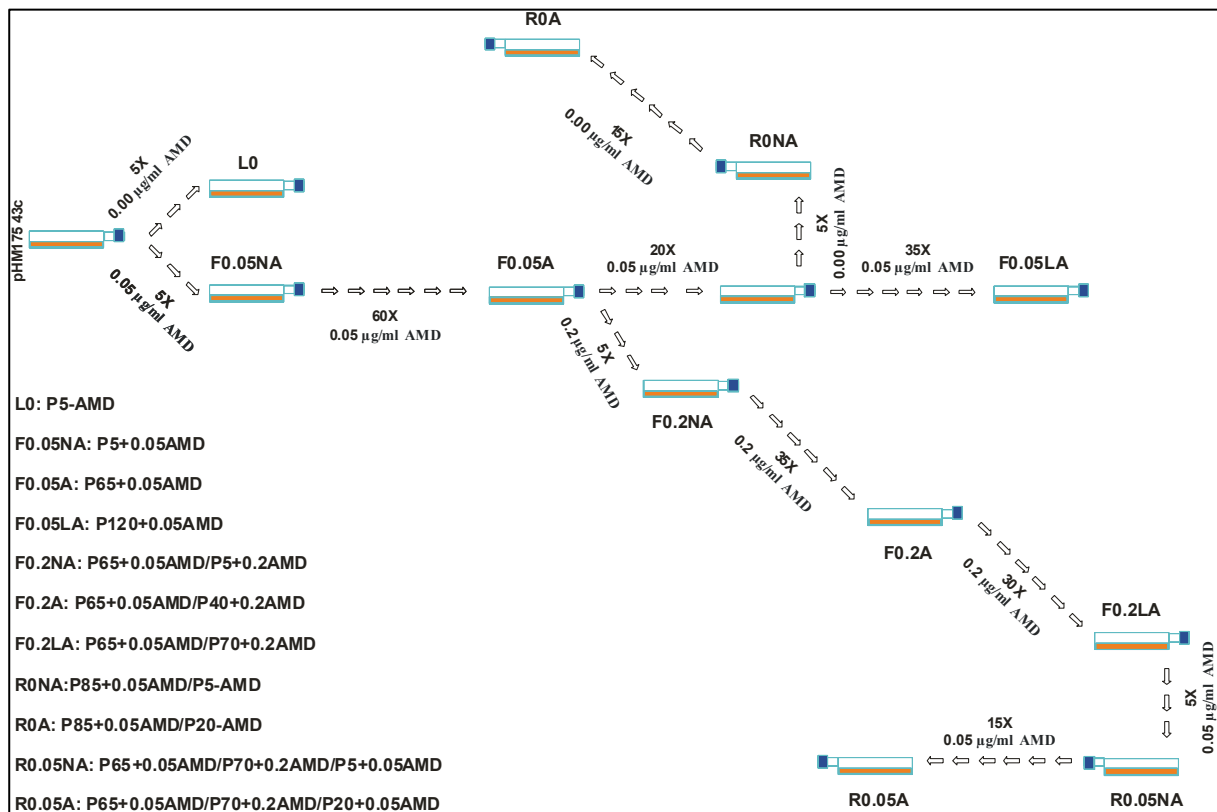


Figura 9. Esquema del flujo de trabajo realizado en el Laboratorio de Virus Entéricos, para la obtención de poblaciones del VHA adaptadas a diferentes niveles de silenciamiento celular. L0, es la población del VHA replicando en 0.0 $\mu\text{g/ml}$ de AMD; F0.05 y F0.2 son las poblaciones del VHA replicando en 0.05 y 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, respectivamente; donde NA, A y LA, corresponden a No Adaptada, Adaptada y Largamente Adaptada, respectivamente. R0 y R0.05 corresponden a las poblaciones del VHA puestas a replicar nuevamente en sus condiciones originales previas, nuevamente NA y A corresponden a No Adaptada y Adaptada, respectivamente. Imagen extraída de Costafreda *et al.*, 2014.

Finalmente, también se obtuvo una población de rápido crecimiento llamada HM175-HP, la cual es el resultado de un *molecular breeding* entre F0.05LA (120 pasajes en 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD) y F0.2LA (65 pasajes en 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD + 70 pasajes en 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD), en un ambiente con bajo silenciamiento de la transcripción celular (0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD). Estas poblaciones se pusieron a replicar en una proporción inicial de 1:1 y con una m.o.i. total de 2 (1 para cada población), y al cabo de 30 pasajes de dejar

replicando juntas a las 2 poblaciones parentales, se obtuvo la población HM175-HP.

En resumen, las 4 poblaciones que se utilizaron a lo largo de este estudio fueron:

- **L0:** pasaje 5 de la cepa pHM175 43c del VHA replicando en ausencia de AMD.
- **F0.05LA o población largamente adaptada a 0.05 µg/ml de AMD:** pasaje 120 de la población replicando en presencia de 0.05 µg/ml de AMD.
- **F0.2LA o población largamente adaptada a 0.20 µg/ml de AMD:** 65 pasajes replicando en 0.05 µg/ml + 70 pasajes replicando en 0.20 µg/ml de AMD.
- **HM175-HP o población de rápido crecimiento:** resultado del *molecular breeding* luego de 30 pasajes, donde se puso a replicar de forma conjunta a F0.05LA y F0.2LA en una proporción inicial de 1:1.

Los *stocks* víricos empleados en los experimentos se obtenían infectando con cada una de las poblaciones a estudiar, células FRhK-4 que formaban monocapas en frascos de cultivo T-25 cm². El protocolo que se seguía se detalla a continuación:

- Decantar el medio de crecimiento de los frascos de cultivo e infectar la monocapa con una m.o.i. de 1 virus infeccioso por cada célula.
- Incubar los frascos infectados a 37°C durante 60 minutos para permitir la adsorción del virus a las células.
- Incorporar el medio post-infección, de composición idéntica al medio de crecimiento pero con un 2% de SFBi, y la concentración correspondiente de AMD (0.00 µg/ml, 0.05 µg/ml y 0.20 µg/ml).
- Incubar a 37°C durante 7 días.
- Lisar las células mediante 3 ciclos de congelación (-80°C) / descongelación (37°C).
- Centrifugar el cultivo lisado a 4000 g durante 20 minutos para obtener una suspensión vírica libre de restos celulares.
- Guardar la suspensión vírica a -80°C, excepto las alícuotas en uso que

se guardaban a 4°C y -20°C.

3.2.3 Extracción de ARN de las cuatro poblaciones en estudio

A partir de los pasajes 5 de la población L0, 120 de la población F0.05LA, 70 de la población F0.2LA y 30 de la población HM175-HP, se llevó a cabo la extracción de los ARN correspondientes, utilizando el *kit NucleoSpin® RNA Virus* (Macherey-Nagel), siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- Tomar una alícuota de 150 µl de la suspensión vírica a la cual se va a extraer su ARN.
- Lisar los virus: añadir 600 µl de Buffer RAV1, provisto en el *kit* y conteniendo el *carrier* de ARN, a la alícuota de la suspensión vírica, mezclar bien e incubar a 70°C durante 5 minutos.
- Ajustar las condiciones de unión: añadir 600 µl de etanol (96 a 100%) a la solución de lisis y mezclar utilizando vórtex (10 a 15 segundos).
- Unión del ARN viral: colocar una columna *NucleoSpin® RNA Virus* (provisto en el *kit*) que posee una membrana de sílice, en un tubo colector de 2 ml (provisto en el *kit*) y cargar 700 µl de la muestra lisada. Centrifugar a 8000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Repetir el paso anterior con la solución de lisis restante. Descartar el tubo colector y colocar la columna en un nuevo tubo colector.
- Lavar y secar la membrana de sílice:
 - 1) Primer lavado: añadir 500 µl de Buffer RAW (provisto en el *kit*) en el interior de la columna. Centrifugar a 8000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Descartar el flujo recuperado en el tubo colector.
 - 2) Segundo lavado: añadir 600 µl de Buffer RAV3 (provisto en el *kit*) en el interior de la columna. Centrifugar a 8000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Descartar el flujo recuperado con el tubo colector.
 - 3) Tercer lavado: poner la columna en un nuevo tubo colector y añadir 200 µl de Buffer RAV3 en el interior de la misma. Centrifugar 11000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Descartar el flujo recuperado con el tubo colector.

- Eluir el ARN viral: poner la columna en un microtubo de centrifuga estéril de 1.5 ml y añadir 50 µl de agua libre de RNAsas (provista en el *kit*) precalentada a 70°C. Incubar 1 a 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 11000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Guardar el ARN a -80°C.

3.2.4 Amplificación por RT-PCR de dos fragmentos de las regiones de VP1 y VP3 de las cuatro poblaciones en estudio

Para llevar a cabo un estudio de la velocidad de traducción a nivel de cuasiespecie, se procedió a la amplificación de 2 regiones genómicas de la cápside del VHA en las 4 poblaciones en estudio. Se amplificó un fragmento de la región que codifica para la proteína estructural VP1, de 564 nts desde la posición 2392 a la 2955 según la secuencia del genoma de la cepa pHM175 43c, los cuales corresponden a los aa 68 a 255 de la proteína VP1 (63% de la longitud total de VP1). También se amplificó un fragmento de la región que codifica para la proteína estructural VP3, de 369 nts desde la posición 1453 a la 1821 en la secuencia del genoma de la cepa pHM175 43c, que corresponde a los aa 1 a 123 de la proteína VP3 (50% de la longitud total de VP3). En estas regiones se incluyen la mayoría de los epítomos descritos para el VHA, y en conjunto representarían un 41% de la región P1 del genoma del VHA.

3.2.4.1 Procedimiento de Transcripción Reversa

La Transcripción Reversa (RT) constó de varias etapas:

1) Preparación de la muestra: se realizó una dilución 1:10 de los ARN extraídos de las 4 poblaciones en estudio.

2) Se tomó 10 µl de cada uno de los ARN y se les añadieron los *primers* Rev VP1 KpnI y Rev VP3 KpnI (ver Tabla 3) en una concentración 0.5 micromolar (µM) para realizar la RT de VP1 y VP3, respectivamente.

3) Las mezclas ARN-*primer* se sometieron a 65°C durante 10 minutos en un termociclador *GeneAmp PCR system 2700*, de Applied Biosystems. También

se realizaron controles negativos utilizando 10 μl de agua destilada libre de DNasa/RNasa (Gibco[®], Life Technologies[™]) en lugar de ARN, y se los sometió al mismo tratamiento de temperatura que el resto de las muestras.

4) Se realizó una mezcla de reacción añadiendo los siguientes reactivos por muestra:

- 4.34 μl de agua destilada libre de DNasa/RNasa (Gibco[®], Life Technologies[™]).
- 5 μl de Buffer *Expand Reverse Transcriptase* 5X concentrado (Roche).
- 2.5 μl de DTT 100 milimolar (mM).
- 2.5 μl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's) en una concentración de 2 mM.
- 0.16 μl de la enzima ADN polimerasa ARN dependiente *Expand Reverse Transcriptase* (Roche), en una concentración de 50 unidades de enzima (U) / μl .

5) Se mezcló los μl de muestra-*primer* con la mezcla de reacción, obteniendo un volumen final de 25 μl .

6) Se incubó a 45°C durante 1 hora en el termociclador mencionado anteriormente.

Es importante destacar que ambos *primers* utilizados para hacer la RT llevan añadido en su extremo 5' el sitio de restricción para la enzima *KpnI*, el cual era necesario para clonar estos fragmentos en un vector bicistrónico.

3.2.4.2 Procedimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

La amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) constó de las siguientes etapas:

1) Se realizó la siguiente mezcla de reacción por cada muestra:

- 28.9 μl de agua destilada libre de DNasa/RNasa (Gibco[®], Life Technologies[™])

- 5 µl de Buffer con Sulfato de Magnesio (MgSO₄) 10X concentrado (Roche)
- 5 µl de dNTP's 2mM
- 0.5 µl de los *primers* Fwd VP1 CC 5'P y Rev VP1 KpnI (ver Tabla 3), para el fragmento de VP1; y los *primers* Fwd VP3 CC 5'P y Rev VP3 KpnI (ver Tabla 3), para el fragmento de VP3. Todos los *primers* estaban a una concentración de 100 µM.
- 0.1 µl de la ADN polimerasa *Pwo* (Roche) en una concentración de 5 U/µl

2) A la mezcla de reacción se le añadió 10 µl del ADN copia (ADNc) obtenido previamente por RT, consiguiendo así un volumen final de 50 µl.

3) El volumen final se incubó:

- 94°C durante 5 minutos (desnaturalización inicial)
- 40 ciclos de 94°C / 40 segundos, 60°C / 40 segundos y 72°C / 1 minuto para el fragmento de VP1 (desnaturalización, hibridación y extensión, respectivamente); y 40 ciclos de 94°C / 1 minuto, 60°C / 1 minuto y 72°C / 1 minuto para el fragmento de VP3 (desnaturalización, hibridación y extensión, respectivamente)
- 72°C durante 10 minutos (extensión final), en el termociclador *GeneAmp PCR system 2700*, de Applied Biosystems

4) Se guardaron los productos de PCR a 4°C.

Es importante resaltar que los *primers* Fwd o positivos para ambos fragmentos, poseen un fosfato unido en su extremos 5' para facilitar la clonación de éstos en vectores bicistrónicos. Es importante mencionar también que la ADN polimerasa *Pwo* posee una alta tasa de fidelidad.

3.2.5. Electroforesis en gel de agarosa y purificación de productos de PCR

Con el fin de observar si los productos obtenidos por PCR eran del tamaño deseado, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE. Se cargó en cada pocillo del gel 10 µl de producto de PCR + 2 µl de buffer de carga 6X (Thermo Scientific) compuesto de Tris-HCl, Azul de bromofenol, Xilencianol, Glicerol y EDTA. Además, en un pocillo se cargó como referente 4 µl del marcador de peso molecular *GeneRuler*[™] 50 bp (Thermo Scientific), que va desde 50 a 1000 pares de bases (pb). La corrida electroforética fue realizada durante 1 hora aproximadamente a 100 Voltios (V). Por último, el gel se tiñó durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente en una solución de Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml) y se observó sobre un Transiluminador con luz ultravioleta (UV) *Gel Doc*[™] *XR+* (Bio-Rad), obteniendo las imágenes correspondientes.

En todos los casos, tanto para el fragmento de VP1 como para el de VP3, en las electroforesis en gel de agarosa realizadas se vio la banda de tamaño esperado y ausencia de bandas inespecíficas, por lo tanto, se procedió a la purificación de las muestras directamente utilizando el *kit* comercial de purificación *High Pure PCR Product Purification* (Roche), siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- Ajustar el volumen resultante de cada PCR a 100 µl.
- Añadir 500 µl de Binding Buffer (provisto en el *kit*) al volumen ajustado previamente. Mezclar bien.
- Insertar un *High Pure Filter Tube* (provisto en el *kit*) en un tubo colector (provisto en el *kit*). Transferir la muestra preparada en el paso anterior al interior del *Filter Tube*. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descartar el flujo recolectado en el tubo colector, y añadir 500 µl de Wash Buffer (provisto en el *kit*) en el interior del *Filter Tube*. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descartar el flujo recolectado en el tubo colector, y añadir 200 µl de Wash Buffer en el interior del *Filter Tube*. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente.

- Insertar el *Filter Tube* en un microtubo de centrifuga estéril de 1.5 ml y añadir 50 a 100 µl de Elution Buffer (provisto en el *kit*) en el interior del *Filter Tube*. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente y recuperar el volumen del eluido.
- Guardar el producto purificado a 4°C.

SOLUCIÓN NECESARIA:

Buffer TBE 10X:

Tris-HCl.....108 g/l
 Ácido bórico.....55 g/l
 EDTA.....0.05 M
 En agua Milli-Q.
 pH 8.0.
 Esterilizar por autoclave 15 minutos.
 Conservar a temperatura ambiente.

3.2.6 Clonación de los fragmentos de VP1 y VP3 de cada una de las cuatro poblaciones en estudio en vectores bicistrónicos

Una vez obtenidos los amplicones purificados correspondientes a las regiones de VP1 y VP3 de las 4 poblaciones en estudio (L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP), se llevó a cabo una digestión de los mismos con la enzima de restricción *KpnI* a una concentración de 10 U/µl (Thermo Scientific), para obtener extremos cohesivos en el extremo 3' de los fragmentos y así permitir su clonación. El protocolo de la digestión con *KpnI* que se realizaba se detalla a continuación:

- 1) Realizar la siguiente mezcla de digestión por cada muestra:
 - 2.5 µl de Buffer *KpnI* 10X (Thermo Scientific)
 - 2 µl de enzima *KpnI* (10 U/µl) (Thermo Scientific)
 - ADN (producto de PCR) en una concentración de 0.5-1 µg
 - Agua destilada libre de DNasa/RNasa (Gibco®, Life Technologies™) hasta un volumen final de 25 µl.
- 2) Mezclar suavemente y realizar una centrifugación por 5 segundos.

3) Incubar a 37°C *overnight*.

Como fue mencionado anteriormente, el sitio de restricción para *KpnI* se había añadido en ambos *primers* Rev o negativos con este propósito. Luego de la digestión, se llevó a cabo la purificación de los fragmentos digeridos utilizando el *kit High Pure PCR Product Purification* (Roche) (ver apartado 3.2.5 del presente Capítulo).

Estos fragmentos digeridos fueron clonados de forma independiente en el vector bicistrónico G1RC de 7121 pb (ver Figura 10), el cual está basado en el vector pCRHAVL que fue gentilmente cedido por la Dra. Anne Marie Roque-Afonso (Villejuif, Francia). Este vector bicistrónico posee un sistema dual de luciferasas; es decir, posee un gen que codifica para la *Firefly luciferase (FLuc)*, que actúa como un gen reportero, y un gen que codifica para la *Renilla luciferase (RLuc)*, que actúa como un control interno. A su vez, el IRES del VHA de la cepa adaptada a cultivo se encuentra entre ambos genes. La transcripción está bajo el control del promotor de citomegalovirus y la traducción es cap-dependiente para *RLuc*, y dependiente del IRES del VHA para *FLuc* (ver Figura 10). Debido a que el mapa de restricción del vector bicistrónico G1RC que se mencionaba en la bibliografía no coincidía con los resultados obtenidos en algunas pruebas realizadas en el laboratorio, se procedió a la obtención del mapa de restricción completo de dicho vector. Se realizaron varios ciclos de amplificación por PCR y posterior secuenciación de los fragmentos amplificados, basándonos en un primer momento en la presencia de los genes *RLuc* y *FLuc* para el diseño de las primeras parejas de *primers*. También se tuvo en cuenta la secuencia del gen de resistencia a Ampicilina para diseñar *primers*. De esta manera, a medida que obteníamos secuencias nuevas se diseñaban nuevos *primers*, y así sucesivamente hasta que finalmente se obtuvo la secuencia completa del vector bicistrónico de 7121 pares de bases.

Una vez obtenido el mapa completo del vector de trabajo se procedió a la introducción consecutiva de 2 dianas de restricción mediante mutagénesis dirigida. Se diseñó un *primer* para modificar la secuencia del plásmido con el fin de introducir una diana para la enzima *MscI*, que deja extremos romos, y otro *primer* para la introducción de la diana de la enzima *KpnI* que deja extremos

cohesivos, para permitir la clonación de las regiones de VP1 y VP3 de las diferentes poblaciones en estudio. Se llevó a cabo una amplificación del vector completo utilizando *primers* solapantes, conteniendo la base mutada que iba a generar las dianas, y homólogos a cada una de las cadenas. Para la amplificación se utilizó una ADN polimerasa de alto procesamiento. Estas 2 nuevas dianas de restricción fueron introducidas entre las regiones correspondientes al IRES y a *FLuc*.

Para poder llevar a cabo la clonación de los fragmentos de VP1 y VP3 en el vector G1RC, se realizaron los siguientes pasos:

1) Se digirió el vector G1RC con la enzima de restricción *KpnI* a una concentración de 10 U/ μ l (Thermo Scientific), siguiendo un protocolo tal y como se detalló previamente en este apartado.

2) Se realizó la purificación del producto resultante de la digestión utilizando el *kit High Pure PCR Product Purification* (Roche) (ver apartado 3.2.5 del presente Capítulo).

3) Se digirió el vector G1RC (previamente digerido con la enzima *KpnI*) con la enzima *MscI* a una concentración de 5 U/ μ l (Thermo Scientific), siguiendo el protocolo de digestión que se detalla a continuación:

i) Realizar la siguiente mezcla de digestión por cada muestra:

- 2.5 μ l de Buffer *R* 10X (Thermo Scientific)
- 2 μ l de enzima *MscI* (5 U/ μ l) (Thermo Scientific)
- ADN (vector) en una concentración de 0.5-1 μ g
- Agua destilada libre de DNasa/RNasa (Gibco[®], Life Technologies[™]) hasta un volumen final de 25 μ l.

ii) Mezclar suavemente y realizar una centrifugación por 5 segundos.

iii) Incubar a 37°C *overnight*.

4) Se realizó la purificación del producto resultante de la digestión utilizando el *kit High Pure PCR Product Purification* (Roche) (ver apartado 3.2.5 del presente Capítulo).

5) Se hizo un tratamiento del vector resultante digerido con ambas enzimas, con la enzima Fosfatasa Alcalina (Thermo Scientific), para eliminar los 5' fosfatos y así disminuir la probabilidad de re-circulación del mismo sin incorporación del inserto, siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

i) Realizar la siguiente mezcla de reacción:

- 2.5 µl de Buffer 10X Thermo Scientific FastDigest Buffer (Thermo Scientific)
- 2 µl de enzima FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/µl) (Thermo Scientific)
- ADN (vector) en una concentración de 1 µg
- Agua destilada libre de DNasa/RNasa (Gibco®, Life Technologies™) hasta un volumen final de 25 µl.

ii) Mezclar suavemente y realizar una centrifugación por 5 segundos.

iii) Incubar a 37°C durante 20 minutos.

iv) Incubar a 75°C durante 5 minutos (inactivación).

6) Se realizó la reacción de ligación entre el vector G1RC y los fragmentos de VP1 y VP3, de forma independiente y para cada una de las 4 poblaciones en estudio. El protocolo de ligación se detalla a continuación:

i) Realizar la siguiente mezcla de reacción:

- Ajustar una relación 3:1 de inserto:vector en un volumen de 14 µl
- 2 µl de Buffer 10X T4 DNA Ligase (Thermo Scientific)
- 2 µl 50% PEG 4000 Solution (Thermo Scientific)
- 2 µl de enzima T4 DNA Ligase 5 U/µl (Thermo Scientific)

ii) Mezclar suavemente y realizar una centrifugación por 5 segundos.

iii) Incubar a temperatura ambiente *overnight*.

Tabla 3. *Primers* utilizados para hacer la RT-PCR de los fragmentos de VP1 y VP3; y los *primers* utilizados para secuenciar los vectores bicistrónicos con los fragmentos clonados. La región subrayada corresponde al sitio de restricción para *KpnI*.

| Primer | Secuencia |
|---------------------|--|
| Rev VP1 <i>KpnI</i> | 5' CCCGGTACCTGATTGTTCTGTGACAGACAAATAACAAC 3' |
| Rev VP3 <i>KpnI</i> | 5' CCCGGTACCGGGAAAAACTTGAAAATCAAAGAC 3' |
| Fwd VP1 CC 5'P | 5' CCTTTCCTGAATTGAAACCTGGAGAATCC 3' |
| Fwd VP3 CC 5'P | 5' CCATGATGAGAAATGAATTTAGGGTCAG 3' |
| 5NCR2+ | 5' AGGCTACGGGTGAAACCTCT 3' |
| FLuc- | 5' TAAAGCAATTGTTCCAGGAACC 3' |

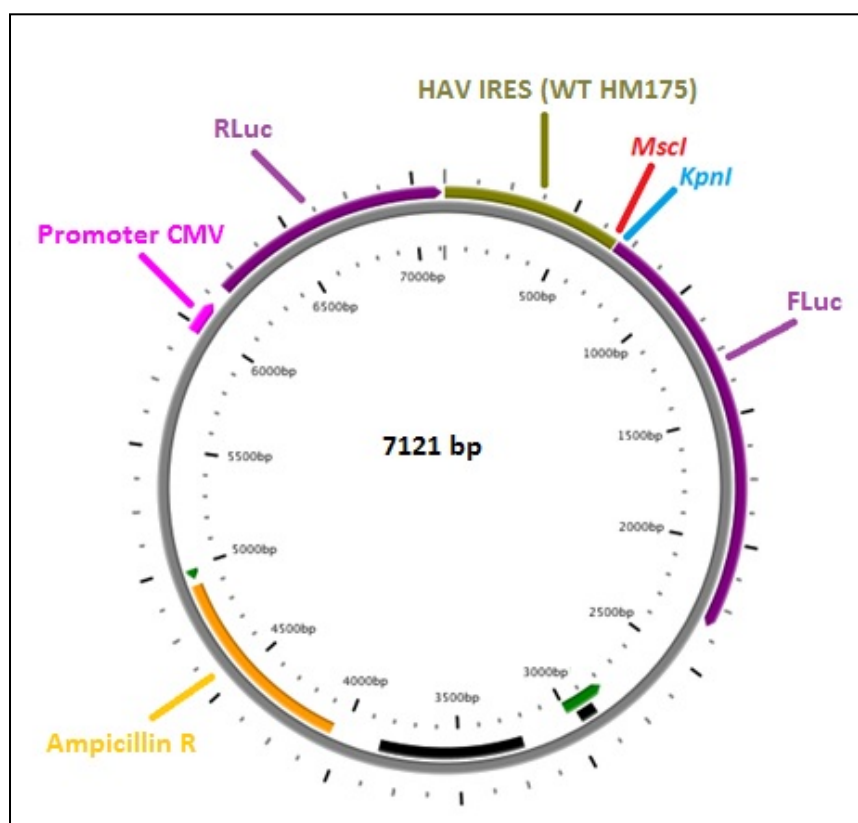


Figura 10. Esquema del vector bicistrónico G1RC utilizado para clonar los fragmentos de VP1 y VP3 de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP. *FLuc* es el gen que codifica para la *Firefly luciferase*, que actúa como reportero; *RLuc* es el gen que codifica para la *Renilla luciferase*, que actúa como control interno; *HAV IRES* es el IRES del VHA de la cepa *wild type* adaptada a cultivo; *promoter CMV* es el promotor de Citomegalovirus; *Ampicillin R* es un gen de resistencia a Ampicilina; *MscI* es el sitio de restricción para la enzima *MscI* que deja extremos romos; *KpnI* es el sitio de restricción para la enzima *KpnI* que deja extremos cohesivos.

3.2.7 Análisis de las cuasiespecies para cada uno de los fragmentos de VP1 y VP3 de cada una de las cuatro poblaciones en estudio

Los vectores bicistrónicos con los fragmentos de VP1 o de VP3 resultantes de las ligaciones, fueron dializados utilizando filtros de membrana de 0.025 micrómetros (μm) (Merck Millipore) durante 40 a 60 minutos, y con los productos resultantes de la diálisis se hicieron electroporaciones en células comerciales *MegaX DH10B™ T1^R Electrocomp™ Cells* (Invitrogen). El protocolo que se realizó para llevar a cabo las electroporaciones se detalla a continuación:

- Descongelar las células electrocompetentes *MegaX DH10B™ T1^R* (Invitrogen) en hielo.
- Poner en hielo durante 20 minutos cubetas de electroporación de 1 milímetro de ancho y de un volumen de 100 μl (Eppendorf).
- Poner en hielo durante 20 minutos las ligaciones dializadas.
- Mezclar 20 μl de células electrocompetentes + 10 μl de producto de ligación dializado.
- Introducir la mezcla de células electrocompetentes-ligación en la respectiva cubeta de electroporación, y dejar la cubeta en hielo.
- Poner a electroporar las células en un electroporador modelo 2510 de *Eppendorf* con un voltaje de 1800 V.
- Añadir 1 ml de medio de recuperación (Invitrogen).
- Pasar todo el contenido de la cubeta de electroporación a un tubo de 10 ml, y dejar en agitación a 37°C durante 60 minutos.
- Sembrar placas de Petri con medio LB agar y con 100 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina a razón de 100 μl de células electroporadas-medio de recuperación.
- Dejar las placas incubando a 37°C *overnight*.

Se seleccionaron colonias de cada uno de los fragmentos para cada una de las 4 poblaciones en estudio, con el fin de analizar la cuasiespecie a partir de unos 50 clones aproximadamente, y se las puso a crecer en medio LB

líquido a 37°C *overnight*. Seguidamente, se realizó la extracción plasmídica o *miniprep* de las colonias que se pusieron a crecer utilizando el *kit* comercial *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel), y siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- Poner a crecer colonias individuales obtenidas como resultado de la electroporación en tubos de 10 ml, con 2ml de medio LB líquido con 100 µg/ml de Ampicilina, a 37°C *overnight*.
- Centrifugar los tubos de 10 ml con el crecimiento bacteriano a 11000 g durante 1 minuto. Descartar el sobrenadante.
- Lisis celular: añadir 250 µl de Buffer A1 (provisto en el *kit*) y resuspender utilizando vórtex.
- Lisis celular: añadir 250 µl de Buffer A2 (provisto en el *kit*). Mezclar suavemente invirtiendo los tubos 6 a 8 veces. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Lisis celular: añadir 300 µl de Buffer A3 (provisto en el *kit*). Mezclar suavemente invirtiendo los tubos 6 a 8 veces.
- Clarificación del lisado: centrifugar los productos lisados a 11000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Unión de ADN: introducir una columna *NucleoSpin® Plasmid* (provista en el *kit*) en un tubo colector de 2 ml (provisto en el *kit*). Decantar 750 µl del sobrenadante obtenido en el paso anterior, y centrifugar a 11000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Descartar el flujo recolectado en el tubo colector.
- Lavado de la membrana de sílice: añadir 500 µl de Buffer AW precalentado a 50°C en el interior de la columna. Centrifugar a 11000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Descartar el flujo recolectado en el tubo colector.
- Lavado de la membrana de sílice: añadir 600 µl de Buffer A4 en el interior de la columna. Centrifugar a 11000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Descartar el flujo recolectado en el tubo colector.
- Secado de la membrana de sílice: centrifugar a 11000 g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Descartar el tubo colector.
- Elución del ADN: introducir la columna en un microtubo de centrifuga estéril de 1.5 ml. Añadir 50 µl de Buffer AE (provisto en el *kit*) en el

interior de la columna e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 11000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Recoger el eluido.

- Guardar los eluidos a -20°C.

Posteriormente, se llevaron a cabo electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para comprobar las extracciones plasmídicas, y ver si se habían incorporado los insertos correspondientes, utilizando como marcador de peso molecular el *GeneRuler™* 1 Kb (Thermo Scientific) que va desde 250 a 10000 pb.

Finalmente, se llevó a cabo una reacción de secuenciación de aquellos vectores que parecían tener el inserto al observar las electroforesis. La reacción de secuenciación constó de las siguientes etapas:

1) Se realizó la siguiente mezcla de reacción por cada muestra:

- 4.86 µl de agua destilada libre de DNasa/RNasa (Gibco®, Life Technologies™)
- 0.64 µl de la dilución 1:20 del *primer* (ya sea el positivo o el negativo) a una concentración de 100 µM
- 1.5 µl de *Dilution buffer* (Applied Biosystems)
- 1 µl del reactivo *sequencing mix* del kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems)

2) Se añadió a la mezcla de reacción 2 µl de la *miniprep* del vector con el inserto correspondiente, obteniendo así un volumen final de 10 µl.

3) El volumen final se incubó:

- 96°C durante 2 minutos (desnaturalización inicial)
- 25 ciclos de 96°C / 10 segundos, 50°C / 5 segundos y 60°C / 4 minutos (desnaturalización, hibridación y extensión, respectivamente), en el termociclador *GeneAmp PCR system 2700*, de Applied Biosystems.

4) Al producto resultante de la incubación se le añadió 10 µl de agua destilada libre de DNasa/RNasa (Gibco®, Life Technologies™).

5) Los productos se enviaron a secuenciar al laboratorio de Genómica del Parque Científico de la Universidad de Barcelona. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automático de ADN, *ABI Prism 377*.

Todos los vectores recombinantes se secuenciaron en ambas direcciones, con el *primer* 5NCR2+ y el *primer* FLuc- (ver Tabla 3), los cuales se unen al IRES de la cepa pHM175 43c del VHA (posiciones 346 a 365), y al gen de *FLuc* (posiciones 130 a 108) respectivamente, con el fin de evitar cualquier discrepancia que pudiera interferir con la lectura y posterior análisis de las secuencias obtenidas.

SOLUCIÓN NECESARIA:

Medio LB:

Peptona o triptona.....10 g/l
Extracto de levadura.....5 g/l
NaCl.....10 g/l
Agar (si se preparan placas de Petri).....15 g/l
En agua Milli-Q.
Esterilizar por autoclave 15 minutos.
Conservar a 4°C.

3.2.8 Análisis de la velocidad de traducción de los diferentes clones obtenidos de los fragmentos de VP1 y VP3: traducción a nivel de cuasiespecies

A partir de los diferentes clones o vectores recombinantes obtenidos para los fragmentos de VP1 y VP3 que constituían las diferentes cuasiespecies, se realizaron transfecciones en células FRhK-4 y se llevaron a cabo las medidas de las actividades de bioluminiscencia de *FLuc* y *RLuc* en cada clon. Estas actividades serían una medida de la tasa o velocidad de traducción de los clones y de las poblaciones estudiadas. Para normalizar los datos obtenidos se utilizó la relación FLuc/RLuc. Para cada clon se hizo este análisis al menos 3 veces de forma independiente con 2 réplicas cada vez y para cada una de las condiciones de silenciamiento celular estudiadas. Esto

significa un mínimo de 36, 54, 90 y 126 análisis para cada una de las luciferasas por población, en los casos de aquellas con 2, 3, 5 y 7 clones para analizar, respectivamente.

3.2.8.1 Transfección de células FRhK-4

Previo a la realización del protocolo de transfección, se obtuvo una alta concentración de ADN de cada uno de los diferentes clones de VP1 y de VP3, utilizando el *kit* de *midiprep* llamado *PowerPrep™ HP Plasmid Purification Systems* (Origene), siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- Poner a crecer en un microtubo de centrifuga 1ml de medio LB líquido + 100 µg/ml de ampicilina con 1-2 colonias resultantes de una siembra en placas de Petri, con los productos de las *minipreps* que poseen el inserto deseado, a 37°C durante 3 horas.
- Poner a crecer en un matraz de Erlenmeyer de 1000 ml, 100 ml de medio LB líquido + 100 µg/ml de ampicilina con el ml de cultivo que se obtuvo en el paso previo, a 37°C en agitación *overnight*.
- Equilibrar la columna para la realización de la *midiprep*: añadir 10 ml de Equilibration Buffer (provisto con el *kit*). Permitir que la solución pase a través de la columna por gravedad.
- Aislamiento de células: centrifugar el crecimiento bacteriano obtenido *overnight* en tubos de centrifuga, a 4000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
- Suspensión celular: añadir 4 ml de Cell Suspension Buffer conteniendo RNasa A (provisto con el *kit*) al precipitado obtenido en el paso anterior. Re-suspender las células hasta que se vea una solución homogénea.
- Lisis celular: añadir 4 ml de Cell Lysis Solution (provisto con el *kit*) a la solución del paso anterior. Mezclar suavemente invirtiendo los tubos tapados 5 veces, e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Neutralizar: añadir 4 ml de Neutralization Buffer (provisto con el *kit*) a la solución del paso anterior. Mezclar suavemente invirtiendo los tubos hasta que la mezcla sea homogénea. Centrifugar a 15000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente.

- Cargar la columna: pipetear el sobrenadante del paso anterior en el interior de la columna previamente equilibrada, y permitir que la solución pase a través de la columna por gravedad.
- Lavar la columna: lavar la columna 2 veces con 10 ml de Wash Buffer (provisto con el *kit*) cada vez. Permitir que la solución pase a través de la columna por gravedad.
- Elución del ADN plasmídico: eluir el ADN unido a la columna añadiendo 5 ml de Elution Buffer (provisto con el *kit*). Permitir que la solución pase a través de la columna por gravedad.
- Precipitación del ADN plasmídico: añadir 3.5 ml de isopropanol al eluido obtenido en el paso anterior. Mezclar y centrifugar a 15000 g durante 30 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante cuidadosamente y lavar el precipitado de ADN con 3 ml de etanol 70%. Centrifugar a 15000 g durante 5 minutos a 4°C. Descartar cuidadosamente el sobrenadante y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- ADN purificado: disolver el precipitado del paso anterior con 200 µl de TE Buffer (provisto con el *kit*).
- Guardar las *midipreps* a -20°C.

El protocolo de transfección que se seguía se detalla a continuación:

- Preparar placas de 96 pocillos con células FRhK-4, 24 horas antes de realizar la transfección, ya que se requiere de un 70-90% de confluencia de las células.
- Cuantificar el vector a transfectar. Para cuantificar se utilizó el Espectrofotómetro *NanoDrop*[®] *ND-1000*.
- Poner a temperatura ambiente el vector a transfectar, medio *Opti MEMI* (Gibco[®], Life Technologies[™]) y el reactivo de transfección *X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent* (Roche).
- Añadir 1 µg del vector a transfectar en 100 µl de medio *Opti MEMI* en un *ependorf* estéril y mezclar suavemente.
- Añadir 4 µl del reactivo de transfección *X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent* al medio con el vector y mezclar suavemente.

- Incubar el complejo reactivo de transfección:vector por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Eliminar el medio de las placas y hacer 2-3 lavados con PBS.
- Añadir el complejo gota a gota a las células a razón de 25 µl por pocillo.
- Incubar las placas a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Añadir 60 µl de medio *Opti MEMI* por pocillo, con la cantidad de AMD apropiada, de ser necesaria. Se realizó con 0.0 µg/ml, 0.05 µg/ml y 0.20 µg/ml de AMD para cada clon.
- Dejar las placas a 37°C en una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂ durante 24 horas.

3.2.8.2 Medición de las actividades bioluminiscentes de *Firefly luciferase* y *Renilla luciferase*

El protocolo que se siguió para la medición de las actividades bioluminiscentes de *FLuc* y *RLuc* se detalla a continuación:

- Poner todos los reactivos del *kit Dual-Glo[®] Luciferase Assay System* (Promega) a temperatura ambiente.
- Sacar del incubador con CO₂ las placas donde se llevó a cabo la transfección.
- Medida de la actividad bioluminiscente de *Firefly luciferase*: añadir 80 µl de *Dual-Glo[®] Luciferase Reagent* en cada pocillo y mezclar.
- Recuperar todo el contenido del pocillo y colocarlo en un tubo de ensayo, y esperar al menos 10 minutos para hacer la medida en el luminómetro *Lumat LB 9507* (Berthold Technologies). La emisión de luz se medía en un intervalo de 10 segundos.
- Medida de la actividad de *Renilla luciferase*: añadir 80 µl de *Dual-Glo[®] Stop & Glo[®] Reagent* (reactivo preparado en el momento) en el tubo de ensayo y mezclar.
- Esperar al menos 10 minutos para hacer la medida en el luminómetro *Lumat LB 9507* (Berthold Technologies). La emisión de luz se medía en un intervalo de 10 segundos.
- Calcular la *ratio* FLuc/RLuc para cada clon en todas las condiciones analizadas.

3.2.9 Secuenciación masiva de los fragmentos de VP1 y VP3

Con el fin de poder calcular las proporciones de cada tipo de fragmento de VP1 y VP3 estudiados, correspondientes a distintos individuos de las poblaciones, y así poder aproximarnos un poco más a la realidad de la composición de la cuasiespecie, se analizó por secuenciación masiva las distintas poblaciones, y luego se ajustaron los resultados obtenidos de traducción con dichas proporciones.

Se realizó la extracción de ARN de las 4 poblaciones en estudio utilizando el *kit NucleoSpin[®] RNA Virus* (Macherey-Nagel) (ver apartado 3.2.3 del presente Capítulo). Posteriormente se llevó a cabo la RT de los fragmentos de VP1 y VP3 siguiendo un protocolo similar al detallado en el apartado 3.2.4.1 del presente Capítulo, y utilizando los *primers* VP1_masiva (-) y VP3_masiva (-), respectivamente (ver Tabla 4). A partir de la RT obtenida se realizaron las PCR correspondientes utilizando los *primers* VP1_masiva (+) y VP1_masiva (-) (ver Tabla 4) para el fragmento de VP1, y los *primers* VP3_masiva (+) y VP3_masiva (-) para el fragmento de VP3 (ver Tabla 4), y siguiendo un protocolo similar al detallado en el apartado 3.2.4.2 del presente Capítulo. Es importante destacar que los 4 *primers* llevan añadido en su secuencia el *primer* universal de M13, que es necesario para la construcción de la librería y para la posterior adición de identificadores de secuencias. Después de realizadas ambas PCR se llevó a cabo la purificación por banda de cada una de ellas utilizando el *kit High Pure PCR Product Purification* (Roche) (ver apartado 3.2.5 del presente Capítulo), para obtener la banda lo más pura posible. Posteriormente se realizó una precipitación con etanol para poder obtener una concentración final de 20 ng/μl (protocolo estandarizado por Francisco Pérez-Rodríguez como parte del trabajo experimental de su tesis doctoral titulada “Estrategias replicativas del virus de la hepatitis A y mejora del rendimiento en la producción de antígeno vacunal”). Finalmente, los productos obtenidos se enviaron al laboratorio de Enfermedades Hepáticas del Dr. Josep Quer, en el Instituto de Investigación del Hospital Vall d’Hebrón, para llevar a cabo la secuenciación masiva, utilizando la plataforma 454/GS Junior (Roche).

Tabla 4. *Primers* utilizados para hacer la RT-PCR de los fragmentos de VP1 y VP3, a partir de las cuales se realizó la secuenciación masiva. En negrita y cursiva se observa la secuencia del *primer* universal de M13 introducido en cada uno de los *primers*.

| Primer | Secuencia |
|----------------|---|
| VP1_masiva (+) | 5' <i>GTTG</i> TAAAACGACGGCCAGTAAAGTRCCTGAGACATTTCTG 3' |
| VP1_masiva (-) | 5' <i>CACAGG</i> AAACAGCTATGACCCAGTGCTCCAGACACAGC 3' |
| VP3_masiva (+) | 5' <i>GTTG</i> TAAAACGACGGCCAGTGAGAAATGAATTTAGGGTCAG 3' |
| VP3_masiva (-) | 5' <i>CACAGG</i> AAACAGCTATGACCCGGAAAACTTGAAAAATCAAAGAC 3' |

3.2.10 Análisis estadístico

Para determinar si había diferencias estadísticamente significativas en la velocidad de traducción entre los diferentes clones individuales, donde se tenía un conjunto de datos pequeño, se utilizó el test t-Student. Pero cuando se querían ver las diferencias entre las diferentes poblaciones en estudio entre sí en su conjunto, y se tenía por tanto una cantidad de datos muy grande y repetición de algunos de ellos, se hicieron intervalos de confianza (IC) con el método de Bonferroni [Abdi, 2007], utilizando el *software* SageMath versión 4.6.2. Los resultados de los diferentes estudios se expresaron como la media \pm el error estándar.

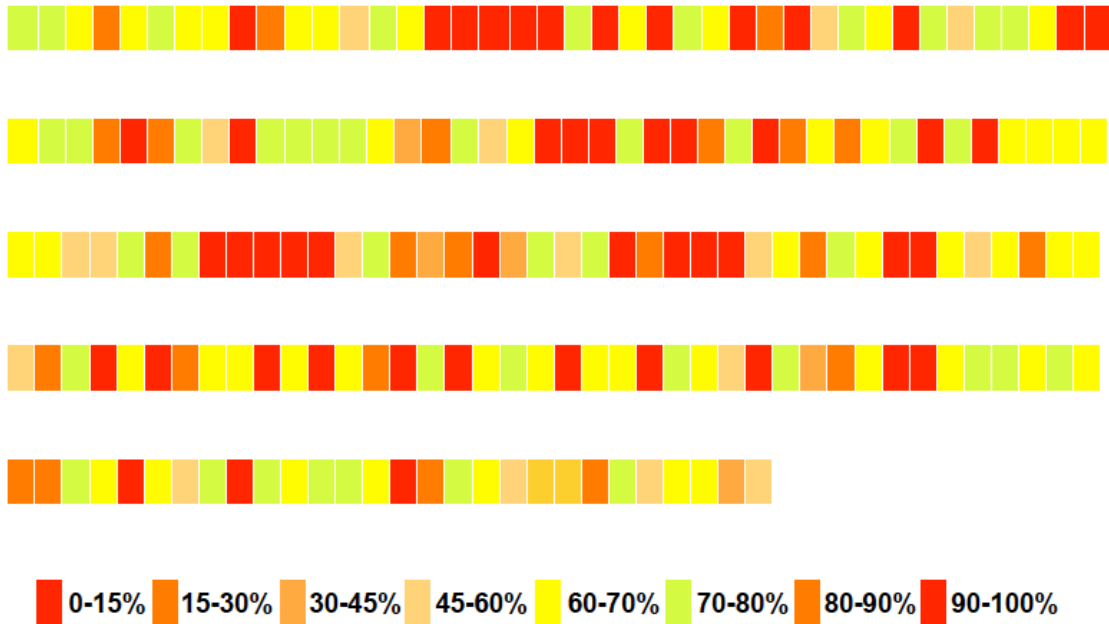
3.3 RESULTADOS

3.3.1 Uso de codones del VHA en las regiones de VP1 y VP3 estudiadas

Tal y como se ha comentado en apartados previos, el VHA es un virus que replica lento y que produce poca cantidad de antígeno. Para comprender un poco esta problemática, es importante destacar que el VHA posee un IRES altamente ineficiente para dirigir la traducción, es incapaz de producir un silenciamiento de la síntesis proteica de la célula hospedadora, y posee un uso de codones altamente deoptimizado con respecto a la misma. Esta última característica tiene como consecuencia el evitar, en la medida de lo posible, la competencia con la célula por los ARNt celulares. El VHA además de utilizar codones raros que se aparean con ARNt poco frecuentes en la célula, también utiliza algunos codones raros que son reconocidos por ARNt altamente frecuentes. Estos últimos, en condiciones de ausencia de silenciamiento celular, son utilizados por la célula hospedadora en una alta frecuencia, lo cual induce a que la probabilidad de incorporar estos tipos de ARNt por parte del virus sea baja, y por tanto se los considera codones raros por competencia. En cambio, en condiciones de silenciamiento de la transcripción celular artificialmente inducido con AMD, la disminución significativa del número de ARNm de la célula hospedadora trae como consecuencia una reducción de la competencia con la célula por los ARNt, y por tanto, una mayor disponibilidad principalmente de aquellos ARNt altamente frecuentes, para ser utilizados por el VHA.

En la Figura 11 se muestra un diagrama para la región de VP1 analizada, en el cual los codones del virus se representan conforme al uso de codones de la célula humana, según una gradación de colores. Esta gradación es distinta según las condiciones del silenciamiento celular. En ausencia de silenciamiento (sin AMD) la gradación va del rojo, correspondiente a codones raros de la célula, pasando por ocre, amarillo y verde pálido hasta nuevamente rojo en los codones raros por competencia que son aquellos altamente frecuentes en la célula. En condiciones de silenciamiento celular la

SIN AMD



CON AMD

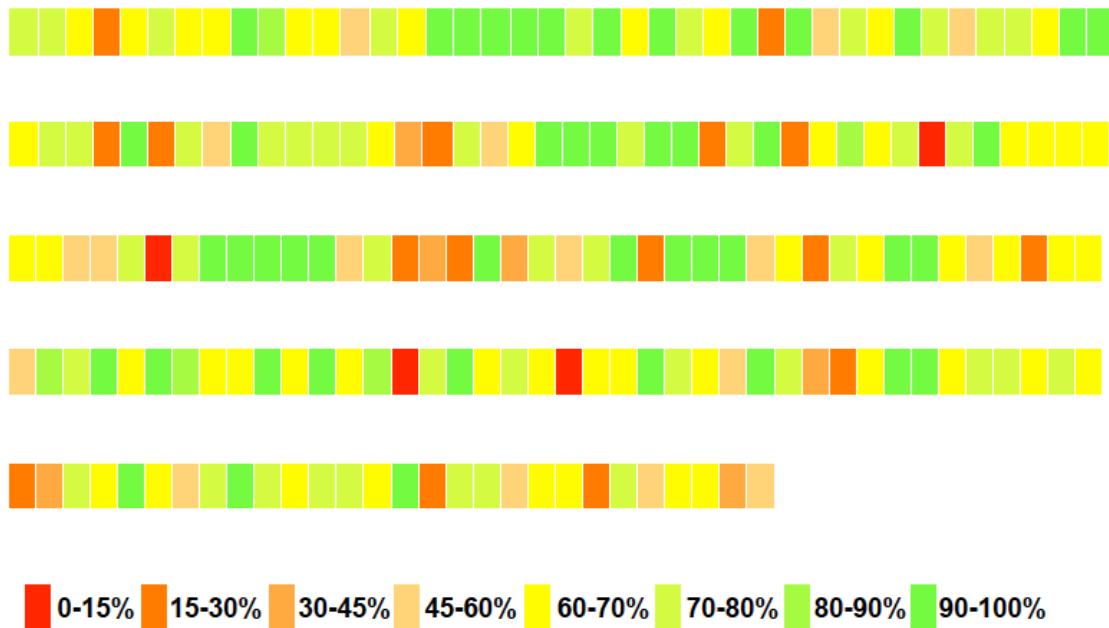


Figura 11. Diagrama del uso de codones de la región de VP1 analizada correspondiente a la cepa pHM175 43c, y conforme al uso de codones de la célula humana. El uso de codones se representa según una gradación de colores dependiendo de la supuesta disponibilidad de los ARNt: en condiciones de no silenciamiento celular (sin AMD) habría poca disponibilidad, y en condiciones de silenciamiento (con AMD) habría alta disponibilidad. En ausencia de silenciamiento la gradación va del rojo, correspondiente a codones raros de la célula, pasando por ocres, amarillo y verde pálido hasta nuevamente rojo en los codones raros por competencia que son aquellos altamente frecuentes en la célula. En condiciones de silenciamiento celular la gradación de colores va del rojo, codón raro celular, al verde intenso, codón abundante celular.

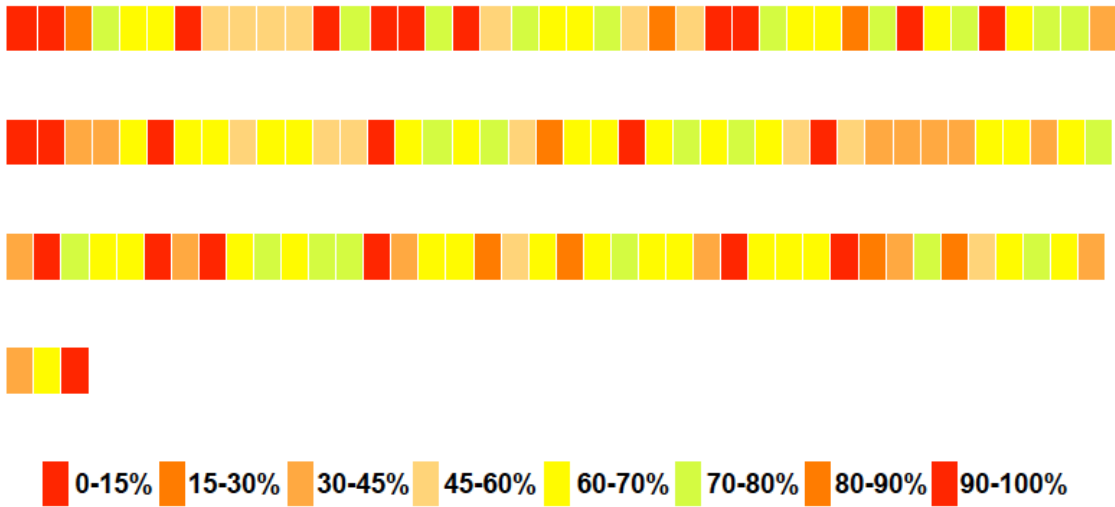
gradación de colores va del rojo, codón raro celular, al verde intenso, codón abundante celular.

Así, en condiciones de ausencia de AMD se ve claramente cómo los colores dominantes son el rojo y las diferentes tonalidades de naranja, lo cual indicaría y explicaría en parte el hecho de que el VHA tenga una baja tasa de traducción (ver Figura 11, sin AMD). En tanto, en condiciones de silenciamiento celular, al eliminar en gran medida la competencia con la célula principalmente por los ARNt altamente frecuentes, la situación se vuelve más favorable para el virus. De esta manera, se puede ver que en el diagrama de uso de codones de la región de VP1 dominan los colores amarillo y verde, lo cual favorecería a una mayor tasa de traducción (ver Figura 11, con AMD).

Por otra parte, en el diagrama de gradación de colores para la región de VP3 estudiada, se observa un patrón bastante similar al que se encuentra en la región de VP1 (ver Figura 12). En condiciones de ausencia de AMD, predominan ampliamente los colores rojo, naranja y ámbar, lo cual indicaría una tasa de traducción reducida, hecho que contribuiría por tanto a la baja tasa de producción vírica encontrada en el VHA en condiciones normales (ausencia de silenciamiento celular) (ver Figura 12, sin AMD). En tanto, en presencia de AMD la situación cambiaría encontrándose un predominio de los colores amarillo y verde, es decir, codones mediana y altamente frecuentes, lo cual induciría a una mayor tasa de traducción en comparación a la observada en condiciones de ausencia de AMD (ver Figura 12, con AMD).

Es importante destacar que tanto en la región de VP1 como en VP3 en presencia de una concentración de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, los diagramas del uso de codones según una gradación de colores mostrados en las Figuras 11 y 12, respectivamente, se intensificarían más que en comparación a la situación encontrada en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. Esto se atribuye a que en esta última condición el nivel de silenciamiento de la transcripción celular es menor.

SIN AMD



CON AMD

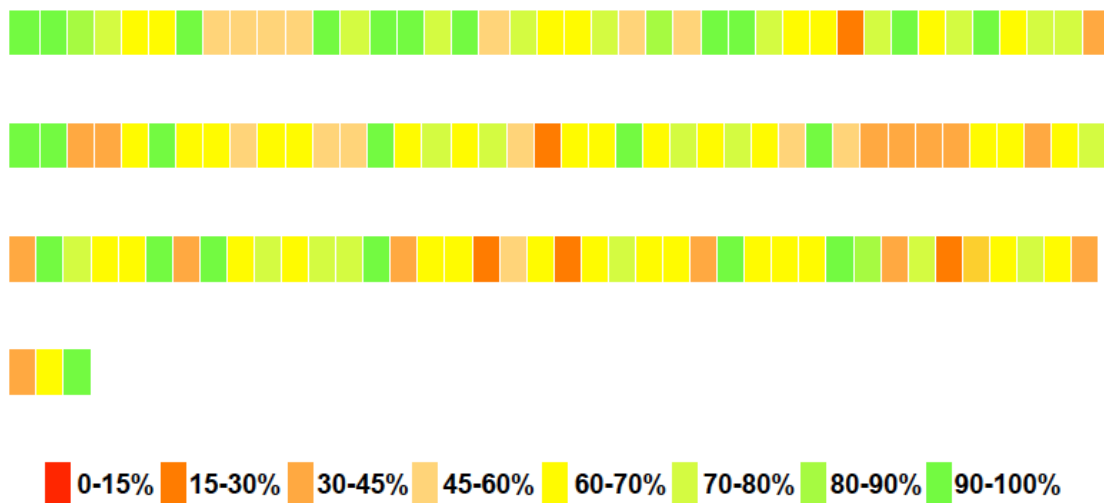


Figura 12. Diagrama del uso de codones de la región de VP3 analizada correspondiente a la cepa pHM175 43c, y conforme al uso de codones de la célula humana. El uso de codones se representa según una gradación de colores dependiendo de la supuesta disponibilidad de los ARNt: en condiciones de no silenciamiento celular (sin AMD) habría poca disponibilidad, y en condiciones de silenciamiento (con AMD) habría alta disponibilidad. En ausencia de silenciamiento la gradación va del rojo, correspondiente a codones raros de la célula, pasando por ocres, amarillo y verde pálido hasta nuevamente rojo en los codones raros por competencia que son aquellos altamente frecuentes en la célula. En condiciones de silenciamiento celular la gradación de colores va del rojo, codón raro celular, al verde intenso, codón abundante celular.

3.3.2 Estudio de la velocidad de traducción a nivel de cuasiespecies en dos regiones de la cápside de cuatro poblaciones del VHA

Con el fin de estudiar la velocidad de traducción en regiones de las proteínas estructurales de VP1 y VP3, en las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP del VHA, se obtuvieron cuasiespecies moleculares para cada una de las 2 regiones de cada una de las poblaciones en estudio, clonadas en un vector bicistrónico. Las proporciones de clones obtenidas en las cuasiespecies moleculares de cada una de las 4 poblaciones en estudio, se ajustaron con los datos obtenidos por secuenciación masiva, para así poder aproximarnos un poco más a la composición de la cuasiespecie real de cada una de ellas.

3.3.2.1 Traducción de las cuasiespecies de VP1

En las cuasiespecies moleculares de la región de VP1 se encontró una diversidad de 14 clones o haplotipos diferentes, denominados $\lambda 1$ a $\lambda 14$, teniendo en cuenta las 4 poblaciones en estudio. Algunos clones no eran específicos de una población particular, sino que se encontraban en más de una de las poblaciones estudiadas (ver Figura 13). Esto es coherente con el hecho de que el origen común a todas las poblaciones en estudio es la cepa *wild type* del VHA adaptada a replicar en cultivo celular (pHM175 43c). En la Tabla 5 se pueden ver las características de los 14 clones aislados, entre las cuales se incluyen los cambios que poseen los mismos con respecto a la cepa pHM175 43c, las posiciones de los cambios dentro de la proteína VP1, y si esos cambios inducen la aparición de un codón de mayor, menor o igual frecuencia (+, -, =, respectivamente), respecto al uso de codones de la célula humana (ver Tabla 1). Se considera que cambia la frecuencia del nuevo codón respecto al que se encontraba en pHM175 43c, al diferir en al menos un 10% en su frecuencia.

Tabla 5. Diferentes clones encontrados en las cuasiespecies de la región de VP1. Cambio codón es con respecto a la cepa *wild type* adaptada a cultivo celular (pHM175 43c); porcentaje frecuencia hace referencia al porcentaje en el cual se encuentra el codón en la célula humana (ver Tabla 1); aa es aminoácido; +, -, =, representan que el nuevo codón en el clon se encuentra en una mayor, menor o igual frecuencia en la célula humana, respectivamente, considerando que cambia su frecuencia al diferir en al menos un 10% con respecto al codón que había en pHM175 43c.

| Clon | Cambio codón y porcentaje frecuencia | Posición en VP1 (aa) | Cambio frecuencia |
|--------------|--------------------------------------|----------------------|-------------------|
| $\lambda 1$ | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |
| $\lambda 2$ | (61%) I(ATT) → I(ATC) (100%) | 198 | + |
| | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |
| $\lambda 3$ | (100%) S(AGC) → T(ACC) (100%) | 197 | = |
| | (75%) D(GAT) → N(AAT) (73%) | 216 | = |
| | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |
| $\lambda 4$ | (100%) I(ATC) → V(GTC) (53%) | 85 | - |
| | (61%) I(ATT) → V(GTT) (34%) | 146 | - |
| | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |
| $\lambda 5$ | (61%) I(ATT) → V(GTT) (34%) | 146 | - |
| | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |
| $\lambda 6$ | (100%) I(ATC) → V(GTC) (53%) | 85 | - |
| | (26%) L(TTG) → F(TTC)(100%) | 123 | + |
| | (61%) I(ATT) → V(GTT) (34%) | 146 | - |
| | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |
| $\lambda 7$ | (26%) L(TTG) → F(TTC) (100%) | 123 | + |
| | (61%) I(ATT) → V(GTT) (34%) | 146 | - |
| | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |
| $\lambda 8$ | (100%) I(ATC) → V(GTC) (53%) | 85 | - |
| | (26%) L(TTG) → F(TTC) (100%) | 123 | + |
| | (61%) I(ATT) → V(GTT) (34%) | 146 | - |
| | (44%) G(GGT) → S(AGT) (50%) | 163 | = |
| | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |
| $\lambda 9$ | (26%) L(TTG) → F(TTC) (100%) | 123 | + |
| | (61%) I(ATT) → V(GTT) (34%) | 146 | - |
| | (100%) D(GAC) → D(GAT) (75%) | 180 | - |
| | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |
| $\lambda 10$ | (65%) H(CAT) → H(CAC) (100%) | 82 | + |
| | (100%) I(ATC) → V(GTC) (53%) | 85 | - |
| | (26%) L(TTG) → F(TTC) (100%) | 123 | + |
| | (61%) I(ATT) → V(GTT) (34%) | 146 | - |
| | (19%) V(GTA) → V(GTT) (34%) | 162 | + |
| | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |
| $\lambda 11$ | (100%) I(ATC) → V(GTC) (53%) | 85 | - |
| | (61%) I(ATT) → V(GTT) (34%) | 146 | - |
| | (19%) V(GTA) → V(GTT) (34%) | 162 | + |
| | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |
| $\lambda 12$ | (100%) F(TTC) → F(TTT) (70%) | 131 | - |
| | (61%) I(ATT) → V(GTT) (34%) | 146 | - |
| | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |
| $\lambda 13$ | (26%) L(TTG) → F(TTC) (100%) | 123 | + |
| | (61%) I(ATT) → V(GTT) (34%) | 146 | - |
| | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |
| | (100%) D(GAC) → D(GAT) (75%) | 220 | - |
| $\lambda 14$ | (95%) S(TCC) → S(TCT) (71%) | 76 | - |
| | (78%) P(CCT) → P(CCC) (100%) | 110 | + |
| | (61%) I(ATT) → V(GTT) (34%) | 146 | - |
| | (100%) A(GCC) → V(GTC) (53%) | 157 | - |
| | (44%) G(GGT) → G(GGA) (67%) | 219 | + |

Según la cuasiespecie molecular clásica se encontró mayor heterogeneidad o complejidad en la población F0.05LA, en la cual se encontraron 7 clones o haplotipos diferentes. En tanto, las cuasiespecies del resto de las poblaciones eran de una complejidad similar, encontrando en cada una de ellas 5 clones diferentes (ver Figura 13).

Al observar la Tabla 5 se puede ver que todos los clones aislados comparten un cambio con respecto a la cepa pHM175 43c, que es a un codón más frecuente en la posición 219, donde se pasa de un codón con una frecuencia en la célula humana de 44%, a otro con una del 67%.

Para incrementar el número de secuencias de los individuos estudiados, y así poder aproximarnos un poco más a las cuasiespecies reales de cada una de las poblaciones en estudio, se analizaron las regiones estudiadas de las poblaciones por secuenciación masiva. Se ajustaron los resultados obtenidos con esta técnica, con los obtenidos previamente en las cuasiespecies moleculares clásicas para el análisis de la velocidad de traducción (ver Figura 13). Contrastando los resultados obtenidos, se vio que para la región de VP1 estudiada había una coincidencia altamente significativa entre los clones o haplotipos encontrados en las cuasiespecies moleculares y los encontrados por secuenciación masiva, en cada una de las 4 poblaciones en estudio (ver Tabla 6). Por lo tanto, esto permitió que fuese posible realizar el análisis de la velocidad de traducción de las cuasiespecies en su conjunto, así como de los diferentes clones individuales de cada una de las poblaciones, teniendo en cuenta prácticamente todas las variantes posibles, ya que en todos los casos se pudo analizar un número de secuencias igual o superior al 90%.

Tabla 6. _Resultados obtenidos con la secuenciación masiva para el fragmento de VP1.

| Población | Número de haplotipos obtenidos^a | Número de haplotipos analizados^b | Secuencias totales obtenidas^a | Secuencias totales analizadas^c | Porcentaje de secuencias analizadas |
|------------------|---|--|---|--|--|
| L0 | 13 | 5 | 3740 | 3370 | 90 |
| F0.05LA | 10 | 7 | 3120 | 3063 | 98 |
| F0.2LA | 5 | 5 | 2860 | 2860 | 100 |
| HM175-HP | 7 | 5 | 3212 | 3131 | 97 |

^a Por secuenciación masiva

^b Análisis de la velocidad de traducción

^c Ajuste de los análisis de la velocidad de traducción con los resultados de secuenciación masiva

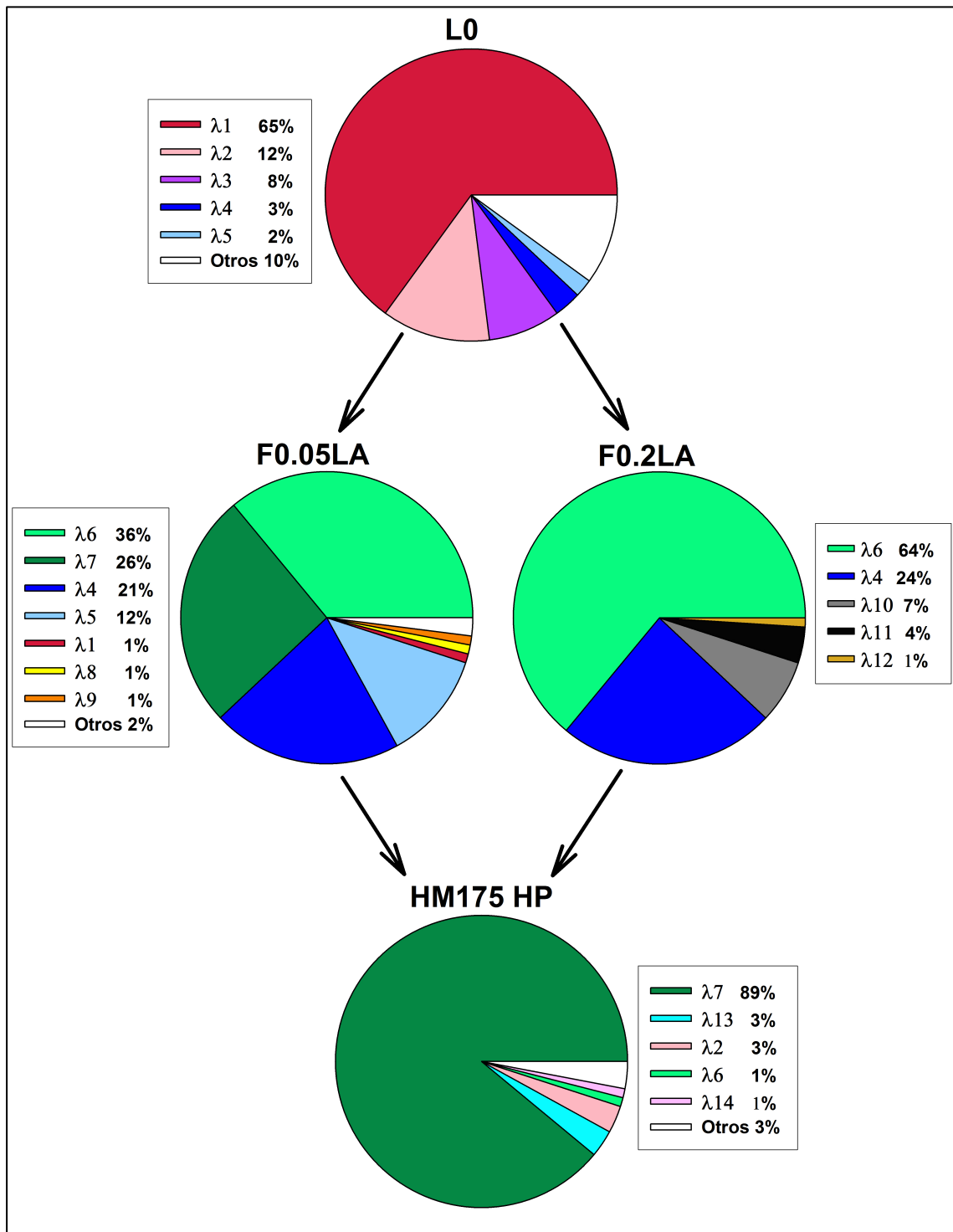


Figura 13. Proporciones de los clones obtenidos para las cuasispecies de L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP de la región de VP1. *Otros*, hace referencia al porcentaje de clones o haplotipos a los que no se les pudo analizar su velocidad de traducción por no haberlos obtenido en las cuasispecies moleculares clásicas.

Al analizar los resultados obtenidos por secuenciación masiva (ver Tabla 6) se vio que las cuasispecies más heterogéneas eran las correspondientes a L0 y F0.05LA con 13 y 10 haplotipos encontrados, respectivamente, seguidas

de HM175-HP y F0.2LA con 7 y 5 haplotipos, respectivamente. Los resultados obtenidos son coherentes con el hecho de que en un ambiente con un alto grado de silenciamiento celular inducido artificialmente con AMD, el número de células viables se reduce significativamente (como ha sido detallado en apartados previos), por tanto sólo aquellos clones muy adaptados son capaces de sobrevivir. En cambio en condiciones de ausencia y de silenciamiento celular moderado, el ambiente no es tan restrictivo, habiendo un mayor porcentaje de células viables y así permitiendo la co-existencia de una mayor variabilidad de haplotipos.

Algo interesante a destacar en la distribución de los diferentes clones de cada cuasiespecie analizada (ver Figura 13), además de la presencia (como se comentó previamente) de algunos clones en más de una población, es ver cómo el clon $\lambda 1$ que es el mayoritario en L0, prácticamente se pierde en F0.05LA (se encuentra sólo en un 1%), y se pierde completamente en F0.2LA, que son las 2 poblaciones que derivan de L0. Asimismo, se ve claramente el cambio en el patrón de distribución de las cuasiespecies de F0.05LA y F0.2LA, con respecto a L0, donde algunos clones que eran muy minoritarios en L0 se vuelven más abundantes en F0.05LA y F0.2LA como $\lambda 4$ en ambas poblaciones, y $\lambda 5$ en F0.05LA. Además se observa la emergencia de nuevos clones como $\lambda 6$ en ambas poblaciones, y también $\lambda 7$, $\lambda 8$ y $\lambda 9$ en F0.05LA y $\lambda 10$, $\lambda 11$ y $\lambda 12$ en F0.2LA. Por otra parte, pero no menos interesante es que en HM175-HP, la población resultante del *molecular breeding* entre F0.05LA y F0.2LA, el clon $\lambda 7$ es el dominante con un 89%. Este último clon se seleccionó claramente de la población parental F0.05LA, donde se encontraba en un 26%, ya que estaba ausente en F0.2LA (se discutirá este caso más adelante).

Con el propósito de conocer la tasa o velocidad de traducción de las diferentes poblaciones del VHA, se midieron las actividades de bioluminiscencia de las 2 luciferasas (*Firefly* o *FLuc* y *Renilla* o *RLuc*) presentes en los vectores bicistrónicos en los cuales fueron clonadas las regiones de VP1 de las 4 poblaciones en estudio, y que diferían entre si en el uso de codones.

En primer lugar se analizaron los porcentajes de bioluminiscencia obtenidos en presencia de 0.05 y 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, en comparación a los resultados obtenidos en ausencia de AMD para ambas luciferasas estudiadas, en el vector bicistrónico de estudio (G1RC) en ausencia de los respectivos

fragmentos de VP1 clonados en el mismo (ver Figura 14). Se encontró una clara inhibición dosis dependiente de la concentración de AMD presente, de la actividad tanto para la bioluminiscencia de *Renilla* como la de *Firefly*. Para la bioluminiscencia de *Renilla* se obtuvo un valor medio del $43 \pm 12\%$ en presencia de $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD, y del $1 \pm 1\%$ en presencia de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD, respecto a los valores en ausencia de AMD. En el caso de la bioluminiscencia de *Firefly* se obtuvo un valor medio del $49 \pm 16\%$ en presencia de $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD, y del $6 \pm 1\%$ en presencia de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD, respecto a los valores en ausencia de AMD. Por lo tanto, se concluye que hay un paralelismo entre el comportamiento de las bioluminiscencias de *Renilla* y *Firefly*.

En cuanto a las 4 poblaciones en estudio, la bioluminiscencia de *Renilla* también se vio claramente inhibida siguiendo un patrón dosis dependiente de la concentración de AMD, con valores de medias que oscilan entre 25 a 38% en presencia de $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD, y entre 3 a 6% en presencia de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD entre las poblaciones, en relación a los valores en ausencia de AMD. En lo que respecta a la bioluminiscencia de *Firefly*, también se vio una inhibición de la misma en presencia de AMD, pero no tan significativa como se observó para *RLuc*. En condiciones de $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD se obtuvieron valores de medias entre 46 a 57%, y en presencia de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD de 29 a 53% entre las poblaciones, con respecto a los valores en ausencia de AMD (ver Figura 14). En estos casos no existe paralelismo entre el comportamiento de las bioluminiscencias de *Renilla* y *Firefly*.

Estos resultados sugerirían que algún factor estaría afectando el comportamiento de *FLuc* en presencia del fragmento de VP1. Es decir, si su bioluminiscencia sólo dependiera de la tasa de transcripción, su valor debería caer respecto a los valores en ausencia de AMD, en las mismas proporciones en las que caen los valores de bioluminiscencia de *Renilla*, o incluso más ya que podría ocurrir que algunos transcritos que se inician en el promotor del citomegalovirus se aborten antes de transcribir completamente el gen de *FLuc*. Esta hecho se ve claramente para el vector G1RC en ausencia de inserto, pero no en presencia de inserto.

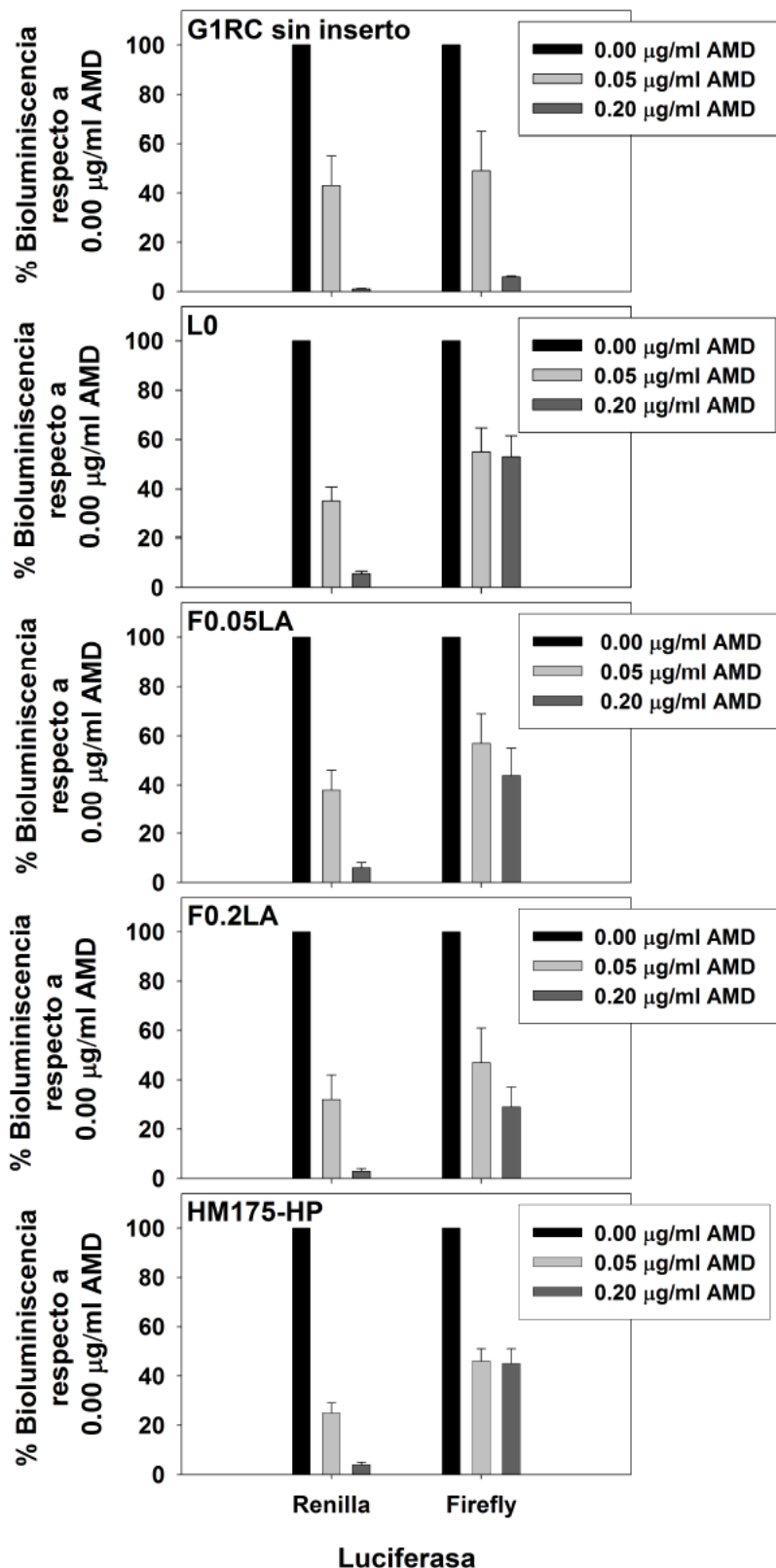


Figura 14. Porcentajes de bioluminiscencia de las luciferasas *Renilla* y *Firefly* en presencia de 0.05 y 0.20 µg/ml de AMD, con respecto a sus respectivos valores obtenidos en ausencia de AMD. Estas luciferasas se encuentran en el vector bicistrónico de trabajo (G1RC) que posee clonado, justo antes del gen codificante para *Firefly luciferase*, la región de VP1 correspondiente a los respectivos haplotipos de L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP. Se analizó también los porcentajes de bioluminiscencia de las respectivas luciferasas para el vector bicistrónico de trabajo sin inserto.

Por tanto, lo que podría estar influyendo en las actividades bioluminiscentes de *Firefly* en presencia de AMD sería la secuencia de VP1 clonada justo antes del gen *FLuc*, la cual estaría modulando la velocidad de traducción de la misma, ya que como se vio anteriormente en la Figura 11, esta región tiene un uso de codones donde domina la tonalidad amarillo-verde en presencia de AMD, y los colores naranja-rojo en ausencia de AMD.

Posteriormente, se utilizaron las actividades bioluminiscentes como una medida de la tasa de traducción de las poblaciones analizadas, y para normalizar los datos obtenidos se utilizó la relación FLuc/RLuc. De esta forma, utilizando esta metodología se analizaron todos los clones posibles para la región de VP1, con el fin de obtener una medida de la tasa de traducción de la cuasiespecie en su conjunto para la región estudiada y de las 4 poblaciones analizadas. Se vio que en ausencia de AMD, la tasa de traducción era prácticamente la misma para todas las poblaciones, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ellas utilizando el método de Intervalos de Confianza al 90% (IC 90%; ver Figura 15). Sin embargo, en condiciones de *shut-off* de la transcripción celular, la tasa de traducción de la cuasiespecie de la población HM175-HP era superior al resto y dosis dependiente de la cantidad de AMD utilizada, siendo más relevante el incremento observado en 0.20 µg/ml de AMD (ver Figura 15).

A pesar de que los valores de las tasas de traducción medias de las diferentes cuasiespecies no son significativamente distintos en la mayoría de casos (como todas las poblaciones en ausencia de AMD; entre L0, F0.05LA y F0.2LA en condiciones de 0.05 y 0.20 µg/ml de AMD; y entre F0.05LA y HM175-HP en condiciones de 0.05 µg/ml de AMD), la composición de individuos de las respectivas cuasiespecies no es la misma. Por tanto, tener en cuenta solamente el valor medio de las tasas de traducción de las cuasiespecies para comparar las poblaciones entre si, puede conducir a una interpretación errónea, ya que individuos con diferente velocidad de traducción pueden llevar a la obtención de un mismo valor medio de tasa de traducción a nivel poblacional. Es por esta razón, que se analizaron los valores de FLuc/RLuc correspondientes a los diferentes haplotipos en función de su frecuencia en la población (ver Figuras 16, 17 y 18).

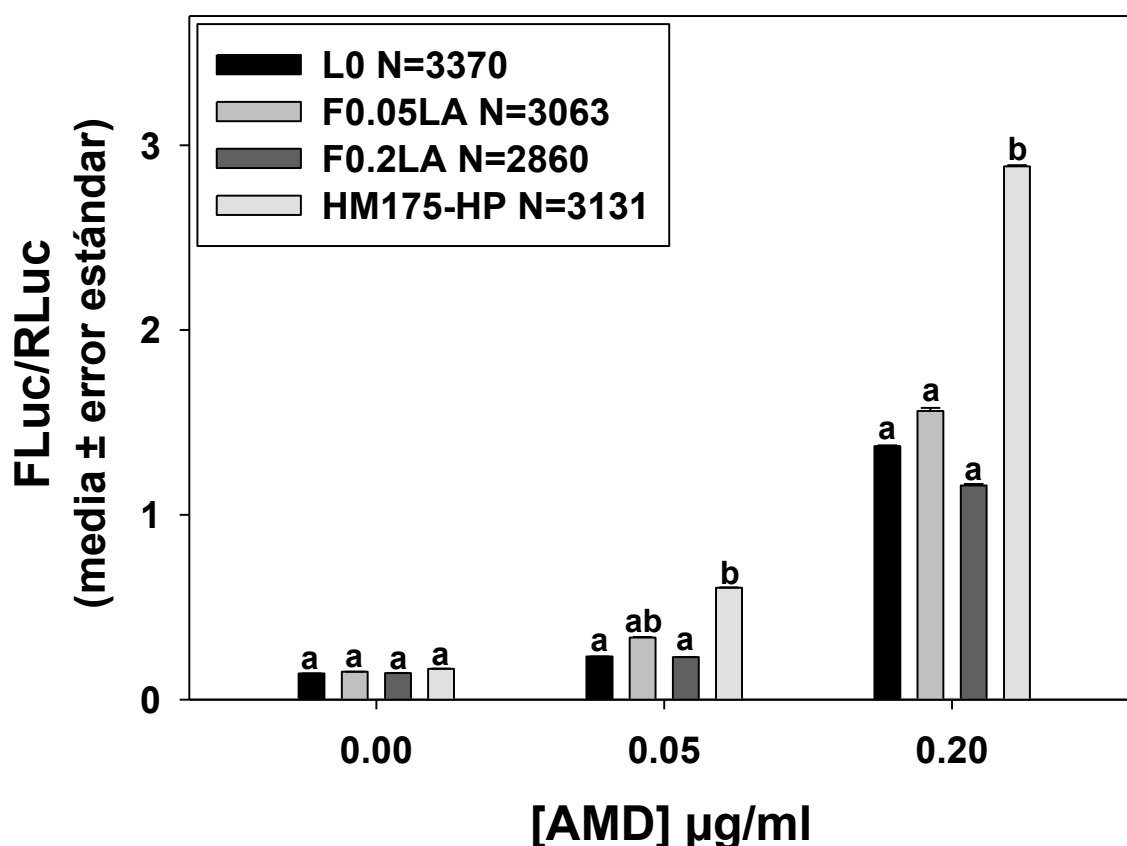


Figura 15. Tasa de traducción de las cuasiespecies de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP en la región de VP1, en condiciones de ausencia, 0.05 µg/ml y 0.20 µg/ml de AMD. Las N corresponden al número de secuencias analizadas para cada una de las poblaciones. Las diferencias estadísticamente significativas utilizando el método de Intervalos de Confianza al 90% (IC al 90%) entre las cuasiespecies de diferentes poblaciones en una misma condición de *shut-off* de la transcripción celular, se señalan utilizando el criterio de letras a=ab; ab=b; a≠b.

En la Figura 16, donde se observa la composición de las 4 cuasiespecies en condiciones de ausencia de AMD, se puede observar que el valor de la media de la tasa de traducción de L0 y F0.2LA es prácticamente el mismo (0.142 ± 0.001 y 0.143 ± 0.001 , respectivamente). Sin embargo, el valor correspondiente a F0.05LA es un poco superior al de las anteriores (0.151 ± 0.001), y el de HM175-HP es incluso mayor a todas (0.167 ± 0.001). Al analizar el panel correspondiente a L0 se vio que había un clon ampliamente mayoritario (λ_1) que sería el responsable del valor de la media de traducción obtenida, a pesar de la existencia de clones minoritarios en la población con valores de tasa de traducción un poco superiores al valor de la media (λ_3 , λ_4 y λ_5) (ver Figura 16).

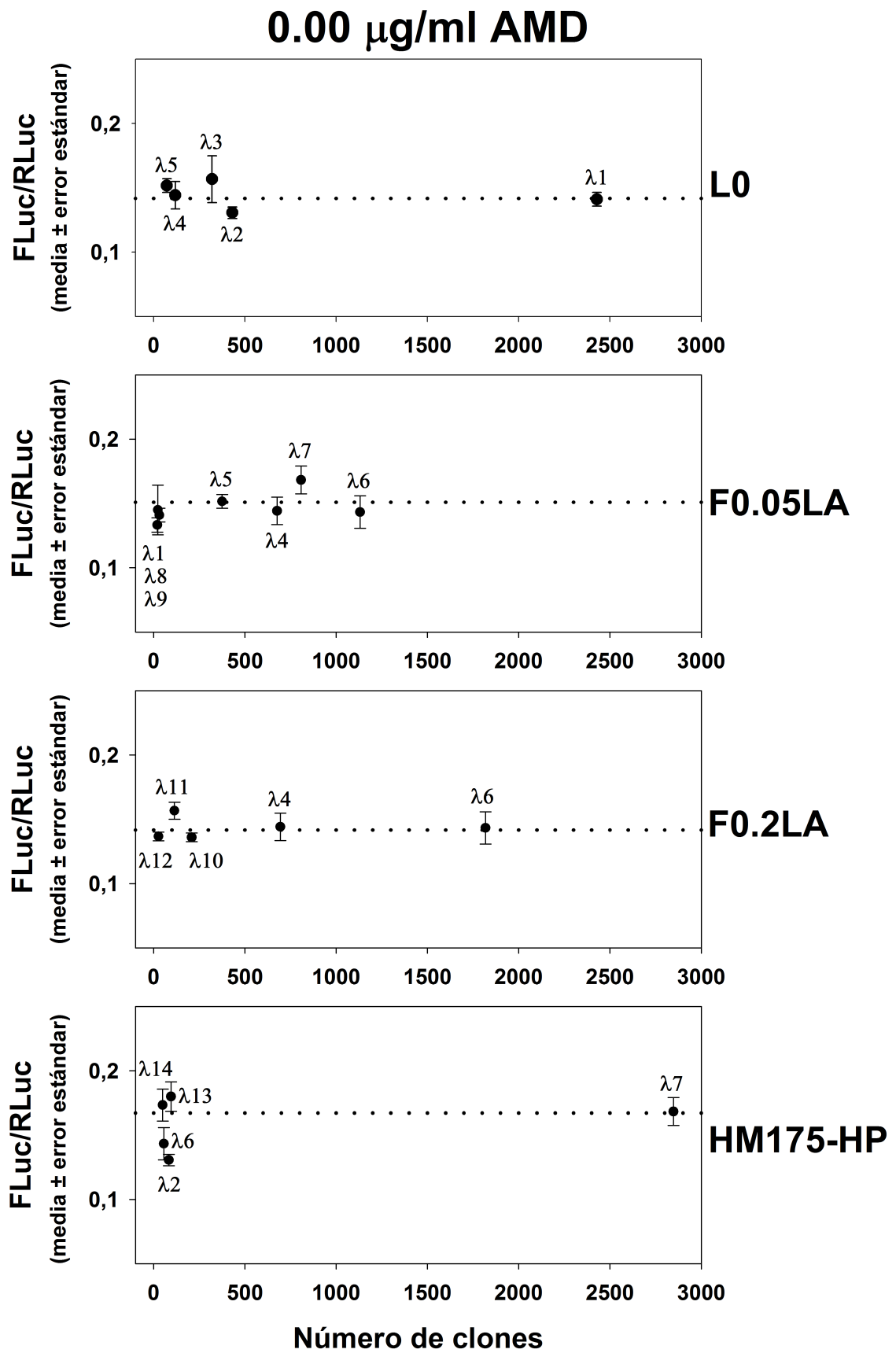


Figura 16. Tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc de los diferentes clones de la región de VP1 que componen las cuasiespecies de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP en presencia de 0.00 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. La línea punteada señala el valor medio de la tasa de traducción de la respectiva cuasie especie.

En el panel correspondiente a F0.05LA se vio que el segundo clon dominante de su cuasiespecie ($\lambda 7$) posee una tasa de traducción superior al resto de los integrantes de la misma ($\lambda 1$, $\lambda 4$, $\lambda 5$, $\lambda 6$, $\lambda 8$ y $\lambda 9$), lo que trae como consecuencia que el valor de la media de velocidad de traducción de esta cuasiespecie sea algo superior a los valores de L0 y F0.2LA (ver Figura 16).

Con respecto a F0.2LA se vio que sus 2 clones mayoritarios ($\lambda 6$ y $\lambda 4$) poseen una tasa de traducción similar entre sí, y serían por tanto los principales responsables del valor de la media de tasa de traducción obtenida (ver Figura 16). En el caso de HM175-HP se vio que tanto su clon mayoritario ($\lambda 7$) como algunos de sus clones minoritarios ($\lambda 13$ y $\lambda 14$) poseen una tasa de traducción superior a la mayoría de los clones de las otras poblaciones. Ésto explicaría que el valor de la tasa de traducción media de esta población sea superior a la de las otras poblaciones, aunque las diferencias no sean estadísticamente significativas (ver Figura 16).

En condiciones de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD (ver Figura 17), se observó un patrón similar al observado en ausencia de AMD, pero aquí las diferencias entre las cuasiespecies son más evidentes. La tendencia observada de HM175-HP hacia una mayor tasa de traducción en ausencia de AMD, se ve más claramente en condiciones de silenciamiento celular moderado con un valor de 0.606 ± 0.002 , que es significativamente superior a los valores de L0 (0.233 ± 0.001) y F0.2LA (0.230 ± 0.001), y superior a F0.05LA (0.336 ± 0.003), aunque no de forma significativa. Esto último sería debido a que el segundo clon mayoritario en F0.05LA ($\lambda 7$), con una alta tasa de traducción, es el clon mayoritario en HM175-HP (91%) (ver Figura 17).

Por otra parte, en condiciones de silenciamiento celular alto (ver Figura 18), todas las tasas de traducción medias de las cuasiespecies y de sus clones individuales, aumentan debido a una mayor disponibilidad de la maquinaria traduccional y/o de los recursos de la célula para el virus. Sin embargo, en la población HM175-HP el aumento es significativo, alcanzando valores de media de traducción de la cuasiespecie de 2.886 ± 0.006 , en comparación a los valores obtenidos de 1.372 ± 0.004 , 1.561 ± 0.017 y 1.158 ± 0.009 , para L0, F0.05LA y F0.2LA, respectivamente.

0.05 $\mu\text{g/ml}$ AMD

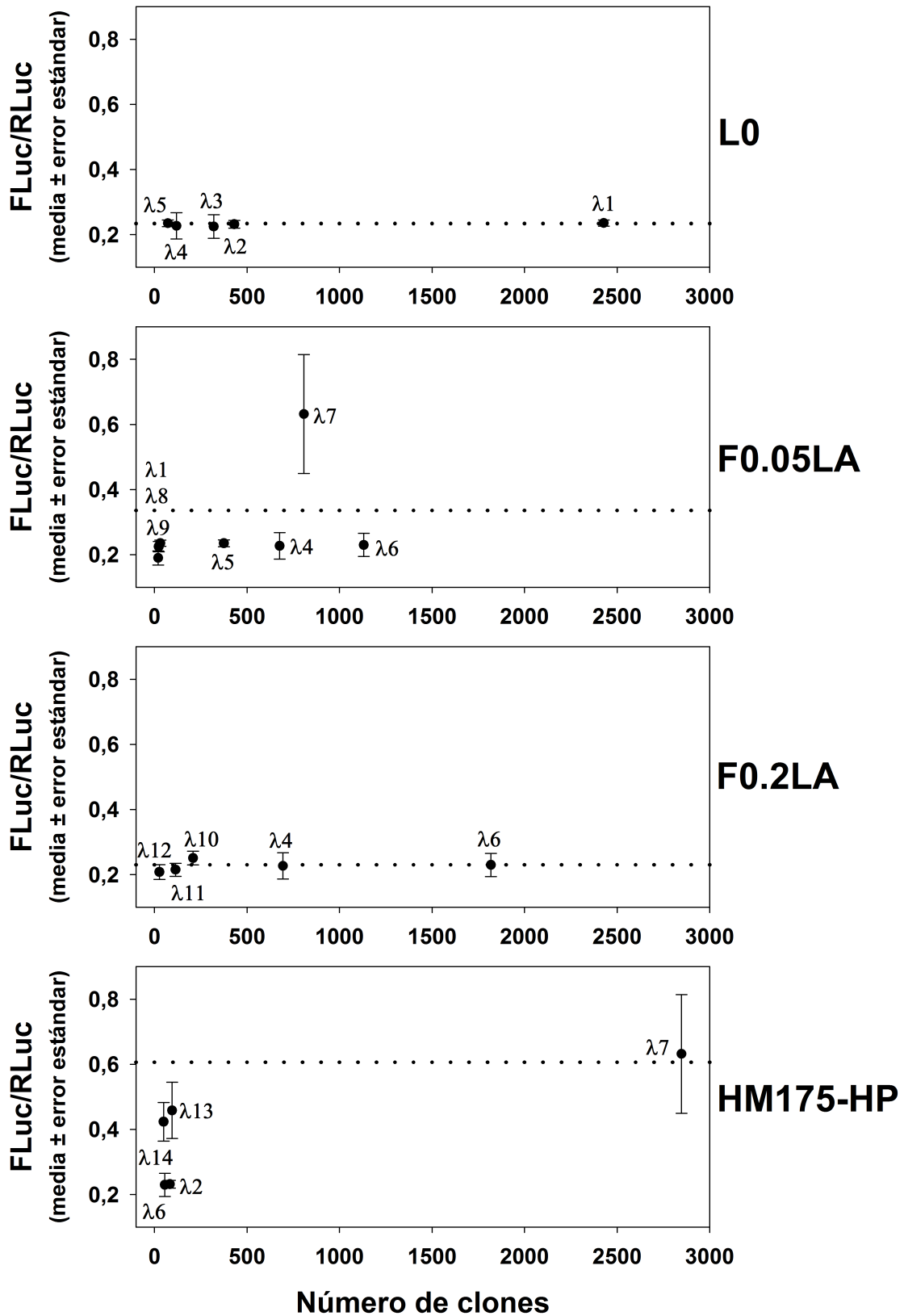


Figura 17. Tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc de los diferentes clones de la región de VP1 que componen las cuasiespecies de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. La línea punteada señala el valor medio de la tasa de traducción de la respectiva cuasiespecie.

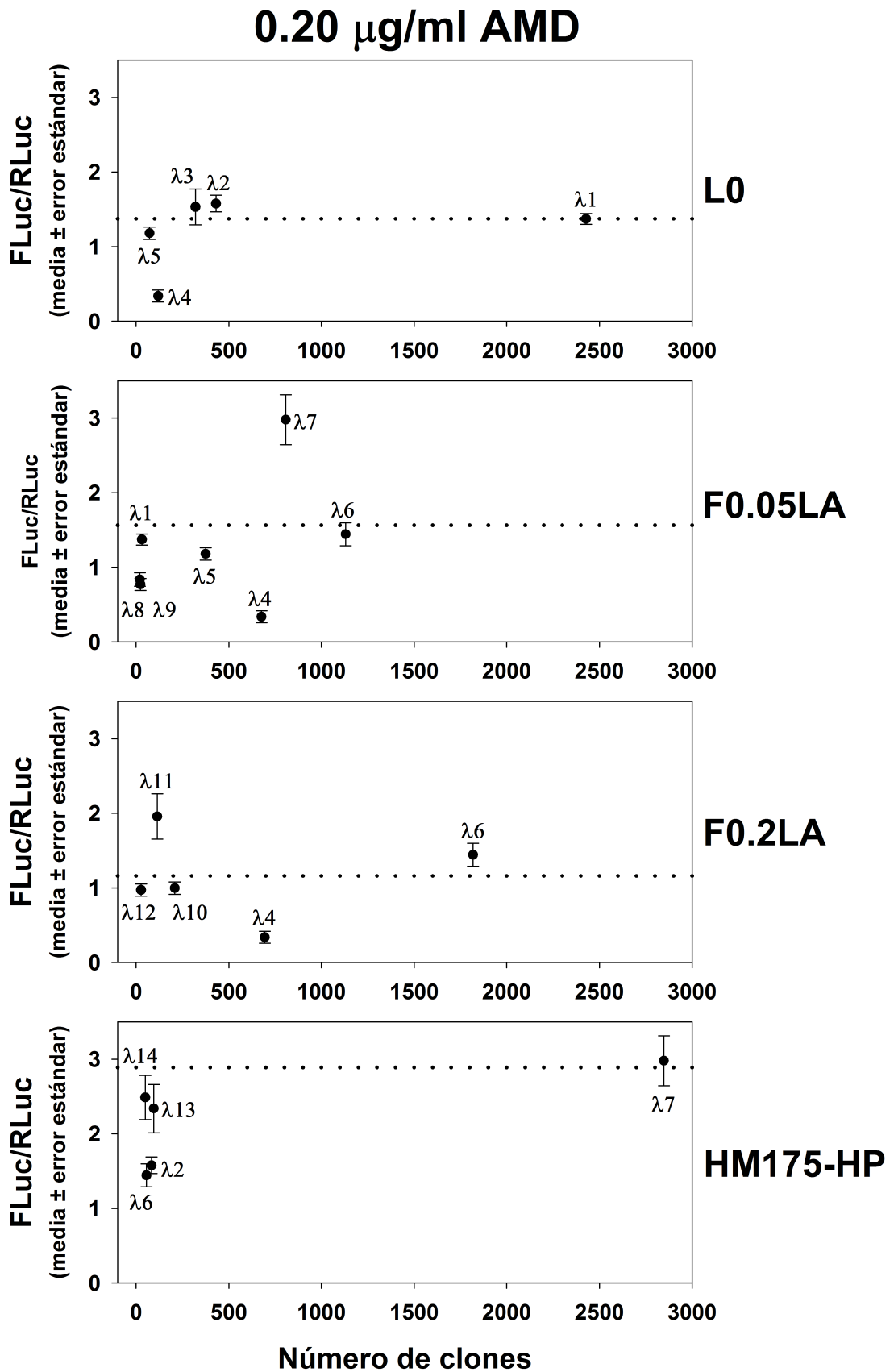


Figura 18. Tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc de los diferentes clones de la región de VP1 que componen las cuasiespecies de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP en presencia de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. La línea punteada señala el valor medio de la tasa de traducción de la respectiva cuasiepecie.

Por tanto, se observó claramente la tendencia de HM175-HP a traducir a una mayor velocidad en la región de VP1 estudiada, lo cual ayudaría a explicar, al menos en parte, el hecho de que sea una población de rápido crecimiento.

El tener en cuenta solamente los valores de las medias de traducción de las cuasiespecies en su conjunto, puede llevar a conclusiones sesgadas y en muchos casos erróneas, y ello se observa también con el análisis de los intervalos de confianza del valor real de la tasa media de traducción. Un ejemplo muy claro es lo que ocurre entre las cuasiespecies de las poblaciones F0.05LA y HM175-HP en condiciones de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD (ver Figura 19). Si bien se vio una diferencia relevante en la altura de las barras correspondientes a las respectivos valores de las medias de FLuc/RLuc de las poblaciones F0.05LA y HM175-HP (ver Figura 15), no se observó que estos valores fueran estadísticamente diferentes utilizando el método de IC 90%, como se comentó previamente. Sin embargo, es importante resaltar que hay un porcentaje superior al 90% de las secuencias que componen la cuasiespecie de HM175-HP (clones $\lambda 7$, $\lambda 13$ y $\lambda 14$), que contribuyen a que el intervalo en el cual estaría el valor de la tasa media de traducción real de dicha cuasiespecie sea amplio ya que poseen una alta tasa de traducción. La mayoría de estos datos de HM175-HP no se superponen con el intervalo de posibles valores en el cual pueda estar el valor de la media real de la cuasiespecie de F0.05LA (ver Figura 19). Aunque, debido a que el clon $\lambda 7$ que es el que posee una mayor tasa de traducción, que se encuentra representado en un 26% dentro de la cuasiespecie de F0.05LA, induce a la expansión de la tasa de traducción de esta población hacia valores altos, ocasionando un cierto grado de superposición entre los intervalos de confianza de F0.05LA y HM175-HP. De esta forma, el hecho de que en el valor de las medias de estas 2 cuasiespecies no se observen diferencias estadísticamente significativas, no implica que no existan diferencias entre ambas cuasiespecies al tener en cuenta todos los haplotipos que la componen, así como sus proporciones, y no solamente las medias totales de las poblaciones.

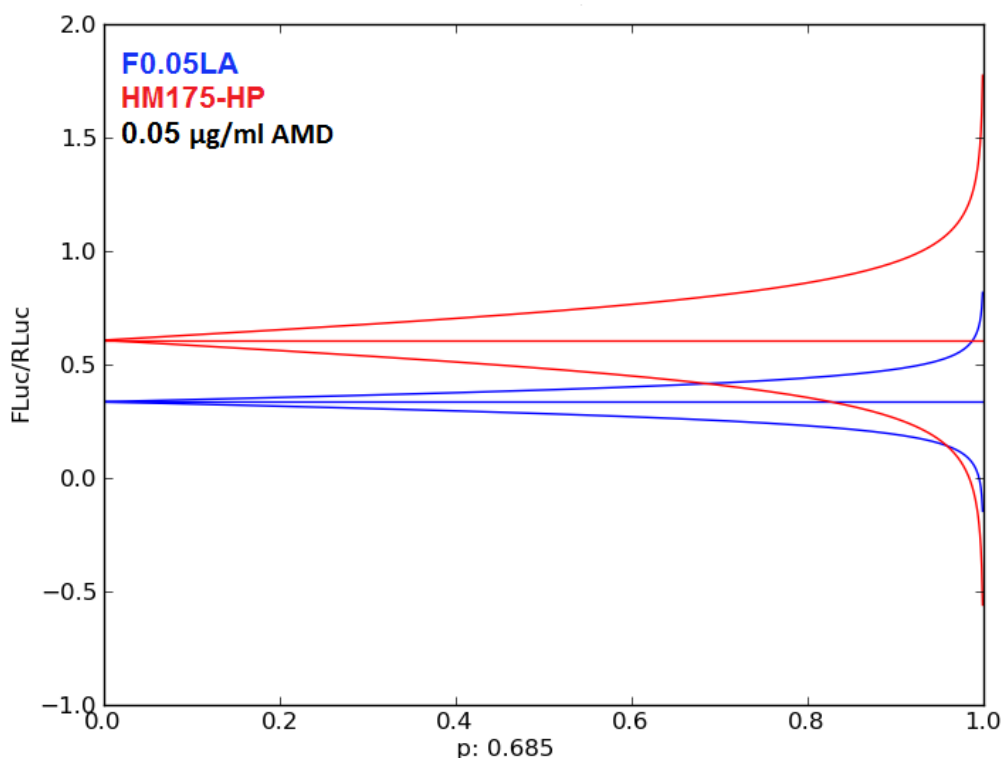


Figura 19. Intervalos de Confianza para las cuasiespecies de F0.05LA y HM175-HP en presencia de 0.05 µg/ml de AMD. Las rectas dentro de los intervalos representan el valor medio del intervalo respectivo. $FLuc/RLuc$ es la relación utilizada como medida de la tasa de traducción; p es la probabilidad de que el valor real de la media de velocidad de traducción se encuentre en el intervalo correspondiente. Con una probabilidad del 68.5% podemos decir que las medias de las dos poblaciones son diferentes (punto de corte entre ambos gráficos), pero el análisis estadístico utilizado requiere un IC del 90% para considerar que las medias son significativamente distintas.

De forma complementaria, en la Tabla 7 se puede ver la composición de cada una de las cuasiespecies en estudio de la región de VP1 según la velocidad de traducción de sus clones respecto a la media de clones de L0. Se vio como en presencia de 0.05 µg/ml de AMD tanto en la cuasiespecie de F0.05LA como de HM175-HP hay porcentajes de clones (26 y 95, respectivamente) que tienen una tasa de traducción significativamente superior a la media de clones de L0. En tanto, en el resto de los clones de dichas cuasiespecies y en el 100% de los correspondientes a L0 y F0.2LA, no se encontraron diferencias significativas con respecto a la media de clones de L0. A su vez, en presencia de 0.2 µg/ml de AMD los porcentajes de clones que en 0.05 µg/ml de AMD tenían una tasa de traducción significativamente superior se mantienen, pero sus valores de FLuc/RLuc aumentan debido a una mayor

disponibilidad de recursos y/o de la maquinaria traduccional de la célula. En la población F0.2LA en 0.2 µg/ml de AMD, se encontró también un 4% de clones que tienen una tasa de traducción significativamente superior a la media de clones de L0. Además, se encontró que en las cuasiespecies de las poblaciones de L0, F0.05LA y F0.2LA hay un porcentaje de clones que traducen a una velocidad significativamente inferior a la media de L0, determinado casi exclusivamente por el clon λ4.

Tabla 7. Composición de las cuasiespecies en estudio de la región de VP1 según la velocidad de traducción expresada como la media ± error estándar, respecto a la media de los clones de L0. =, +, - hace referencia a si los valores de las medias de traducción de los clones no son diferentes significativamente, son significativamente superiores, o significativamente inferiores, con respecto a la media de clones de L0, respectivamente.

| [AMD] µg/ml | Población | % Clones | FLuc/RLuc respecto a media L0 | FLuc/RLuc (media ± error estándar) | Clones ^a |
|----------------|-----------|----------|-------------------------------------|--|---------------------------|
| 0.05 | L0 | 100 | = | 0.233 ± 0.001 | λ1, λ2, λ3, λ4, λ5 |
| | F0.05LA | 74 | = | 0.230 ± 0.001 | λ6, λ4, λ5, λ1, λ8, λ9 |
| | | 26 | + | 0.632 ± 0.183 | λ7 |
| | F0.2LA | 100 | = | 0.230 ± 0.001 | λ6, λ4, λ10, λ11, λ12 |
| | HM175-HP | 5 | = | 0.231 ± 0.001 | λ2, λ6 |
| 95 | | + | 0.592 ± 0.064 | λ7, λ13, λ14 | |
| 0.20 | L0 | 96 | = | 1.410 ± 0.090 | λ1, λ2, λ3, λ5 |
| | | 4 | - | 0.337 ± 0.080 | λ4 |
| | F0.05LA | 50 | = | 1.378 ± 0.079 | λ6, λ5, λ1 |
| | | 26 | + | 2.978 ± 0.335 | λ7 |
| | | 24 | - | 0.374 ± 0.156 | λ4, λ8, λ9 |
| | F0.2LA | 72 | = | 1.394 ± 0.153 | λ6, λ10, λ12 |
| | | 4 | + | 1.956 ± 0.304 | λ11 |
| | | 24 | - | 0.337 ± 0.080 | λ4 |
| HM175-HP | 5 | = | 1.523 ± 0.067 | λ2, λ6 | |
| | 95 | + | 2.953 ± 0.193 | λ7, λ13, λ14 | |

^a Orden según abundancia en la población

Estos resultados estarían sugiriendo que no todos los clones se benefician, en términos de velocidad de traducción, de tener una mayor disponibilidad de los recursos y/o de la maquinaria traduccional de la célula. Este hecho podría explicarse, al menos en parte, por el uso de codones que poseen, lo cual estaría modulando sus respectivas tasas de traducción.

3.3.2.2 Traducción de las cuasiespecies de VP3

En lo que respecta a las cuasiespecies moleculares obtenidas para la región de VP3 se encontró una diversidad de 9 clones o haplotipos diferentes, denominados θ_1 a θ_9 , teniendo en cuenta las 4 poblaciones en estudio. Tal y como ocurrió con las cuasiespecies de la región de VP1, algunos clones no eran específicos de una población particular, sino que se encontraban en más de una de las poblaciones estudiadas (ver Figura 20). En la Tabla 8 se pueden ver las características de los 9 tipos de clones aislados, en las cuales se incluyen los cambios que poseen los mismos con respecto a la cepa *wild type* adaptada a cultivo celular pHM175 43c, las posiciones de los cambios dentro de la proteína VP3, y si esos cambios inducen la aparición de un codón de mayor, menor o igual frecuencia (+, -, =, respectivamente), respecto al uso de codones de la célula humana (ver Tabla 1), considerándose que cambia la frecuencia del nuevo codón respecto al que se encontraba en pHM175 43c, al diferir en al menos un 10% en su frecuencia.

Se encontró que las cuasiespecies moleculares más heterogéneas o complejas eran las correspondientes a F0.05LA y HM175-HP, en las cuales se encontraron 5 clones o haplotipos diferentes en cada una. En la cuasiespecie de la población L0 se encontraron 3 haplotipos diferentes, y al igual que en la región de VP1, la cuasiespecie más homogénea era la correspondiente a F0.2LA con tan sólo 2 haplotipos diferentes (ver Figura 20).

Al observar la Tabla 8 se puede ver que todos los clones aislados comparten 3 cambios con respecto a la cepa pHM175 43c, que se localizan en las posiciones 91, 106 y 113. En el caso de la posición 91 se vio un cambio a un codón más frecuente donde se pasa de un codón con una frecuencia en la célula humana del 29%, a otro con una del 64%. En las otras 2 posiciones los cambios eran a codones menos frecuentes, pasando de un codón con una frecuencia del 100% a uno con una del 33%, y de un codón con una frecuencia del 67% a otro con una del 44%, en las posiciones 106 y 113, respectivamente.

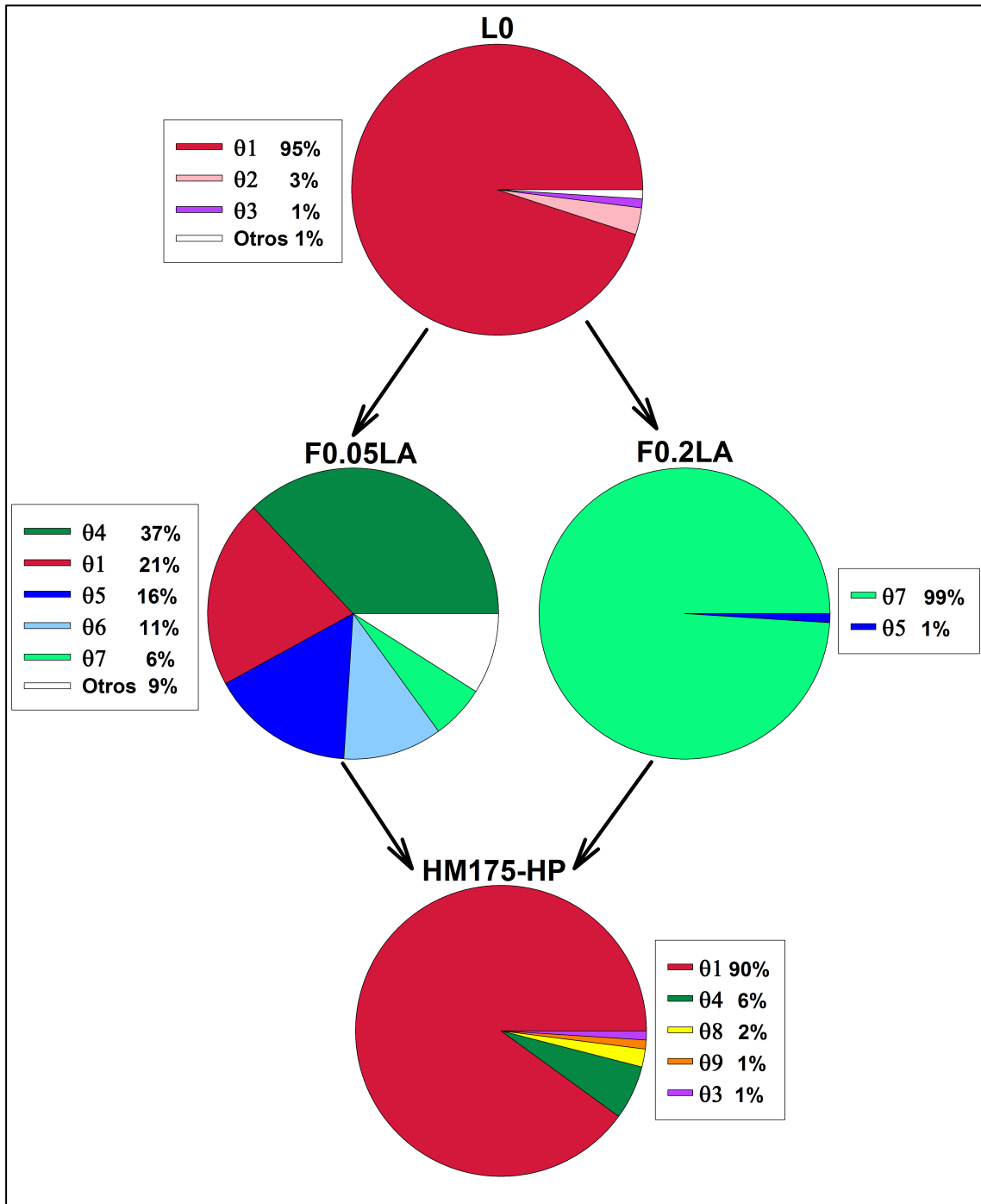


Figura 20. Proporciones de los clones obtenidos para las cuasispecies de L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP de la región de VP3. *Otros*, hace referencia al porcentaje de clones o haplotipos a los que no se les pudo analizar su velocidad de traducción, por no haberlos obtenido en las cuasispecies moleculares clásicas.

Tabla 8. Diferentes clones encontrados en las cuasiespecies de la región de VP3. Cambio codón es con respecto a la cepa *wild type* adaptada a cultivo (pHM175 43c); porcentaje frecuencia hace referencia al porcentaje en el cual se encuentra el codón en la célula humana (ver Tabla 1); aa es aminoácido; +, -, =, representan que el nuevo codón en el clon se encuentra en una mayor, menor o igual frecuencia en la célula humana, respectivamente, considerando que cambia su frecuencia al diferir en al menos un 10% con respecto al codón que había en pHM175 43c.

| Clon | Cambio codón y porcentaje frecuencia | Posición en VP3 (aa) | Cambio Frecuencia |
|------|--------------------------------------|----------------------|-------------------|
| 01 | (100%) E(GAG) → A(GCG) (25%) | 12 | - |
| | (29%) T(ACG) → K(AAA) (64%) | 91 | + |
| | (100%) Q(CAG) → Q(CAA) (33%) | 106 | - |
| | (67%) G(GGA) → G(GGT) (44%) | 113 | - |
| 02 | (100%) E(GAG) → A(GCG) (25%) | 12 | - |
| | (65%) H(CAT) → Y(TAT) (66%) | 50 | = |
| | (29%) T(ACG) → K(AAA) (64%) | 91 | + |
| | (100%) Q(CAG) → Q(CAA) (33%) | 106 | - |
| 03 | (67%) G(GGA) → G(GGT) (44%) | 113 | - |
| | (100%) E(GAG) → A(GCG) (25%) | 12 | - |
| | (100%) I(ATC) → I(ATT) (61%) | 46 | - |
| | (29%) T(ACG) → K(AAA) (64%) | 91 | + |
| 04 | (100%) Q(CAG) → Q(CAA) (33%) | 106 | - |
| | (67%) G(GGA) → G(GGT) (44%) | 113 | - |
| | (100%) E(GAG) → A(GCG) (25%) | 12 | - |
| | (100%) I(ATC) → T(ACC) (100%) | 46 | = |
| 05 | (29%) T(ACG) → K(AAA) (64%) | 91 | + |
| | (100%) Q(CAG) → Q(CAA) (33%) | 106 | - |
| | (67%) G(GGA) → G(GGT) (44%) | 113 | - |
| | (100%) E(GAG) → G(GGG) (68%) | 12 | - |
| 06 | (29%) T(ACG) → K(AAA) (64%) | 91 | + |
| | (100%) Q(CAG) → Q(CAA) (33%) | 106 | - |
| | (67%) G(GGA) → G(GGT) (44%) | 113 | - |
| | (100%) Q(CAG) → R(CGG) (92%) | 33 | = |
| | (65%) E(GAA) → E(GAG) (100%) | 34 | + |
| | (64%) K(AAA) → K(AAG) (100%) | 37 | + |
| | (55%) T(ACT) → A(GCT) (67%) | 49 | + |
| | (70%) F(TTT) → F(TTC) (100%) | 85 | + |
| 07 | (29%) T(ACG) → K(AAA) (64%) | 91 | + |
| | (100%) Q(CAG) → Q(CAA) (33%) | 106 | - |
| | (67%) G(GGA) → G(GGT) (44%) | 113 | - |
| | (100%) E(GAG) → A(GCG) (25%) | 12 | - |
| 08 | (29%) T(ACG) → K(AAA) (64%) | 91 | + |
| | (100%) Q(CAG) → Q(CAA) (33%) | 106 | - |
| | (68%) C(TGT) → S(AGT) (50%) | 109 | - |
| | (67%) G(GGA) → G(GGT) (44%) | 113 | - |
| 09 | (68%) C(TGT) → S(AGT) (50%) | 109 | - |
| | (67%) G(GGA) → G(GGT) (44%) | 113 | - |
| | (100%) E(GAG) → A(GCG) (25%) | 12 | - |
| | (100%) I(ATC) → T(ACC) (100%) | 46 | = |

Para incrementar el número de secuencias de los individuos estudiados, y así poder aproximarnos un poco más a la composición de las cuasiespecies reales de cada una de las poblaciones en estudio para la región de VP3, se analizaron las poblaciones por secuenciación masiva, tal y como se hizo también para la región de VP1. Se ajustaron los resultados obtenidos con esta técnica, con los obtenidos previamente en las cuasiespecies moleculares clásicas para el análisis de la velocidad de traducción (ver Figura 20). Contrastando los resultados obtenidos, se vio que para la región de VP3 estudiada había también (al igual que en VP1) una coincidencia altamente significativa entre los clones o haplotipos encontrados en las cuasiespecies moleculares y los encontrados por secuenciación masiva, en cada una de las 4 poblaciones en estudio (ver Tabla 9). Por lo tanto, esto permitió que fuese posible realizar el análisis de la velocidad de traducción de las cuasiespecies en su conjunto, así como de los diferentes clones individuales de cada una de las poblaciones, teniendo en cuenta prácticamente todas las variantes posibles, ya que en todos los casos se pudo analizar un número de secuencias igual o superior al 91%.

Tabla 9. Resultados obtenidos de la secuenciación masiva para el fragmento de VP3.

| Población | Número de haplotipos obtenidos^a | Número de haplotipos analizados^b | Secuencias totales obtenidas^a | Secuencias totales analizadas^c | Porcentaje secuencias analizadas |
|------------------|---|--|---|--|---|
| L0 | 4 | 3 | 7893 | 7826 | 99 |
| F0.05LA | 9 | 5 | 7482 | 6835 | 91 |
| F0.2LA | 2 | 2 | 7418 | 7418 | 100 |
| HM175-HP | 5 | 5 | 6918 | 6918 | 100 |

^a Por secuenciación masiva

^b Análisis de la velocidad de traducción

^c Ajuste de los análisis de la velocidad de traducción con los resultados de secuenciación masiva

Al observar los resultados obtenidos por secuenciación masiva (ver Tabla 9) se encontró que las cuasiespecies más heterogéneas eran las correspondientes a F0.05LA y HM175-HP con 9 y 5 haplotipos diferentes encontrados, respectivamente, seguidas de L0 y F0.2LA con 4 y 2 haplotipos, respectivamente. Estos resultados para F0.2LA están en acuerdo también, tal y como se vio para la región de VP1, con el hecho de que en un ambiente muy restrictivo, como lo es un alto grado de silenciamiento celular, sólo un grupo de

clones muy adaptados son capaces de sobrevivir. En cambio, en condiciones de ausencia y de silenciamiento celular moderado, al no ser el ambiente tan restrictivo, permite la co-existencia de una mayor variabilidad de haplotipos.

En cuanto a la distribución de los diferentes clones de la región de VP3 de cada cuasiespecie analizada (ver Figura 20), se vio que a pesar de que algunos clones se encontraban en más de una población como ocurría en las cuasiespecies de VP1, el patrón de distribución de los clones en las poblaciones era bastante diferente a VP1. Se vio que θ_1 , el clon dominante de L0 (95%), se encontraba en un 21% en F0.05LA y en un 90% en HM175-HP, mientras estaba ausente en F0.2LA. Asimismo, a diferencia de lo que ocurría con la región de VP1, los clones minoritarios de L0 (θ_2 y θ_3) no se encontraron en las poblaciones F0.05LA y F0.2LA, las cuales derivan de L0. Sin embargo, se observó la emergencia de nuevos clones como θ_5 y θ_7 tanto en la población de F0.05LA como de F0.2LA, y también θ_4 y θ_6 en F0.05LA. Por otra parte, en cuanto a la población HM175-HP se vio que además de su clon dominante, se encontraba el clon θ_4 , seleccionado a partir de la población F0.05LA ya que es la única que lo posee. También se observó la emergencia de los clones minoritarios θ_8 y θ_9 (2% y 1%, respectivamente), los cuales están ausentes en las otras poblaciones, y la presencia minoritaria del clon θ_3 (1%) el cual también fue encontrado en la población L0. Por tanto, este último clon podría representar un ejemplo de lo que se denomina memoria de cuasiespecie.

Es importante destacar que al observar las distribuciones de clones de las diferentes cuasiespecies de VP1 y VP3, resulta intuitivo pensar (aunque no se puede asegurar porque sólo se tienen regiones discretas del genoma por separado) que muy probablemente las secuencias correspondientes al clon λ_7 en VP1 y al clon θ_1 en VP3, formarían parte de un mismo genoma/individuo. Este individuo sería seleccionado a partir de la población F0.05LA para obtener una nueva población de rápido crecimiento, ya que en F0.05LA λ_7 y θ_1 se encuentran en unas proporciones del 26% y 21%, respectivamente, y en HM175-HP se encuentran en unas proporciones del 89% y 90%, respectivamente.

Con el fin de estudiar la tasa o velocidad de traducción de las diferentes poblaciones del VHA, se midieron las actividades de bioluminiscencia de las 2 luciferasas (*Firefly* o *FLuc* y *Renilla* o *RLuc*) presentes en los vectores

bicistronicos en los cuales fueron clonadas las regiones de VP3 de las 4 poblaciones en estudio, y que diferían entre si en el uso de codones.

En primer lugar se analizaron los porcentajes de bioluminiscencia obtenidos en presencia de 0.05 y 0.20 µg/ml de AMD, en comparación a los resultados obtenidos en ausencia de AMD para ambas luciferasas estudiadas, en el vector bicistronico de estudio (G1RC) en ausencia de los respectivos fragmentos de VP3 clonados en el mismo (ver Figura 21). Tal y como se comentó en el apartado 3.3.2.1 del presente Capítulo, se encontró que tanto en la bioluminiscencia de *Renilla* como en la de *Firefly*, había una clara inhibición dosis dependiente de la concentración de AMD presente, con un valor medio del $43 \pm 12\%$ en presencia de 0.05 µg/ml de AMD, y del $1 \pm 1\%$ en presencia de 0.20 µg/ml de AMD para *RLuc*, con respecto a 0.00 µg/ml de AMD. En el caso de *FLuc* se obtuvo un valor medio del $49 \pm 16\%$ en presencia de 0.05 µg/ml de AMD, y del $6 \pm 1\%$ en presencia de 0.20 µg/ml de AMD, con respecto a 0.00 µg/ml de AMD. Estos resultados permiten establecer un paralelismo entre el comportamiento de las bioluminiscencias de *Renilla* y *Firefly*.

En lo que respecta a las 4 poblaciones en estudio, se vio un patrón similar al observado para la región de VP1. En la bioluminiscencia de *Renilla* también se vio una clara inhibición dosis dependiente de la concentración de AMD presente, con valores de medias que oscilan entre 26 a 30% en presencia de 0.05 µg/ml de AMD, y entre 2 a 3% en presencia de 0.20 µg/ml de AMD entre las poblaciones, con respecto a 0.00 µg/ml de AMD. En lo que respecta a la bioluminiscencia de *Firefly*, también se vio una inhibición de la misma en presencia de AMD, pero no tan significativa como se observó para *RLuc*. En condiciones de 0.05 µg/ml de AMD se obtuvieron valores de medias entre 58 a 63%, y en presencia de 0.20 µg/ml de AMD de 40 a 46% entre las poblaciones, con respecto a 0.00 µg/ml de AMD (ver Figura 21). En estos casos el paralelismo entre el comportamiento de las bioluminiscencias de *Renilla* y *Firefly* no es evidente.

De la misma forma que sucedió con los resultados obtenidos con la región de VP1 clonada, los datos obtenidos con las regiones de VP3 sugerirían que algún factor estaría afectando el comportamiento de *FLuc* en presencia del fragmento de VP3.

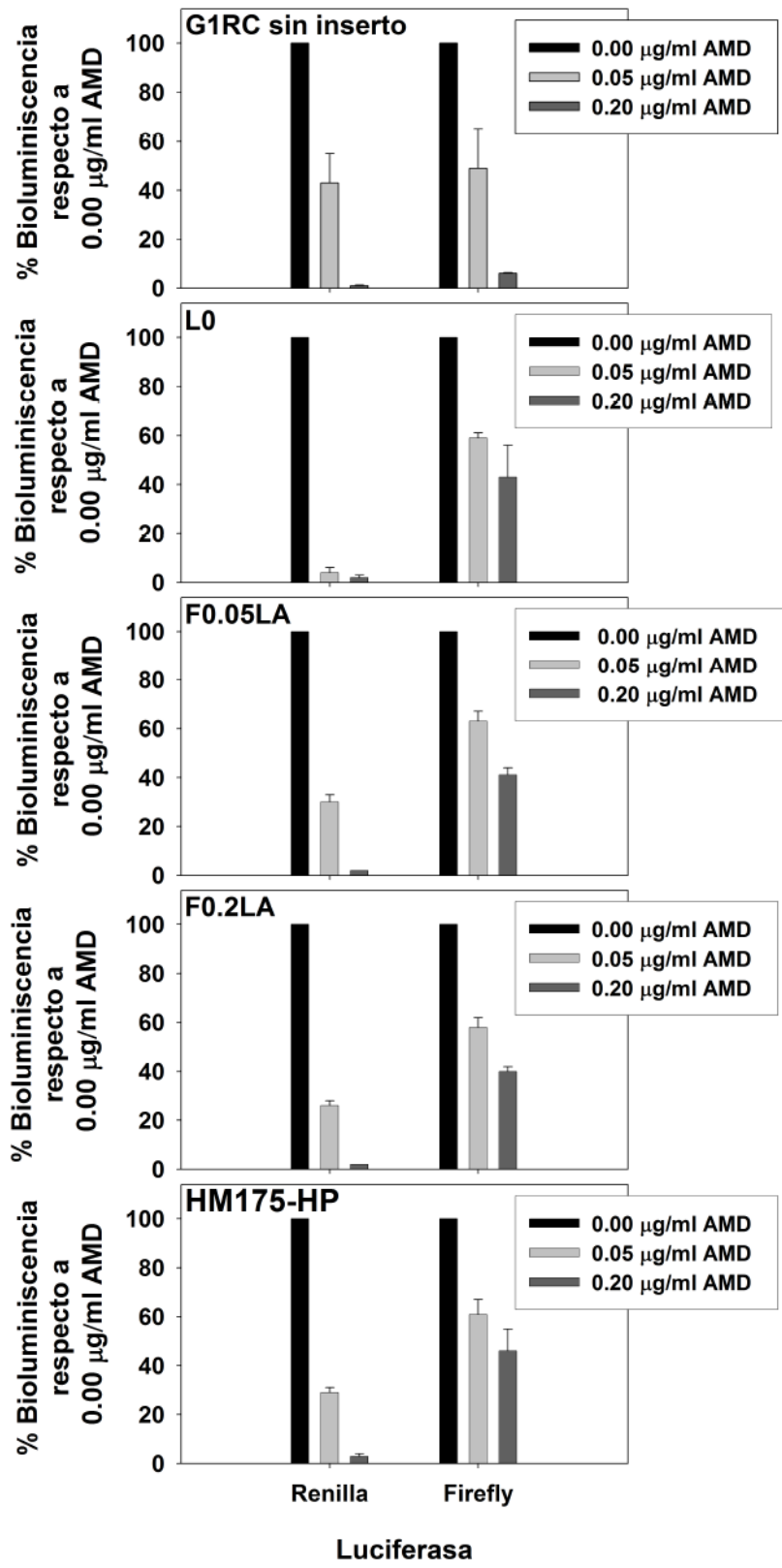


Figura 21. Porcentajes de bioluminiscencia de las luciferasas de *Renilla* y *Firefly* en presencia de 0.05 y 0.20 µg/ml de AMD, con respecto a sus respectivos valores obtenidos en ausencia de AMD. Estas luciferasas se encuentran en el vector bicistrónico de trabajo (G1RC) que posee clonado, justo antes del gen codificante para *Firefly luciferase*, la región de VP3 correspondiente a los respectivos haplotipos de L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP. Se analizó también los porcentajes de bioluminiscencia de las respectivas luciferasas para el vector bicistrónico de trabajo sin inserto.

Por tanto, lo que podría estar influyendo en las actividades bioluminiscentes de *Firefly* en presencia de AMD sería el uso de codones que posee la secuencia de VP3 clonada justo antes del gen *FLuc*, el cual modularía la velocidad de traducción de la misma, ya que como se vio anteriormente en la Figura 12, esta región tiene un uso de codones donde dominan los colores amarillo y verde en presencia de AMD, y los colores amarillo y rojo en ausencia de AMD.

Posteriormente, se utilizaron las actividades bioluminiscentes de *Firefly* y *Renilla* como una medida de la tasa de traducción de las poblaciones analizadas, y para normalizar los datos obtenidos se utilizó la relación FLuc/RLuc. De esta forma, utilizando esta metodología se analizaron todos los clones posibles para la región de VP3, con el propósito de obtener una medida de la tasa de traducción de la cuasiespecie en su conjunto para la región estudiada de las 4 poblaciones analizadas. Se vio que tanto en ausencia de AMD, como a niveles moderados y altos de *shut-off* de la transcripción celular (0.05 µg/ml y 0.20 µg/ml de AMD, respectivamente), no habían diferencias estadísticamente significativas, utilizando el método de IC al 90%, entre las tasas de traducción de las cuasiespecies de todas las poblaciones, dentro de cada una de las condiciones estudiadas (ver Figura 22).

Es importante destacar que los valores de las tasas de traducción registrados para las 4 poblaciones en estudio eran significativamente más bajos en la región de VP3 que en VP1, del orden de 10 veces menos, tanto en ausencia de AMD como en presencia de la misma a concentraciones de 0.05 y 0.20 µg/ml.

A pesar de que los valores de las tasas de traducción medias de las diferentes cuasiespecies no eran significativamente distintos entre si en una condición de silenciamiento celular determinada, la composición de individuos de las respectivas cuasiespecies no era la misma. Por tanto, análogamente a como se hizo para las cuasiespecies correspondientes a la región de VP1, y para no realizar interpretaciones sesgadas en cuanto a las velocidades de traducción, se hicieron gráficos donde se analizaron los valores de FLuc/RLuc correspondientes a los diferentes haplotipos en función de su frecuencia en la población, para cada una de las condiciones de silenciamiento celular estudiadas (ver Figuras 23, 24 y 25).

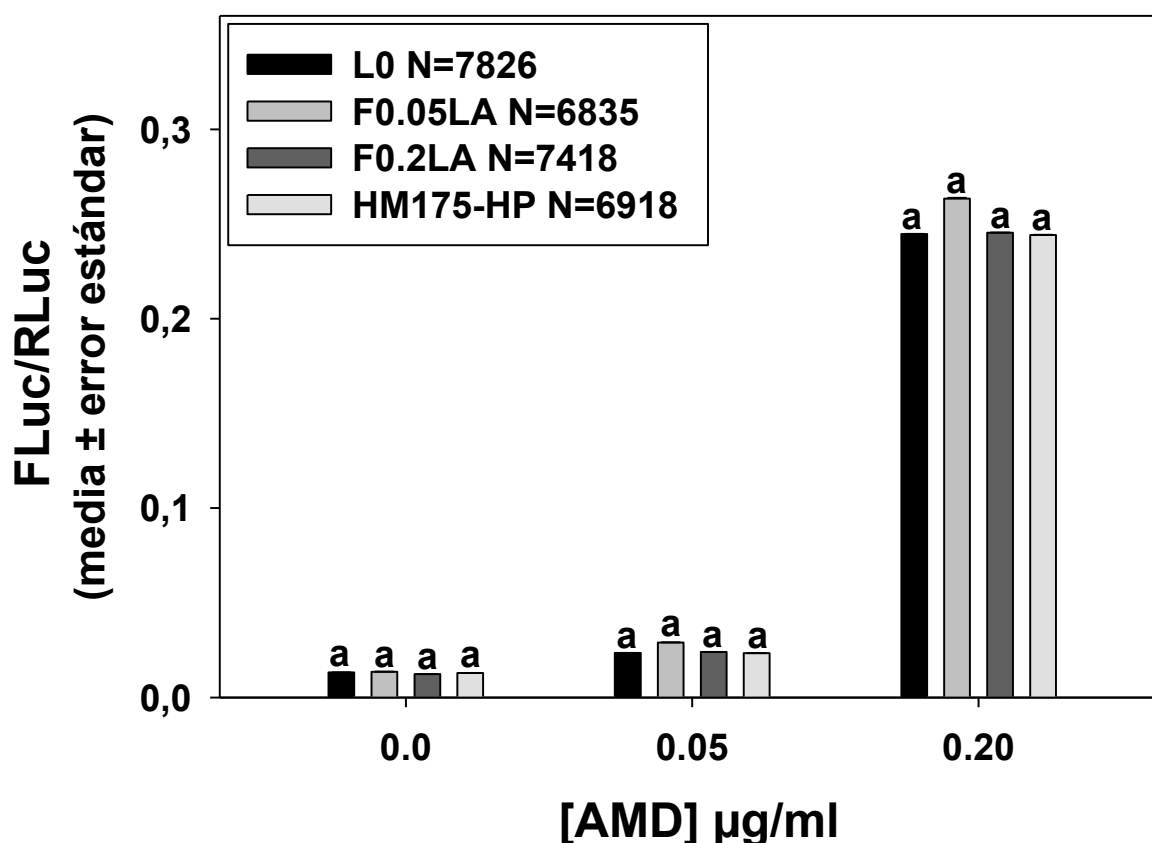


Figura 22. Tasa de traducción de las cuasiespecies de las poblaciones de L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP en la región de VP3, en condiciones de ausencia, 0.05 µg/ml y 0.20 µg/ml de AMD. Las N corresponden al número de secuencias analizadas para cada una de las poblaciones. Las diferencias estadísticamente significativas utilizando el método del IC al 90% entre las cuasiespecies de diferentes poblaciones en una misma condición de *shut-off* de la transcripción celular, se señalan utilizando el criterio de letras a=ab; ab=b; a≠b.

En la Figura 23, donde se observa la composición de las 4 cuasiespecies en condiciones de ausencia de AMD se puede observar que el valor de la media de la tasa de traducción es similar en todas, con valores de 0.013 ± 0.001 para L0 y HM175-HP, 0.014 ± 0.001 para F0.05LA y 0.012 ± 0.001 para F0.2LA. Sin embargo, al analizar los paneles de L0 y HM175-HP, se encontró que si bien en ambas poblaciones el clon mayoritario es θ_1 ya que se encuentra en un 96% y 90%, respectivamente, y por tanto es el responsable casi exclusivo de los valores de las medias de traducción obtenidos, también estas cuasiespecies están integradas por otros clones. En L0 hay 2 tipos de clones que poseen una tasa de traducción superior al valor de la media de traducción de la población (θ_2 y θ_3), y en HM175-HP hay 2 tipos de clones con tasas de traducción mayor (θ_3 y θ_9) y 2 con tasas de traducción menores (θ_4 y

θ8), con respecto al valor de la media de la población. En F0.05LA, no hay ningún clon que se encuentre en un porcentaje muy elevado, y por tanto, el valor de la media de traducción de la población es bastante equivalente al de todos sus clones individuales que son θ4, θ1, θ5, θ6 y θ7 (siguiendo el orden de abundancia en la población) (ver Figura 23). En cuanto a F0.2LA hay un haplotipo que se encuentra en un 99% (θ7), y por tanto es el responsable del valor medio de traducción obtenido, a pesar, de que el haplotipo que se encuentra en una proporción del 1% (θ5) tiene una mayor tasa de traducción (ver Figura 23).

En condiciones de 0.05 µg/ml de AMD (ver Figura 24), se observó un patrón bastante similar al observado en ausencia de AMD, pero las tasas de traducción eran un poco superiores, obteniéndose valores de 0.024 ± 0.001 para L0 y F0.2LA, 0.029 ± 0.001 para F0.05LA y 0.023 ± 0.001 para HM175-HP. Al igual que en ausencia de AMD, en L0 el clon dominante θ1 traduce como el valor de la media de la población, y los clones minoritarios (θ2 y θ3) tienen una mayor tasa de traducción respecto al valor de la media de la población (ver Figura 24). En F0.05LA hay una mezcla de diferentes clones con distintas tasas de traducción, donde su clon mayoritario (θ4) tiene una tasa de traducción igual al valor de la media de la población, mientras que los clones θ1 y θ7 tienen tasas de traducción menores, y los clones θ5 y θ6 tienen tasas de traducción mayores, con respecto al valor medio de la población. En cuanto a F0.2LA, su clon mayoritario (θ7) tiene una tasa de traducción igual al valor de la media de la población y su clon minoritario (θ5) tiene una tasa de traducción mayor. Por último, en la población HM175-HP el clon mayoritario (θ1) tiene una tasa de traducción igual a la media de la población, 3 clones minoritarios tienen tasas de traducción superiores al valor de la media de la población (θ3, θ4 y θ9) y otro clon minoritario (θ8) tiene una tasa de traducción similar a la media de la población (ver Figura 24).

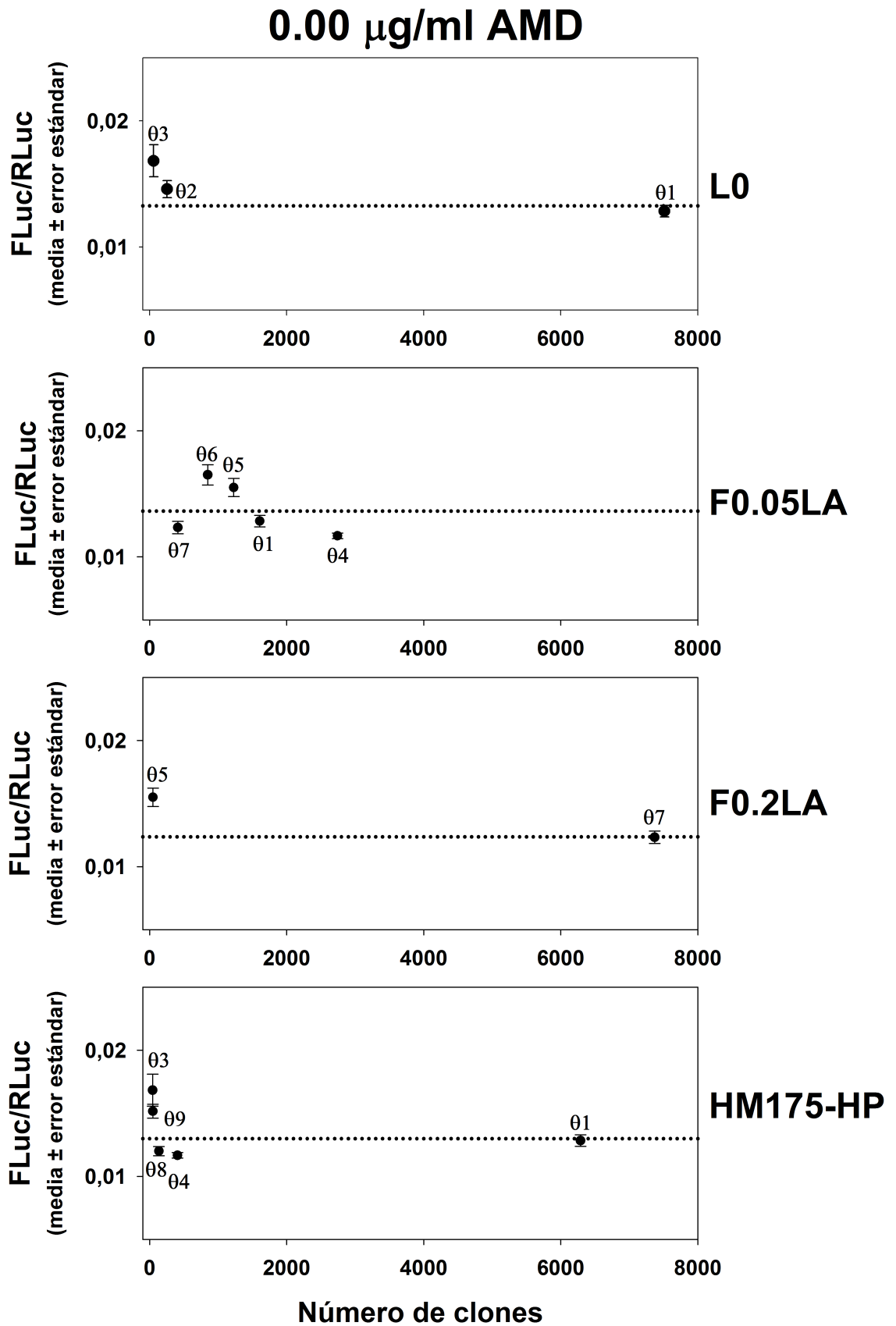


Figura 23. Tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc de los diferentes clones de la región de VP3 que componen las cuasiespecies de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP en presencia de 0.00 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. La línea punteada señala el valor medio de la tasa de traducción de la respectiva cuasiepecie.

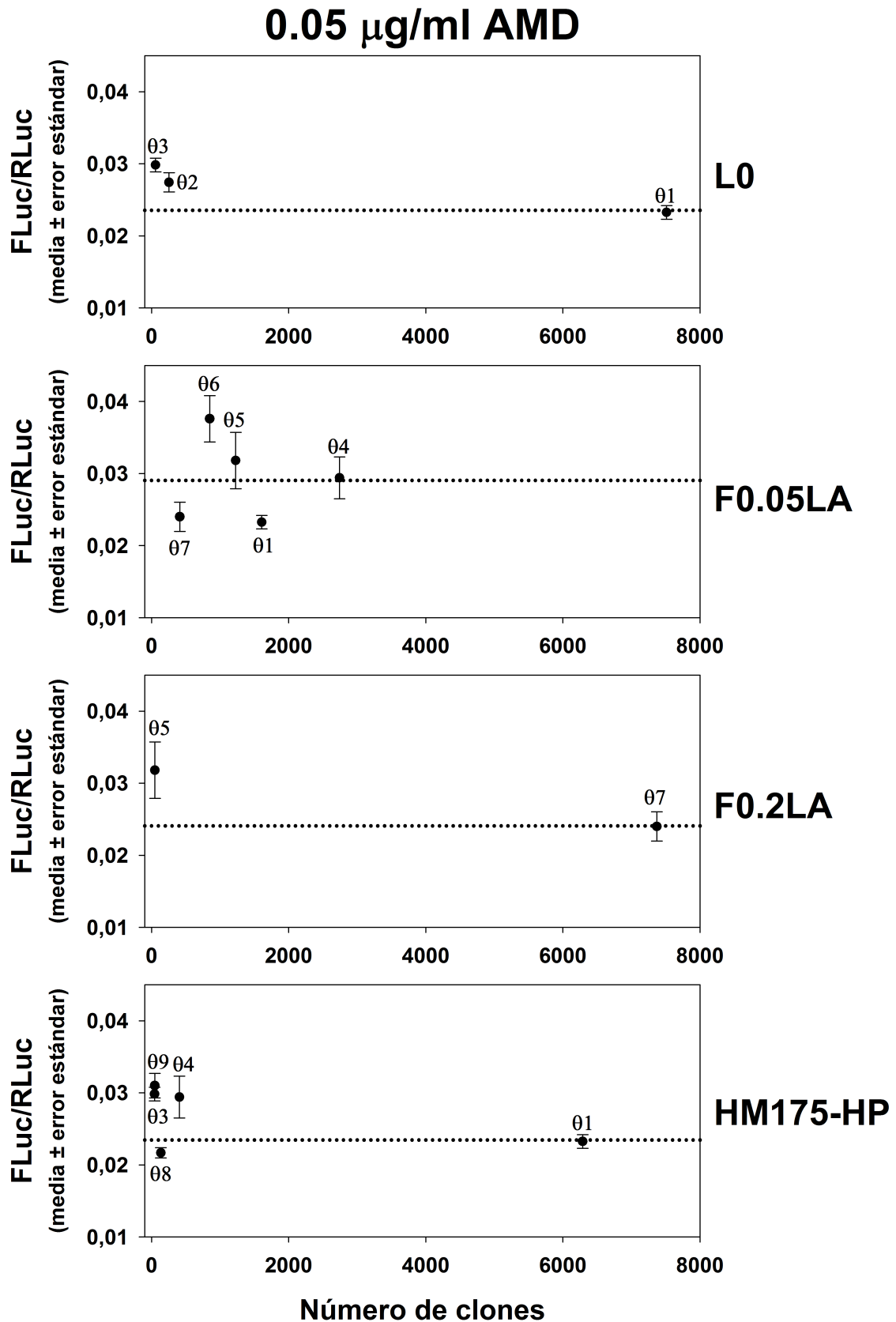


Figura 24. Tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc de los diferentes clones de la región de VP3 que componen las cuasiespecies de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. La línea punteada señala el valor medio de la tasa de traducción de la respectiva cuasiepecie.

En condiciones de silenciamiento celular alto (ver Figura 25), las tasas de traducción de los clones individuales aumentaron, y por tanto también lo hicieron las correspondientes a las medias de las cuasiespecies, obteniéndose valores de tasas de traducción a nivel poblacional de 0.245 ± 0.001 para L0 y F0.2LA, 0.263 ± 0.001 para F0.05LA y 0.244 ± 0.001 para HM175-HP. En las 4 cuasiespecies, sus respectivos clones dominantes poseían una tasa de traducción igual al valor de la tasa de traducción media de su respectiva cuasiespecie. A su vez, tanto en L0 como en F0.2LA, el resto de sus clones tenían tasas de traducción superiores al valor de la media de traducción de sus respectivas poblaciones. En F0.05LA el clon θ_5 tenía una tasa de traducción mayor, y los clones θ_1 , θ_6 y θ_7 tenían tasas de traducción inferiores al valor de la tasa de traducción media de la población (ver Figura 25). Finalmente, HM175-HP tenía 2 clones (θ_3 y θ_4) que traducían a una tasa superior, 1 clon (θ_9) que traducía a una tasa inferior, y otro (θ_8) a una tasa similar al valor de la tasa media de traducción de la población (ver Figura 25). De este modo, si bien el valor de la tasa de traducción a nivel poblacional de F0.05LA, es ligeramente superior en las 3 condiciones de silenciamiento celular estudiado en comparación a las otras poblaciones, estas diferencias no son significativas. Por otra parte, es interesante destacar el hecho de que la población HM175-HP haya seleccionado como clon dominante a θ_1 en lugar de θ_7 , que posee una tasa de traducción muy similar (se retomará este caso en el próximo Capítulo donde se analiza el efecto de 3 mutaciones en el IRES). Por lo tanto, en la región de VP3, a diferencia de lo que ocurre en la región de VP1, se puede considerar que todas las poblaciones traducen a una misma velocidad.

0.20 $\mu\text{g/ml}$ AMD

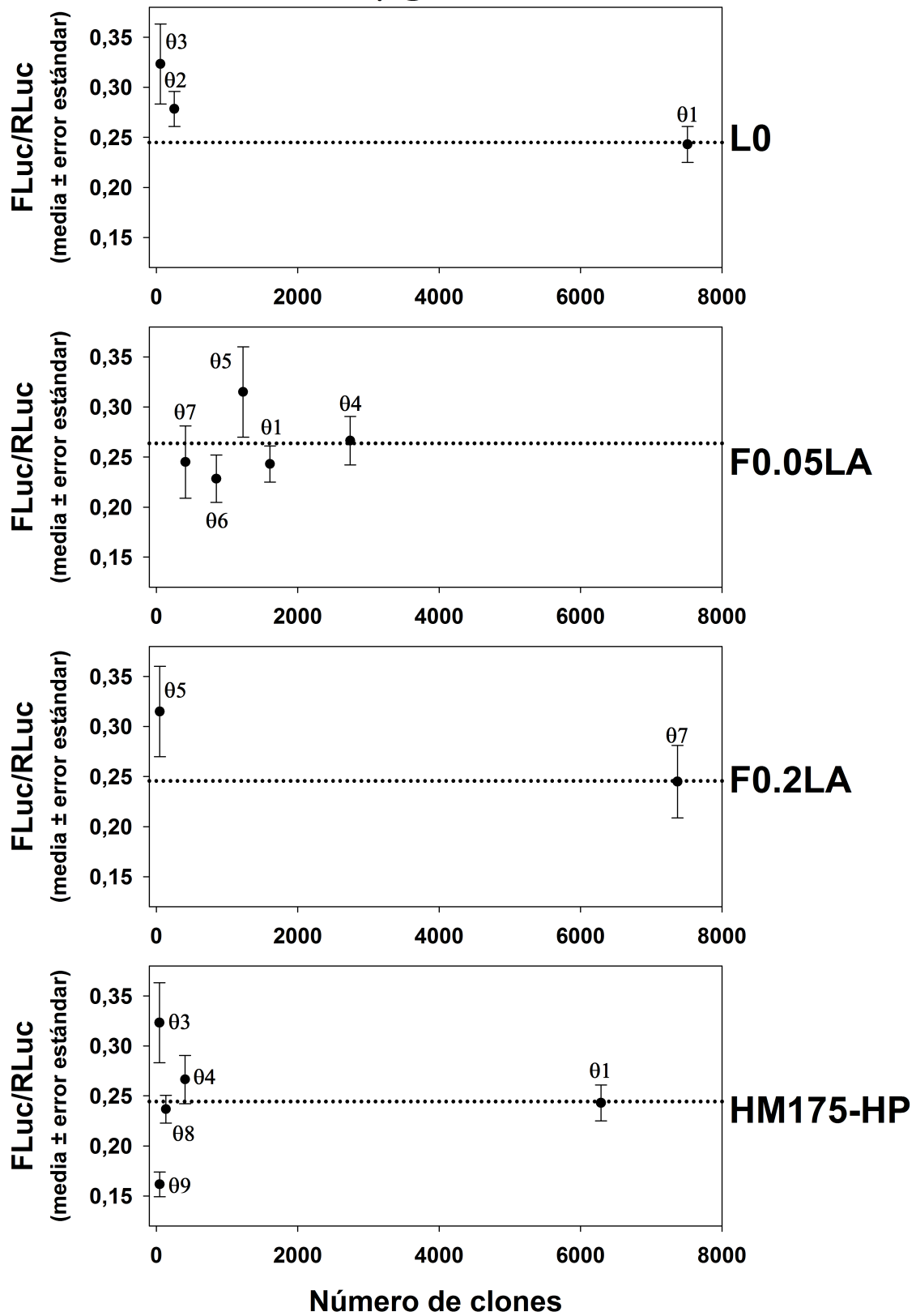


Figura 25. Tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc de los diferentes clones de la región de VP3 que componen las cuasiespecies de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP en presencia de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. La línea punteada señala el valor medio de la tasa de traducción de la respectiva cuasiepecie.

Complementariamente, en la Tabla 10 se puede ver la composición de cada una de las cuasiespecies en estudio de la región de VP3 según la velocidad de traducción de sus clones respecto a la media de clones de L0. Se vio que en presencia de 0.05 µg/ml de AMD, la mayoría de los clones tienen una velocidad de traducción que no es significativamente diferente a la de la media de los clones de L0. Sin embargo, en las cuasiespecies de F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP se vio que un 30%, 1% y 1% de los clones, respectivamente, mostraban una velocidad de traducción significativamente superior. A su vez, en la cuasiespecie correspondiente a HM175-HP se vio que un 2% de clones poseían una tasa de traducción significativamente inferior a la media de clones de L0. No obstante, es importante destacar que si bien existen diferencias significativas entre las tasas de traducción de algunos clones y la media de clones de L0, en la Tabla 10 se puede ver que estas diferencias no son muy relevantes.

En cambio, en un estudio análogo pero en presencia de 0.20 µg/ml de AMD, todos los clones a excepción de un 1% presente en la cuasiespecie de HM175-HP (θ9) poseen tasas de traducción similares a la media de clones de L0, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ellas (ver Tabla 10). Estos datos estarían sugiriendo la existencia de una especie de optimización u homogeneización en las tasas de traducción de los diferentes clones, probablemente debido a sus respectivos usos de codones, a pesar de que existan pequeñas variaciones nucleotídicas entre ellos.

Por otra parte, es interesante destacar el hecho de que en la población F0.05LA en presencia de 0.05 µg/ml de AMD, había un 30% de clones (θ5 y θ6) que tenían unas tasas de traducción significativamente superiores a la media de traducción de los clones de L0. En tanto, los mismos clones en presencia de 0.20 µg/ml de AMD, mostraban tasas de traducción similares a la media de traducción de los clones de L0.

Tabla 10. Composición de las cuasiespecies en estudio de la región de VP3 según la velocidad de traducción expresada como la media \pm error estándar, respecto a la media de los clones de L0. =, +, - hace referencia a si los valores de las medias de traducción de los clones no son diferentes significativamente, son significativamente superiores, o significativamente inferiores, con respecto a la media de clones de L0, respectivamente.

| [AMD] $\mu\text{g/ml}$ | Población | % Clones | FLuc/RLuc respecto a media L0 | FLuc/RLuc (media \pm error estándar) | Clones ^a |
|---------------------------|-----------|----------|-------------------------------------|--|-----------------------|
| 0.05 | L0 | 100 | = | 0.024 \pm 0.001 | 01, 02, 03 |
| | F0.05LA | 70 | = | 0.027 \pm 0.002 | 04, 01, 07 |
| | | 30 | + | 0.034 \pm 0.003 | 05, 06 |
| | F0.2LA | 99 | = | 0.024 \pm 0.002 | 07 |
| | | 1 | + | 0.032 \pm 0.004 | 05 |
| | HM175-HP | 97 | = | 0.024 \pm 0.002 | 01, 04, 03 |
| 1 | | + | 0.031 \pm 0.002 | 09 | |
| 0.20 | L0 | 2 | - | 0.022 \pm 0.001 | 08 |
| | | 100 | = | 0.245 \pm 0.001 | 01, 02, 03 |
| | F0.05LA | 100 | = | 0.263 \pm 0.001 | 04, 01, 05, 06, 07 |
| | | 100 | = | 0.245 \pm 0.001 | 07, 05 |
| | HM175-HP | 99 | = | 0.245 \pm 0.002 | 01, 04, 08, 03 |
| 1 | | - | 0.162 \pm 0.012 | 09 | |

^a Orden según abundancia en la población

3.3.3 Efecto del uso de codones en la modulación de la velocidad de traducción

Con el fin de estudiar el efecto del uso de codones en la modulación de la velocidad de traducción de los clones de las poblaciones del VHA en estudio, se comparó la tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc de la media de los clones de L0 (ya que a partir de esta población se obtuvo el resto de las poblaciones) y la de clones individuales de las diferentes poblaciones, tanto para la región de VP1 como para VP3, y en condiciones de ausencia, 0.05 $\mu\text{g/ml}$ y 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD.

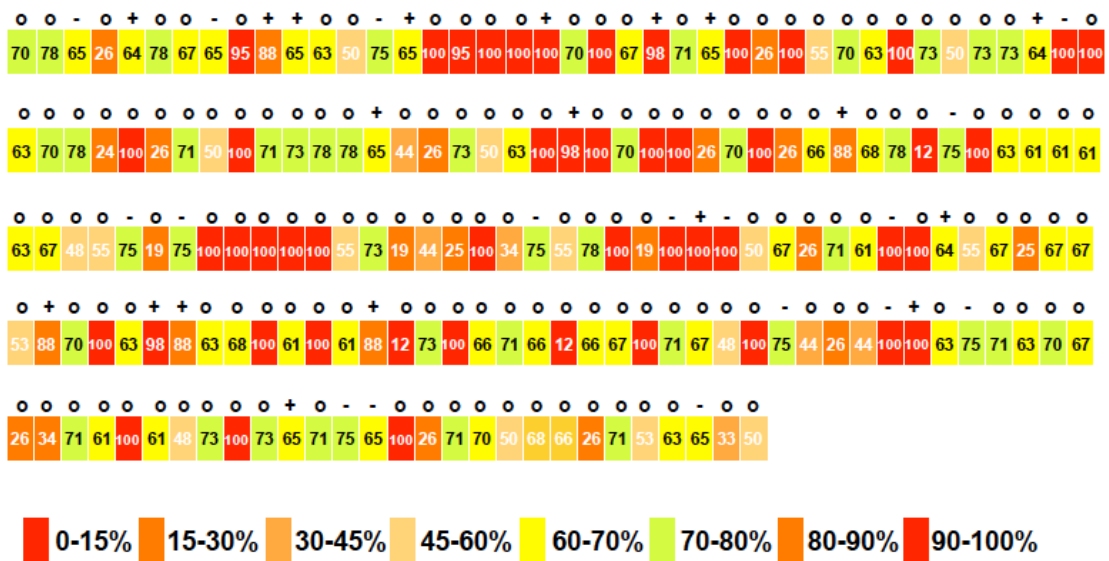
Para comprender el efecto de cambios puntuales en el uso de codones en lo que respecta a la modulación de la velocidad de traducción, es importante tener en cuenta todo el contexto en el cual se produce el cambio. Por esta razón, se hicieron las Figuras correspondientes al uso de codones para las regiones de VP1 y VP3 según una gradación de colores, donde además se incluye para cada codón su porcentaje de uso en la célula humana, las cargas

electrostáticas de los aa que codifican y todos los cambios que se han registrado en los diferentes clones obtenidos (ver Figuras 26 y 27). Es interesante destacar que en ausencia de AMD, al haber competencia con la célula, aquellos codones altamente abundantes se traducirían a una baja velocidad en el virus, ya que son altamente utilizados por la célula. En cambio, en presencia de AMD la competencia con la célula disminuye considerablemente, y por tanto aumentaría la velocidad de traducción de los codones víricos altamente utilizados por la célula. Estos efectos se pueden observar en las Figuras 14 y 21, donde la bioluminiscencia de *Firefly* en los vectores con fragmentos genómicos del VHA es superior a los vectores sin fragmento, sobretodo en condiciones de alto silenciamiento celular comparado a condiciones sin silenciamiento. Además la bioluminiscencia de *Firefly* en condiciones de silenciamiento versus no silenciamiento es significativamente mayor que la bioluminiscencia de *Renilla*. Ello sugiere que los fragmentos del genoma del VHA en ausencia de silenciamiento frenan la tasa de traducción del gen *FLuc* debido a la gran abundancia de codones raros por competencia (ver Figuras 26 y 27). En tanto, en condiciones de silenciamiento celular, muchos de estos codones van a ser traducidos más eficientemente (ver Figuras 26 y 27), y por ende van a incrementar la traducción de *FLuc*.

Otro factor importante de la modulación de la tasa de traducción, es la presencia de regiones ricas en codones que codifiquen aminoácidos cargados positivamente, ya que pueden interactuar con las paredes del túnel de salida del ribosoma y enlentecer la salida de la proteína recientemente sintetizada hacia el exterior del mismo. Además, la presencia de estructuras en el ARNm pueden influir de forma negativa en la tasa de traducción. Estos factores moduladores van a ser analizados en los siguientes subapartados.

Por otra parte, con el fin de conocer la ubicación de los fragmentos analizados de las proteínas de VP1 y VP3 y de los cambios más relevantes en la modulación de la tasa de traducción de las respectivas regiones, se adaptó la imagen de un protómero del VHA, recientemente publicado por Wang y colaboradores en el año 2015 (ver Figura 28), y en ella se señalaron tanto los fragmentos de las regiones estudiadas como las posiciones más relevantes en la modulación de sus respectivas tasas de traducción.

SIN AMD



AMD

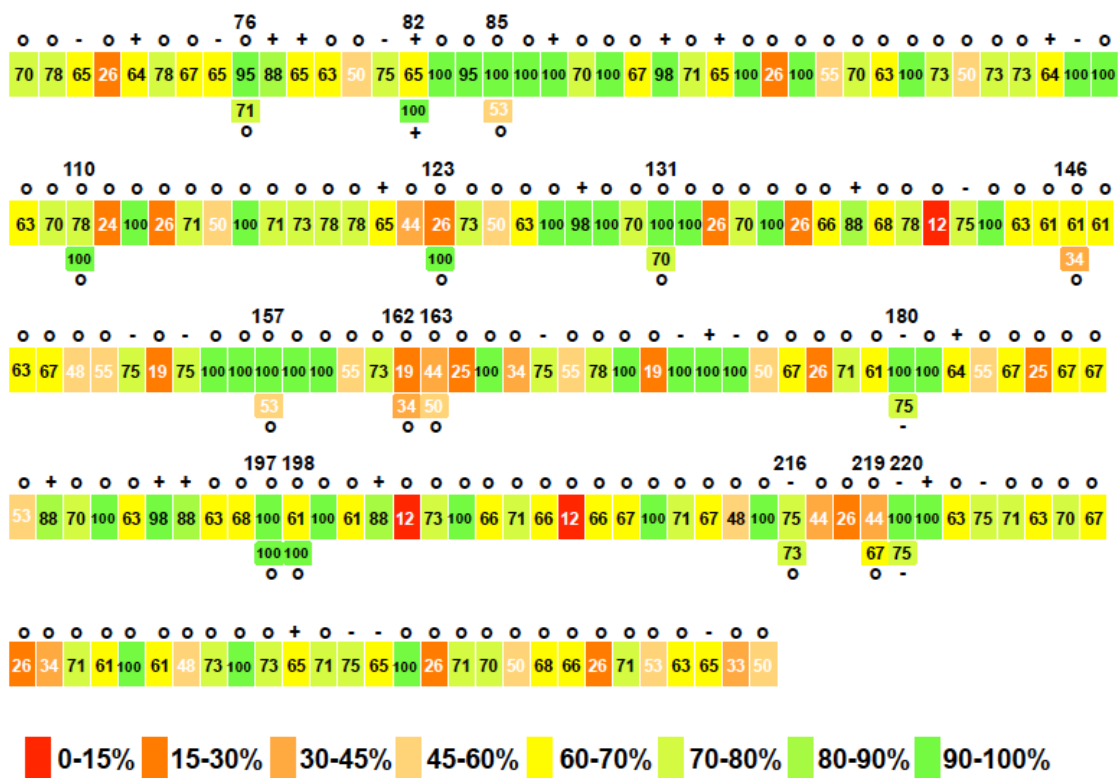
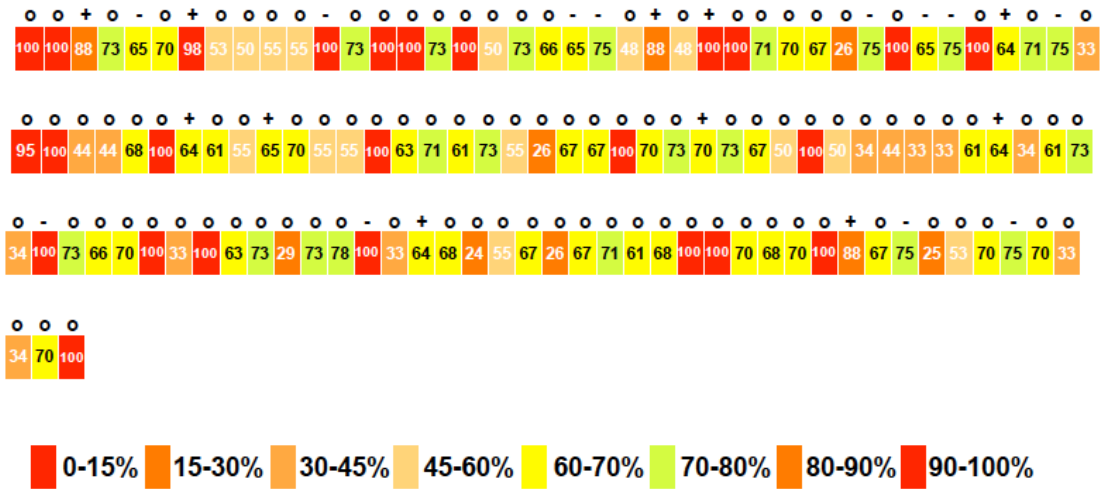


Figura 26. Diagrama del uso de codones de la región de VP1 correspondiente a la cepa pHM175 43c, en ausencia y presencia de AMD. Se representa con una gradación de colores dependiendo de las frecuencias de los codones según el uso de codones de la célula humana (ver Figura 11). Los números en el interior de la secuencia corresponden a los porcentajes de los respectivos codones según el uso de codones de la célula humana. o, +, -, representan que los aminoácidos que codifican los respectivos codones tienen carga neutra, positiva, negativa, respectivamente. Con AMD, los números que se indican arriba de la secuencia estudiada corresponden a las posiciones en donde se han encontrado cambios en los diferentes clones. Por debajo de la secuencia analizada se representan los cambios que se han registrado teniendo en cuenta todos los clones, y en su interior el porcentaje del nuevo codón.

SIN AMD



AMD

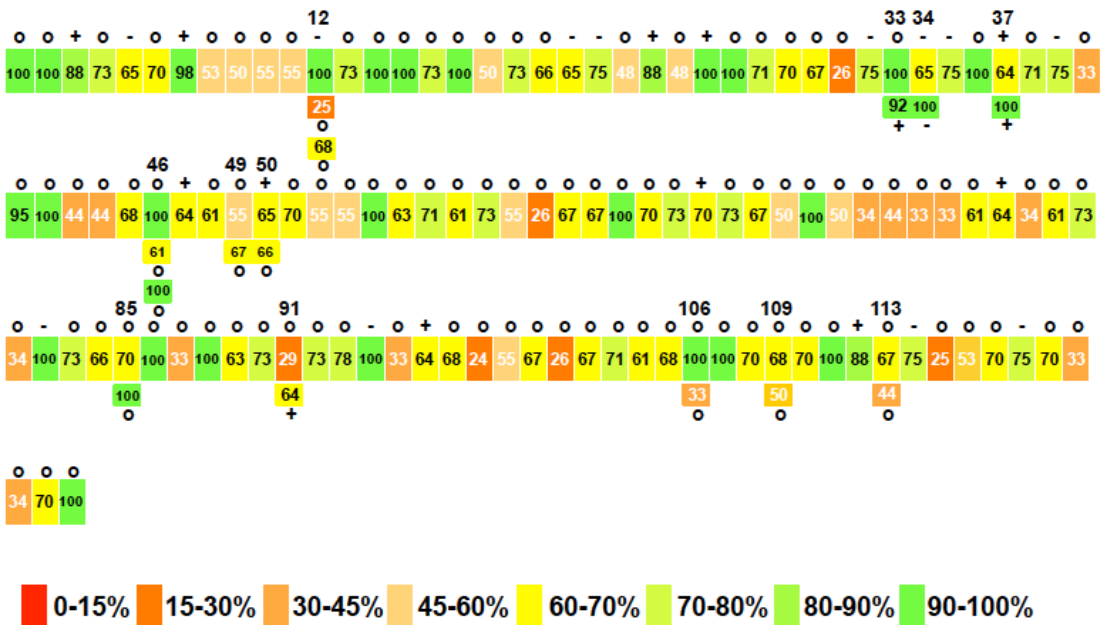


Figura 27. Diagrama del uso de codones de la región de VP3 analizada correspondiente a la cepa pHM175 43c, en ausencia y presencia de AMD. Se representa con una gradación de colores dependiendo de las frecuencias de los codones según el uso de codones de la célula humana (ver Figura 12). Los números en el interior de la secuencia corresponden a los porcentajes de los respectivos codones según el uso de codones de la célula humana. o,+,-, representan que los aminoácidos que codifican los respectivos codones tienen carga neutra, positiva, negativa, respectivamente. Con AMD, los números que se indican arriba de la secuencia estudiada corresponden a las posiciones en donde se han encontrado cambios en los diferentes clones. Por debajo de la secuencia analizada se representan los cambios que se han registrado teniendo en cuenta todos los clones, y en su interior el porcentaje del nuevo codón.

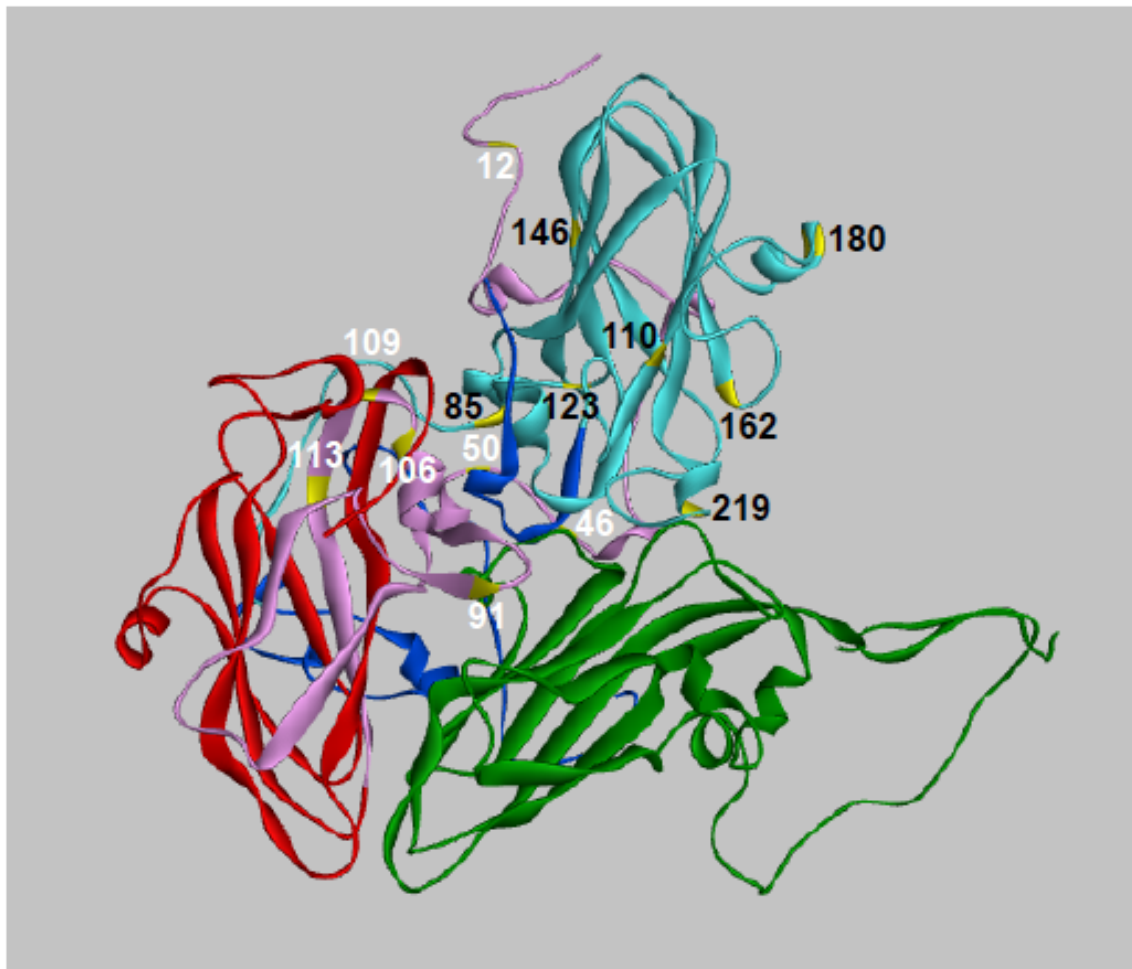


Figura 28. Representación de un protómero del VHA. En azul, verde y rojo se señalan las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3, respectivamente. Los colores celeste y rosado corresponden a las regiones analizadas de VP1 y VP3, respectivamente. En amarillo aparecen señalados los diferentes cambios relevantes en la modulación de las tasas de traducción de las regiones estudiadas. Los números en color negro corresponden a las posiciones de los cambios relevantes en la región estudiada de VP1, y en blanco a las posiciones en la región estudiada de VP3. Imagen adaptada de Wang *et al.*, 2015.

3.3.3.1 Deoptimización de codones: efecto de frenar o disminuir la tasa de traducción

El estudio de las tasas de traducción de los diferentes clones puso de manifiesto que cambios puntuales en el uso de codones que inducen la aparición de codones menos frecuentes, tienen como consecuencia la disminución de la tasa de traducción, que será en mayor o menor medida dependiendo de la significancia de la pérdida de frecuencia y del contexto en el cual tenga lugar el cambio. Algunos ejemplos de este tipo de situación son los clones $\lambda 4$, $\lambda 5$ y $\lambda 12$ de VP1. En la Figura 29 se pueden ver las posiciones

dentro de la región de VP1 en la cual se observan cambios en estos clones con respecto a la cepa pHM175 43c, donde en color rojo y verde se señalan si los cambios inducen a la aparición de un codón menos o más frecuente, respectivamente de acuerdo a pHM175 43c. También se incluyó el clon λ 1 que es el que posee solamente un cambio con respecto a pHM175 43c, en la posición 219 y compartido por todos los clones.

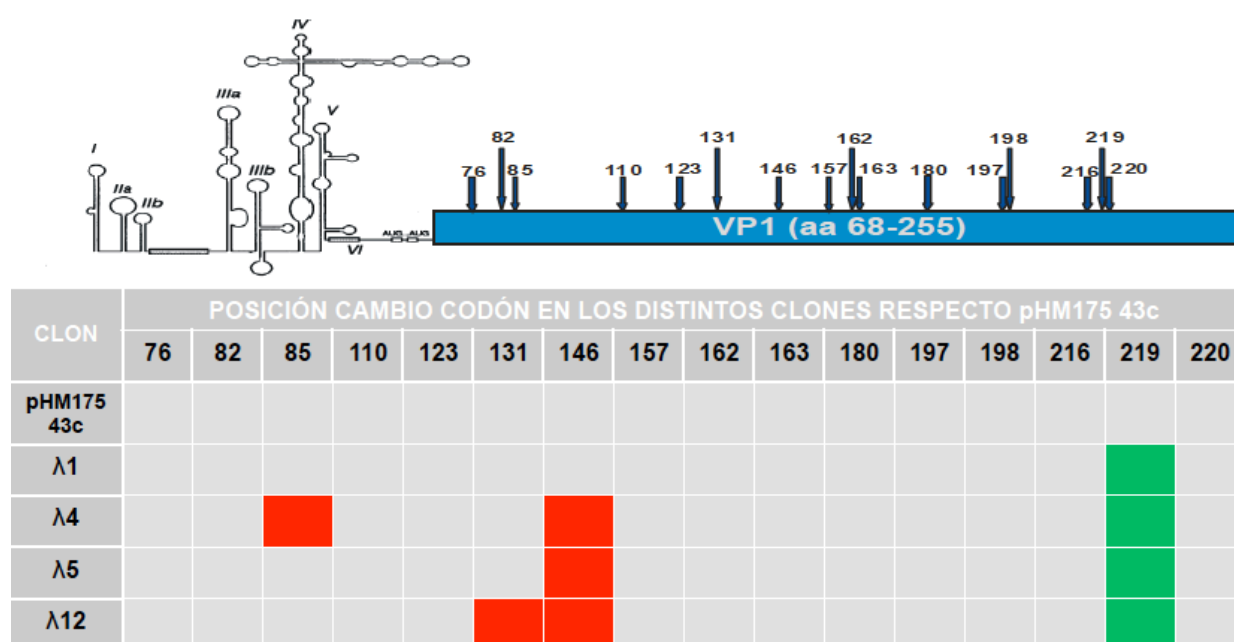


Figura 29. Posiciones de los cambios en el uso de codones con respecto a pHM175 43c de los clones λ 1, λ 4, λ 5 y λ 12 de VP1. En rojo y verde se señalan aquellos cambios que inducen a la aparición de un codón menos o más frecuente, respectivamente, de acuerdo al que se encontraba en pHM175 43c.

El clon λ 1 a pesar de poseer un cambio a un codón más frecuente (ver Tabla 7), muestra una cinética de traducción similar a la de la media de clones de L0 en todas las condiciones analizadas, no encontrándose diferencias significativas con la misma. Teniendo en cuenta que la posición 219 no tiene un rol significativo en la modulación de la velocidad de traducción, al momento de analizar los diferentes clones nos vamos a centrar en las otras posiciones que cambian. En cuanto a la tasa de traducción expresada como FLuc/RLuc del clon λ 5 se vio que en condiciones de 0.20 μ g/ml de AMD, la presencia de un cambio a un codón menos frecuente en la posición 146, donde se pasa de un codón con una frecuencia del 61% a otro con una del 34% (ver Tabla 5), induce

una pequeña disminución de la velocidad de traducción en comparación a la media de los clones de L0 (ver Figura 30).

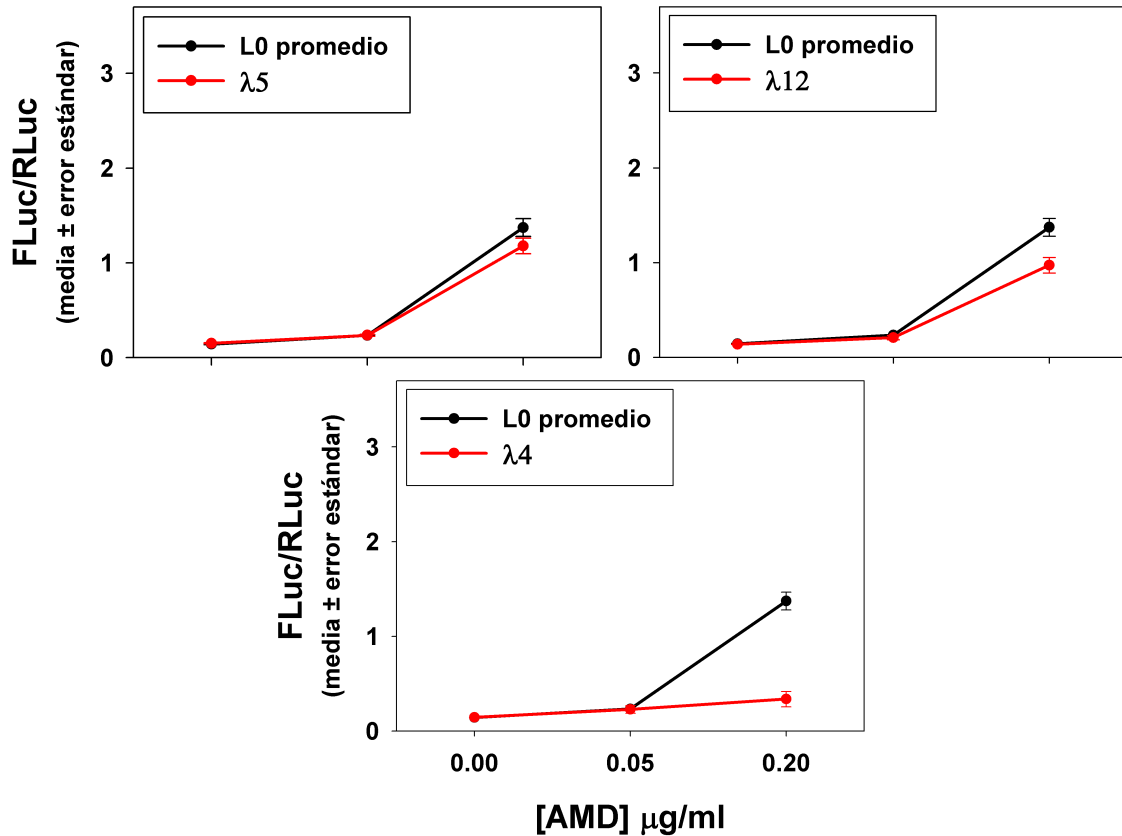


Figura 30. Tasa de traducción expresada como FLuc/RLuc (media \pm error estándar) de los clones λ_4 , λ_5 y λ_{12} de VP1 y de la media de clones de L0 en presencia de 0.00 $\mu\text{g/ml}$, 0.05 $\mu\text{g/ml}$ y 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. Las gráficas se disponen en orden ascendente de la disminución de la tasa de traducción.

El clon λ_{12} además de tener el mismo cambio en la posición 146 que el clon λ_5 , tiene otro en la posición 131 que induce un cambio de frecuencia del 100% al 70% (ver Tabla 5). Estos cambios inducen una mayor disminución de la tasa de traducción en comparación al clon λ_5 en presencia de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD (ver Figura 30). Por lo tanto, podríamos decir que la disminución de la tasa de traducción observada en este clon, vendría determinada por un efecto aditivo de los 2 cambios a codones menos frecuentes que posee.

En cuanto al clon λ_4 , además de tener el mismo cambio en la posición 146 que λ_5 y λ_{12} , posee otro cambio en la posición 85 donde se pasa de tener un codón con una frecuencia del 100% a otro con una del 53% (ver Tabla 5). Este cambio en la posición 85 induce una clara y significativa ($p < 0.05$)

disminución de la tasa de traducción en comparación a la media de clones de L0 y en condiciones de silenciamiento celular alto (ver Figura 30). Al observar el diagrama de uso de codones de la Figura 26 se puede ver que este cambio se sitúa en una región enriquecida con codones altamente frecuentes (95 a 100%) en presencia de AMD, pero raros en ausencia de AMD por la competencia existente con la célula. La caída de casi un 50% de frecuencia enlentecería significativamente la tasa de traducción de dicho codón, intentando emular la situación original, y de esta forma tendría un efecto negativo en esta región de traducción rápida. Además, es importante destacar que la posición 85 al estar cercana al inicio del fragmento en estudio, puede tener efectos adversos relevantes en cuanto a velocidad de traducción si es que no hay algún tipo de compensación posterior, ya que habrían pausas de duración considerable en los ribosomas prácticamente al comenzar la traducción.

Todos los cambios de codones registrados en los clones $\lambda 4$, $\lambda 5$ y $\lambda 12$ codifican para aa de igual carga electrostática a los que había previamente (ver Figura 26). Esto es lógico en el caso de la posición 131 ya que tanto el codón original como el mutado codifican para el mismo aa, pero en las otras 2 posiciones sí hay cambio de aa, e igualmente se mantiene el mismo tipo de carga. Por lo tanto, el rol de las cargas electrostáticas en la modulación de las tasas de traducción en estos clones podría considerarse despreciable.

3.3.3.2 Optimización u optimización/deoptimización concomitante de codones: efecto de aumento de la tasa de traducción

El clon $\lambda 2$ además de poseer en la posición 219 un cambio a un codón más frecuente (como todos los clones aislados de la región de VP1), tenía en la posición 198 otro cambio que inducía a la aparición de un codón más frecuente (ver Figura 31), donde se pasaba de tener un codón con una frecuencia del 61% a otro con una del 100% (ver Tabla 5).

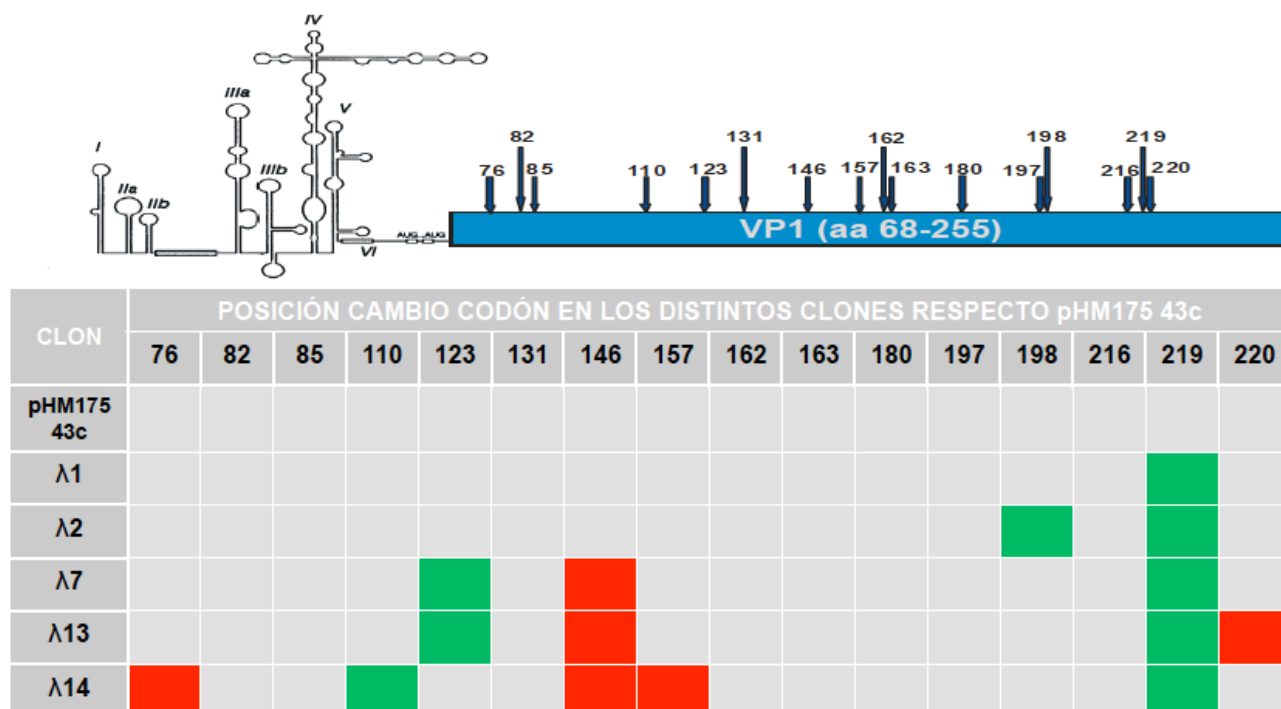


Figura 31. Posiciones de los cambios en el uso de codones con respecto a pHM175 43c de los clones $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 7$, $\lambda 13$ y $\lambda 14$ de VP1. En rojo y verde se señalan aquellos cambios que inducen a la aparición de un codón menos o más frecuente, respectivamente, de acuerdo al que se encontraba en pHM175 43c.

Al estudiar la tasa de traducción de $\lambda 2$ se vio que en condiciones de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD su tasa era superior a los valores de la media de traducción obtenida para los clones de L0, pero esas diferencias observadas no alcanzaban a ser estadísticamente significativas (ver Figura 32). A pesar de que la frecuencia del nuevo codón en la posición 198 es claramente mayor a la que había antes, esto no se ve reflejado en un aumento significativo de la tasa de traducción del clon $\lambda 2$ con respecto a la media de clones de L0. Este hecho podría explicarse porque el cambio se da en una región enriquecida en codones de mediana y alta frecuencia (ver Figura 26), entonces al ser una región de traducción relativamente rápida en sí, cambios en aumento de frecuencia no tendrían consecuencias muy significativas, a diferencia de lo que podría ocurrir si hubiera un cambio que ocasionase la aparición de un codón poco frecuente o raro. Por lo tanto, es relevante resaltar que además del cambio puntual en un codón, el contexto en el cual se encuentra posicionado dicho cambio también es muy importante.

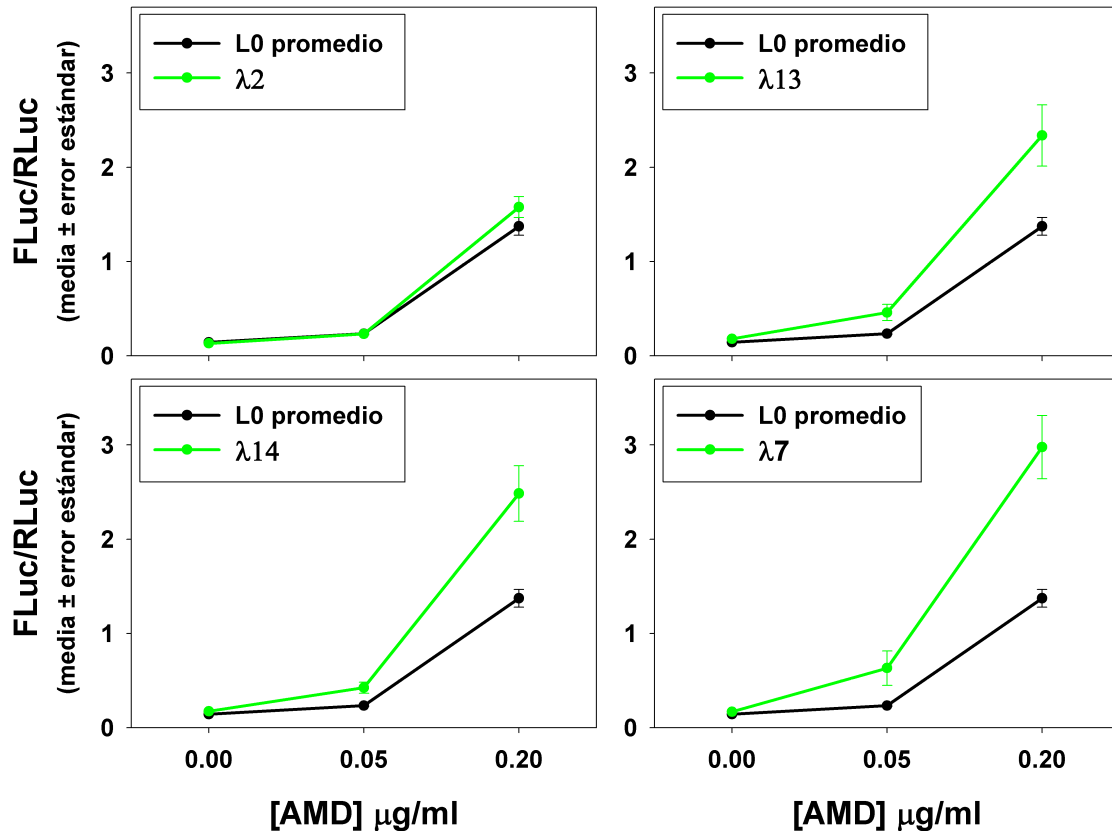


Figura 32. Tasa de traducción expresada como FLuc/RLuc (media \pm error estándar) de los clones $\lambda 2$, $\lambda 7$, $\lambda 13$ y $\lambda 14$ y de la media de clones de L0 en presencia de 0.00 $\mu\text{g/ml}$, 0.05 $\mu\text{g/ml}$ y 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. Las gráficas se disponen en orden ascendente del aumento de la tasa de traducción.

A su vez, se encontró que en algunos clones habían algunos cambios de codones combinados que no sólo equilibraban el efecto de la disminución de la tasa de traducción inducida por codones menos frecuentes, sino que también ocasionaban un incremento significativo de la misma, como se vio en los casos de los clones $\lambda 7$, $\lambda 13$ y $\lambda 14$ de VP1. En los 3 casos se observó que la tasa de traducción era significativamente superior ($p < 0.05$) a la media de clones L0 tanto en condiciones de silenciamiento celular moderado como alto (ver Figura 32). Tanto en el clon $\lambda 7$ como en el $\lambda 13$ se vio que la presencia de un cambio a mayor frecuencia en la posición 123, donde se pasa de tener un codón con una frecuencia del 26% a uno con una del 100%, jugaría un rol muy importante en los valores de tasa de traducción obtenidos. Asimismo, a pesar de que ambos poseen un cambio a menos frecuente en la posición 146, carecen de la presencia de un cambio a menos frecuente en la posición 85, el cual en el apartado previo se ha visto que tiene un rol negativo en la tasa de

traducción. Por ello, tanto la presencia del cambio en la posición 123 como la ausencia del cambio en la posición 85, contribuirían para conseguir los altos valores de traducción obtenidos. El clon $\lambda 13$ posee además un cambio a menos frecuente en la posición 220 (ver Figura 31), donde se pasa de un codón con una frecuencia del 100% a otro con una del 75% (ver Tabla 5). A pesar de perder un 25% de frecuencia, la posición 220 se encuentra precediendo a una región rica en codones de mediana frecuencia (ver Figura 26), por tanto el nuevo codón tendría valores de frecuencia similares a los codones que van a traducirse posteriormente, por lo cual sería lógico pensar que esta pérdida de frecuencia no tuviera gran influencia en la tasa de traducción final. En cuanto al clon $\lambda 14$ se vio que además de poseer los cambios a un codón más frecuente en la posición 219 y a uno menos frecuente en la posición 146 (que como se ha visto anteriormente no tienen un rol significativo en la tasa de traducción), tiene un cambio a más frecuente en la posición 110 donde se pasa de un codón con una frecuencia del 78% a uno con una del 100%. A su vez, también posee 2 cambios a menos frecuentes en las posiciones 76 y 157 donde se pasa de frecuencia del 95% y 100% a 71% y 53%, respectivamente (ver Tabla 5). El cambio a menos frecuente en la posición 76 probablemente no tenga mucha influencia en la tasa de traducción obtenida, debido a que esta posición se encuentra en una región donde hay varios codones de mediana-alta frecuencia (ver Figura 26), y una frecuencia del 71% es considerada mediana-alta, por tanto no se esperarían grandes cambios en la velocidad de traducción. Sin embargo, el cambio a un codón más frecuente que se observa en la posición 110, si bien sólo se aumenta en un 22% la frecuencia en el nuevo codón, éste podría tener un efecto muy importante contrarrestando en cierta medida las pausas ocasionadas por los codones que se encuentran en las posiciones 111 y 113, donde ambos tienen una frecuencia del 26% (ver Figura 26). Finalmente, en cuanto al cambio a un codón menos frecuente en la posición 157, teniendo en cuenta que la bajada de frecuencia es considerable (casi un 50%) y además el cambio se da en una región enriquecida con codones altamente frecuentes (100%) (ver Figura 26), se esperaría que tuviera un efecto negativo en la tasa traducción, tal y como una sustitución idéntica en la posición 85 tenía. Pero sin embargo, teniendo en cuenta el resultado de la relación FLuc/RLuc del clon $\lambda 14$ indicaría que este

cambio tendría poco efecto en su tasa de traducción (ver Figura 32). Este hecho podría explicarse por la posición en la que se encuentra el cambio con respecto al inicio de la traducción del fragmento. Es decir, tal y como se vio para la posición 85 en varios clones, el hecho de aumentar el tiempo que tarda el ribosoma en encontrar el ARNt correspondiente cerca del inicio de traducción del fragmento tendría efectos más perjudiciales ya que impediría y/o retrasaría la potencial traducción por parte de otros ribosomas al comienzo, lo que tendría una repercusión desfavorable en el resto del fragmento. De esta forma, al observarse esta pérdida de frecuencia en una región avanzada del fragmento, se esperaría que los efectos de la pausa generada por el ribosoma en esa región, no afectaran tanto a la traducción del resto del fragmento. De todas formas, las conclusiones en clones con muchas mutaciones que pueden tener efectos aditivos, compensatorios o sustractivos, son difíciles de explicar.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este apartado se podría decir que los clones $\lambda 7$, $\lambda 13$ y $\lambda 14$ de VP1 tienen un uso de codones adaptado a traducir más rápido, por lo que no resulta sorprendente que hayan sido aislados principalmente en la cuasiespecie de la población de crecimiento rápido HM175-HP (ver Figura 13).

Al igual como ocurrió con los clones analizados en el apartado previo, en todos los casos en los que los cambios en el uso de codones en los clones $\lambda 2$, $\lambda 7$, $\lambda 13$ y $\lambda 14$ inducían a un cambio de aa, no se observaba un cambio en la carga electrostática del mismo en comparación al que se encontraba previamente (ver Figura 26). Por lo tanto, se puede decir que las cargas electrostáticas no serían un factor a tener en cuenta, a la hora de explicar la tasa de traducción obtenida en estos clones.

3.3.3.3 Deoptimización/optimización concomitante de codones: efecto de recuperación/ganancia de la tasa de traducción perdida

En los clones $\lambda 6$, $\lambda 10$ y $\lambda 11$ de VP1, que presentan los 2 cambios a codones menos frecuentes en las posiciones 85 y 146 (ver Figura 33), que como se comentó en el apartado anterior inducen una disminución significativa de la tasa de traducción, se vio que la presencia de cambios en otras posiciones que conllevan a la aparición de codones más frecuentes, se asocian

a un efecto compensatorio de la tasa de traducción perdida (ver Figura 34). En $\lambda 6$ y $\lambda 10$ se recupera la velocidad de traducción, pero en $\lambda 11$ se observa un aumento de la misma.

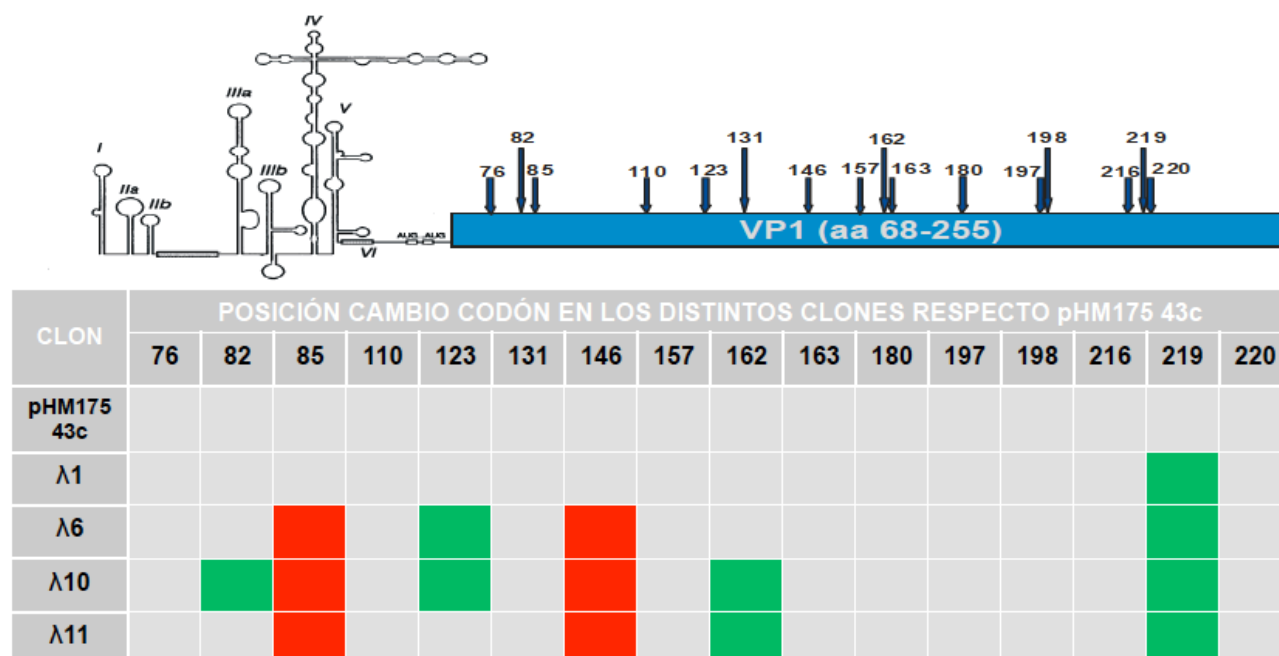


Figura 33. Posiciones de los cambios en el uso de codones con respecto a pHM175 43c de los clones $\lambda 1$, $\lambda 6$, $\lambda 10$ y $\lambda 11$ de VP1. En rojo y verde se señalan aquellos cambios que inducen a la aparición de un codón menos o más frecuente, respectivamente, de acuerdo al que se encontraba en pHM175 43c.

El clon $\lambda 6$ además de tener los cambios en las posiciones 85, 146 y 219, posee un cambio en la posición 123 que induce a la aparición de un codón más frecuente (ver Figura 33), donde como se dijo en el apartado anterior, se pasa de tener un codón con una frecuencia del 26% a otro con una del 100% (ver Tabla 5). La ganancia de casi un 75% de frecuencia ayuda a contrarrestar el efecto de los codones menos frecuentes en la tasa de traducción e incluso equilibra la misma hasta valores similares a los valores de la media de los clones de L0, por tanto, se podría considerar como un efecto compensatorio (ver Figura 34). Este efecto podría estar relacionado con la reducción considerable del tiempo de espera o pausa por parte del ribosoma, para traducir el codón que se encuentra en la posición 123. De esta manera, la tasa de traducción que pierde en unos sitios, la recupera en otro.

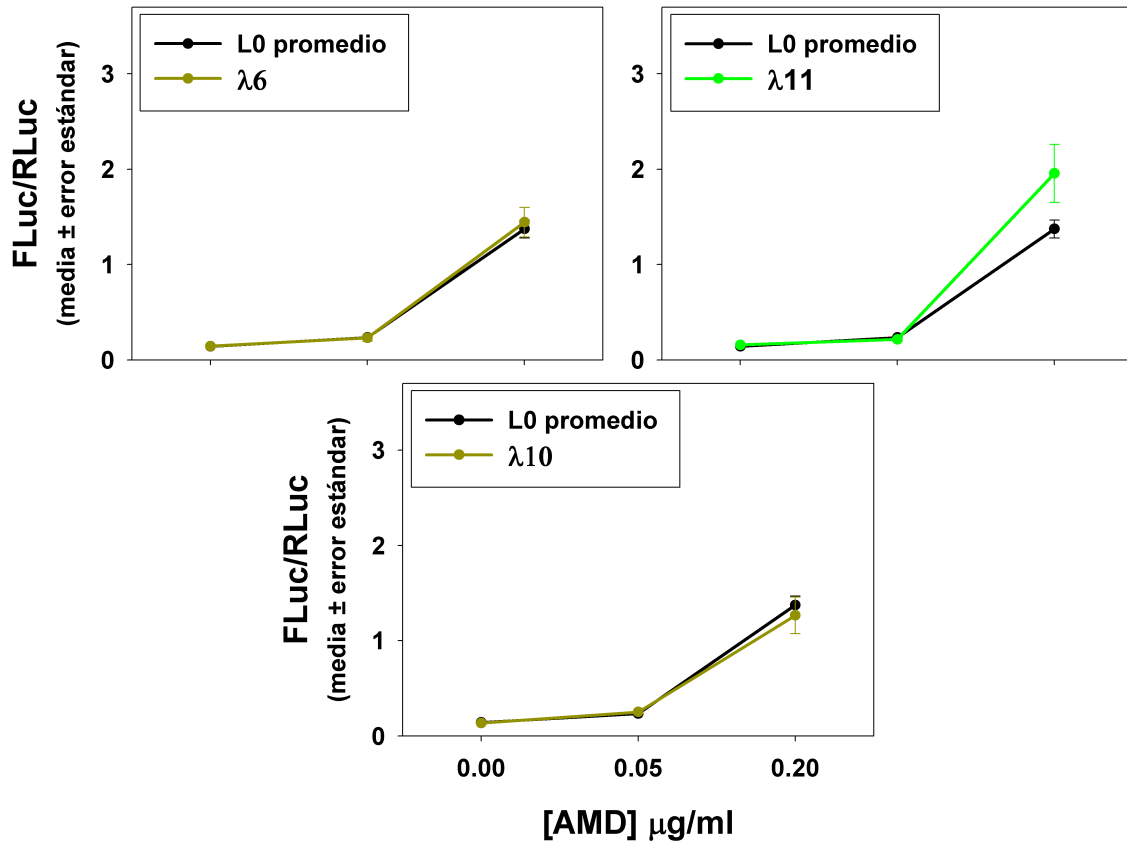


Figura 34. Tasa de traducción expresada como FLuc/RLuc (media \pm error estándar) de los clones $\lambda 6$, $\lambda 10$ y $\lambda 11$ de VP1 y de la media de clones de L0 en presencia de 0.00 $\mu\text{g/ml}$, 0.05 $\mu\text{g/ml}$ y 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. Las gráficas se disponen en orden ascendente del número de cambios respecto a pHM175 43c.

En cuanto al clon $\lambda 11$, se vio que además de los cambios en las posiciones 85, 146 y 219, posee un cambio en la posición 162 que induce a la aparición de un codón más frecuente (ver Figura 33), donde se pasa de tener un codón con una frecuencia del 19% a otro con una del 34% (ver Tabla 5). A pesar de que la frecuencia del nuevo codón en la posición 162 sigue siendo relativamente baja, es capaz de contrarrestar el efecto de los cambios en las posiciones 85 y 146 e incluso aumentar la tasa de traducción de forma significativa con respecto al valor de la media de los clones de L0 en condiciones de silenciamiento celular alto (ver Figura 34). Este efecto podría deberse a la reducción del tiempo de las pausas que los ribosomas deben sufrir para la incorporación de ARNt correctos, ya que la posición 162 se encuentra en una región rica en codones de baja y mediana frecuencia (ver Figura 26), sugiriendo un efecto local. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los clones $\lambda 6$ y $\lambda 11$ se podría decir que las pausas,

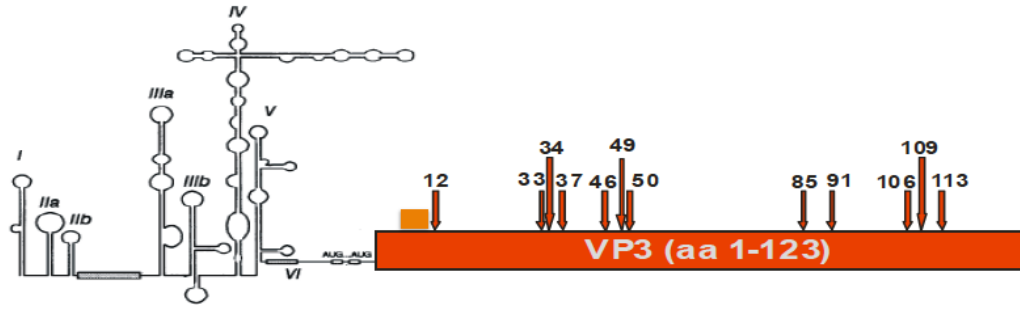
entendiéndolas como el tiempo requerido para la incorporación del ARNt correcto por parte de los ribosomas para la traducción de ciertos codones, son factores muy importantes en la regulación de la velocidad de traducción.

Por otra parte, el clon $\lambda 10$ además de poseer los cambios en las posiciones 85, 146 y 219 como $\lambda 6$ y $\lambda 11$, tenía también 3 cambios a codones más frecuentes en las posiciones 82, 123 y 162 (ver Figura 33). El cambio en la posición 123 era el mismo al encontrado en el clon $\lambda 6$ y el de la posición 162 era el mismo al encontrado en el clon $\lambda 11$. El cambio en la posición 82 inducía pasar de tener un codón con una frecuencia del 65% a otro con una del 100% (ver Tabla 5). De esta forma, *a priori* se pensaba que se iba a obtener una tasa de traducción significativamente superior a la de la media de clones de L0, al ver lo influyentes que eran los cambios a más frecuentes en las posiciones 123 y 162 en contrarrestar los efectos de los cambios a codones menos frecuentes en las posiciones 85 y 146 (clones $\lambda 6$ y $\lambda 11$). Sin embargo, se vio que la tasa de traducción del clon $\lambda 10$ era similar a la de la media de clones de L0, ya que no se encontraron diferencias significativas entre ambos en ninguna de las condiciones de silenciamiento celular analizadas (ver Figura 34). Estos resultados nos sugerirían que si bien las posiciones 123 y 162 son importantes para equilibrar el efecto en la tasa de traducción de codones menos frecuentes, el efecto de ellos no es aditivo, e incluso sería interferente. Asimismo, se podría decir que probablemente el efecto del codón más frecuente en la posición 82 se vio eclipsado por el efecto del cambio a un codón menos frecuente en la posición 85, lo cual nos sugeriría de nuevo que el efecto de los diferentes cambios de codones encontrados son a nivel local.

Tal y como ocurrió con los clones de los apartados anteriores, los cambios en los clones $\lambda 6$, $\lambda 10$ y $\lambda 11$ de VP1 que inducen a un cambio de aa, codifican para aa que tienen la misma carga electrostática que el que era codificado previamente. Por lo tanto, en estos clones el rol de las cargas electrostáticas en la modulación de las tasas de traducción también podría considerarse despreciable.

3.3.3.4 Efecto rampa

En los clones aislados en las cuasiespecies correspondientes a VP3 se observó la característica de que sus tasas de traducción eran significativamente inferiores, del orden de 10 veces, en comparación a las encontradas en los clones correspondientes a la región de VP1. Este hecho podría explicarse por la existencia de lo que se denomina “rampa” en el fragmento de VP3, que es la presencia de un grupo de codones que se aparean con ARNt no muy abundantes al comienzo de secuencias codificantes. En nuestro caso estas rampas comprenderían los codones de las posiciones 8, 9, 10 y 11 de cada uno de los clones de VP3, los cuales tienen frecuencias entre 50 a 55% según el uso de codones de la célula humana. En cuanto al resto de la secuencia codificante de los clones $\theta 1$ a $\theta 8$, si bien se encontraron algunos cambios en el uso de codones entre los diferentes clones (ver Figura 35), estos no tuvieron un rol significativo a la hora de determinar sus respectivas tasas de traducción. Tanto en condiciones de ausencia como en presencia de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, no se observaron diferencias significativas entre las tasas de traducción de los diferentes clones (ver Figura 36). Sin embargo, en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD se observaron algunas pequeñas diferencias significativas en algunos clones con respecto a la media de clones de L0, tal como se muestra en la Tabla 10, en el apartado 3.3.2.2. del presente Capítulo. No obstante, si bien en algunos casos las diferencias eran significativas, las diferencias numéricas entre ellos eran pequeñas. Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos de las tasas de traducción del fragmento de VP3, se puede decir que las mismas están regidas y moduladas por la presencia de rampas cercanas al inicio de la traducción del fragmento. Dicha rampa no se encuentra en la secuencia vírica puesto que la región codificante de VP3 no está cerca del IRES, y por ello no se pueden sacar conclusiones de relevancia biológica. Sin embargo, se puede anticipar que ese *cluster* de codones poco abundantes en las posiciones 8 a 11 puede ejercer una influencia *in vivo* aunque quizás no tan significativa como en el caso de los clones.



| CLON | POSICIÓN CAMBIO CODÓN EN LOS DISTINTOS CLONES RESPECTO pHM175 43c | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---|--------|--------|--------|-----|--------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-----|-----|-----|
| | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 33 | 34 | 37 | 46 | 49 | 50 | 85 | 91 | 106 | 109 | 113 |
| HM175 43c | Orange | Orange | Orange | Orange | | | | | | | | | | | | |
| θ1 | Orange | Orange | Orange | Orange | Red | | | | | | | | Green | Red | | Red |
| θ2 | Orange | Orange | Orange | Orange | Red | | | | | | Yellow | | Green | Red | | Red |
| θ3 | Orange | Orange | Orange | Orange | Red | | | | Red | | | | Green | Red | | Red |
| θ4 | Orange | Orange | Orange | Orange | Red | | | | Yellow | | | | Green | Red | | Red |
| θ5 | Orange | Orange | Orange | Orange | Red | | | | | | | | Green | Red | | Red |
| θ6 | Orange | Orange | Orange | Orange | | Yellow | Green | Green | | Green | | Green | Green | Red | Red | Red |
| θ7 | Orange | Orange | Orange | Orange | | | | | | | | | Green | Red | | Red |
| θ8 | Orange | Orange | Orange | Orange | Red | | | | | | | | Green | Red | Red | Red |

Figura 35. Posiciones de los cambios en el uso de codones con respecto a pHM175 43c de los clones θ1, θ2, θ3, θ4, θ5, θ6, θ7 y θ8 de VP3. En rojo, amarillo y verde se señalan aquellos cambios que inducen a la aparición de un codón menos, igual y más frecuente, respectivamente, de acuerdo al que se encontraba en pHM175 43c. En naranja se señala la ubicación de la “rampa” que induce a un descenso generalizado de la tasa de traducción.

En cuanto a la influencia sobre las tasas de traducción que pudieran tener las cargas electrostáticas de los nuevos aa codificados, como consecuencia de los cambios en el uso de codones observado en los diferentes clones, ésta podría considerarse prácticamente inexistente. Si bien en varias posiciones se observaron cambios en las cargas de los nuevos aa codificados con respecto a los que eran codificados previamente, sólo en 2 de ellas (posiciones 33 y 91) se codificaba para aa con carga positiva (ver Figura 27). Estos nuevos aa con carga positiva, al no encontrarse dentro de una región rica en muchos aa con la misma carga, se considera que no tendrían un rol significativo en la disminución de las tasas de traducción.

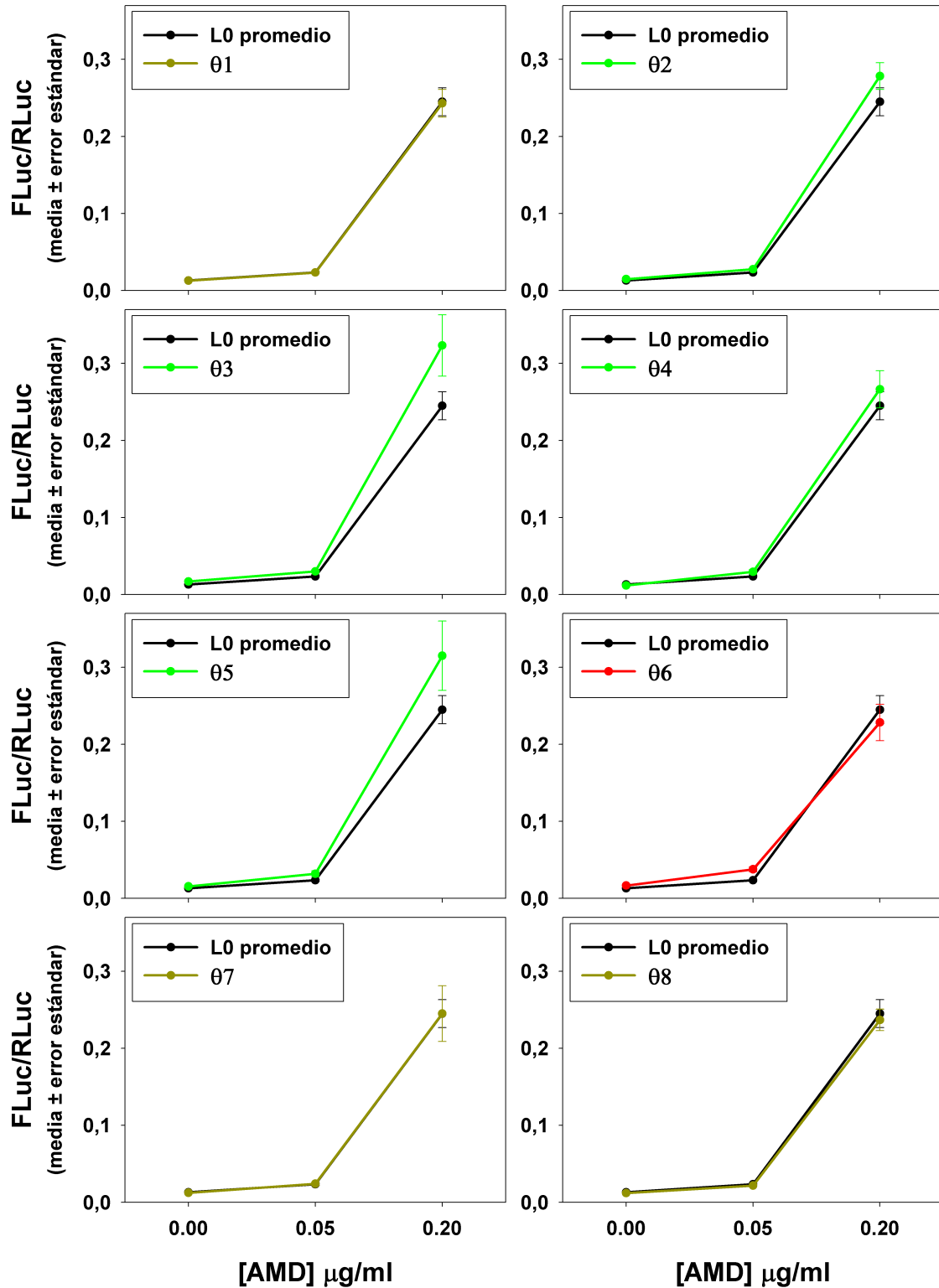


Figura 36. Tasa de traducción expresada como FLuc/RLuc (media ± error estándar) de los clones $\theta 1$, $\theta 2$, $\theta 3$, $\theta 4$, $\theta 5$, $\theta 6$, $\theta 7$ y $\theta 8$ de VP3, y de la media de clones de L0 en presencia de 0.00 µg/ml, 0.05 µg/ml y 0.20 µg/ml de AMD.

3.3.3.5 Efecto de la estructura secundaria del ARN

Con el propósito de estudiar si la estructura secundaria del ARN puede tener un rol en la modulación de la velocidad de traducción de los diferentes clones analizados para las regiones de VP1 y VP3, se llevó a cabo el cálculo del *P-num*, así como también la visualización de las estructuras secundarias y la determinación de la energía libre de Gibbs, para cada uno de los clones. Estos análisis se realizaron utilizando el servidor *mfold* (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>). El *pairing number* o *P-num* es una medida cuantitativa del nivel de promiscuidad de una base particular de participar en apareamientos de bases en un conjunto de plegamientos subóptimos. Si el *P-num* es un valor grande, el cual es un término relativo, significa que la base en cuestión es promiscua en su asociación con otras bases. Por lo tanto, se dice que esta base está “pobrementemente determinada”. [Jaeger, *et al.*, 1989; Zuker & Jacobson, 1998].

La energía libre de Gibbs o ΔG , es la suma de las energías libres asociadas a todos los *loops* y apilamientos de bases en una estructura secundaria. Cuanto mayor es el valor negativo de ΔG , más estable es la estructura [Zuker & Jacobson, 1998].

3.3.3.5.1 Efecto de los cambios del uso de codones en la estructura secundaria del ARN del fragmento de VP1

En la Tabla 11 se detallan los valores de *P-num* medios teniendo en cuenta todo el fragmento estudiado, así como los valores de ΔG obtenidos para las estructuras de cada uno de los diferentes clones de la región de VP1. Al observar los valores de *P-num* obtenidos se ve que habría 2 grupos relativos de valores, uno más bajo ($\lambda_3, \lambda_4, \lambda_6, \lambda_8, \lambda_{10}, \lambda_{11}$) y otro más alto ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_5, \lambda_7, \lambda_9, \lambda_{12}, \lambda_{13}$ y λ_{14}). Además se vio que habría una cierta correlación entre el *P-num* y los valores de ΔG , donde el grupo de clones con un valor de *P-num* relativamente más bajo, se asocia en general con valores $-\Delta G$ relativamente un poco más altos. Y por el contrario, el grupo de clones con un valor relativamente más alto de *P-num* se asocia con valores $-\Delta G$ relativamente un poco más bajos (ver Tabla 11). Esto es coherente con el hecho de que cuanto más bajo es el *P-num*, más estructurada se encuentra una estructura, sus

bases son menos promiscuas a participar en apareamientos alternativos, y por tanto es más estable.

Tabla 11. Valores de *P-num* y de energía libre de Gibbs (ΔG) para los diferentes clones de la región de VP1 estudiada.

| CLON | <i>P-num</i> (media) | ΔG (kcal/mol) |
|--------------|----------------------|-----------------------|
| $\lambda 1$ | 20.2 | -158.30 |
| $\lambda 2$ | 20.8 | -158.60 |
| $\lambda 3$ | 18.6 | -158.60 |
| $\lambda 4$ | 17.7 | -160.30 |
| $\lambda 5$ | 21.6 | -158.60 |
| $\lambda 6$ | 17.1 | -159.50 |
| $\lambda 7$ | 20.2 | -157.80 |
| $\lambda 8$ | 17.1 | -158.80 |
| $\lambda 9$ | 20.7 | -155.90 |
| $\lambda 10$ | 18.0 | -159.50 |
| $\lambda 11$ | 18.0 | -160.30 |
| $\lambda 12$ | 20.9 | -157.10 |
| $\lambda 13$ | 19.5 | -157.70 |
| $\lambda 14$ | 20.3 | -157.00 |

Con el fin de estudiar si habían diferencias en la visualización de las estructuras secundarias entre clones pertenecientes a los diferentes grupos relativos de *P-num*, se obtuvieron las imágenes correspondientes a los fragmentos completos de la región VP1 de los clones $\lambda 2$ y $\lambda 4$ utilizando el servidor *m-fold* (ver Figura 37A y B). Se vio que no hay diferencias relevantes entre ambas estructuras, pero sí se observó que difieren en cierto grado en la región que se encuentra enmarcada en el extremo inferior izquierdo de las respectivas imágenes (ver Figura 37A y B). Por lo tanto, se procedió a analizar en más detalle lo que ocurría en esa región, y se obtuvieron las imágenes correspondientes para los clones $\lambda 2$ y $\lambda 4$ utilizando fragmentos de 51 nts que incluían la región en conflicto (ver Figuras 37C y D). Una vez más, no se observaron diferencias significativas entre ambas estructuras ni en los valores

de ΔG obtenidos que eran -6.00 y -6.90 para los fragmentos de 51 nts de $\lambda 2$ y $\lambda 4$, respectivamente.

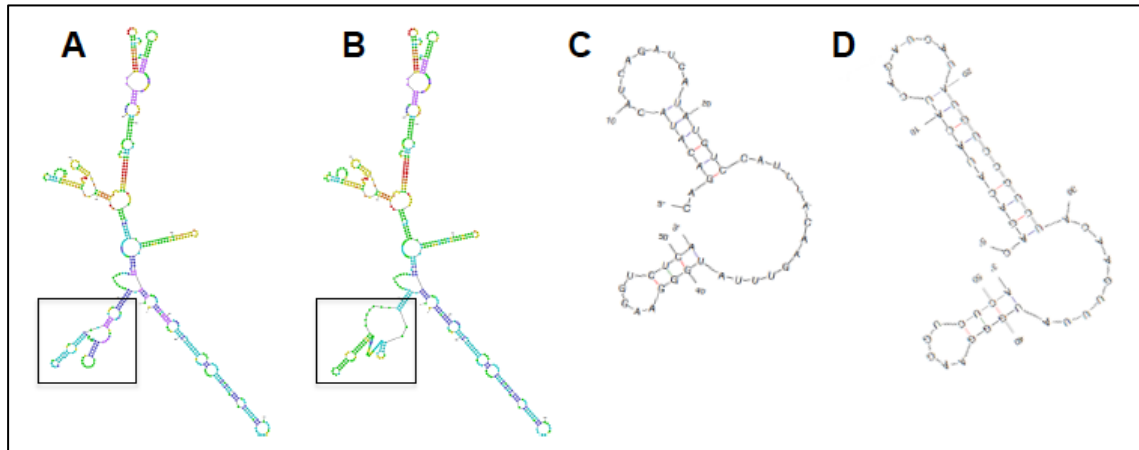


Figura 37. Estructuras secundarias obtenidas para los clones $\lambda 2$ y $\lambda 4$, utilizando el servidor *mfold*. (A) Fragmento completo de VP1 del clon $\lambda 2$, $\Delta G = -158.60$. La zona enmarcada dentro del cuadrado corresponde a la región de conflicto con respecto al clon $\lambda 4$. (B) Fragmento completo de VP1 del clon $\lambda 4$, $\Delta G = -160.30$. La zona enmarcada dentro del cuadrado corresponde a la región de conflicto con respecto al clon $\lambda 2$. (C) Fragmento de 51 nts de VP1 del clon $\lambda 2$, correspondiente a la región de conflicto, $\Delta G = -6.00$. (D) Fragmento de 51 nts de VP1 del clon $\lambda 4$, correspondiente a la región de conflicto, $\Delta G = -6.90$. Los colores que se observan en los paneles A y B corresponden a una gradación de colores de los valores de *P-num* para cada uno de los pares de bases, que va desde el color rojo hasta el negro, para representar si están “bien determinados” o “pobremente determinados”, respectivamente.

3.3.3.5.2 Efecto de los cambios del uso de codones en la estructura secundaria del ARN del fragmento de VP3

En la Tabla 12 se detallan los valores de *P-num* medios teniendo en cuenta todo el fragmento estudiado, así como los valores de ΔG obtenidos para las estructuras de cada uno de los diferentes clones de la región de VP3. Al observar los valores de *P-num* obtenidos se vio, al igual que para la región de VP1 estudiada, que habría 2 grupos relativos de valores, uno más bajo ($\theta 1$, $\theta 2$, $\theta 3$, $\theta 4$, $\theta 5$, $\theta 7$, $\theta 8$ y $\theta 9$) y otro más alto ($\theta 6$). A diferencia de lo que se observó en el apartado anterior con los clones de VP1, se vio que aquellos clones con valores medios de *P-num* más bajos se asociaban con valores de $-\Delta G$ relativamente más bajos, en comparación al clon $\theta 6$ que era el que presentaba el valor de *P-num* medio más alto (ver Tabla 12).

Tabla 12. Valores de *P-num* y de energía libre de Gibbs (ΔG) para los diferentes clones de la región de VP3 estudiada.

| CLON | <i>P-num</i> (media) | ΔG (kcal/mol) |
|-----------|----------------------|-----------------------|
| 01 | 5.9 | -92.50 |
| 02 | 5.7 | -92.50 |
| 03 | 5.6 | -92.50 |
| 04 | 6.2 | -92.20 |
| 05 | 5.9 | -92.50 |
| 06 | 7.6 | -98.20 |
| 07 | 6.2 | -92.50 |
| 08 | 5.5 | -93.60 |
| 09 | 5.8 | -93.30 |

Con el propósito de ver si habían diferencias en la visualización de las estructuras secundarias entre clones pertenecientes a los diferentes grupos relativos de *P-num*, se obtuvieron las imágenes correspondientes a los fragmentos completos de la región VP3 de los clones $\theta 1$ y $\theta 6$ utilizando el servidor *m-fold* (ver Figura 38A y B). Nuevamente, se vio que no hay diferencias importantes entre ambas estructuras, pero sí se vio que difieren en cierto grado en la región que se encuentra enmarcada en el extremo superior de las respectivas imágenes (ver Figura 38A y B). Por esta razón, se analizó en más detalle lo que ocurría en esa región, y se obtuvieron las imágenes correspondientes para los clones $\theta 1$ y $\theta 6$ utilizando fragmentos de 71 nts que incluían la región en conflicto (ver Figuras 38C y D). A pesar de que se observaron diferencias entre las estructuras de los fragmentos de 71 nts correspondientes a los clones $\theta 1$ y $\theta 6$, no se obtuvieron diferencias relevantes en los valores de ΔG , presentando valores de -20.90 y -24.00, respectivamente.

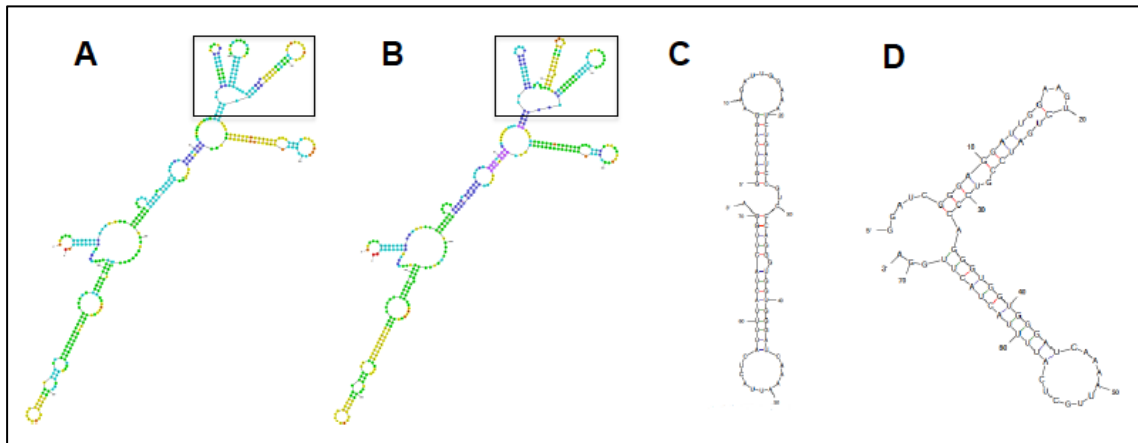


Figura 38. Estructuras secundarias obtenidas para los clones $\theta 1$ y $\theta 6$, utilizando el servidor *mfold*. (A) Fragmento completo de VP3 del clon $\theta 1$, $\Delta G = -92.50$. La zona enmarcada dentro del rectángulo corresponde a la región de conflicto con respecto al clon $\theta 6$. (B) Fragmento completo de VP3 del clon $\theta 6$, $\Delta G = -98.20$. La zona enmarcada dentro del rectángulo corresponde a la región de conflicto con respecto al clon $\theta 1$. (C) Fragmento de 71 nts de VP3 del clon $\theta 1$, correspondiente a la región de conflicto, $\Delta G = -20.90$. (D) Fragmento de 71 nts de VP3 del clon $\theta 6$, correspondiente a la región de conflicto, $\Delta G = -24.00$. Los colores que se observan en los paneles A y B corresponden a una gradación de colores de los valores de *P-num* para cada uno de los pares de bases, que va desde el color rojo hasta el negro, para representar si están “bien determinados” o “pobremente determinados”, respectivamente.

Teniendo en consideración los resultados obtenidos de los análisis de las estructuras secundarias en los apartados 3.3.3.5.1 y 3.3.3.5.2, nos sugerirían que el rol de las estructuras secundarias presentes en los diferentes clones estudiados sería poco significativo en la modulación de las tasas de traducción de dichos clones, ya que no se han encontrado diferencias significativas entre los clones de un mismo fragmento. De esta forma, se estaría dando énfasis a la existencia de un rol muy importante del uso de codones de los fragmentos estudiados, en la modulación de sus respectivas tasas de traducción.

3.4 DISCUSIÓN

Con respecto a las cuasiespecies obtenidas de las diferentes poblaciones del VHA en estudio para la regiones de VP1 y VP3, se vio que el efecto directo de la AMD en inhibir la transcripción celular, e indirecto sobre los *pool* relativos de ARNt (mayor disponibilidad para el virus), se reflejaba en las proporciones de los diferentes clones que se aislaban en cada población (ver Figuras 13 y 20).

En cuanto al análisis de VP1, el hecho de que clones de mayor tasa de traducción se hayan aislado principalmente en la cuasiespecie correspondiente a HM175-HP ($\lambda 7$, $\lambda 13$, $\lambda 14$), no tiene una connotación casual sino causal, ya que resulta ser una población de rápido crecimiento. Por lo tanto, observando los resultados obtenidos, podemos decir que HM175-HP ha evolucionado para traducir más rápido que sus ancestros (F0.05LA y F0.2LA) en la región de VP1 (ver Figura 15 y Tabla 7).

Una observación no menor e importante a resaltar, es que se vio que uno de los clones con mayor tasa de traducción, el clon $\lambda 7$, se aisló también en la cuasiespecie de la población F0.05LA. En esta cuasiespecie el clon se encontraba en una proporción del 26%, y en la cuasiespecie de la población HM175-HP se encontró en una proporción del 89%, lo que indica sin lugar a dudas que al realizar el *molecular breeding* fue seleccionado. Estos resultados están en acuerdo con experimentos realizados por De la Torre y Holland en el año 1990, donde trabajando con el virus de la estomatitis vesicular, también otro virus ARN, observaron que variantes del virus que poseían un *fitness* relativo significativamente superior dentro de una población, podrían encontrarse de cierta forma “escondidas” y suprimidas dentro de una cuasiespecie compleja con un *fitness* relativo promedio más bajo [De la Torre & Holland, 1990]. No obstante, estos investigadores en condiciones de una m.o.i. baja (un valor de 1), y una proporción del clon con mayor *fitness* relativo de aproximadamente un 10 % dentro de la población, consiguieron que este clon se volviera dominante en la población luego de tan sólo 5 pasajes. En cambio, en condiciones de una m.o.i elevada (un valor de 100), y 10 % de proporción, su presencia había disminuido significativamente de forma progresiva en la población al cabo de 5 pasajes. Situación similar la obtuvieron también

utilizando una m.o.i baja y una proporción inicial del clon con mayor *fitness* del 1% [De la Torre & Holland, 1990]. Por lo tanto para permitir la emergencia y dominancia de la variante *fittest* del virus (la que posee un mayor *fitness* en un ambiente particular) en una población, tiene que haber un escenario con ciertas características, además de tener una ventaja individual sobre el resto de los individuos, cuando su presencia se ve suprimida por el resto de la población. De esta forma, para comprender la selección del clon $\lambda 7$ se hizo una analogía entre los resultados obtenidos por estos investigadores y los encontrados en nuestro trabajo. Al poner a replicar juntas las poblaciones F0.05LA y F0.2LA para la obtención de la población HM175-HP, en una proporción inicial de 1:1 y con una m.o.i total de 2 (m.o.i. de 1 de cada una de las 2 poblaciones parentales), la cual es considerada una m.o.i baja, se pasó de tener al clon con mayor *fitness* relativo de la población F0.05LA ($\lambda 7$) en una proporción del 26% a una proporción del 13.6%. Por tanto, nuestra situación emularía bastante bien las condiciones de m.o.i. baja y proporción de aproximadamente un 10% del clon con mayor *fitness* dentro de la población, que son las óptimas que encontraron de la Torre y Holland en sus experimentos, para permitir la emergencia y dominancia del clon $\lambda 7$, y conseguir a su vez una nueva población con un crecimiento más rápido en comparación con sus parentales. Sin embargo, es probable que la población F0.2LA jugara algún rol en el rescate del haplotipo $\lambda 7$ con 3 mutaciones en el IRES (el efecto de éstas se estudiará en el próximo Capítulo) que estaba en una proporción muy inferior. Este aspecto será objeto de estudio en la tesis de Francisco Pérez-Rodríguez.

En lo que respecta a las cuasiespecies de la región de VP3, se encontró un patrón totalmente diferente al observado en la región de VP1, donde no se encontraron diferencias significativas entre las tasas de traducción de las diferentes poblaciones, en ninguna de las condiciones de silenciamiento celular estudiadas (ver Figura 22). A su vez, en la mayoría de los casos tampoco se encontraron diferencias significativas entre clones aislados en diferentes poblaciones, y cuando las había, las diferencias eran bajas (ver Tabla 10). Por lo tanto, la región estudiada de VP3, no contribuiría de forma tan decisiva como la región de VP1 a que HM175-HP sea una población de rápido crecimiento.

A pesar de que existen unas muy pocas excepciones, el código genético se considera universal, lo cual significa que 2 organismos no importando qué

tan evolutivamente distantes sean, van a utilizar siempre las mismas combinaciones de codones para codificar los mismos aa. Además, el código genético es degenerado, lo cual trae como consecuencia la existencia de 61 codones que son utilizados para codificar los 20 aa estándar. Esto significa que mientras la Metionina y el Triptófano son codificados por un solo codón, cada uno del resto de los 18 aa van a ser codificados por entre 2 a 6 codones sinónimos. Debido a que los codones sinónimos no alteran la secuencia de aa codificada, han sido históricamente considerados como equivalentes e intercambiables. De esta manera, mutaciones en el ADN que alteran el uso de codones sinónimo son denominadas “mutaciones silenciosas”, y se asume normalmente que son neutrales en los modelos de mutación y selección [Kimura, 1980; Hurst, 2002]. Sin embargo, en los últimos años un creciente número de evidencias han puesto de manifiesto que la elección de los codones sinónimos no es al azar, y que además puede afectar múltiples aspectos de la biogénesis de proteínas en diversos organismos, incluyendo los humanos [Chaney & Clark, 2015]. El hecho de preferir la utilización de un codón sinónimo sobre otro que codifique para el mismo aa, es un fenómeno conocido como sesgo de uso de codones. Este sesgo es una característica de cada genoma y está mantenido por un equilibrio entre mutación, selección y deriva génica [Bulmer, 1991].

Existe extensa evidencia de que los codones sinónimos son traducidos a diferentes velocidades, debido principalmente a las diferentes concentraciones celulares de los ARNt que los reconocen [Ikemura, 1981; Soerensen & Pedersen, 1991; Dong *et al.*, 1996; Akashi, 2003; Man & Pilpel, 2007]. Es generalmente aceptado que los codones más abundantes se aparean con los ARNt más abundantes, y por tanto, normalmente existe una correlación positiva entre contenido de ARNt y uso de codones [Novoa & Ribas de Pouplana, 2012]. En comparación a los codones sinónimos más frecuentes, los codones sinónimos raros generalmente se aparean con los ARNt cognatos que se encuentran en menor concentración o mediante interacciones débiles en la tercera posición (“wobble”) (ARNt *near cognate*). Por estas razones, los codones raros son generalmente traducidos más lentamente que los codones abundantes [Chaney & Clark, 2015].

La traducción o síntesis de proteína es un proceso crucial para la viabilidad y función celular; y debido a las diferentes concentraciones de ARNt procede a una tasa no uniforme a lo largo de los transcritos. Esencialmente se trata de un proceso de polimerización que consiste de 4 fases: iniciación, elongación, terminación y reciclaje. La iniciación ocurre cuando el ribosoma se une al sitio de unión del ribosoma, cercano al extremo 5' del ARNm que posee la secuencia de codones a traducir. Durante la fase de elongación, el ribosoma permite el ensamblaje de la cadena polipeptídica añadiendo un aa por cada codón y ciclo de elongación, los cuales son transportados hacia el ribosoma por los ARNt. La terminación involucra la liberación del péptido completo por parte del ribosoma, cerca del extremo 3' del ARNm, y finalmente el reciclaje es la separación del ribosoma y el ARNm para quedar disponibles para ser utilizados en un nuevo ciclo de traducción [Zouridis & Hatzimanikatis, 2008].

La tasa de traducción tiene un rol muy importante en la fidelidad de la traducción y en el plegamiento de la proteína. Ésta varía a lo largo de un único transcrito debido a las pausas y paradas que sufre el ribosoma, conforme va elongando la cadena polipeptídica [Shah *et al.*, 2013]. Se entiende como pausa al tiempo que tarda el ribosoma en encontrar el ARNt correcto, y como parada a la cantidad de tiempo que desperdicia el ribosoma en una posición particular debido a la interferencia por un ribosoma adyacente, que le impide continuar con la elongación de la proteína [Shah *et al.*, 2013]. Los mecanismos que contribuyen a estos fenómenos son diversos, y dentro de ellos se incluye a la estructura del ARNm. La velocidad de procesamiento del ribosoma está fuertemente modulada por la estabilidad del ARNm a nivel local y por la presencia de motivos estructurales [Hunt *et al.*, 2014]. Hace casi 3 décadas, Kozak (1986) encontró que la inserción de oligonucleótidos diseñados para crear estructuras tipo *hairpin*, previos al codón de iniciación ATG podrían tener una importante influencia en la velocidad de traducción. Utilizando plásmidos que codificaban para la proinsulina, cuando los *hairpins* requerían una energía de $\Delta G = -30$ kcal/mol no reducían la producción de proinsulina. Sin embargo, un *hairpin* con una estructura más estable, con un $\Delta G = -50$ kcal/mol, reducía en un 85 a 95% la producción de la misma [Kozak, 1986]. Posteriormente, Babendure y colaboradores (2006) utilizando vectores bicistrónicos que tenían clonado los genes que codifican para las proteínas RFP (*red fluorescent*

protein) y GFP (*green fluorescent protein*), encontraron que cuando la estabilidad de un *hairpin* clonado justo antes del gen de GFP, se incrementaba pasando de $\Delta G = -25$ kcal/mol a $\Delta G = -35$ kcal/mol, tenía como consecuencia un descenso significativo en la eficiencia de traducción de GFP. Además, cuando el *hairpin* tenía una estabilidad de $\Delta G = -50$ kcal/mol, se inhibía la traducción de GFP por completo [Babendure *et al.*, 2006]. Teniendo en cuenta que en los clones obtenidos tanto para la región de VP1 como para la región de VP3, nunca se obtuvo una diferencia superior a $\Delta G = -6$ kcal/mol entre las estructuras secundarias de los diferentes clones de una misma región, se podría concluir que la presencia de estructuras secundarias no explicarían las diferencias en las tasas de traducción obtenidas entre los diferentes clones.

Otro importante modulador de la tasa de traducción es la proteína naciente, la cual puede ocasionar una disminución del movimiento del ribosoma a través de interacciones con el túnel de salida del ribosoma [Hunt *et al.*, 2014; Tarrant & von der Haar, 2014]. Normalmente se asume que el túnel de salida es neutro con respecto a las secuencias peptídicas que transitan por él. Sin embargo, nuevos datos obtenidos de diferentes sistemas muestran que el túnel de salida no puede ser neutro a las diferentes secuencias. Las cadenas peptídicas contienen motivos de secuencia especiales, y cuando estas secuencias efectoras se encuentran situadas en el túnel de salida de los ribosomas que se encuentran traduciendo, pueden afectar dramáticamente tanto la elongación de la proteína como la terminación de la misma [Tenson & Ehrenberg, 2002]. Sorprendentemente, cuando estos motivos efectores fueron comparados, no se encontró mucha similitud de secuencia entre ellos. Sin embargo, en muchos casos, dichos motivos contenían varios residuos cargados positivamente que podían interactuar con el esqueleto de fosforibosas del ARN ribosomal, cargado negativamente, que forma parte de las paredes del túnel, pero no se detectaron otras homologías. No obstante, algunas características funcionales comunes entre los péptidos nacientes pudieron ser identificadas. Entre ellas se encuentra el hecho de que en todos los casos conocidos, los péptidos con motivos efectores actúan en *cis* y por tanto sólo afectan a aquellos ribosomas donde están siendo sintetizados. Otra característica es que la mayoría de las secuencias efectoras dan lugar a

paradas de los complejos ribosomales tanto en la fase de elongación como de terminación de la síntesis proteica [Tenson & Ehrenberg, 2002].

Por otra parte, existe evidencia experimental de que las tasas a las cuales son incorporados los aa, son variables. Se ha visto que la incorporación del aa Prolina a la cadena peptídica naciente es de 3 a 6 veces más lenta en comparación al resto de los 19 aa, debido a la naturaleza inusual del residuo cíclico que posee, el cual limita la formación de la estructura secundaria de la proteína. Por lo tanto, motivos ricos en poliprolinas conducirían a paradas traduccionales [Chevance *et al.*, 2014].

Teniendo en consideración que tanto la presencia de regiones ricas en aa cargados positivos como la existencia de regiones ricas en poliprolinas pueden alterar de forma negativa la tasa de traducción del ARNm, se analizaron las secuencias de los diferentes clones obtenidos tanto para la región de VP1 como de VP3. Se vio que en ambas regiones estudiadas había presencia de aa con carga positiva, pero éstos se encontraban de forma aislada y no inmersos en regiones ricas en aa cargados positivamente. De hecho, ninguno de los cambios de aa registrados en los diferentes clones de la región de VP1 inducían a la aparición de un aa con carga positiva (ver Figura 26). En cuanto a los clones de la región de VP3, si bien el cambio compartido por todos ellos en la posición 91 inducía a la aparición de un aa con carga positiva, éste se encontraba en una región rica en aa con carga neutra (ver Figura 27). También se vio que el cambio en la posición 33 del clon $\theta 6$ inducía a la aparición de un aa con carga positiva, pero nuevamente este aa se encontraba en un región rica en aa con carga neutra y negativa (ver Figura 27). Además, se observó la ausencia de motivos ricos en poliprolinas tanto en la región de VP1 como en la de VP3 estudiadas. Por lo tanto, ante la ausencia de motivos ricos en cargas positivas y/o de poliprolinas, podemos concluir que estos factores no participarían en la modulación de las tasas de traducción obtenidas para los diferentes clones.

Otro factor clave en la modulación de la tasa de traducción es el uso de codones. Las concentraciones celulares de ARNt isoaceptores varían sustancialmente entre codones sinónimos lo cual sugiere que la tasa de traducción puede ser modificada por la elección de codones [Hunt *et al.*, 2014]. Los codones raros han sido históricamente considerados como levemente

deletéreos debido a sus bajas tasas de traducción y precisión [Bulmer, 1991]. Muchos investigadores asumen que la evolución ha favorecido a los codones abundantes en general, y que al no ser la presión selectiva negativa lo suficientemente fuerte para eliminar completamente todos los codones raros, algunos continúan siendo incorporados como resultado de la deriva mutacional [Bulmer, 1991]. Sin embargo, los codones raros sinónimos no se encuentran distribuidos aleatoriamente a lo largo de las secuencias codificantes; de hecho tienden a agruparse en *clusters* dentro de las secuencias codificantes de proteínas de la mayoría de las especies [Clarke & Clark, 2010]. Este hecho conduce a la hipótesis de que los codones raros se encontrarían bajo selección positiva en ciertas regiones debido a roles funcionales, como su influencia en el plegamiento proteico. Sin embargo, debido a la baja precisión traduccional, los codones raros estarían bajo selección negativa en regiones codificantes funcionalmente importantes [Clarke & Clark, 2010]. A su vez, secuencias altamente expresadas tienden a estar codificadas por codones abundantes, lo cual conduce a la hipótesis de que los codones abundantes estarían bajo una fuerte selección positiva en genes altamente expresados debido a sus rápidas tasas de traducción, conduciendo así a una mayor eficiencia de la producción proteica [Gouy & Gautier, 1982].

La presencia de regiones enriquecidas en codones raros cercanas al extremo 5' de muchas secuencias codificantes, ha sido observada en muchas especies incluyendo *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* [Tuller *et al.*, 2011]; así como también en virus como lo es el virus West Nile [Ma *et al.*, 2014]. Estas regiones son denominadas “rampas” y debido a que cuando el ribosoma llega a traducir estas regiones, la cadena polipeptídica naciente aún no ha salido del ribosoma, se considera que su función no estaría relacionada con la regulación del plegamiento co-traduccional. Sin embargo, su presencia tendría la función de optimizar el espaciamiento entre ribosomas en el ARNm, y prevenir así la existencia de atascos de ribosomas (ver Figura 39) [Tuller *et al.*, 2011]. La reducción de atascos es beneficiosa en varios aspectos. En primer lugar, se reduce la cantidad total de tiempo que los ribosomas son secuestrados en un transcrito particular. En segundo lugar, la existencia de muchos ribosomas atascados en codones poco frecuentes, ocasiona que éstos se encuentren mayor tiempo sobre el transcrito, incrementando así la

probabilidad de liberaciones espontáneas de los ribosomas del ARNm. En tercer lugar, la síntesis de proteínas abortivas podría ocurrir debido a colisiones entre ribosomas atascados, por tanto, las rampas serían ventajosas en prevenir abortos espontáneos dependientes de colisiones. En cuarto lugar, pero no menos importante, las rampas podrían limitar al inicio de los transcritos la mayoría de las abortos que tienen lugar. Esto sería muy beneficioso para disminuir los costos de energía (ATPs) y de las materias primas como lo son los ARNt cargados, si las abortos tuvieran lugar en una región avanzada del transcrito [Tuller *et al.*, 2010]. A pesar de que la existencia de rampas al inicio de un transcrito incrementaría el tiempo de la traducción al comienzo, esto se compensaría con un incremento global en la eficiencia de la síntesis proteica [Fredrick & Ibba, 2010].

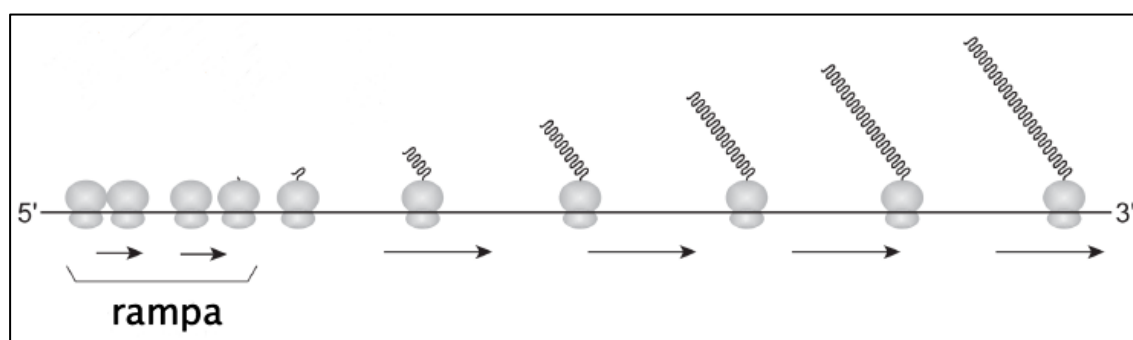


Figura 39. Efecto de la presencia de una “rampa” o región enriquecida en codones poco frecuentes cercano al extremo 5’ de un ARNm. Imagen adaptada de Fredrick & Ibba, 2010.

Los resultados obtenidos en las tasas de traducción para los diferentes clones de la región de VP3, estarían en concordancia con la existencia de estas “rampas”, al inicio de sus extremos 5’. La región con 4 codones con frecuencias de 50 a 55% en las posiciones 8 a 11 de la proteína de VP3, ejemplificarían una rampa (ver Figura 35). A pesar de encontrar pequeñas variaciones entre las secuencias de nucleótidos de estos clones, se vio que presentaban una homogeneización en los valores de sus tasas de traducción en las diferentes condiciones de silenciamiento celular estudiadas, no encontrando diferencias significativas en la mayoría de los casos (ver Figura 36). Esta “rampa” sería artificial ya que el fragmento de VP3 estudiado no se encuentra en el extremo 5’ del ARN vírico, pero confirma la teoría del efecto

“rampa” en la velocidad de traducción. Sin embargo, es evidente el efecto que estos codones podrían tener en ocasionar una pausa importante durante la traducción del ARNm viral.

Por otra parte, además del enriquecimiento de codones raros en el extremo 5', algunas especies muestran un enriquecimiento de codones raros en el extremo 3' de secuencias codificantes. En comparación con los codones raros en el extremo 5', estos codones raros en el extremo 3' han sido menos estudiados en la literatura. No obstante, se considera que serían beneficiosos al permitir un tiempo adicional para que se lleve a cabo el plegamiento co-traducciona l previo a la terminación y liberación de la cadena polipeptídica naciente [Clarke & Clark, 2010].

En el ribosoma existe una clara división de tareas entre sus 2 subunidades. La pequeña se encarga principalmente de codificar la información genética, mientras que la subunidad grande es la responsable de la elongación y liberación de la proteína que sintetiza [Ramakrishnan, 2002]. La síntesis de proteína ocurre en el sitio activo peptidiltransferasa ubicado en la subunidad mayor del ribosoma. La proteína naciente para salir al exterior debe atravesar el túnel de salida del ribosoma, ubicado también en la subunidad mayor del ribosoma, el cual posee un diámetro de unos 10 nm. Este túnel limita la conformación de los 30 a 40 aa recientemente sintetizados de la proteína naciente, y debido a que su diámetro es pequeño, no permite que la cadena naciente adopte una estructura terciaria, aunque sí es lo suficientemente ancho como para permitir la conformación de una α -hélice (ver Figura 40) [Woolhead *et al.*, 2004]. Una vez que la cadena naciente tiene una longitud superior a 30 a 40 aa, su extremo N-terminal emerge a la superficie del ribosoma, donde las restricciones conformacionales se reducen significativamente. De esta forma, el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica tiene la oportunidad de comenzar a plegarse antes de que aparezca su extremo C-terminal. Las pausas/paradas transitorias que sufren los ribosomas le permiten a las proteínas nacientes la libertad de plegarse, o facilitar la interacción con chaperonas o proteínas reguladoras, sin la interferencia de las regiones de las proteínas que se traducen posteriormente (ver Figura 40) [Parmley & Huynen, 2009].

Numerosos estudios han demostrado que la sustitución de codones sinónimos poco frecuentes por otros más frecuentes inhibe la función de proteínas específicas, probablemente debido a que no se forma la estructura funcional nativa [Komar *et al.*, 1999; Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007; Chaney & Clark, 2015]. Un ejemplo clásico es el gen que codifica para la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) en *Escherichia coli*. La secuencia codificante *wild type* de CAT contiene 2 *clusters* largos de codones raros, donde se vio que el reemplazo de uno de ellos por codones sinónimos más frecuentes, resultó en una traducción más rápida de CAT, pero su actividad específica se había reducido en un 20%. Esto estaría sugiriendo que alguna región de la secuencia traducida de CAT con codones más frecuentes, adopta una estructura distinta a la estructura nativa funcional [Komar *et al.*, 1999]. Otro ejemplo, es lo que sucede en humanos, donde una mutación “silenciosa” o sinónima en el gen *MDR1*, provoca un plegamiento diferencial de la glicoproteína que codifica, afectando la especificidad de sustrato. Esto indicaría que el cambio de conformación es causado por un desajuste entre traducción y plegamiento [Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007].

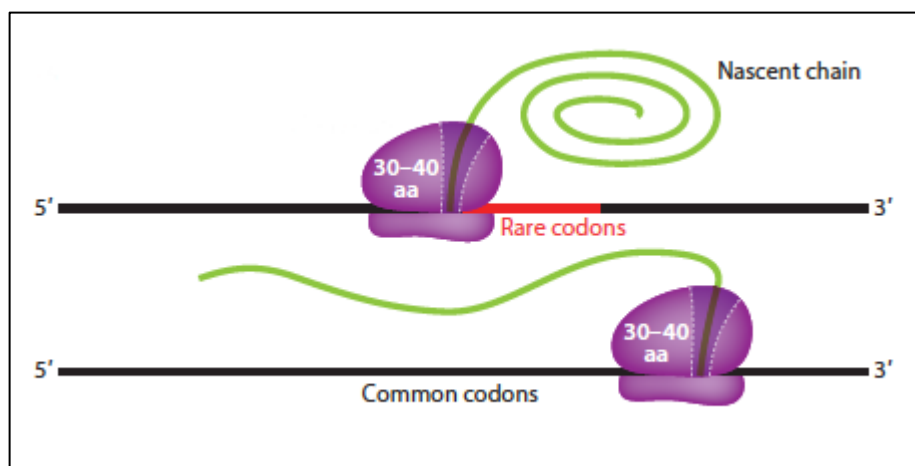


Figura 40. Los codones raros o poco frecuentes inducirían pausas transitorias de los ribosomas, necesarias para modular el plegamiento co-traduccional de la proteína nascente. Imagen extraída de Chaney & Clark, 2015.

Teniendo en cuenta lo que se ha expresado anteriormente, es importante destacar que la adaptación del uso de codones a la disponibilidad de los ARNt, debe encontrar un equilibrio crítico entre la tasa de traducción y el

correcto plegamiento de las proteínas para conseguir un *fitness* elevado. Es por esta razón que para el VHA se ha propuesto la existencia de una cinética de traducción del tipo *fine-tuning* [Aragonès *et al.*, 2010], donde hay una combinación de codones raros y abundantes, en la cual el estratégico uso de codones raros, provoca la existencia de pausas más largas durante la traducción, las cuales permiten que el segmento ya traducido de la proteína pueda plegarse en ausencia de cualquier tipo de interferencia que pueda causar el segmento de la proteína que aún no se ha traducido [Gingold & Pilpel, 2011]. De hecho, cuando se puso el VHA a replicar en presencia de silenciamiento celular inducido artificialmente con AMD, en vez de obtenerse una optimización de su uso de codones, se obtuvo una re-deoptimización para seguir manteniendo esa sintonización fina en su tasa de traducción, entre codones abundantes y raros [Aragonès *et al.*, 2010].

El uso de codones de los virus, es un claro ejemplo de cómo los genes se adaptan a las necesidades de expresión. El hecho de que los virus requieran de la maquinaria traduccional, así como de todos los recursos de la célula hospedadora para su expresión, trae como consecuencia que muchos virus a lo largo de su evolución hayan adquirido diversos mecanismos que le permitan explotar el uso de codones del hospedador. Las secuencias codificantes de algunos virus, particularmente aquellas que requieren de una alta expresión, poseen un sesgo en el uso de codones similar al que posee su organismo hospedador [Bahir *et al.*, 2009]. Sin embargo, hay otros virus como es el caso del VHA, que posee un uso de codones altamente deoptimizado. Además el VHA posee un IRES poco eficiente, que combinado con el uso de codones deoptimizado tiene como consecuencia una baja producción proteica (ver Figura 41A). Asimismo, tal y como se comentó anteriormente para el ejemplo del gen que codifica para CAT, la sustitución de codones poco frecuentes por codones abundantes en el genoma del VHA, induciría a un aumento en la producción proteica, pero éstas no tendrían el plegamiento adecuado, lo cual se traduciría probablemente en una disminución del número de partículas infecciosas (ver Figura 41B). Esto estaría en acuerdo con la re-deoptimización del uso de codones del VHA que se observó en presencia de AMD.

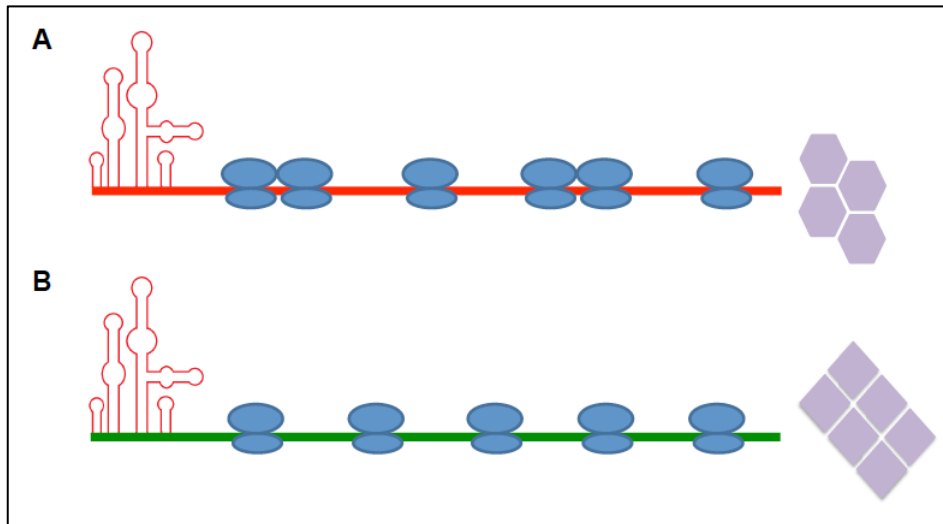


Figura 41. Uso de codones del VHA. (A) En condiciones normales (ausencia de silenciamiento celular), el IRES ineficiente y el uso deoptimizado de codones inducen a una baja producción proteica pero plegada correctamente. (B) En condiciones de silenciamiento celular, un IRES ineficiente y un uso de codones optimizado inducían a un aumento en la síntesis proteica pero con un plegamiento no adecuado.

Por otra parte, otro hecho que también pone de manifiesto el rol crucial del uso de codones del VHA en la modulación de su tasa de traducción, es que el plegamiento de su cápside es independiente de la actividad de algunas proteínas chaperonas muy comunes en otros picornavirus [Geller *et al.*, 2007]. Aragonés y colaboradores (2010), estudiaron el efecto que tenía la geldanamicina, un inhibidor de la chaperona Hsp90 en el VHA y en poliovirus, utilizando concentraciones crecientes desde 0 a 1 μM de la misma. Como resultado se obtuvo que el título infeccioso del VHA no se veía afectado por la presencia de concentraciones crecientes de geldanamicina, mientras que el de poliovirus se vio severamente afectado [Aragonés *et al.*, 2010].

Recientemente, Gorochofski y colaboradores (2015) han publicado la primera evidencia de una fuerte relación sinérgica entre 2 factores, que de forma separada influyen la tasa de traducción tanto en organismos procariotas como eucariotas. Sus estudios mostraron una clara relación entre la abundancia de ARNt y la estructura secundaria local del ARNm, mantenida a través de la elección de codones a lo largo de los genomas de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Encontraron que regiones del ARNm con un alto contenido de estructuras secundarias, estaban codificadas por codones que se apareaban con ARNt altamente abundantes; mientras que regiones con un

bajo contenido de estructuras secundarias, eran codificadas por codones que se apareaban con ARNt poco abundantes. Teniendo en cuenta que ambos factores por separado influyen significativamente las tasas de elongación de la traducción, la relación observada sugeriría la existencia de un *trade-off* o compensación entre ambos factores [Gorochofski *et al.*, 2015]. La región P1 (secuencia codificante de las proteínas estructurales) del VHA es muy rica en codones poco abundantes. El 30% de ellos se encuentran en zonas muy estructuradas del ARN [Sánchez *et al.*, 2003b], lo cual induciría una pausa importante del ribosoma, mientras el 70% restante se encuentran en zonas menos estructuradas, lo cual estaría en acuerdo con la propuesta del *trade-off*.

Para finalizar, podemos concluir que la modulación de la tasa de traducción en los diferentes organismos es un proceso extremadamente complejo, en el cual participan numerosos factores con el fin de obtener aquellas tasas que mejor se adapten a las necesidades de cada uno teniendo en cuenta sus respectivas limitaciones.

3.5 CONCLUSIONES

- ❖ La población HM175-HP tiene una mayor tasa de traducción en la región de VP1 que sus ancestros y que la población de L0.
- ❖ La presencia de tan sólo 1 o 2 codones poco frecuentes pueden producir una disminución significativa de la tasa de traducción, que tendrá un efecto mayor o menor dependiendo del contexto de secuencia en el cual se encuentran.
- ❖ La presencia de codones abundantes puede equilibrar el efecto de los codones menos frecuentes a través del incremento de la tasa de traducción en regiones concretas.
- ❖ La posición de los codones poco frecuentes/abundantes y el contexto en el cual se encuentran, tiene un rol muy importante en la modulación de la tasa de traducción, y el efecto que producen es localizado.
- ❖ El uso de codones del VHA es un factor crucial en la modulación de su tasa de traducción, observandose esto de forma más significativa en la región de VP1. Esto sugiere un rol clave en permitir la generación de una cápside altamente compacta, gracias a la correcta combinación de codones abundantes y poco frecuentes que permiten un plegamiento adecuado. Por lo tanto, esto le permitiría al VHA tener un alto nivel de persistencia en el ambiente, y de supervivencia a las condiciones extremas a las que se enfrenta en su ciclo entero-hepático; así como también ser lo suficientemente flexible como para permitir la desencapsidación de su material genético, e iniciar su ciclo biológico.

**4. CAPÍTULO 2:
Efecto de tres mutaciones del
IRES sobre la velocidad de
traducción en regiones de la
cápside de poblaciones del virus
de la hepatitis A**

4.1 ANTECEDENTES

Las estructuras que ahora conocemos como elementos IRES, fueron originalmente descritas hace casi 3 décadas en el genoma de ARN de picornavirus. Pelletier y Sonenberg en 1988, demostraron que la región 5'NCR de poliovirus era capaz de dirigir una iniciación interna de síntesis proteica dentro de un ARNm bicistrónico sintético. Estos autores utilizaron el término de “pista de aterrizaje de ribosomas” (*ribosome landing pad*) para este elemento. Estudios análogos utilizando la región 5'NCR del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) reportados por Jang y colaboradores en 1988, acuñaron el término de sitio interno de entrada de ribosoma o IRES, el cual ha sido utilizado generalmente desde entonces [Belsham, 2009].

Teniendo en cuenta las secuencias de nucleótidos, las características estructurales y los requerimientos para una óptima actividad, se ha realizado una clasificación en 3 tipos de IRES dentro de los picornavirus. El Tipo I, que son los IRES que poseen los enterovirus, como lo son poliovirus, rinovirus y coxsackievirus; el Tipo II, que es el IRES presente en cardiovirus (como EMCV), aphthovirus (como FMDV), parechovirus y algunos erbovirus; y el Tipo III, el cual podemos encontrar solamente en el VHA [Borman *et al.*, 2001; Sweeney *et al.*, 2012]. Una característica compartida por estos 3 tipos de IRES es la presencia cerca del extremo 3' de un segmento de polipirimidinas, localizado en las proximidades de un codón AUG.

Además, se ha propuesto la existencia de un cuarto tipo de IRES dentro de los picornavirus, que fue caracterizado primariamente en teschovirus porcino y carece de un segmento significativo de polipirimidinas como poseen los otros 3 tipos. También se encuentra un IRES similar en kobuvirus porcino, en miembros de teschovirus, sapelovirus, senecavirus, tremovirus y avihepatovirus. Este cuarto tipo de IRES comparte ciertas características estructurales y funcionales con los elementos IRES del virus de la hepatitis C y de los pestivirus, miembros de la familia *Flaviviridae* [Pisarev *et al.*, 2004]. Recientemente, Sweeney y colaboradores (2012) propusieron la existencia de un quinto tipo de IRES en miembros de kobuvirus, salivirus y paraturdivirus dentro de la familia *Picornaviridae*. Éstos poseen 4 dominios denominados de I a L y requieren de factores de iniciación únicos [Sweeney *et al.*, 2012].

Los elementos IRES dirigen una iniciación interna de la síntesis proteica de un modo cap-independiente. Este proceso es mecánicamente bastante diferente del mecanismo estándar cap-dependiente, utilizado en los ARNm celulares. Todos los ARNm celulares citoplasmáticos tienen una estructura cap (m^7GpppG) en el extremo 5', a la cual se une el factor de iniciación de la traducción eIF4E, el cual a su vez es parte del complejo eIF4F, el cual incluye además al factor eIF4A (una helicasa de ARN), y el eIF4G que actúa como un "andamio de proteínas" (*protein scaffold*). A través de múltiples interacciones proteína-proteína, este complejo proteico actúa como una especie de puente entre el ARNm y la subunidad ribosomal 40S. Luego, el complejo de factores de iniciación y la subunidad menor del ribosoma, migran a lo largo del ARNm hasta encontrar el codón de iniciación AUG, y es en este punto donde la subunidad 60S del ribosoma se une para formar así el ribosoma completo, entonces los factores de iniciación son liberados y comienza la formación del polipéptido [Pestova *et al.*, 2007].

La presencia de un IRES en el ARN viral tiene múltiples consecuencias para la biología del virus. Entre ellas se encuentra el hecho de que el ARN viral no requiere de una estructura cap, para ser reconocido eficientemente por la maquinaria de traducción celular. De hecho, el ARN de los picornavirus tiene unido covalentemente en su extremo 5' un péptido pequeño codificado por el virus, llamado VPg, fruto del proceso de replicación. Por otra parte, las regiones 5'NCR de muchos picornavirus también contienen una variedad de otros elementos estructurales, incluyendo por ejemplo una estructura en hoja de trébol (*cloverleaf*) en el extremo 5' de los genomas de enterovirus, y la presencia de pseudolazos o pseudonudos (*pseudoknots*) dentro de las secuencias de cardiovirus y aftovirus. También, la presencia de un IRES le permite a muchos picornavirus inhibir la síntesis proteica de la célula hospedadora, mediante el bloqueo de la iniciación de la traducción cap-dependiente, sin comprometer la síntesis proteica viral, siendo esto muy importante para contrarrestar los mecanismos de defensa del organismo hospedador, como por ejemplo la inducción de interferón [Belsham, 2009]; así como evitando cualquier tipo de competencia por los recursos y maquinaria traduccional de la célula [Bedard & Semler, 2004].

Los picornavirus poseen una región 5'NCR larga (600 a 1300 nts), sumamente estructurada y con varios codones AUG no auténticos para iniciar la traducción previos al codón de inicio, que podría imposibilitar un escaneo o *scanning* por parte de los ribosomas. Teniendo en cuenta estas características y la ausencia de una estructura cap en el extremo 5', se acepta que la iniciación de la traducción en los picornavirus es a través de un mecanismo cap-independiente, donde la subunidad ribosomal 40S reconoce una secuencia, una estructura de ARN, o un complejo ribonucleoproteico dentro de la región 5'NCR y se inicia la traducción en el codón de inicio auténtico. Durante la infección por poliovirus, rinovirus humano o coxsackievirus, las proteinasas virales 3C y 2A clivan varias proteínas celulares, incluyendo el factor de iniciación de la traducción eIF4G, el cual causa un rápido *shut-off* de la traducción dependiente de cap, quedando así la maquinaria celular disponible casi en exclusividad para llevar a cabo los procesos virales [Bedard & Semler, 2004]. Por otra parte, el FMDV posee una proteína líder (L), la cual se sabe que es requerida para el clivaje de eIF4G que inhibe la traducción dependiente de cap durante una infección [Devaney *et al.*, 1988]. En contraste, EMCV no utiliza el clivaje de factores de iniciación de la traducción para hacer un silenciamiento de la traducción de la célula hospedadora, sino que alternativamente activa un represor traduccional, 4E-BP1, que inhibe la traducción dependiente de cap al unirse a la subunidad de unión a cap, el factor eIF4E [Gingras *et al.*, 1996]. Por el contrario, el VHA tiene un comportamiento único entre los picornavirus ya que no es capaz de realizar un *shut-off* de la traducción celular durante la infección, y se ha demostrado que el VHA requiere de un eIF4G intacto para llevar a cabo su traducción [Borman & Kean, 1997].

La región 5'NCR del VHA tiene una longitud de unos 735 nts, y es la región más conservada del genoma. Esta región está involucrada tanto en la replicación como en la iniciación de la traducción del virus. Predicciones de plegamiento y análisis bioquímicos mostraron que esta región forma una estructura secundaria muy ordenada y compleja, que contiene una región rica en pirimidinas y un IRES de una longitud aproximada de 450 nts, que posee entre 10 y 12 tripletes AUG precediendo al codón de iniciación auténtico de la traducción. El IRES permite la iniciación de la traducción del genoma viral de

un modo cap-independiente, como fue mencionado anteriormente. La mayor parte del conocimiento que se tiene de la actividad del IRES del VHA es derivado de estudios realizados con la cepa de referencia HM175, y sus variantes adaptadas a cultivo celular. Estos experimentos, han puesto de manifiesto que el VHA posee la más baja actividad en la iniciación de la traducción IRES dependiente entre los picornavirus [Brown *et al.*, 1994; Borman *et al.*, 1997b]. Estas características han sido atribuidas a una muy baja afinidad de la región 5'NCR por los factores de traducción. La hipótesis de que el lento crecimiento del VHA en cultivo celular podría estar relacionado con su ineficiente traducción, es apoyada por la emergencia de mutaciones en la región 5'NCR en cepas adaptadas a cultivo celular, en donde su replicación se ve aumentada [Day *et al.*, 1992; Mackiewicz *et al.*, 2010].

En 1991, Brown y colaboradores determinaron parcialmente la estructura secundaria de la región 5'NCR del VHA, y realizaron un modelo basándose en la identificación de sustituciones nucleotídicas covariantes (ver Figura 42). Posteriormente, la estructura fue refinada aplicando modelos termodinámicos y con los resultados de experimentos en los cuales se examinaba el efecto de RNasas específicas de simple y doble cadena en ARN sintéticos [Brown *et al.*, 1991]. El modelo de la estructura final contiene 6 estructuras secundarias principales denominadas dominios I a VI, comenzando desde el extremo 5' de la región 5'NCR (ver Figura 42). Los dominios I y II tienen una estructura primaria relativamente conservada. El dominio I (nts 1 a 41) es probable que forme una estructura en horquilla en el extremo 5' del genoma. En la estructura del dominio II (nts 42 a 98) se ha predicho la existencia de posibles *pseudoknots*. En el dominio III (nts 99 a 323) se ha definido la existencia de una estructura en "tallo-bucle" (*stem-loop*). Luego, en los dominios IV y V (nts 324 a 692) se han identificado 2 grandes estructuras en *stem-loop*. En el dominio IV se pueden observar múltiples *loops* internos y una estructura en forma de trébol; y en el dominio V hay largas hélices y un brazo en *stem-loop* que podría formar un *pseudoknot*. Finalmente, el dominio VI se extiende desde la base U-706 hasta el AUG-11, el cual puede iniciar la pauta de lectura [Brown *et al.*, 1991].

Unos años más tarde, Brown y colaboradores encontraron que transcritos bicistrónicos con la ausencia de los dominios I y II, traducían con la

misma eficiencia que transcritos bicistrónicos conteniendo la región completa de 5'NCR en el espacio intercistrónico. Ésto sugiere que los primeros 150 nts no contribuyen a la actividad del IRES y podrían cumplir un rol minoritario, si es que lo tienen, en la traducción. Sin embargo, mutantes a los que se les había deleccionado un fragmento mayor (hasta el nt 257), traducían de una forma mucho menos eficiente que los transcritos conteniendo la secuencia completa de 5'NCR, y que aquellos a los que se les habían deleccionado los primeros 150 nts. Por lo tanto, el límite 5' del IRES se encontraría dentro del dominio III. Estos investigadores observaron también que la delección de cualquier segmento de los dominios III, IV y V, suprimía la traducción en los transcritos bicistrónicos. Por último, utilizando constructos bicistrónicos con delecciones cerca del extremo 3' de la región 5'NCR, encontraron que el límite 3' del IRES del VHA estaría muy cercano a los codones de inicio de la traducción auténticos [Brown *et al.*, 1994].

Recientemente, en nuestro laboratorio se han detectado 3 mutaciones en el IRES: U359C, U590C y U726C, que aparecen en un 0.72% en la población de F0.05LA y en aproximadamente un 90% en la población de crecimiento rápido o HM175-HP (tesis doctoral en preparación, de Francisco Pérez-Rodríguez), y están ausentes en las poblaciones de L0 y F0.2LA (para su ubicación, ver Figura 42). Se observó que la actividad del IRES en presencia de estas 3 mutaciones se incrementaba de forma significativa, en comparación con el IRES en ausencia de estas mutaciones.

Por lo tanto, estas mutaciones fueron introducidas en los clones de VP1 y VP3 previamente obtenidos, para poder estudiar si se modificaba (aumentaba, disminuía o no cambiaba) la velocidad de traducción de los distintos haplotipos.

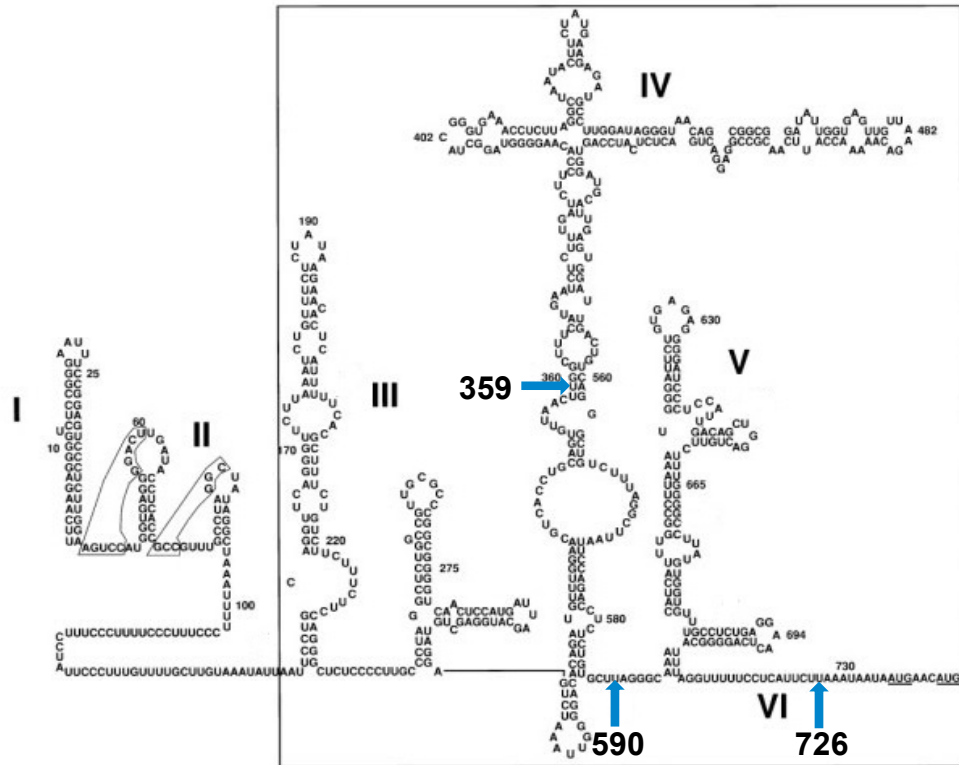


Figura 42. Modelo de la estructura secundaria de la región 5'NCR del VHA. Se pueden observar los 6 dominios que la componen denominados del I-VI. La región que aparece dentro del rectángulo correspondería al IRES, donde se encuentran los codones de iniciación auténticos de la traducción AUG-11 y AUG-12, los cuales están subrayados. Las flechas azules señalan las posiciones en las que se encuentran las 3 mutaciones del IRES que le confieren una mayor actividad: U359C, U590C y U726C (tesis doctoral en preparación, de Francisco Pérez-Rodríguez). Imagen adaptada de Brown *et al.*, 1991.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Introducción de las mutaciones U359C, U590C y U726C en el IRES del VHA, de los haplotipos de VP1 y VP3

Para estudiar el efecto que tenían las mutaciones U359C, U590C y U726C, sobre la velocidad de traducción de regiones de la cápside del VHA, se introdujo cada una de ellas de forma independiente a través de 3 rondas de PCR diferentes en los IRES del VHA, presentes en cada uno de los diferentes haplotipos de VP1 y VP3.

4.2.1.1 Introducción de la mutación U359C

Los pasos que se llevaron a cabo para introducir la mutación U359C (T359C) y comprobar el éxito de la inserción, se detallan a continuación:

(i) PCR para introducir la mutación U359C (T359C). Se realizó de la siguiente manera:

1) Conformación de la siguiente mezcla de reacción por cada muestra:

- 37 μ l de agua destilada libre de DNasa/RNasa (Gibco[®], Life Technologies™)
- 5 μ l de Buffer *PfuUltra* II 10X concentrado (Agilent Technologies)
- 1 μ l de dNTP's mix 25 mM cada uno
- 2 μ l de MgSO₄ (Roche) 25 mM
- 1 μ l de los *primers* Fwd T359C y Rev T359C (ver Tabla 13) a una concentración 10 μ M. Fueron diseñados siguiendo las recomendaciones especificadas en el manual del *kit QuikChange[®] Site-Directed mutagenesis* (Stratagene).
- 1 μ l de la ADN polimerasa *PfuUltra* II HS (Agilent Technologies).

2) A la mezcla de reacción se le añadió 2 μ l del vector con el inserto correspondiente a cada uno de los haplotipos a una concentración de 5 a 30 nanogramos (ng). Se obtuvo un volumen final de 50 μ l.

3) El volumen final se incubó:

- 94°C durante 5 minutos (desnaturalización inicial)
- 20 ciclos de 95°C / 30 segundos, 62°C / 2 minutos y 72°C / 2 minutos (desnaturalización, hibridación y extensión, respectivamente)
- 72°C durante 10 minutos (extensión final)

Las incubaciones se realizaron en el termociclador *GeneAmp PCR system* 2700, de Applied Biosystems. Los productos resultantes de la PCR se almacenaron a 4°C.

(ii) Tratamiento de los productos obtenidos por PCR con la enzima *DpnI* a una concentración de 10 U/μl (Thermo Scientific), con el objetivo de digerir el vector de ADN molde metilado, y quedarnos sólo con el vector de ADN no metilado que posee la mutación introducida en el IRES. El protocolo de la digestión con *DpnI* que se realizaba se detalla a continuación:

1) Realizar la siguiente mezcla de digestión por cada muestra:

- 2 μl de Buffer Tango 10X (Thermo Scientific)
- 1 μl de enzima *DpnI* (10 U/μl) (Thermo Scientific)
- Vector ADN (producto de PCR) en una concentración de 0.5-1 μg
- Agua destilada libre de DNasa/RNasa (Gibco®, Life Technologies™) hasta un volumen final de 20 μl.

2) Mezclar suavemente y realizar una centrifugación por 5 segundos.

3) Incubar a 37°C durante 2 horas.

(iii) Purificación de los productos resultantes de la digestión con *DpnI* utilizando el *kit* comercial de purificación *High Pure PCR Product Purification* (Roche) (para el protocolo, ver apartado 3.2.5 del Capítulo 1).

(iv) Con los vectores purificados que poseían presuntamente la mutación T359C se hicieron electroporaciones en células comerciales *MegaX DH10B™ T1^R Electrocomp™ Cells* (Invitrogen), y posterior siembra en placas de Petri, siguiendo el protocolo que se detalló en el apartado 3.2.7 del Capítulo 1.

Respecto al protocolo detallado en el Capítulo 1, se introdujeron 2 modificaciones menores: se utilizó 10 μl de células electrocompetentes por muestra en vez de 20 μl , y 500 μl de medio de recuperación por muestra en vez de 1 ml.

(v) Selección de 3 a 4 colonias de cada uno de los vectores bicistrónicos recombinantes a los que se les había introducido presuntamente la mutación T359C, y crecerlas en medio LB líquido a 37°C *overnight*.

(vi) *Miniprep* de los cultivos utilizando el *kit* comercial *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel), siguiendo el protocolo que se detalló en el apartado 3.2.7 del Capítulo 1.

(vii) Reacción de secuenciación de las *minipreps* obtenidas, siguiendo el protocolo que se detalló en el apartado 3.2.7 del Capítulo 1. Se utilizaron los *primers* Fwd IRES mut y *primer* Rev IRES mut (ver Tabla 13) de forma independiente, a una concentración de 100 μM . Se secuenciaron ambas direcciones para evitar cualquier discrepancia que pudiera interferir con la lectura y posterior análisis de las secuencias obtenidas.

4.2.1.2 Introducción de la mutación U590C

Para la introducción de la mutación U590C (T590C) y comprobación del éxito de la inserción, se siguieron los pasos detallados en el apartado 4.2.1.1 del presente Capítulo, los cuales fueron llevados a cabo para la introducción de la mutación U359C (T359C). Los *primers* utilizados para la realización de la PCR fueron Fwd T590C new y Rev T590C new (ver Tabla 13), añadiendo 1 μl de cada uno de ellos a una concentración de 25 μM , los cuales fueron diseñados siguiendo las recomendaciones de Liu & Naismith, 2008. El molde de ADN utilizado para la realización de la PCR era el vector con el inserto correspondiente y la mutación T359C en el IRES previamente introducida, en una concentración de 2 a 10 ng. La incubación que se llevó a cabo para la realización de la PCR fue:

- 95°C durante 5 minutos (desnaturalización inicial)

- 12 ciclos de 95°C / 1 minuto, 58.7°C / 1 minuto y 72°C / 15 minutos (desnaturalización, hibridación y extensión, respectivamente)
- 55.8°C / 1 minuto
- 72°C / 30 minutos (extensión final)

Al igual que para la mutación U359C (T359C) la secuenciación de las *minipreps* obtenidas se realizó utilizando los *primers* Fwd IRES mut y Rev IRES mut (ver Tabla 13).

4.2.1.3 Introducción de la mutación U726C

Para la introducción de la mutación U726C (T726C) y comprobación del éxito de la inserción, se siguieron los pasos detallados en el apartado 4.2.1.1 del presente Capítulo, los cuales fueron llevados a cabo para la introducción de la mutación U359C (T359C). Los *primers* utilizados para la realización de la PCR fueron Fwd T726C new y Rev T726C new (ver Tabla 13) para los clones de VP1, y los *primers* Fwd T726C VP3 y Rev T726C new (ver Tabla 13) para los clones de VP3, diseñados siguiendo las recomendaciones de Liu & Naismith, 2008. En las correspondientes PCR se añadió 1 µl de cada uno de los integrantes de las parejas de *primers* respectivas, a una concentración de 25 µM. El molde de ADN utilizado para la realización de las PCR era el vector con el inserto correspondiente y las mutaciones T359C y T590C en el IRES previamente introducidas, en una concentración de 2 a 10 ng. La incubación que se llevó a cabo para la realización de las PCR fue:

- 95°C durante 5 minutos (desnaturalización inicial)
- 12 ciclos de 95°C / 1 minuto, 56.6°C / 1 minuto y 72°C / 15 minutos (desnaturalización, hibridación y extensión, respectivamente)
- 47.1°C / 1 minuto
- 72°C / 30 minutos (extensión final)

Al igual que para la mutaciones U359C (T359C) y U590C (T590C), la secuenciación de las *minipreps* obtenidas se realizó utilizando los *primers* Fwd IRES mut y Rev IRES mut (ver Tabla 13).

Tabla 13. *Primers* utilizados para introducir las mutaciones U359C (T359C), U590C (T590C) y U726C (T726C) en 3 rondas de PCR donde en negrita y subrayada se observa la mutación que se quiere introducir; y los *primers* utilizados para comprobar la presencia de las mismas.

| Primer | Secuencia |
|---------------|--|
| Fwd T359C | 5' CACCTTGCAGTGTAACT <u>C</u> GGCTTTCATGAATCTCTTTG 3' |
| Rev T359C | 5' CAAAGAGATTCATGAAAGCC <u>G</u> AGTTAACTGCAAGGTG 3' |
| Fwd T590C new | 5' CCTCTCTGTGCT <u>C</u> GGGGCAAACATCATTGGCCTTAAATGG 3' |
| Rev T590C new | 5' CCC <u>G</u> AGCACAGAGAGGTCTGGAATTAAGCCTAAAGACAGCCC 3' |
| Fwd T726C new | 5' TTTTCCTCATTCT <u>C</u> AAATAATAATGGCCTTTCCTGAATTG 3' |
| Fwd T726C VP3 | 5' TTTTCCTCATTCT <u>C</u> AAATAATAATGGCCATGATGAGAAATG 3' |
| Rev T726C new | 5' TATT <u>G</u> AGAATGAGGAAAAACCTAAATGCCCTGAGTACC 3' |
| Fwd IRES mut | 5' TTCTGTCTTCTTTCTCCAGG 3' |
| Rev IRES mut | 5' TTCTCCAGGTTTCAATTCAGG 3' |

4.2.2 Medidas de la velocidad de traducción de los diferentes haplotipos obtenidos para VP1 y VP3 con las mutaciones U359C (T359C), U590C (T590C) y U726C (T726C) del IRES

A partir de los diferentes clones o vectores recombinantes obtenidos para los fragmentos de VP1 y VP3 de las cuasiespecies de las 4 poblaciones en estudio (L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP), a los cuales se les introdujo las 3 mutaciones en el IRES (T359C, T590C y T726C), se realizaron transfecciones en células FRhK-4 siguiendo todos los pasos que se detallan en el apartado 3.3.8.1 del Capítulo 1. Posteriormente, se llevaron a cabo las medidas de las actividades de bioluminiscencia de *FLuc* y *RLuc* en cada clon siguiendo los pasos especificados en el apartado 3.3.8.2 del Capítulo 1. Para cada clon se realizaron estos análisis al menos 3 veces de forma independiente, con 2 réplicas cada vez y para cada una de las condiciones de silenciamiento celular estudiadas. Esto significa un mínimo de 36, 72, 90 y 126 análisis para cada una de las luciferasas por población, en los casos de aquellas con 2, 4, 5 y 7 clones para analizar, respectivamente.

4.2.3 Análisis estadístico

Se realizó tal y como se indicó en el apartado 3.2.10 del Capítulo 1.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Estudio del efecto de tres mutaciones del IRES en la velocidad de traducción a nivel de cuasiespecies en dos regiones de la cápside de cuatro poblaciones del VHA

Con el objetivo de estudiar si la presencia de las mutaciones del IRES (U359C, U590C y U726C) modifican el efecto del uso de codones en la velocidad de traducción, fueron introducidas en los clones previamente analizados en el estudio de la traducción de las cuasiespecies en las regiones de VP1 y VP3 en las 4 poblaciones del VHA en estudio (ver apartado 4.2.1 del presente Capítulo). Si bien las 3 mutaciones fueron introducidas en todos los clones tanto de VP1 como de VP3, los resultados de las tasas de traducción correspondientes a los clones $\lambda 3$ y $\lambda 13$ de la región de VP1, y al clon $\theta 2$ de la región de VP3, no fueron tenidos en cuenta en los diferentes análisis a lo largo de este Capítulo. Con dichos clones se obtuvieron resultados incoherentes con valores extremos, y fueron considerados *outliers*. Al igual que en el Capítulo 1, para ajustar las proporciones de cada una de las cuasiespecies se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos con la secuenciación masiva.

4.3.1.1 Traducción de las cuasiespecies de VP1

Con el propósito de conocer la tasa o velocidad de traducción de las diferentes poblaciones del VHA en presencia de las mutaciones en el IRES, se midieron las actividades de bioluminiscencia de 2 luciferasas (*Firefly* o *FLuc* y *Renilla* o *RLuc*). Estas luciferasas estaban presentes en los vectores bicistrónicos en los cuales se habían clonado los haplotipos de VP1 de las 4 poblaciones en estudio que diferían entre si en el uso de codones, y a los que posteriormente se les añadió las mutaciones en el IRES.

En primer lugar se analizaron los porcentajes de bioluminiscencia obtenidos en presencia de 0.05 y 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, en comparación a los resultados obtenidos en ausencia de AMD para ambas luciferasas estudiadas, en el vector bicistrónico de estudio (G1RC) en ausencia de los respectivos

fragmentos de VP1 clonados en el mismo, pero en presencia de las mutaciones en el IRES (ver Figura 43).

Se encontró que tanto en la bioluminiscencia de *Renilla* como en la de *Firefly*, al igual que ocurría en ausencia de las mutaciones del IRES, había una clara inhibición dosis dependiente de la concentración de AMD presente. Para la bioluminiscencia de *Renilla* se obtuvo un valor medio del $28 \pm 4\%$ en presencia de $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD, y del $1 \pm 1\%$ en presencia de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD, respecto a $0.00 \mu\text{g/ml}$ de AMD. En el caso de la bioluminiscencia de *Firefly* se obtuvo un valor medio del $14 \pm 3\%$ en presencia de $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD, y del $1 \pm 1\%$ en presencia de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD, respecto a $0.00 \mu\text{g/ml}$ de AMD (ver Figura 43). La inhibición de la bioluminiscencia de ambas luciferasas era superior, en presencia de las mutaciones del IRES en el vector sin inserto que en ausencia de las mismas. Probablemente, las mutaciones sean las responsables de la mayor inhibición observada.

En cuanto a las 4 poblaciones en estudio, en la bioluminiscencia de *Renilla* también se vio una clara inhibición dosis dependiente de la concentración de AMD presente, con valores de medias que oscilan entre 19 a 35% en presencia de $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD, y entre 3 a 5% en presencia de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD en las poblaciones de L0, F0.05LA y F0.2LA, con respecto a $0.00 \mu\text{g/ml}$ de AMD. Para la población HM175-HP se obtuvieron valores un poco más elevados, con un valor medio de $56 \pm 25\%$ en presencia de $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD, y de $30 \pm 24\%$ en presencia de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD, respecto a $0.00 \mu\text{g/ml}$ de AMD. En lo que respecta a la bioluminiscencia de *Firefly*, también se vio una inhibición de la misma en presencia de AMD, pero no tan significativa como se observó para *RLuc* y *FLuc* del vector bicistrónico sin inserto, un patrón similar al que se había observado en ausencia de las mutaciones del IRES. En condiciones de $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD se obtuvieron valores de medias entre 23 a 45%, y en presencia de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD de 12 a 26% en las poblaciones de L0, F0.05LA y F0.2LA, respecto a $0.00 \mu\text{g/ml}$ de AMD (ver Figura 43). Al igual que ocurrió con la bioluminiscencia de *Renilla*, en HM175-HP se obtuvieron valores un poco más elevados en comparación al resto de las poblaciones. En presencia de $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD se obtuvo un valor medio de $68 \pm 17\%$, y en presencia de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD se obtuvo un valor medio de $35 \pm 11\%$, respecto a $0.00 \mu\text{g/ml}$ de AMD (ver Figura 43).

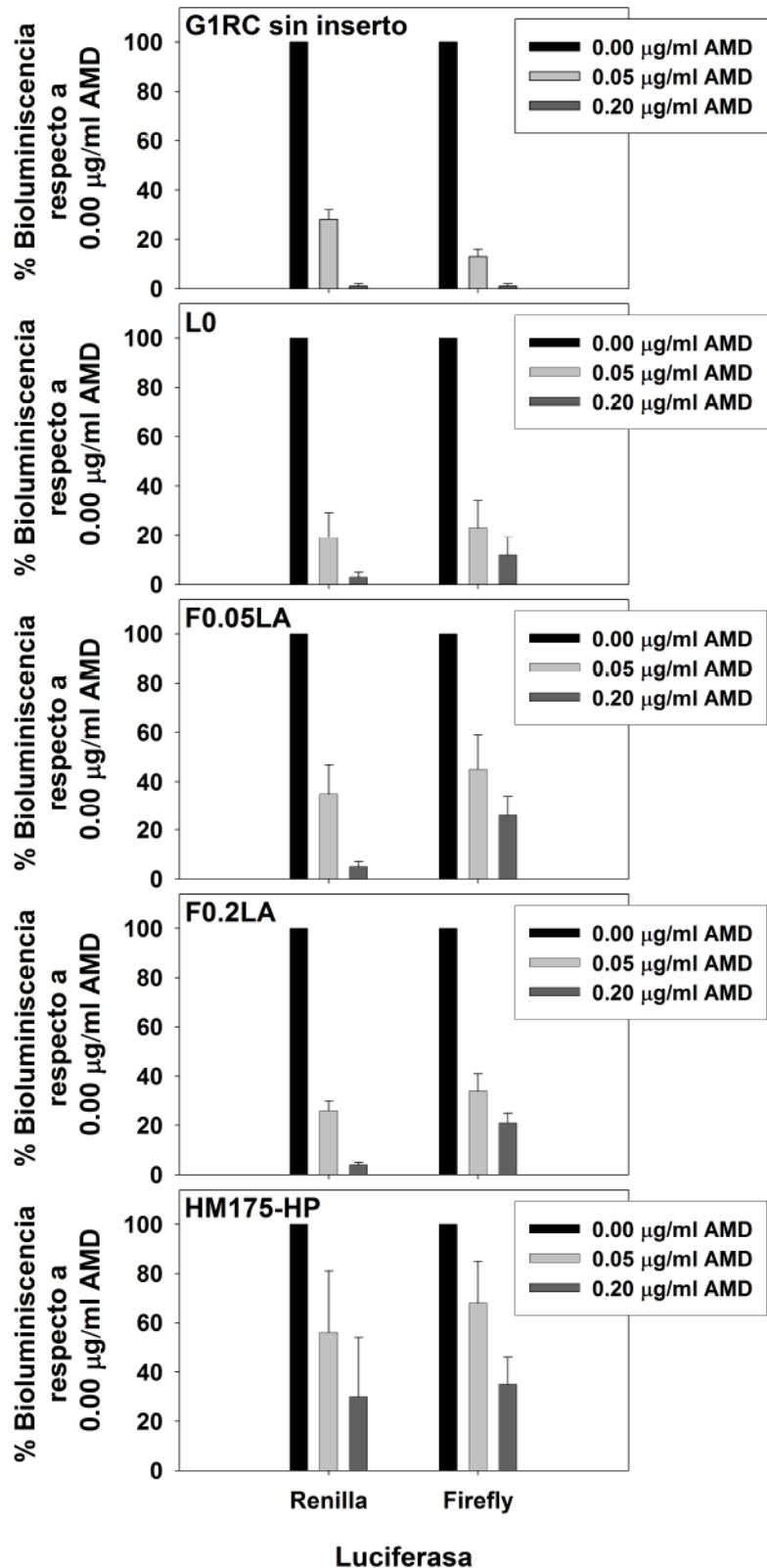


Figura 43. Porcentajes de bioluminiscencia de las luciferasas *Renilla* y *Firefly* en presencia de 0.05 y 0.20 µg/ml de AMD con respecto a sus respectivos valores obtenidos en ausencia de AMD. Estas luciferasas se encuentran en el vector bicistrónico de trabajo (G1RC) que posee clonada la región de VP1 correspondiente a los respectivos haplotipos de L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP, justo antes del gen codificante para *Firefly luciferase*, y con las 3 mutaciones del IRES. Se analizó también los porcentajes de bioluminiscencia de las respectivas luciferasas para el vector bicistrónico de estudio sin inserto.

Sin embargo, el efecto del uso de codones del fragmento de VP1 en la modulación de la traducción de *FLuc* en condiciones de silenciamiento respecto no silenciamiento celular no era tan evidente.

Posteriormente, se utilizaron las actividades bioluminiscentes de *Firefly* y *Renilla* como una medida de la tasa de traducción de las poblaciones analizadas, y para normalizar los datos obtenidos se utilizó la relación FLuc/RLuc. En condiciones de ausencia de AMD, se encontró que las 4 poblaciones en estudio presentaban diferencias estadísticamente significativas entre sí, utilizando IC al 90%, siendo estas diferencias claramente más relevantes en las poblaciones de F0.05LA y HM175-HP (ver Figura 44), a diferencia de lo que ocurría en ausencia de las mutaciones del IRES donde no habían diferencias significativas entre las poblaciones. Entre las poblaciones de L0 y F0.2LA si bien existen diferencias significativas, éstas son pequeñas ya que se obtuvieron valores de tasa de traducción de 0.182 ± 0.001 y 0.154 ± 0.001 , respectivamente, como valores de media \pm error estándar.

En lo que respecta a las tasas de traducción medias obtenidas en condiciones de silenciamiento de la transcripción celular, se vio que tanto en condiciones de $0.05 \mu\text{g/ml}$ como de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD, la tasa de traducción de la población de F0.05LA era significativamente superior a las de L0 y F0.2LA, tanto utilizando IC 90% como IC 99% (ver Figura 44). Además, se vio que su valor también era significativamente superior a los valores obtenidos para la misma población en ausencia de las mutaciones (ver Figura 15). Con las mutaciones en el IRES se obtuvieron valores de 3.279 ± 0.092 y 8.953 ± 0.243 , en presencia de 0.05 y $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD, respectivamente, y en ausencia de las mutaciones se habían registrado valores de 0.336 ± 0.003 y 1.561 ± 0.017 , en presencia de 0.05 y $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD, respectivamente.

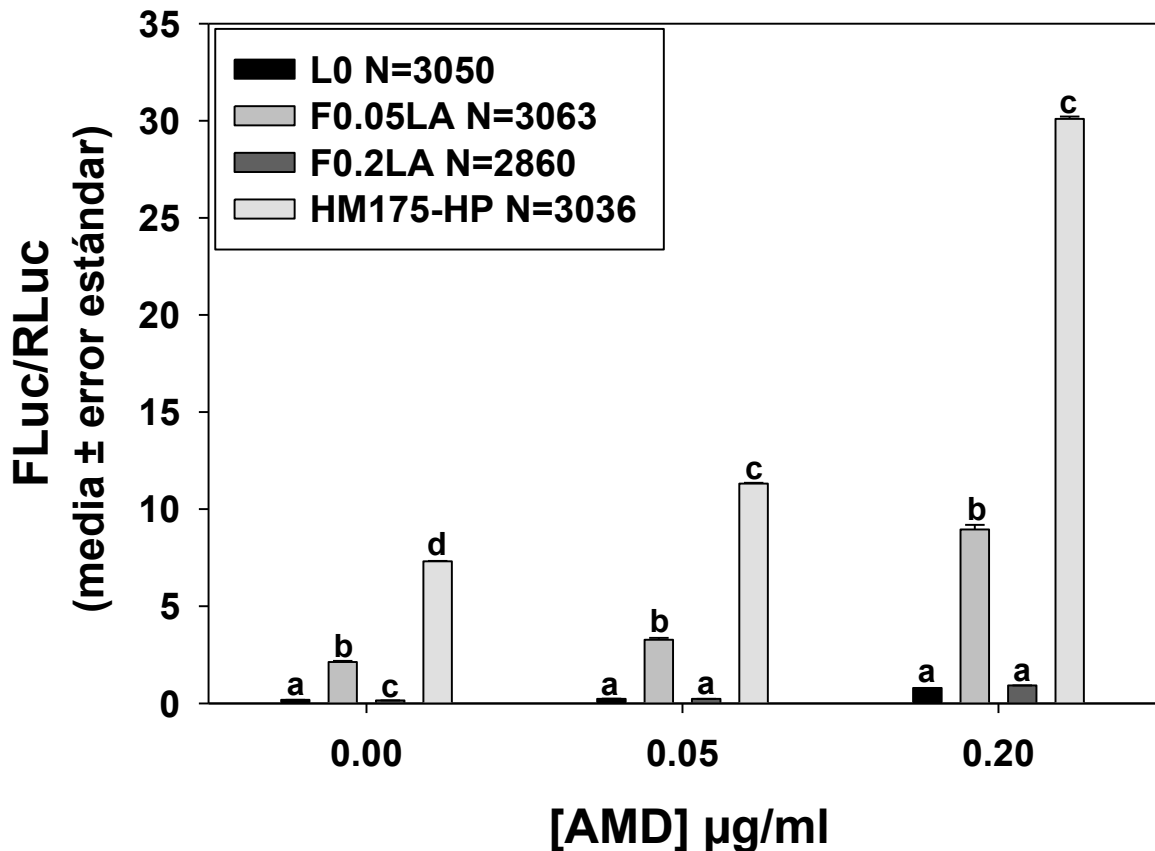


Figura 44. Tasa de traducción en presencia de las 3 mutaciones en el IRES (U359C, U590C y U726C) de las cuasiespecies de las poblaciones de L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP en la región de VP1, en condiciones de ausencia, 0.05 µg/ml y 0.20 µg/ml de AMD. Las N corresponden al número de secuencias analizadas para cada una de las poblaciones. Las diferencias estadísticamente significativas utilizando el método de Intervalos de Confianza al 90% (IC 90%) entre las cuasiespecies en una misma condición de *shut-off* de la transcripción celular, se señalan utilizando el criterio de letras a=ab; ab=b; a≠b; etc;...

En cuanto a la población HM175-HP, se observó una situación similar, pero en este caso la media de ésta era significativamente superior a todas las poblaciones tanto utilizando IC 90% como IC 99%, por tanto, no hay duda alguna de su mayor tasa de traducción en esta región (ver Figura 44). A su vez, se vio que su valor también era significativamente superior, a los valores obtenidos para la misma población en ausencia de las mutaciones del IRES. Con las mutaciones en el IRES se obtuvieron valores de 11.315 ± 0.044 y 30.096 ± 0.117 , en presencia de 0.05 y 0.20 µg/ml de AMD, respectivamente, y en ausencia de las mutaciones se habían registrado valores de 0.606 ± 0.002 y 2.886 ± 0.006 , en presencia de 0.05 y 0.20 µg/ml de AMD, respectivamente. Entre las poblaciones de L0 y F0.2LA en presencia de las mutaciones del IRES no se observaron diferencias significativas entre ellas, en ambos ambientes

con silenciamiento celular. En comparación a los valores obtenidos para estas poblaciones en ausencia de las mutaciones del IRES, para ambas poblaciones no se encontraron diferencias significativas en condiciones de 0.05 µg/ml de AMD. En condiciones de 0.20 µg/ml de AMD para F0.2LA tampoco se encontraron diferencias significativas, pero para L0 sí, aunque las diferencias no eran muy relevantes.

Con el fin de analizar la contribución que hacen cada uno de los clones de una misma cuasiespecie a los valores de las medias poblacionales obtenidos, se hicieron gráficos donde se analiza la composición de cada una de las diferentes cuasiespecies. Se graficaron los valores de FLuc/RLuc de cada uno de los clones según su proporción en las poblaciones, para cada una de las condiciones de silenciamiento celular estudiadas (ver Figuras 45, 46 y 47).

En la Figura 45, donde se observa la composición de las 4 cuasiespecies en condiciones de ausencia de AMD, se vio que tanto para la población L0 como para F0.2LA, sus clones dominantes $\lambda 1$ y $\lambda 6$, respectivamente, son los principales responsables de los valores de las medias poblacionales obtenidas, ya que sus tasas de traducción son prácticamente idénticas a ellas. El resto de los clones que componen estas cuasiespecies, poseen valores de FLuc/RLuc que oscilan cercanas al valor de sus respectivas medias poblacionales. Para la población F0.05LA, se vio que el claro responsable de tener un valor de media superior a L0 y F0.2LA es el clon $\lambda 7$, que es el segundo clon dominante en la población F0.05LA. Debido a que el resto de los clones que componen la cuasiespecie de F0.05LA tienen valores de FLuc/RLuc significativamente más bajos a los encontrados en $\lambda 7$, conlleva a que el valor de la media no sea más alto (ver Figura 45). En cuanto a la población HM175-HP, el valor de su tasa media de traducción está determinado casi en exclusividad por su clon dominante $\lambda 7$, y una menor colaboración del clon minoritario $\lambda 14$, los cuales tienen tasas de traducción ampliamente superiores a las obtenidas para el resto de los clones de la cuasiespecie (ver Figura 45).

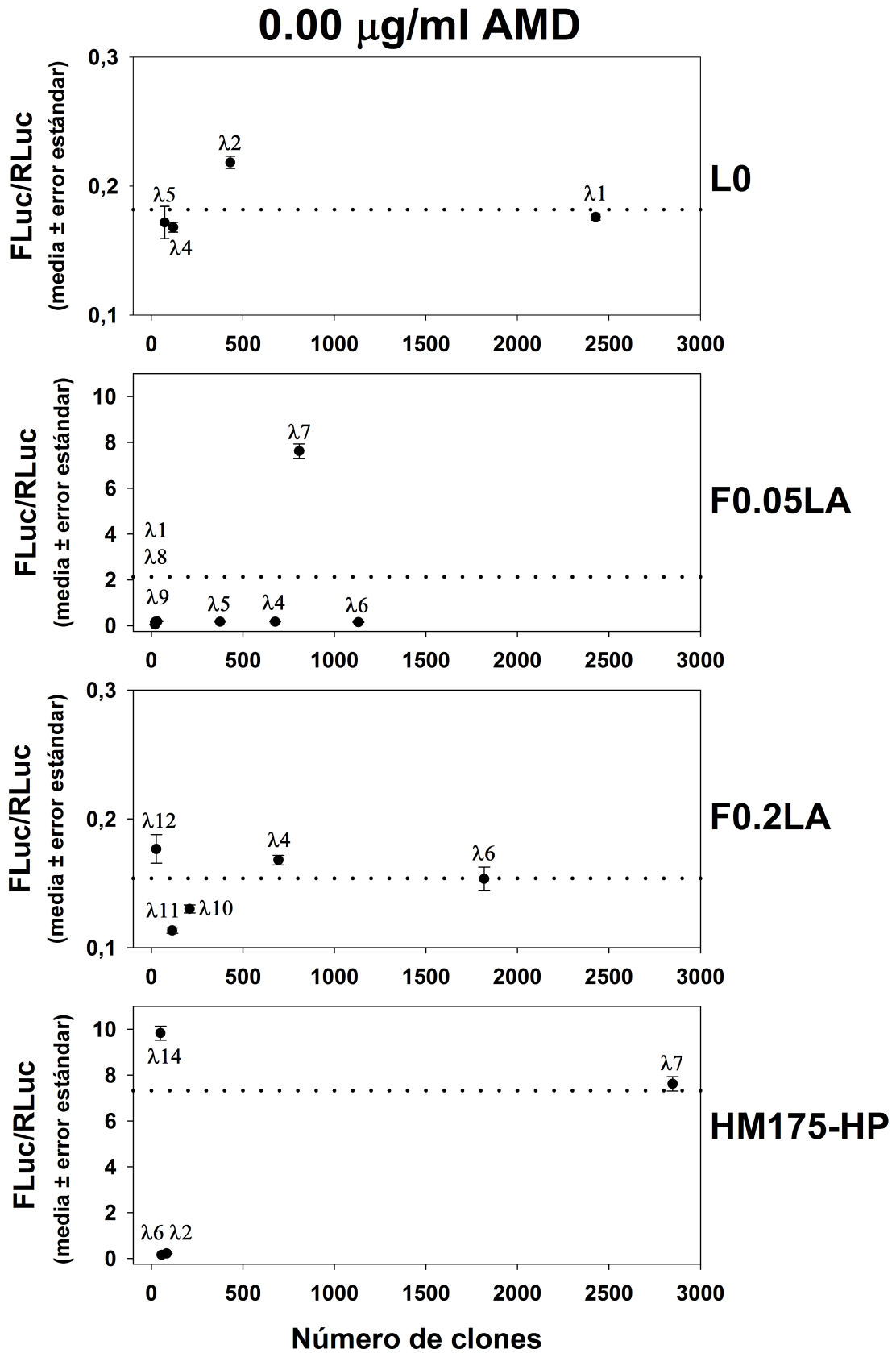


Figura 45. Tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc en presencia de las 3 mutaciones del IRES de los diferentes clones de la región de VP1 que componen las cuasiespecies de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP, en condiciones de 0.00 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. La línea punteada señala el valor medio de la tasa de traducción de la respectiva cuasiespecie.

En condiciones de 0.05 µg/ml de AMD (ver Figura 46), se observó un patrón similar al observado en ausencia de AMD, pero aquí las diferencias entre las cuasiespecies son más relevantes. Las mayores tasas de traducción obtenidas en ausencia de AMD por parte de F0.05LA y HM175-HP, en condiciones de silenciamiento celular moderado se incrementan aún más. En HM175-HP es donde se da el incremento más significativo, ya que prácticamente la totalidad de sus haplotipos traducen a una elevada velocidad en comparación al resto de los clones.

Por otra parte, en condiciones de silenciamiento celular alto (ver Figura 47), todas las tasas de traducción medias de las cuasiespecies como de sus clones individuales, aumentan debido a una mayor disponibilidad de recursos y de la maquinaria traduccional de la célula para el virus. Sin embargo, en la población HM175-HP es nuevamente donde más relevante es el aumento, consiguiendo un valor de media de traducción de la cuasiespecie superior a 30. De este modo, al igual que ocurrió con los resultados obtenidos en ausencia de las mutaciones del IRES, se observa claramente la tendencia de HM175-HP de traducir a una mayor velocidad en la región de VP1, lo cual ayudaría a explicar, al menos en parte, el hecho de que sea una población de rápido crecimiento.

En la Tabla 14 se muestra la composición de cada una de las cuasiespecies en estudio de la región de VP1 en presencia de las mutaciones del IRES, según la velocidad de traducción de sus clones respecto a la media de clones de L0. Se vio que en presencia de 0.05 µg/ml de AMD las cuasiespecies de L0, F0.05LA y HM175-HP presentaban un 14%, 26% y 98% de clones, respectivamente, con una tasa de traducción significativamente superior a la media de clones de L0. Además, los valores de las tasas de traducción de dichos clones con mayor traducción en F0.05LA y HM175-HP, dominados principalmente por el clon λ7, eran ampliamente superiores al clon λ2, responsable exclusivo de la tasa de traducción incrementada en la cuasiespecie de L0 (ver Tabla 14). En casi el resto de los clones, no se encontraron diferencias significativas con respecto a la media de clones de L0. El porcentaje de clones con una mayor, menor o igual tasa de traducción con respecto a la media de clones de L0, es bastante similar al encontrado en ausencia de las mutaciones del IRES, en un ambiente con silenciamiento celular moderado (ver Tabla 7).

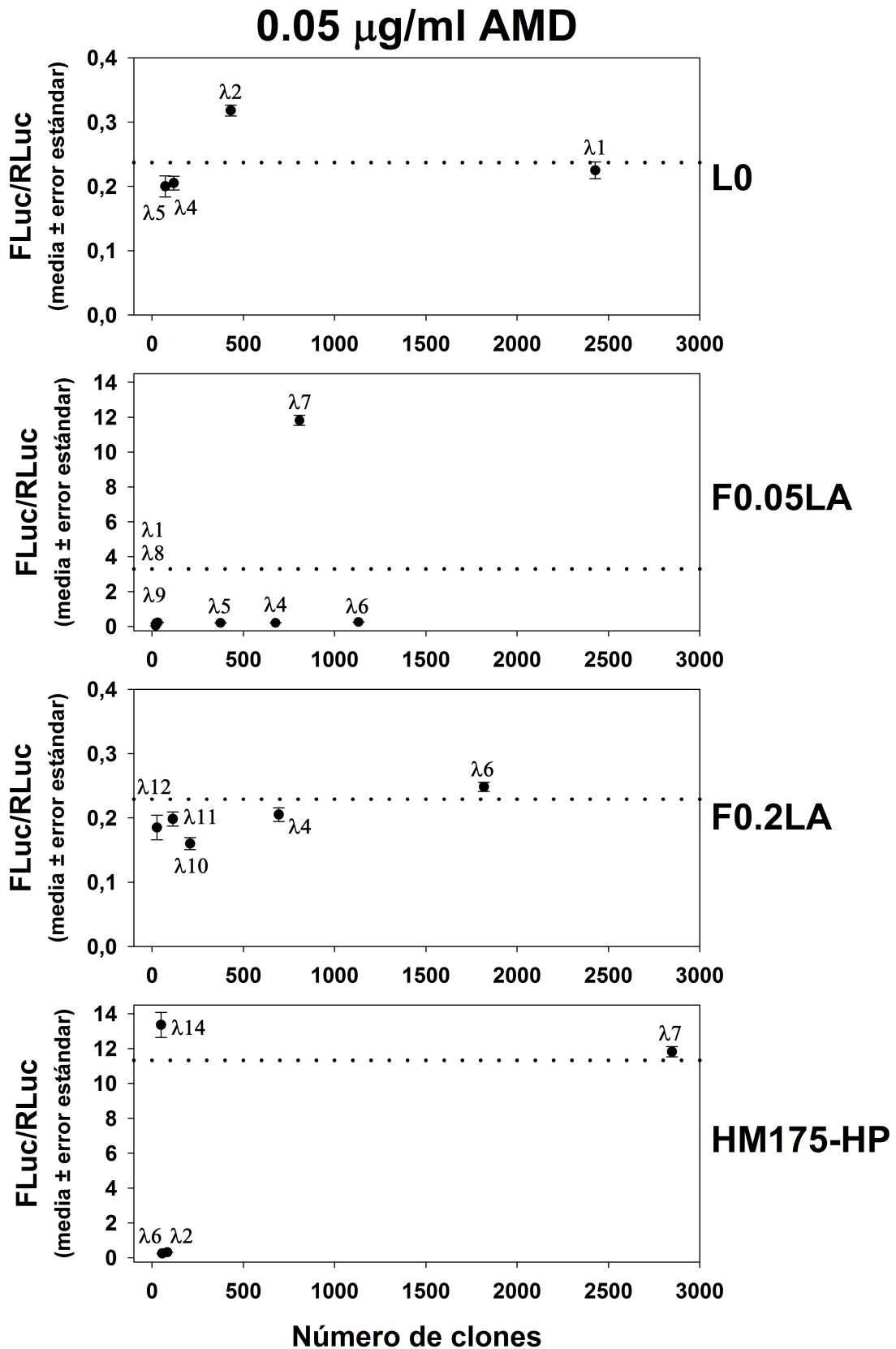


Figura 46. Tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc en presencia de las 3 mutaciones del IRES de los diferentes clones de la región de VP1 que componen las cuasiespecies de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP, en condiciones de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. La línea punteada señala el valor medio de la tasa de traducción de la respectiva cuasiepecie.

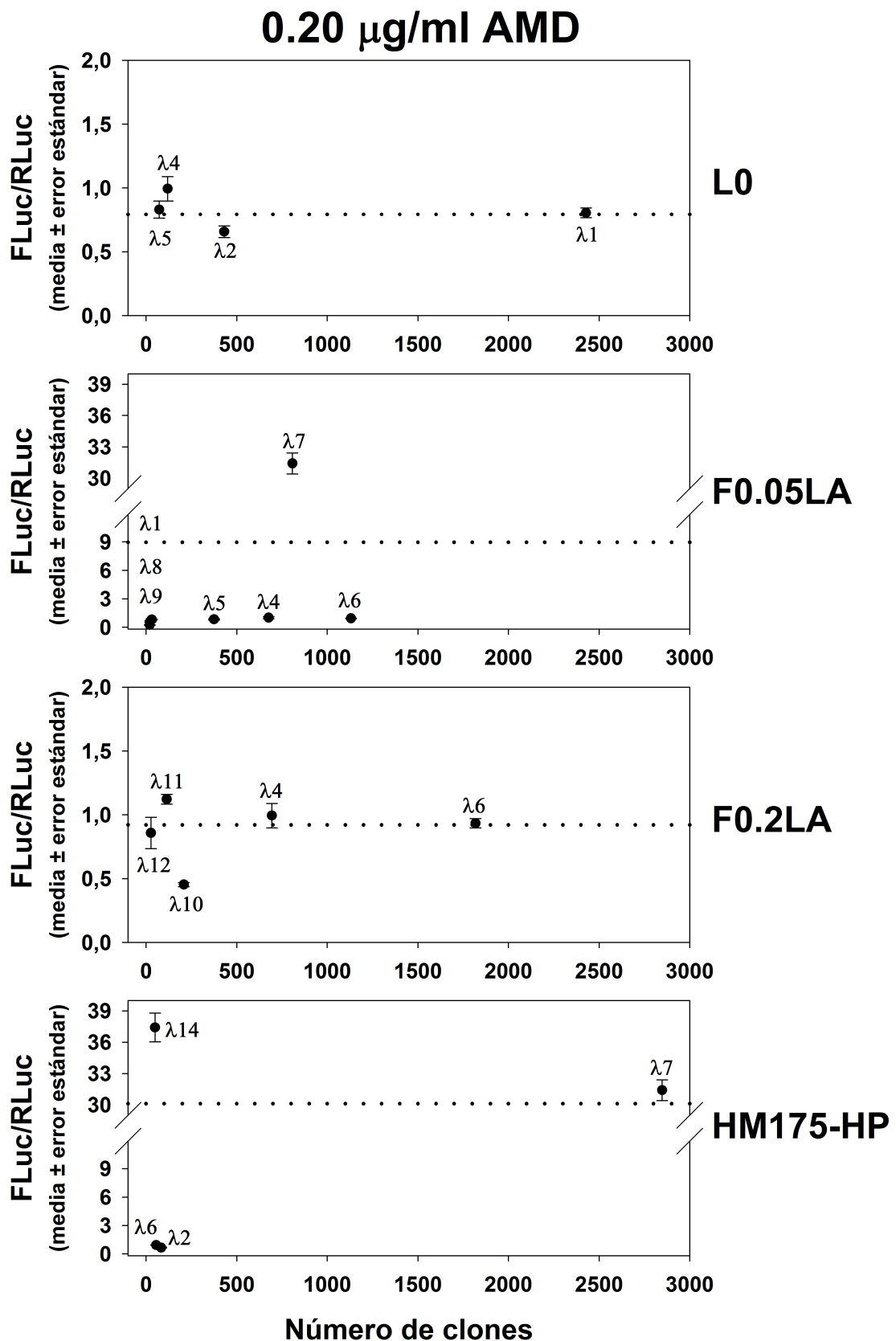


Figura 47. Tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc en presencia de las 3 mutaciones del IRES de los diferentes clones de la región de VP1 que componen las cuasiespecies de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP, en condiciones de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. La línea punteada señala el valor medio de la tasa de traducción de la respectiva cuasiepecie.

Por otro lado, en presencia de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, con una mayor disponibilidad de recursos y de la maquinaria traduccional de la célula para el virus, los clones $\lambda 7$ (F0.05LA y HM175-HP) y $\lambda 14$ (HM175-HP), siguen traduciendo a una mayor velocidad que la media de clones de L0, y de forma extraordinariamente elevada (valores superiores a 30) (ver Tabla 14). En la población F0.2LA, se detectó el clon $\lambda 11$ (4% del total) con una tasa de traducción significativamente superior a la media de clones de L0. Sin embargo, su valor de FLuc/RLuc es casi 30 veces inferior a los valores obtenidos para $\lambda 7$ y $\lambda 14$. El resto de los clones traducen con tasas similares a la media de clones de L0, a excepción de porcentajes minoritarios en F0.05LA (2%) y F0.2LA (7%) que tienen una tasa de traducción inferior (ver Tabla 14).

Tabla 14. Composición de las cuasiespecies en estudio de la región de VP1 en presencia de las 3 mutaciones del IRES según la velocidad de traducción expresada como la media \pm error estándar, respecto a la media de los clones de L0. =, +, - hace referencia a si los valores de las medias de traducción de los clones no son diferentes significativamente, son significativamente superiores, o significativamente inferiores, con respecto a la media de clones de L0, respectivamente.

| [AMD] $\mu\text{g/ml}$ | Población | % Clones | FLuc/RLuc respecto a media L0 | FLuc/RLuc (media \pm error estándar) | Clones ^a | |
|---------------------------|-----------|----------|-------------------------------------|--|--|--|
| 0.05 | L0 | 86 | = | 0.224 \pm 0.013 | $\lambda 1, \lambda 4, \lambda 5$ | |
| | | 14 | + | 0.318 \pm 0.009 | $\lambda 2$ | |
| | F0.05LA | 73 | = | 0.226 \pm 0.010 | $\lambda 6, \lambda 4, \lambda 5,$ $\lambda 1, \lambda 8$ | |
| | | 26 | + | 11.818 \pm 0.285 | $\lambda 7$ | |
| | F0.2LA | 1 | - | 0.050 \pm 0.005 | $\lambda 9$ | |
| | | 93 | = | 0.234 \pm 0.008 | $\lambda 6, \lambda 4, \lambda 11,$ $\lambda 12$ | |
| | HM175-HP | 7 | - | 0.160 \pm 0.009 | $\lambda 10$ | |
| | | 2 | = | 0.248 \pm 0.007 | $\lambda 6$ | |
| | | | 98 | + | 11.488 \pm 0.281 | $\lambda 7, \lambda 2, \lambda 14$ |
| | 0.20 | L0 | 100 | = | 0.792 \pm 0.001 | $\lambda 1, \lambda 2, \lambda 3,$ $\lambda 4, \lambda 5$ |
| 72 | | | = | 0.933 \pm 0.060 | $\lambda 6, \lambda 4, \lambda 5, \lambda 1$ | |
| F0.05LA | | 26 | + | 31.402 \pm 1.000 | $\lambda 7$ | |
| | | 2 | - | 0.416 \pm 0.044 | $\lambda 8, \lambda 9$ | |
| F0.2LA | | 89 | = | 0.949 \pm 0.053 | $\lambda 6, \lambda 4, \lambda 12$ | |
| | | 4 | + | 1.122 \pm 0.038 | $\lambda 11$ | |
| HM175-HP | | 7 | - | 0.453 \pm 0.017 | $\lambda 10$ | |
| | | 5 | = | 0.768 \pm 0.042 | $\lambda 2, \lambda 6$ | |
| | | | 95 | + | 31.462 \pm 1.004 | $\lambda 7, \lambda 14$ |

^a Orden según abundancia en la población

Estos resultados estarían sugiriendo que las mutaciones en el IRES tienen un efecto desigual en los clones, dependiendo principalmente del uso de codones que presenten.

4.3.1.2 Traducción de las cuasiespecies de VP3

Con el propósito de estudiar la velocidad de traducción de las diferentes poblaciones del VHA en estudio en la región de VP3, y en presencia de las 3 mutaciones del IRES, se midieron las actividades de bioluminiscencia de las 2 luciferasas (*Firefly* y *Renilla*) presentes en los vectores bicistrónicos de trabajo. En éstos estaban clonados además, los haplotipos de VP3 que diferían entre sí en el uso de codones, y a los que posteriormente se les había introducido las 3 mutaciones en el IRES.

Tal y como se comentó en el apartado 4.3.1.1 del presente Capítulo, en el vector bicistrónico de estudio (G1RC) en ausencia de los respectivos fragmentos de VP3 y en presencia de las 3 mutaciones del IRES, se encontró que tanto la bioluminiscencia de *Renilla* como la de *Firefly*, eran inhibida de forma dosis dependiente de la concentración de AMD presente (ver Figura 48).

En cuanto a las 4 poblaciones en estudio, la bioluminiscencia de *Renilla* también se vio claramente inhibida de forma dosis dependiente de la concentración de AMD presente, con valores de medias que oscilan entre 15 a 23% en presencia de 0.05 µg/ml de AMD, y entre 0.5 a 2% en presencia de 0.20 µg/ml de AMD entre las poblaciones, con respecto a 0.00 µg/ml de AMD. En lo que respecta a la bioluminiscencia de *Firefly*, también se vio una inhibición de la misma en presencia de AMD, pero no tan significativa como las respectivas bioluminiscencias de *Renilla*, ni como la que se observó para la bioluminiscencia de *Firefly* del vector bicistrónico sin inserto y con las mutaciones del IRES. En condiciones de 0.05 µg/ml de AMD se observaron valores de bioluminiscencia de *Firefly* de entre 41 a 56%, y en presencia de 0.20 µg/ml de AMD de 8 a 31% en las 4 poblaciones en estudio (ver Figura 48), con respecto a 0.00 µg/ml de AMD.

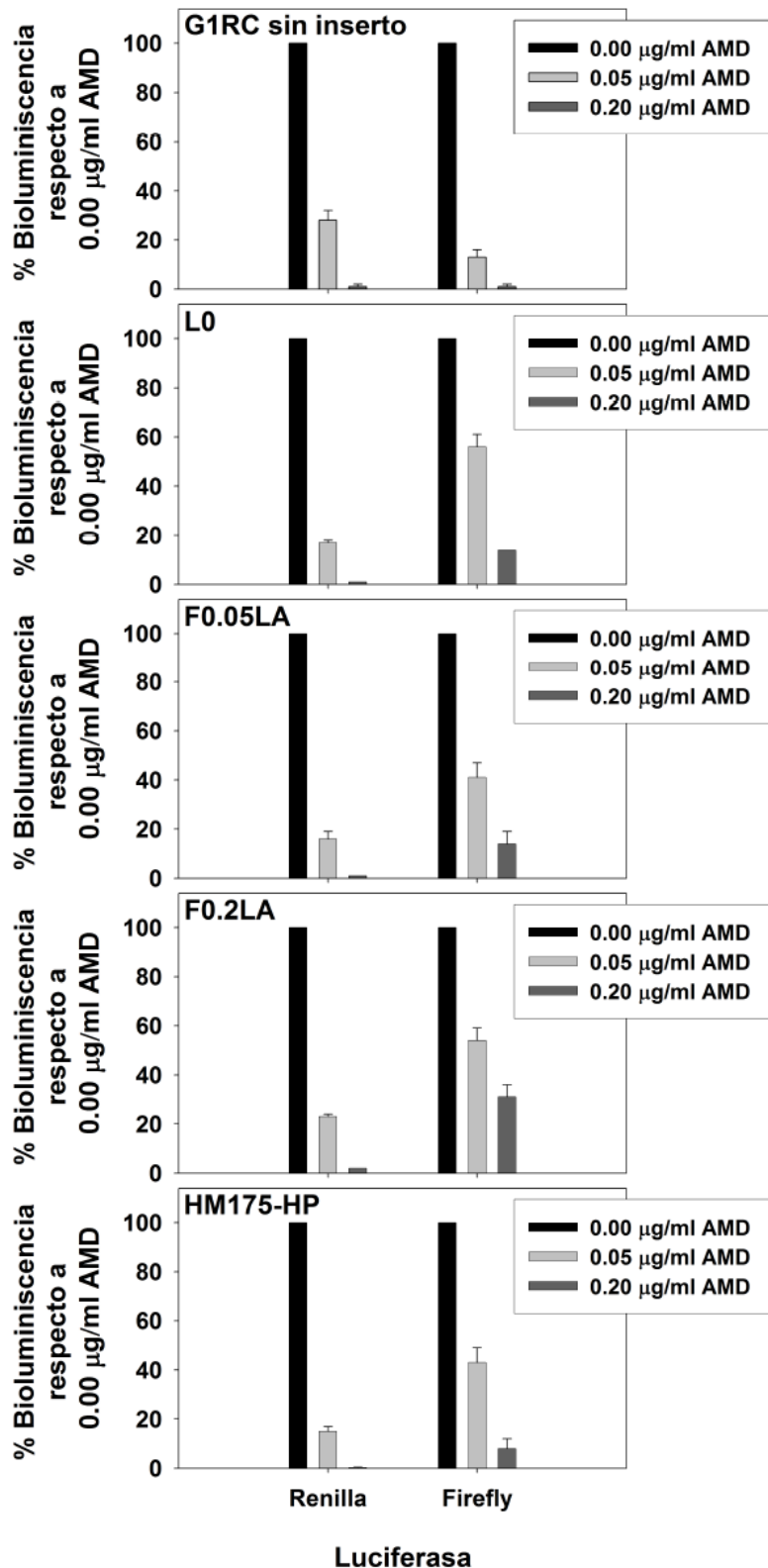


Figura 48. Porcentajes de bioluminiscencia de las luciferasas *Renilla* y *Firefly* en presencia de 0.05 y 0.20 µg/ml de AMD con respecto a sus respectivos valores obtenidos en ausencia de AMD. Estas luciferasas se encuentran en el vector bicistrónico de trabajo (G1RC) que posee clonada la región de VP3 correspondiente a los respectivos haplotipos de L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP, justo antes del gen codificante para *Firefly luciferase*, y con las 3 mutaciones del IRES. Se analizó también los porcentajes de bioluminiscencia de las respectivas luciferasas para el vector bicistrónico de estudio sin inserto.

Posteriormente, se utilizaron las actividades bioluminiscentes de *Firefly* y *Renilla* como una medida de la tasa de traducción de las poblaciones analizadas en la región de VP3 y en presencia de las 3 mutaciones en el IRES, normalizando los datos obtenidos con el cálculo de la relación FLuc/RLuc. De esta forma, utilizando esta metodología se analizaron todos los clones posibles para la región de VP3 en presencia de las 3 mutaciones del IRES, con el fin de estudiar si el tener un IRES más eficiente modificaba las tasas de traducción obtenidas en esta región en ausencia de las mutaciones.

En condiciones de ausencia de AMD no se observaron diferencias significativas entre las diferentes poblaciones al utilizar IC 90% (ver Figura 49), tal y como se había observado en el Capítulo 1 en ausencia de las mutaciones. A su vez, tanto en presencia como en ausencia de las mutaciones se obtuvieron valores de la traducción media de las cuasiespecies entre 0.012 a 0.014 para todas las poblaciones (ver Figuras 22 y 49). En condiciones de silenciamiento celular moderado y con las 3 mutaciones del IRES, se obtuvo que la población F0.2LA tenía tasas de traducción significativamente inferiores (0.026 ± 0.001) a las correspondientes a las poblaciones de L0 y HM175-HP (0.044 ± 0.001 y 0.043 ± 0.001 , respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a F0.05LA (ver Figura 49). No obstante, en comparación a las medias de las tasas de traducción obtenidas en ausencia de las mutaciones, tanto para F0.05LA como para F0.2LA, no se encontraron diferencias significativas (ver Figuras 22 y 49). Sin embargo, para L0 y HM175-HP sí se encontraron diferencias significativas, siendo los valores encontrados en presencia de las mutaciones superiores (0.044 ± 0.001 y 0.043 ± 0.001 , respectivamente) a los encontrados en ausencia de las mutaciones del IRES (0.024 ± 0.001 y 0.023 ± 0.001 , respectivamente). En tanto, en presencia de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD se observó un patrón similar al encontrado en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, donde el valor de F0.2LA era significativamente inferior (0.182 ± 0.001) a los encontrados en L0 y HM175-HP (0.339 ± 0.001 y 0.333 ± 0.001 , respectivamente), mientras no se encontraron diferencias significativas con respecto a F0.05LA (ver Figura 49). Sin embargo, en comparación a las medias de las tasas de traducción obtenidas en ausencia de las mutaciones, no se encontraron diferencias significativas entre los respectivos valores

correspondientes a cada una de las poblaciones, en un ambiente con silenciamiento celular alto.

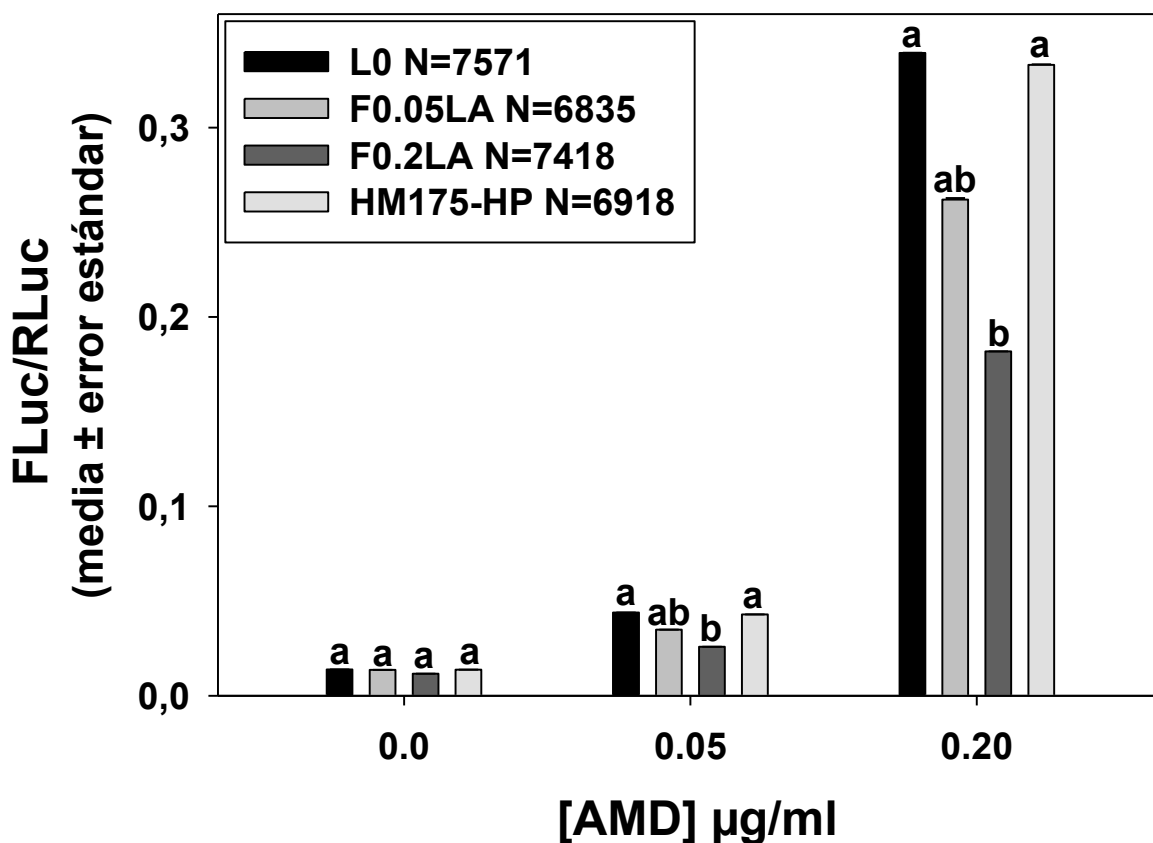


Figura 49. Tasa de traducción en presencia de las 3 mutaciones en el IRES (U359C, U590C y U726C) de las cuasispecies de las poblaciones de L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP en la región de VP3, en condiciones de ausencia, 0.05 µg/ml y 0.20 µg/ml de AMD. Las N corresponden al número de secuencias analizadas para cada una de las poblaciones. Las diferencias estadísticamente significativas utilizando el método de Intervalos de Confianza al 90% (IC 90%) entre las cuasispecies en una misma condición de *shut-off* de la transcripción celular, se señalan utilizando el criterio de letras a=ab; ab=b; a≠b.

Es importante destacar que si bien en condiciones de silenciamiento celular existen diferencias entre los valores de las medias de las tasas de traducción de algunas cuasispecies, éstas están muy lejos de semejarse a las diferencias encontradas al analizar la región de VP1 (ver Figura 49). Sin embargo, se observó una tendencia por parte de L0 y HM175-HP a tener una mayor velocidad de traducción en la región de VP3 en comparación a F0.05LA y F0.2LA, viéndose incrementada en presencia de 0.20 µg/ml de AMD.

A pesar de que las tasas de traducción medias en la regiones de VP3 y en presencia de las mutaciones en el IRES entre las poblaciones, no eran

significativamente distintas en la mayoría de los casos para una condición de silenciamiento celular determinada, la composición de individuos de sus respectivas cuasiespecies no era la misma. Por tanto, análogamente a como se hizo para las cuasiespecies correspondientes a la región de VP1, se desglosó la composición de cada una de las diferentes cuasiespecies y se analizaron los valores de FLuc/RLuc de cada uno de los clones que las componen, para cada una de las condiciones de silenciamiento celular estudiadas (ver Figuras 50, 51 y 52).

En la Figura 50, donde se observa la composición de las 4 cuasiespecies en condiciones de ausencia de AMD, se puede observar que el valor de la media de la tasa de traducción es similar en todas. Además, se vio que para las cuasiespecies de L0, F0.2LA y HM175-HP, los valores de sus respectivas tasas medias de traducción están determinados casi en exclusividad por sus clones dominantes, $\theta 1$ (99%), $\theta 7$ (99%) y $\theta 1$ (90%), respectivamente. Sin embargo, estas cuasiespecies también incluyen clones minoritarios, como $\theta 3$ en L0, $\theta 5$ en F0.2LA y $\theta 4$, $\theta 8$, $\theta 9$ y $\theta 3$ en HM175-HP. Estos clones poseen valores de tasas de traducción que oscilan alrededor de los valores de sus tasas medias poblacionales correspondientes. En el caso de F0.05LA, no hay un clon ampliamente dominante como ocurre en las otras poblaciones. Por tanto, su valor de la tasa de traducción media de la población está determinado por una contribución más equitativa de todos los clones que componen dicha cuasiespecie, $\theta 4$, $\theta 1$, $\theta 5$, $\theta 6$ y $\theta 7$, siendo la contribución de los 3 primeros un poco mayor, ya que son los que se encuentran en una mayor proporción en la población.

En presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, se observó un patrón bastante similar al encontrado en ausencia de la misma para cada una de las diferentes poblaciones (ver Figura 51). Sin embargo, los valores de las tasas medias de traducción eran significativamente superiores, siendo más elevados en L0 y HM175-HP. Los clones dominantes en L0, F0.2LA y HM175-HP siguen traduciendo con unas tasas prácticamente idénticas a las medias de sus respectivas poblaciones.

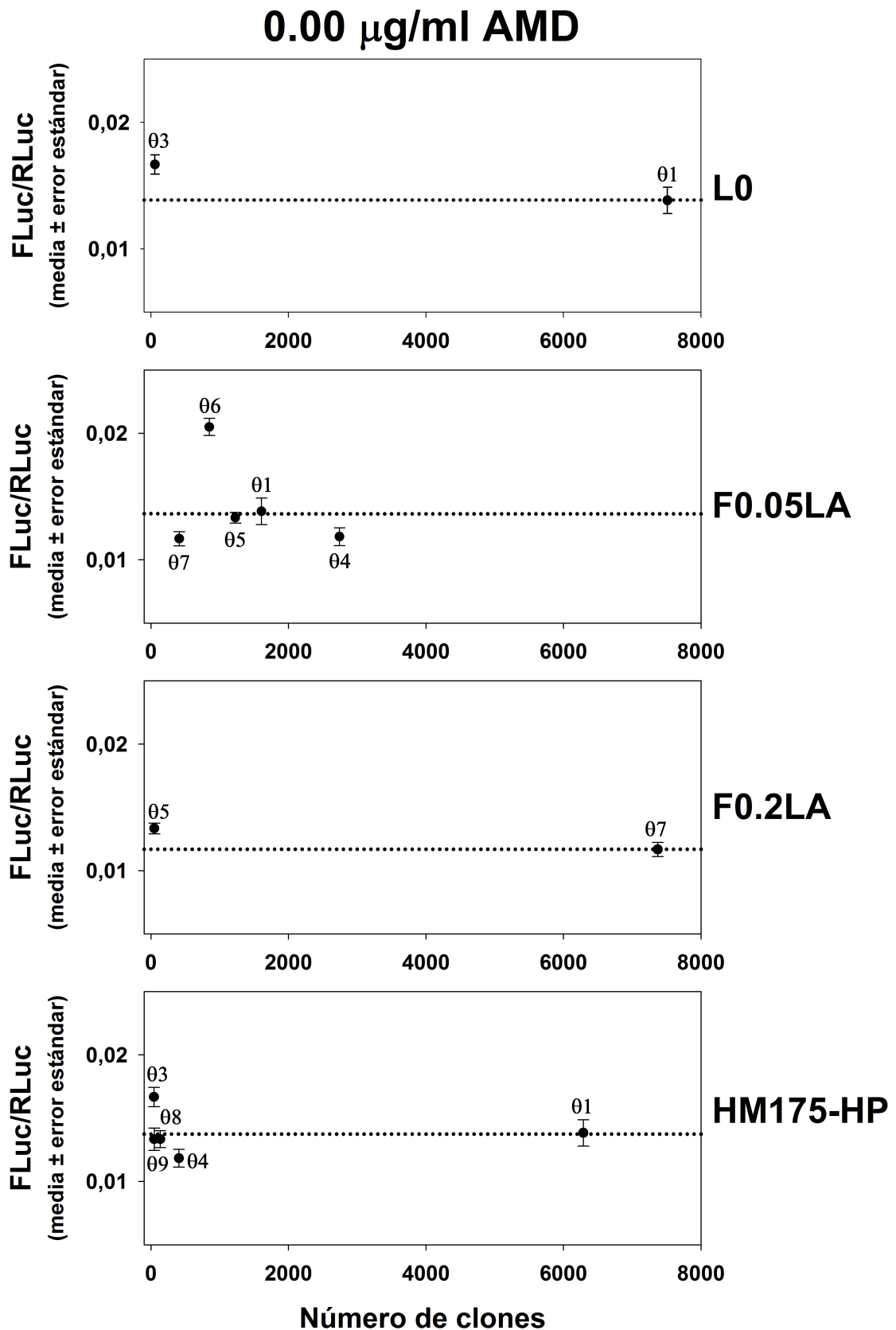


Figura 50. Tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc en presencia de las 3 mutaciones del IRES de los diferentes clones de la región de VP3 que componen las cuasiespecies de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP, en condiciones de 0.00 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. La línea punteada señala el valor medio de la tasa de traducción de la respectiva cuasiespecie.

0.05 $\mu\text{g/ml}$ AMD

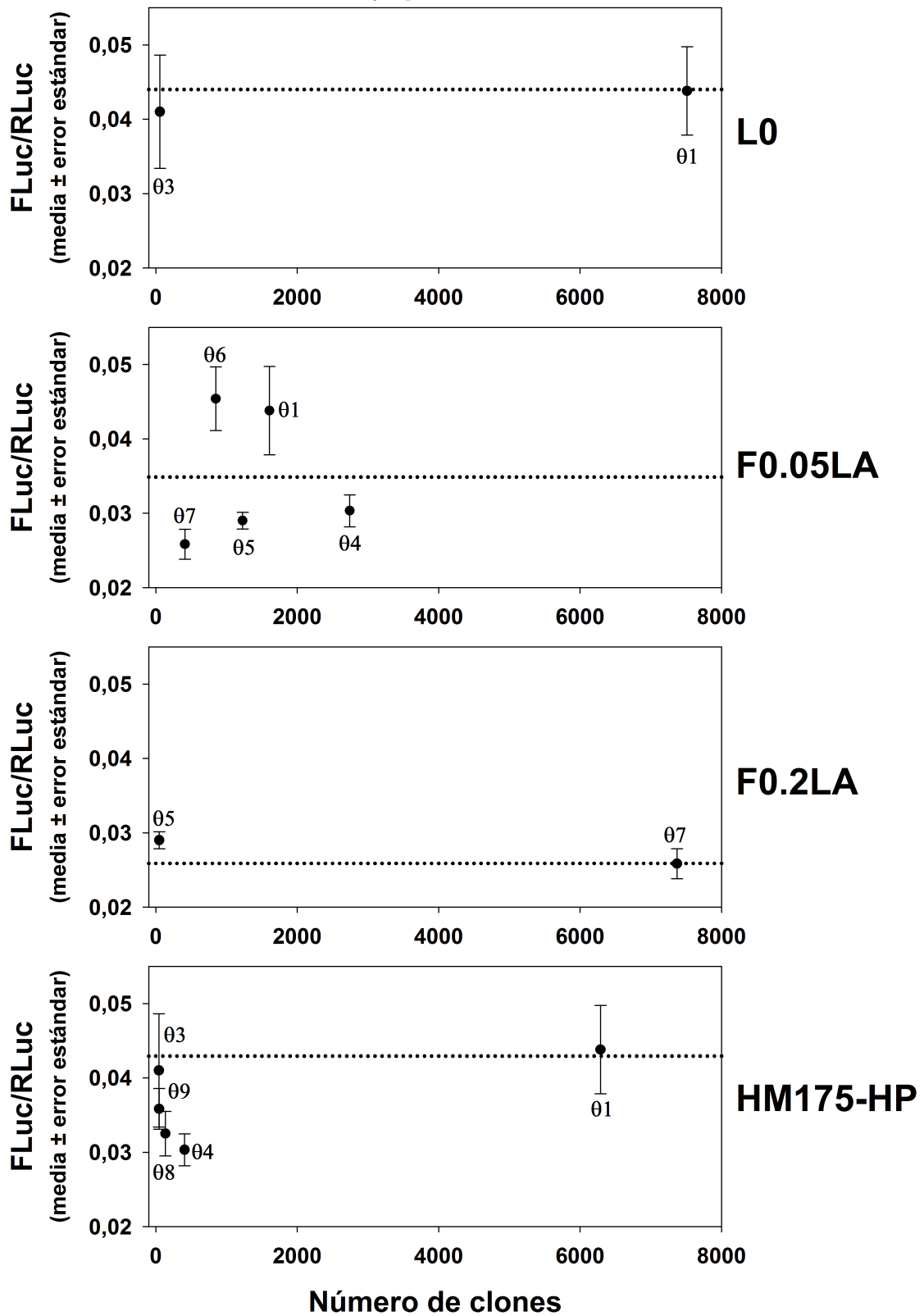


Figura 51. Tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc en presencia de las 3 mutaciones del IRES de los diferentes clones de la región de VP3 que componen las cuasiespecies de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP, en condiciones de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. La línea punteada señala el valor medio de la tasa de traducción de la respectiva cuasiespecie.

En cuanto a los clones minoritarios de las poblaciones, se encontraron algunas variaciones con respecto a sus comportamientos sin AMD. Por ejemplo, el clon minoritario $\theta 3$ en L0, traduce a una tasa inferior a la media poblacional pero no significativa, mientras traducía a una tasa superior a la media en ausencia de AMD. También los clones minoritarios $\theta 4$ y $\theta 8$ de HM175-HP traducen a una tasa significativamente inferior a la media poblacional en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, pero no en ausencia. En tanto para F0.05LA, se observa una mezcla de tasas de traducción, donde algunas son inferiores ($\theta 4$, $\theta 5$ y $\theta 7$) y otras superiores ($\theta 1$ y $\theta 6$) al valor de la media poblacional (ver Figura 51), mientras que en ausencia la traducción de $\theta 1$ y $\theta 5$ coincidía con el valor de la media.

Por otra parte, en presencia de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, nuevamente se observó un patrón similar a 0.00 $\mu\text{g/ml}$ y 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, aunque los valores de FLuc/RLuc registrados tanto para las medias poblacionales como para los clones individuales, eran claramente y significativamente superiores a los registrados en las otras condiciones de silenciamiento celular estudiadas (ver Figura 52). Siendo esto debido básicamente a una mayor disponibilidad de recursos y de la maquinaria traduccional celular en beneficio del virus. A su vez, es interesante resaltar el hecho de que durante el *molecular breeding* en 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD se seleccionó el clon $\theta 1$ (21% de la población F0.05LA) con una tasa de traducción sin mutaciones del IRES del 0.023 ± 0.001 y no el clon $\theta 7$ (6% en F0.05LA y 99% en F0.2LA) con una tasa de traducción similar de 0.024 ± 0.002 . Sin embargo, lo que diferencia $\theta 1$ de $\theta 7$ es su mayor velocidad de traducción en presencia de las mutaciones del IRES (0.044 ± 0.006 y 0.026 ± 0.002 , respectivamente). De esta forma, se pone en evidencia nuevamente, la tendencia de HM175-HP a tener una mayor velocidad de traducción en la región de VP3 estudiada, aunque no a los niveles que se observaron en la región de VP1. Asimismo, se vio que la tendencia de la población F0.2LA seleccionando como clon ampliamente dominante a $\theta 7$, es a disminuir su velocidad de traducción.

Es importante destacar que a diferencia de la situación encontrada para las regiones de VP1 en ausencia o presencia de las mutaciones del IRES, en la región de VP3 no hay un clon cuya tasa de traducción destaque ampliamente sobre el resto de los clones.

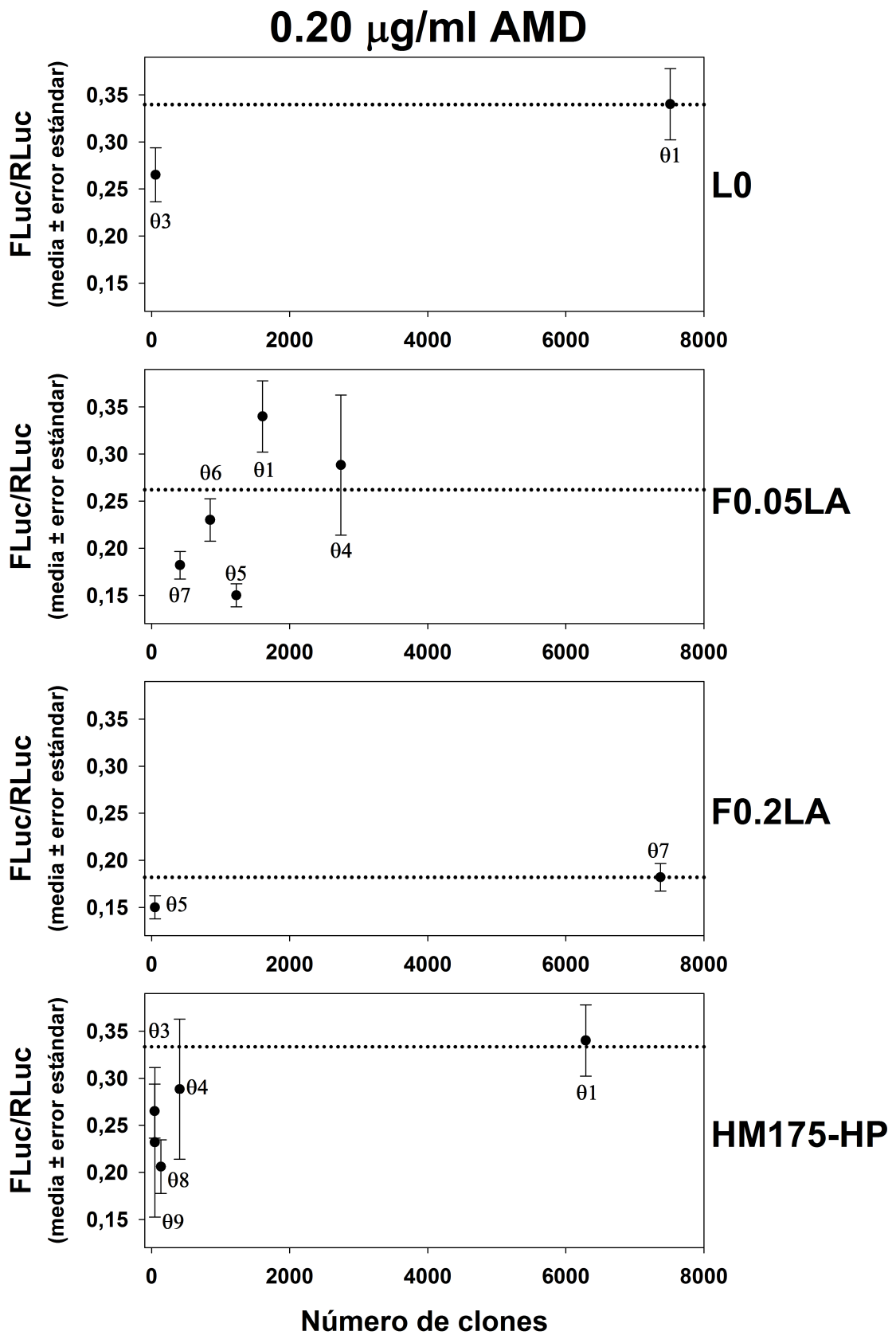


Figura 52. Tasa de traducción expresada como la relación FLuc/RLuc en presencia de las 3 mutaciones del IRES de los diferentes clones de la región de VP3 que componen las cuasiespecies de las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP, en condiciones de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. La línea punteada señala el valor medio de la tasa de traducción de la respectiva cuasiespecie.

De forma complementaria, en la Tabla 15 se puede ver la composición de cada una de las cuasiespecies en estudio de la región de VP3 en presencia de las mutaciones del IRES, según la velocidad de traducción de sus clones respecto a la media de clones de L0. Se vio que tanto en presencia de 0.05 µg/ml como de 0.20 µg/ml de AMD, ninguno de los clones tenía una tasa de traducción significativamente superior a la media de los clones de L0. Esto se explicaría porque el clon $\theta 1$, el clon mayoritario de L0, fue el único de los clones de la región de VP3 que se benefició por la presencia de las mutaciones en el IRES tanto en 0.05 µg/ml (ver Figuras 24 y 51) como en 0.20 µg/ml (ver Figuras 25 y 52) de AMD. En 0.05 µg/ml de AMD tenía valores de 0.023 ± 0.001 y 0.044 ± 0.006 en ausencia y presencia de las mutaciones del IRES, respectivamente, y en 0.20 µg/ml de AMD tenía tasas de traducción de 0.243 ± 0.018 y 0.340 ± 0.038 en ausencia y presencia de las mutaciones del IRES, respectivamente. A diferencia de los valores de las tasa de traducción de los haplotipos de la región de VP1 que se beneficiaban con la presencia de las mutaciones en el IRES ($\lambda 7$ y $\lambda 14$), el incremento de la tasa de traducción del clon $\theta 1$ conseguida en presencia de las mutaciones no es semejante. Asimismo, se vio que en las tasas de traducción de la mayoría de los clones de F0.05LA y HM175-HP, tanto en 0.05 µg/ml como en 0.20 µg/ml de AMD, no eran significativamente distintos a la media de clones de L0, lo cual se explicaría principalmente debido a la presencia dominante del clon $\theta 1$. Por otra parte, se encontró que todos los clones de F0.2LA en ambas condiciones de silenciamiento celular, tenían tasas de traducción significativamente inferiores a la media de clones de L0, lo cual indica la tendencia de esta población a traducir más lento, y es coherente con lo observado en la Figura 49. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las tasas medias de traducción de esta población en presencia y ausencia (ver Tabla 10) de las mutaciones del IRES, ni en 0.05 µg/ml ni en 0.20 µg/ml de AMD. También se vio que un 24% de los clones de F0.05LA en ambas condiciones de silenciamiento celular, tenían tasas de traducción significativamente inferiores a la media de clones de L0 (ver Tabla 15).

Tabla 15. Composición de las cuasiespecies en estudio de la región de VP3 en presencia de las 3 mutaciones en el IRES, según la velocidad de traducción expresada como la media \pm error estándar, respecto a la media de los clones de L0. =, +, - hace referencia a si los valores de las medias de traducción de los clones no son diferentes significativamente, son significativamente superiores, o significativamente inferiores, con respecto a la media de clones de L0, respectivamente.

| [AMD] $\mu\text{g/ml}$ | Población | % Clones | FLuc/RLuc respecto a media L0 | FLuc/RLuc (media \pm error estándar) | Clones ^a |
|---------------------------|-----------|----------|-------------------------------------|---|------------------------------------|
| 0.05 | L0 | 100 | = | 0.044 \pm 0.001 | θ 1, θ 3 |
| | F0.05LA | 76 | = | 0.037 \pm 0.004 | θ 4, θ 1, θ 6 |
| | | 24 | - | 0.028 \pm 0.001 | θ 5, θ 7 |
| | F0.2LA | 100 | - | 0.026 \pm 0.001 | θ 7, θ 5 |
| HM175-HP | 100 | = | 0.043 \pm 0.001 | θ 1, θ 4, θ 8, θ 9, θ 3 | |
| 0.20 | L0 | 100 | = | 0.339 \pm 0.001 | θ 1, θ 3 |
| | F0.05LA | 76 | = | 0.295 \pm 0.055 | θ 4, θ 1, θ 6 |
| | | 24 | - | 0.158 \pm 0.013 | θ 5, θ 7 |
| | F0.2LA | 100 | - | 0.182 \pm 0.001 | θ 7, θ 5 |
| HM175-HP | 98 | = | 0.335 \pm 0.040 | θ 1, θ 4, θ 9, θ 3 | |
| | 2 | - | 0.206 \pm 0.028 | θ 8 | |

^a Orden según abundancia en la población

Sorprendentemente, un porcentaje de haplotipos de la población F0.05LA mostraron un comportamiento distinto en cuanto a la tasa de traducción en presencia de un IRES más o menos activo. Mientras que con un IRES menos eficiente el 30% de los haplotipos de la población mostraban una tasa de traducción mayor a L0, con un IRES más eficiente un 24% de los haplotipos traducían más lentamente. Ello se asocia a una respuesta diferencial de los haplotipos θ 5, θ 6 y θ 7 a la eficiencia del IRES (ver Tablas 10 y 15). Algo similar pero en sentido opuesto, ocurría con un pequeño porcentaje de haplotipos en HM175-HP (ver Tablas 10 y 15). Todos estos datos estarían sugiriendo nuevamente la existencia de una fina sintonización entre eficiencia de IRES y uso de codones.

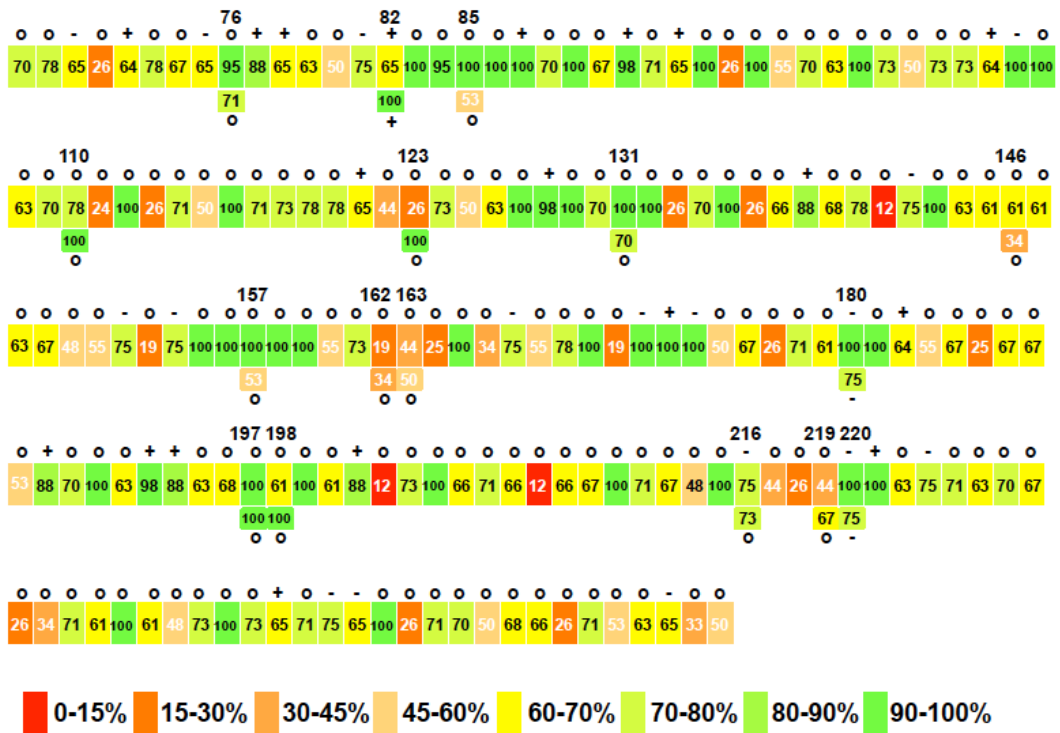
4.3.2 Efecto de las tres mutaciones del IRES sobre la modulación de la velocidad de traducción llevada a cabo por el uso de codones

Para comprender el efecto que pudieran tener las mutaciones en el IRES sobre los cambios en el uso de codones observados, y por consiguiente en los valores de las tasas de traducción obtenidas, es muy importante tener en cuenta el contexto en el cual se observan los cambios en el uso de codones. Por esta razón, se decidió volver a incluir en el presente Capítulo las Figuras correspondientes al uso de codones en presencia de AMD, para la región de VP1 y VP3 según una gradación de colores, que fueron previamente incluidas en el Capítulo 1 (ver Figura 53).

4.3.2.1 Efecto de las mutaciones del IRES sobre haplotipos con traducción disminuida por deoptimización de codones: compensación del descenso de la tasa de traducción

En el Capítulo 1 se vio que los clones $\lambda 4$, $\lambda 5$ y $\lambda 12$ habían adquirido cambios puntuales que inducían a una disminución de sus tasas de traducción, en comparación a la tasa de traducción media de los clones de L0. En cuanto a la tasa de traducción expresada como FLuc/RLuc del clon $\lambda 5$, se vio que en ausencia de las mutaciones del IRES y en condiciones de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD, la presencia de un cambio a un codón menos frecuente en la posición 146 (ver Figura 54), donde se pasa de un codón con una frecuencia del 61% a otro con una del 34%, inducía una pequeña disminución de la velocidad de traducción en comparación a la media de los clones de L0. En presencia de las mutaciones del IRES se observó una compensación de dicha disminución de la tasa de traducción (ver Figura 55).

AMD



AMD

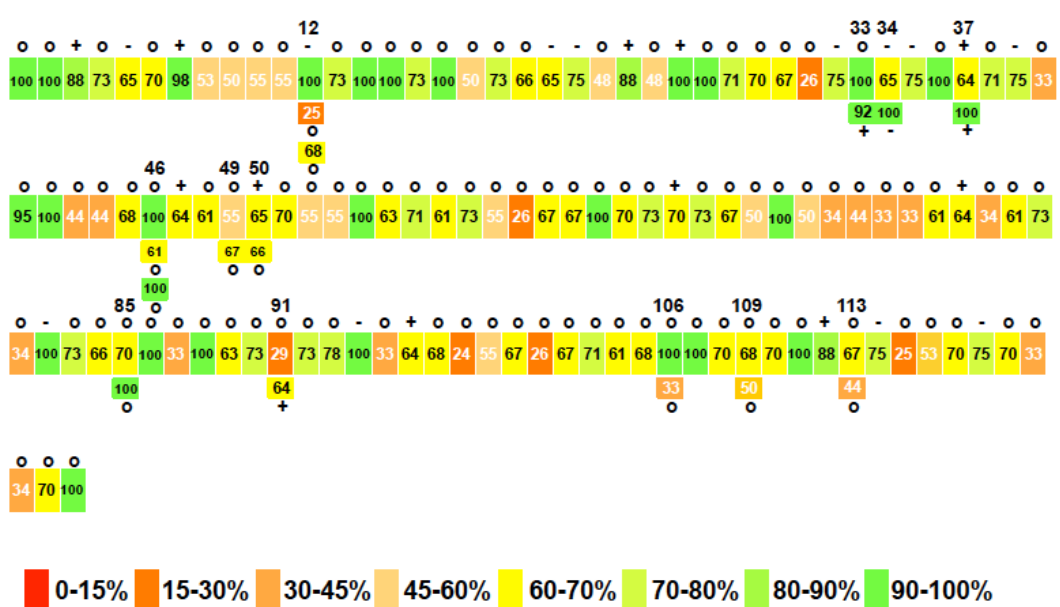
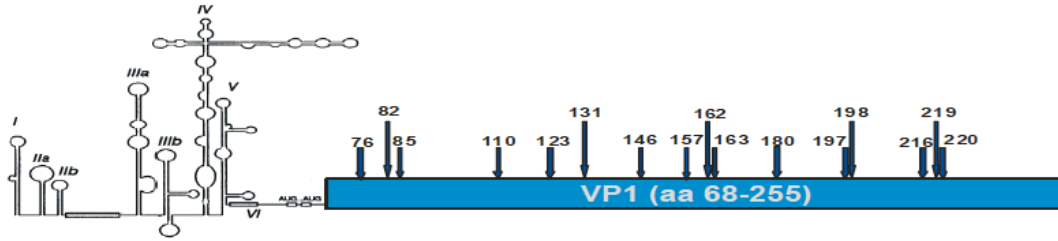


Figura 53. Diagrama del uso de codones de la región de VP1 (panel superior) y VP3 (panel inferior) analizada correspondiente a la cepa pHM175 43c, en presencia de AMD. Se representa con una gradación de colores dependiendo de las frecuencias de los codones según el uso de codones de la célula humana. Los números que se indican arriba de la secuencias estudiadas corresponden a las posiciones en donde se han encontrado cambios en los diferentes clones. Por debajo de las secuencias analizadas se representan los cambios que se han registrado teniendo en cuenta todos los clones y en su interior el porcentaje del nuevo codón. Los números en el interior de la secuencia corresponden a los porcentajes de los respectivos codones según el uso de codones de la célula humana. o,+, -, representan que los aminoácidos que codifican los respectivos codones tienen carga neutra, positiva, negativa, respectivamente.



| CLON | POSICIÓN CAMBIO CODÓN EN LOS DISTINTOS CLONES RESPECTO pHM175 43c | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|---|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 76 | 82 | 85 | 110 | 123 | 131 | 146 | 157 | 162 | 163 | 180 | 197 | 198 | 216 | 219 | 220 |
| pHM175 43c | | | | | | | | | | | | | | | | |
| λ2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| λ4 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| λ5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| λ6 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| λ7 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| λ10 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| λ11 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| λ12 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| λ14 | | | | | | | | | | | | | | | | |

Figura 54. Posiciones de los cambios en el uso de codones con respecto a pHM175 43c de los clones λ2, λ4, λ5, λ6, λ7, λ10, λ11, λ12 y λ14 de VP1. En rojo y verde se señalan aquellos cambios que inducen a la aparición de un codón menos o más frecuente, respectivamente, de acuerdo al que se encontraba en pHM175 43c.

En cuanto al clon λ12, que además de tener el mismo cambio en la posición 146 que el clon λ5, tiene otro en la posición 131 (ver Figura 54) donde se pasa de tener un codón con una frecuencia del 100% a otro con una del 70%, se vio que en ausencia de las mutaciones del IRES inducían a una mayor disminución de la tasa de traducción en comparación al clon λ5, en presencia de 0.20 μg/ml de AMD. En presencia de las mutaciones del IRES, se observó de nuevo una recuperación de la tasa de la traducción (ver Figura 55).

El clon λ4, como se ha dicho en el Capítulo anterior, posee el mismo cambio en la posición 146 que λ5 y λ12, pero posee también otro cambio en la posición 85 (ver Figura 54) donde se pasa de un codón con una frecuencia del 100% a otro con una del 53%. Este clon en ausencia de las mutaciones del IRES y en condiciones de silenciamiento celular alto, mostraba una significativa disminución de la tasa de traducción en comparación a la media de clones de L0. Sin embargo, en presencia de las mutaciones del IRES se vio una sorprendente recuperación de la tasa de traducción perdida (ver Figura 55).

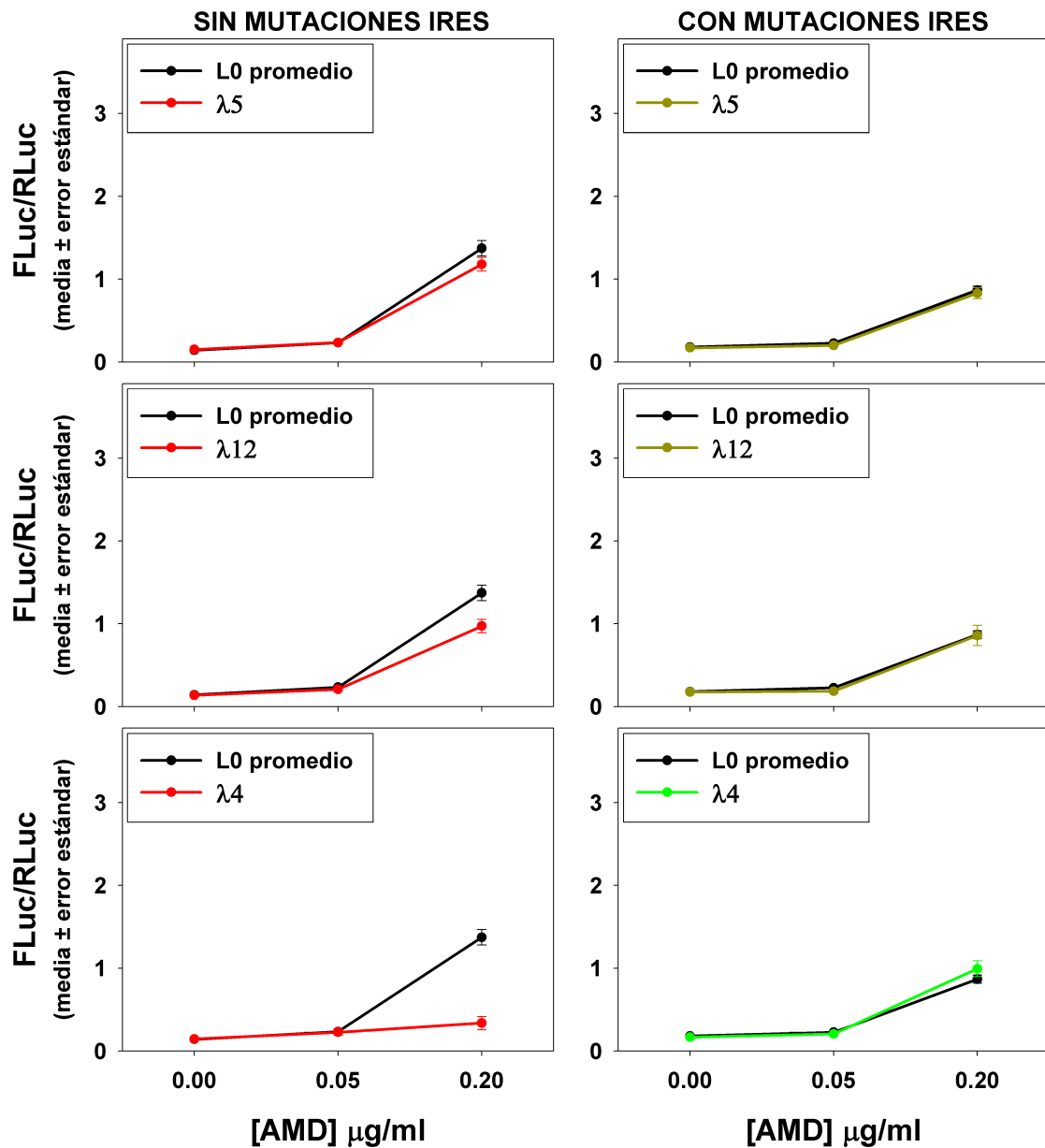


Figura 55. Tasa de traducción expresada como FLuc/RLuc (media \pm error estándar) en ausencia y presencia de las mutaciones del IRES de los clones $\lambda 4$, $\lambda 5$ y $\lambda 12$, y de la media de clones de L0 en presencia de 0.00 μ g/ml, 0.05 μ g/ml y 0.20 μ g/ml de AMD.

Los resultados obtenidos indicarían un efecto positivo de las mutaciones del IRES en haplotipos con usos de codones que tienden a una mayor deoptimización.

4.3.2.2 Efecto de las mutaciones del IRES sobre haplotipos que incrementan la tasa de traducción por efecto del uso de codones: mayor incremento de la tasa de traducción

En ausencia de las mutaciones del IRES, se encontró que en algunos haplotipos habían cambios de codones combinados que no sólo equilibraban el efecto de la disminución de la tasa de traducción inducida por codones menos frecuentes, sino que también ocasionaban un incremento significativo de la misma, como en los casos de $\lambda 7$ y $\lambda 14$ de la región de VP1. En ambos casos, se observó que la tasa de traducción era significativamente superior a la media de clones de L0 tanto en condiciones de silenciamiento celular moderado como alto. En el clon $\lambda 7$ se vio que la presencia de un cambio a mayor frecuencia en la posición 123 y la ausencia de un cambio a menos frecuente en la posición 85 (ver Figura 54), eran determinantes para el valor de la tasa de traducción obtenida en ausencia de las mutaciones del IRES, a pesar de poseer un cambio a menos frecuente en la posición 146. En presencia de las mutaciones del IRES, los valores de la tasa de traducción de este clon en todas las condiciones de silenciamiento celular estudiadas, se incrementaron sorprendentemente en comparación a las observadas en ausencia de las mutaciones (ver Figura 56).

El clon $\lambda 14$ posee un cambio a menos frecuente en la posición 146, un cambio a más frecuente en la posición 110 donde se pasa de un codón con una frecuencia del 78% a uno con una del 100%, y 2 cambios a menos frecuentes en las posiciones 76 y 157, donde se pasa de frecuencia del 95% y 100% a 71% y 53%, respectivamente (ver Figura 54). Para este clon tanto en ausencia como en presencia de las mutaciones del IRES, se consiguió un efecto similar al obtenido para el clon $\lambda 7$, en cuanto a los valores de sus tasas de traducción (ver Figura 56).

Estos resultados se explicarían por la existencia de una especie de *fine-tuning* entre IRES y uso de codones. La combinación de un IRES más eficiente con un uso de codones más optimizado, tanto por la presencia de codones más frecuente como por la ausencia de cambios que induzcan a la presencia de codones poco frecuentes y por tanto a disminuciones significativas de la

tasa de traducción, tiene como consecuencia un aumento muy significativo de la tasa de traducción.

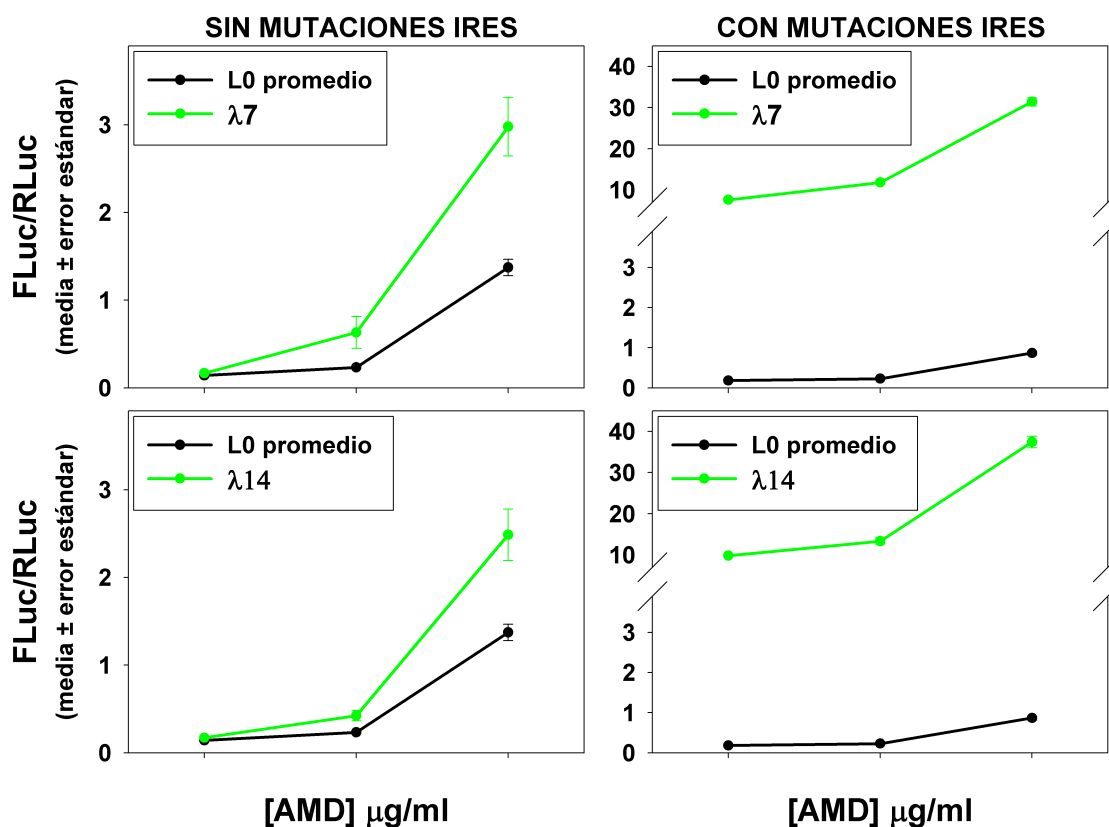


Figura 56. Tasa de traducción expresada como FLuc/RLuc (media ± error estándar) en ausencia y presencia de las mutaciones del IRES de los clones λ7 y λ14, y de la media de clones de L0 en presencia de 0.00 μg/ml, 0.05 μg/ml y 0.20 μg/ml de AMD.

Por tanto, se podría decir que las mutaciones del IRES correlacionarían con la selección traduccional. Es decir, favorecen el aumento de la tasa de traducción de aquellos clones que optimizan más, o lo que es lo mismo, favorecerían a aquellos clones que en ausencia de las mismas habían evolucionado para traducir a una mayor velocidad.

4.3.2.3 Efecto de las mutaciones del IRES sobre haplotipos con traducción aumentada por optimización de codones: disminución de la tasa de traducción

No siempre las mutaciones del IRES inducen un incremento de la tasa de traducción cuando existe optimización de codones. El clon λ2 poseía un

cambio a un codón más frecuente en la posición 198 (ver Figura 54), donde se pasaba de tener un codón con una frecuencia del 61% a otro con una del 100%. En ausencia de las mutaciones del IRES, la tasa de traducción de este clon en condiciones de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD era superior a los valores de la media de traducción obtenida para los clones de L0, pero esas diferencias observadas no alcanzaban a ser estadísticamente significativas. En tanto, en presencia de las mutaciones del IRES, se vio una disminución significativa del valor de la tasa de traducción, respecto a los valores de la media de traducción de los clones de L0 (ver Figura 57). Una explicación plausible sería el hecho de la existencia de 2 codones muy raros (12% de uso), a una distancia de tan sólo 4 y 10 codones en la dirección de traducción (ver Figura 53). El aumento de la tasa de traducción por actividad del IRES podría provocar un efecto de colisiones de ribosomas.

Estos resultados nos sugerirían que las mutaciones del IRES tendrían un efecto positivo en aquellos haplotipos con usos de codones que optimizan, siempre y cuando esa optimización le permitiera conseguir tasas de traducción significativamente superiores a la media de clones de L0 en ausencia de las mutaciones.

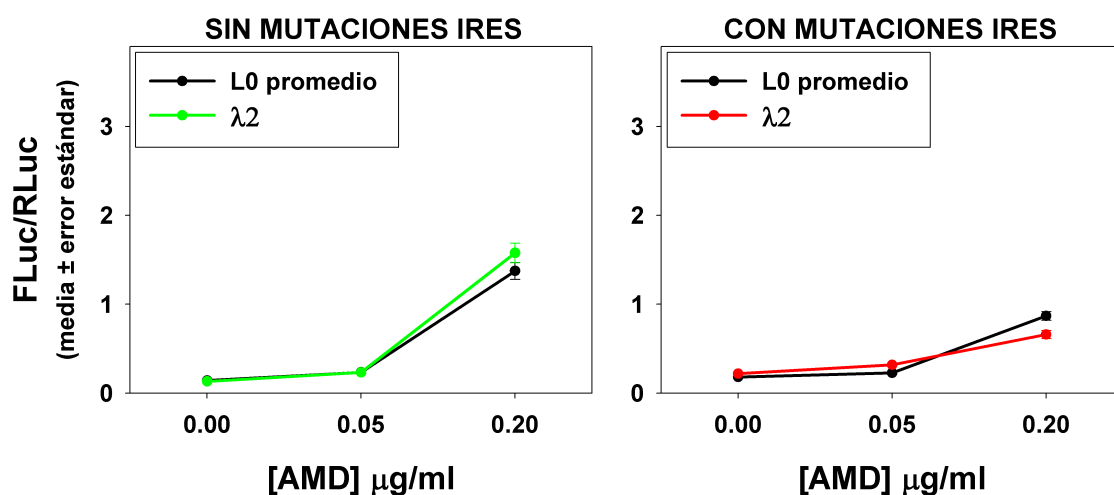


Figura 57. Tasa de traducción expresada como FLuc/RLuc (media \pm error estándar) en ausencia y presencia de las mutaciones del IRES del clon $\lambda 2$ y de la media de clones de L0 en presencia de 0.00 $\mu\text{g/ml}$, 0.05 $\mu\text{g/ml}$ y 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD.

4.3.2.4 Efecto de las mutaciones del IRES sobre haplotipos que deoptimizan y optimizan concomitantemente su uso de codones obteniendo un efecto compensatorio de la tasa de traducción: disminución de la tasa de traducción

En ausencia de las mutaciones en el IRES, se encontró que no sólo los codones menos frecuentes, sino que también cambios a codones más frecuentes cumplían un rol en la modulación de la tasa de traducción. Se vio que los clones $\lambda 6$, $\lambda 10$ y $\lambda 11$, los cuales poseían los 2 cambios a codones menos frecuentes en las posiciones 85 y 146, que inducían a una disminución significativa de la tasa de traducción, tenían también cambios en otras posiciones a codones más frecuentes, que inducían a un efecto de compensación de la tasa de traducción perdida.

El clon $\lambda 6$ además de tener los cambios a menos frecuentes en las posiciones 85 y 146, poseía un cambio en la posición 123 que induce la aparición de un codón más frecuente (ver Figura 54), donde se pasa de un codón con una frecuencia del 26% a otro con una del 100%. En ausencia de las mutaciones del IRES, la ganancia de casi un 75% de frecuencia ayuda a contrarrestar el efecto de los codones menos frecuentes en la tasa de traducción, alcanzando valores similares a la media de los clones de L0 (ver Figura 58). En presencia de las mutaciones del IRES no se observó cambio alguno en la tasa de traducción respecto a la media de clones de L0, y por tanto, se puede concluir que existía el mismo efecto de compensación de codones (ver Figura 58).

En cuanto al clon $\lambda 11$, además de los cambios en las posiciones 85 y 146, posee un cambio en la posición 162 que induce a la aparición de un codón más frecuente (ver Figura 54), donde se pasa de un codón con una frecuencia del 19% a otro con una del 34%. En ausencia de las mutaciones del IRES, este cambio le permite al clon contrarrestar el efecto de los cambios en las posiciones 85 y 146, e incluso aumentar su tasa de traducción de forma significativa con respecto al valor de la media de los clones de L0, en condiciones de silenciamiento celular alto. En presencia de las mutaciones del IRES, se obtuvo también una tasa de traducción superior a la media de clones

de L0, pero no tan significativo como en ausencia de las mutaciones (ver Figura 58).

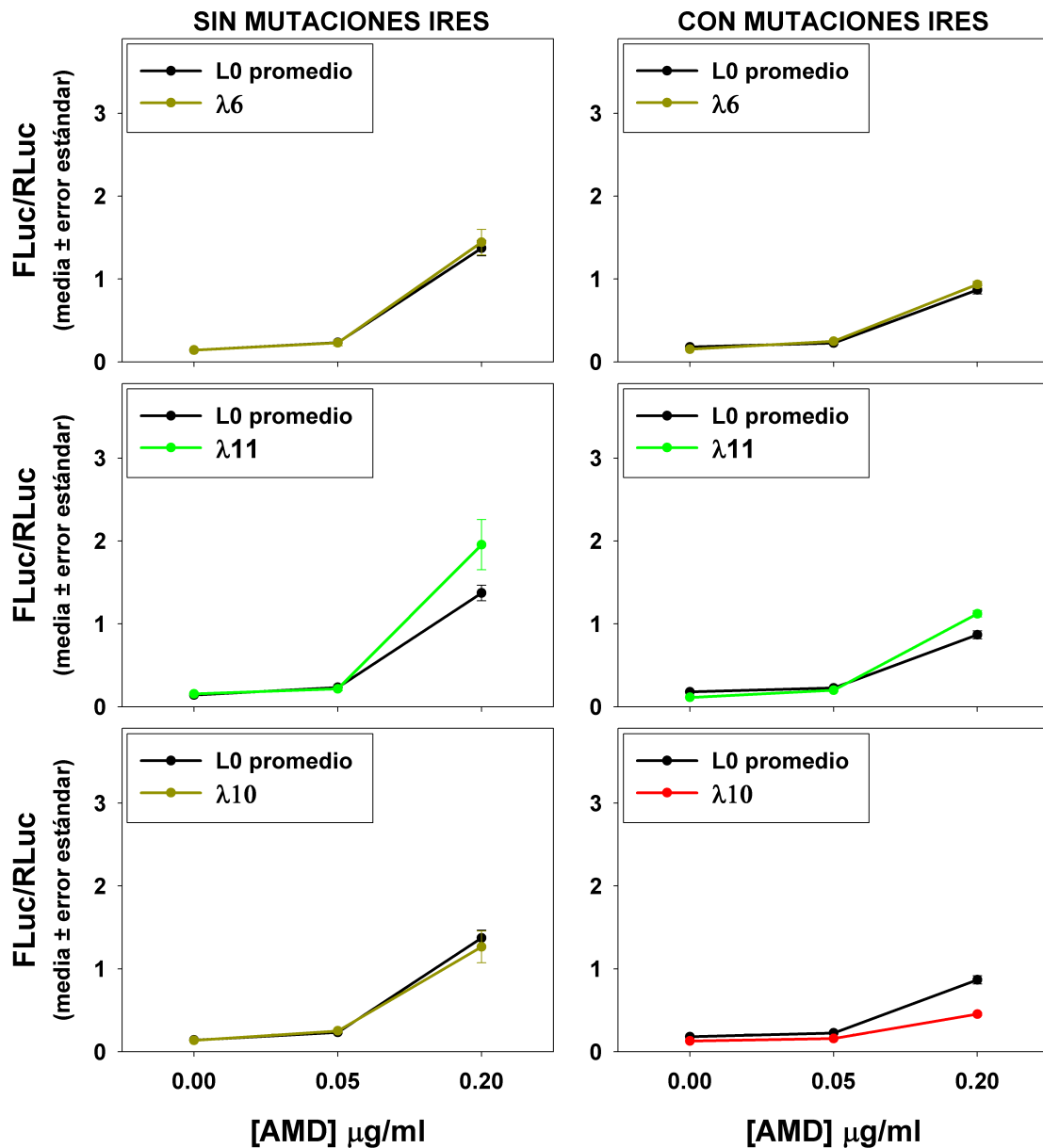


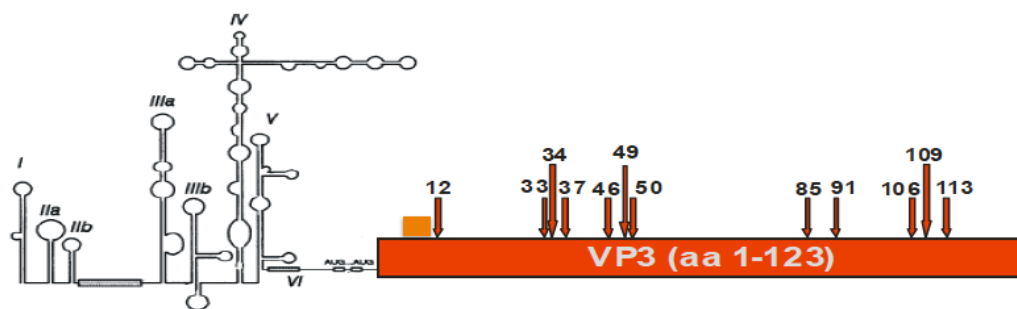
Figura 58. Tasa de traducción expresada como FLuc/RLuc (media \pm error estándar) en presencia de las 3 mutaciones en el IRES de los clones $\lambda 6$, $\lambda 10$ y $\lambda 11$ y de la media de clones de L0 en presencia de 0.00 $\mu\text{g/ml}$, 0.05 $\mu\text{g/ml}$ y 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD.

Por otra parte, el clon $\lambda 10$ además de poseer los cambios en las posiciones 85 y 146 como $\lambda 6$ y $\lambda 11$, tenía también 3 cambios a codones más frecuentes en las posiciones 82, 123 y 162 (ver Figura 54), donde el cambio en la posición 123 era el mismo al encontrado en el clon $\lambda 6$ y el de la posición 162 era el mismo al encontrado en el clon $\lambda 11$. En tanto, el cambio en la posición

82 inducía a pasar de un codón con una frecuencia del 65% a otro con una del 100%. En ausencia de las mutaciones del IRES se vio que su tasa de traducción era similar a la de la media de clones de L0, en todas las condiciones de silenciamiento celular analizadas. En cambio en presencia de las mutaciones del IRES, se vio una clara y significativa caída en su tasa de traducción, en comparación al valor de la tasa media de traducción de los clones de L0 (ver Figura 58).

4.3.2.5 Efecto de las mutaciones del IRES cuando existe un efecto rampa en las tasas de traducción: neutralidad o bajada de la tasa de traducción

En ausencia de las mutaciones del IRES, los clones aislados en las cuasiespecies correspondientes a VP3 tenían tasas de traducción que eran significativamente inferiores, del orden de 10 veces menores en comparación a las encontradas en los clones correspondientes a la región de VP1. Este hecho se explicaría por la existencia de lo que se denomina “rampa” (ver Figura 59). La “rampa” es la presencia de un grupo de codones que se aparean con ARNt menos abundantes al comienzo de secuencias codificantes, y en VP3 se ejemplificaría por los codones ubicados en las posiciones 8 a 11 (ver Figura 59). Es importante recordar que los clones $\theta 1$, $\theta 3$, $\theta 4$, $\theta 5$, $\theta 6$, $\theta 7$ y $\theta 8$ comparten un cambio a un codón más frecuente en la posición 91, y 2 cambios a codones menos frecuentes en las posiciones 106 y 113 (ver Figura 59). En ausencia de las mutaciones del IRES, se vio que dichos clones poseían tasas de traducción similares o un poco superiores a la media de la tasa de traducción de los clones de L0 (ver Figuras 60 y 61). En cambio, en presencia de las mutaciones del IRES se encontró un patrón un poco diferente. Los clones $\theta 1$, $\theta 3$ y $\theta 4$ presentaban tasas de traducción similares o un poco inferiores a la media de clones de L0 (ver Figura 60), mientras que para los clones $\theta 5$, $\theta 6$, $\theta 7$ y $\theta 8$ se obtuvieron tasas de traducción significativamente inferiores a la media de clones de L0 (ver Figura 61).



| CLON | POSICIÓN CAMBIO CODÓN EN LOS DISTINTOS CLONES RESPECTO pHM175 43c | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 33 | 34 | 37 | 46 | 49 | 50 | 85 | 91 | 106 | 109 | 113 |
| HM175 43c | | | | | | | | | | | | | | | | |
| θ1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| θ3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| θ4 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| θ5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| θ6 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| θ7 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| θ8 | | | | | | | | | | | | | | | | |

Figura 59. Posiciones de los cambios en el uso de codones con respecto a pHM175 43c de los clones θ1, θ3, θ4, θ5, θ6, θ7 y θ8 de VP3. En rojo, amarillo y verde se señalan aquellos cambios que inducen a la aparición de un codón menos, igual y más frecuente, respectivamente, de acuerdo al que se encontraba en pHM175 43c. En naranja se señala la ubicación de la “rampa” que induce a un descenso generalizado de la tasa de traducción.

Para los clones θ1, θ3 y θ4, los valores de tasa de traducción obtenidos se podrían explicar por la presencia de un cambio a un codón menos frecuente en la posición 12, donde se pasa de un codón con una frecuencia del 100% a uno con 25% (ver Tabla 8). Este codón menos frecuente sería como una intensificación de la “rampa”, que en presencia de IRES eficiente reduciría en la posición 31, la probabilidad de colisiones de ribosomas debido a la presencia de un codón poco frecuente (26% de uso) (ver Figura 53).

Los clones θ5, θ6 y θ7 carecen del codón con una frecuencia del 25% en la posición 12 (ver Tabla 8), donde en su lugar θ6 y θ7 poseen un codón con una frecuencia del 100%, y θ5 posee uno con una frecuencia del 68%. Estos usos de codones favorecerían la existencia de colisiones de ribosomas, ya que después de la posición 12 hay una zona rica en codones de mediana y alta frecuencia, antes del codón de baja frecuencia en la posición 31 (ver Figura 53).

En cuanto al clon $\theta 8$, si bien posee en la posición 12 el codón con una frecuencia del 25%, que debería evitar colisiones ribosomales y así evitar una caída en la traducción como en $\theta 1$, $\theta 3$ y $\theta 4$, también posee otro cambio a un codón menos frecuente en la posición 109 (ver Figura 59). De forma altamente probable, las pausas en la traducción en las posiciones 106, 109 y 113 serían las responsables de la disminución de la tasa de traducción con respecto a la media de traducción de los clones de L0.

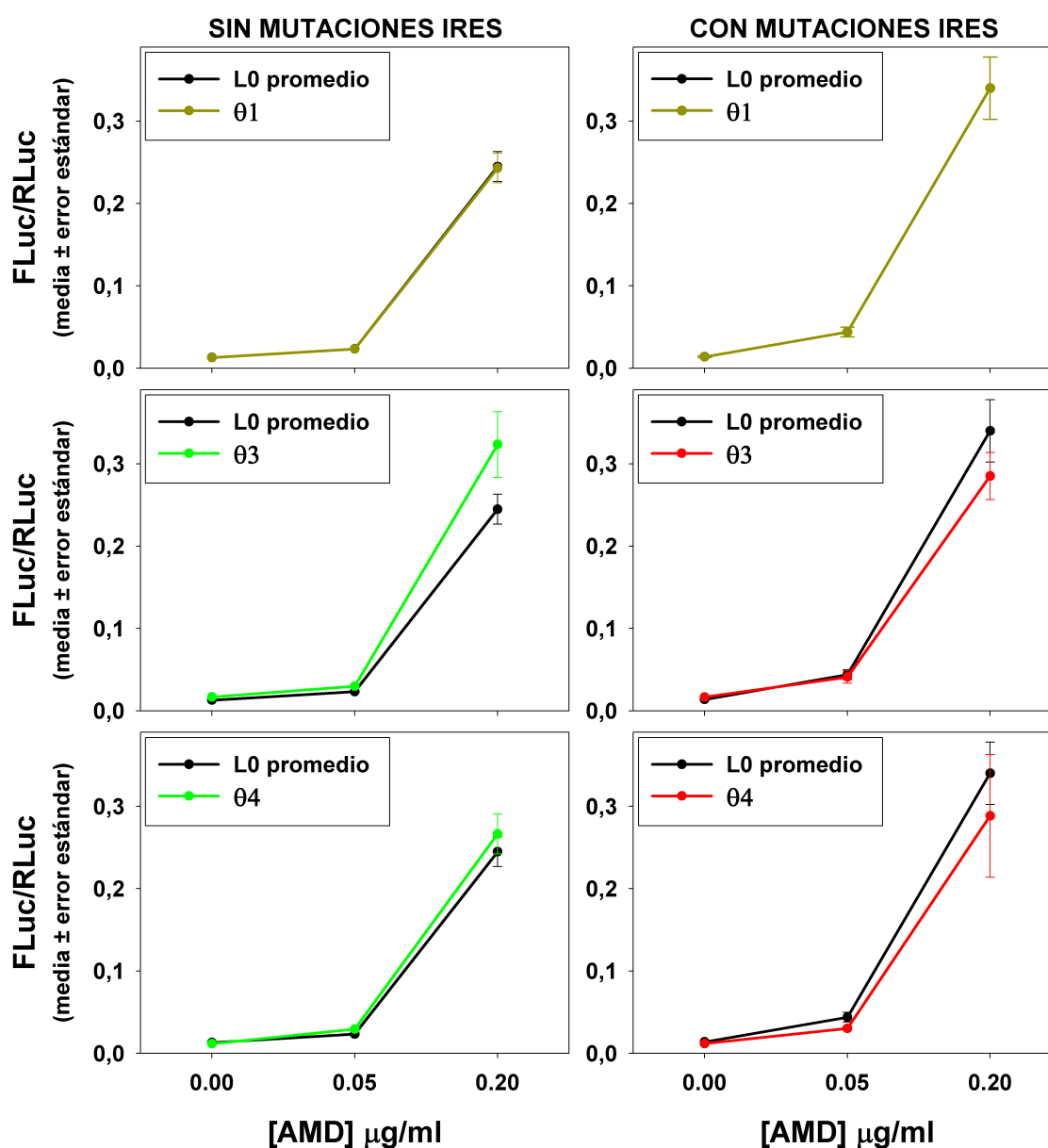


Figura 60. Tasa de traducción expresada como FLuc/RLuc (media \pm error estándar) en ausencia y presencia de las 3 mutaciones del IRES de los clones $\theta 1$, $\theta 3$ y $\theta 4$, en condiciones de 0.00 $\mu\text{g/ml}$, 0.05 $\mu\text{g/ml}$ y 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. También se añadió la media de clones de L0 sin y con las mutaciones del IRES, respectivamente.

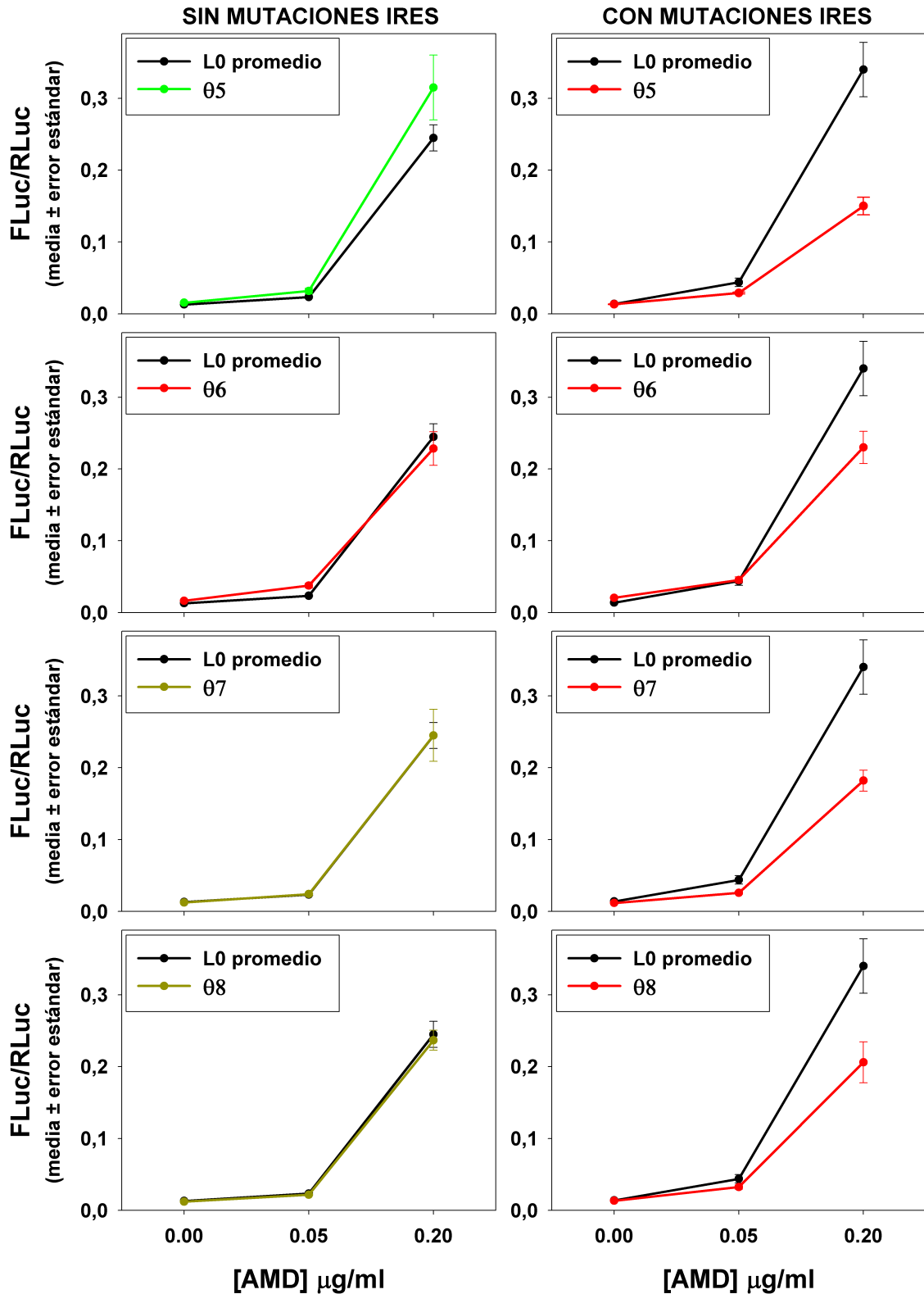


Figura 61. Tasa de traducción expresada como FLuc/RLuc (media ± error estándar) en ausencia y presencia de las 3 mutaciones del IRES de los clones θ5, θ6, θ7 y θ8, en condiciones de 0.00 µg/ml, 0.05 µg/ml y 0.20 µg/ml de AMD. También se añadió la media de clones de L0 sin y con las mutaciones del IRES, respectivamente.

A pesar de detectar cambios en las tasas de traducción en presencia de las mutaciones del IRES, estos cambios no eran tan relevantes como los encontrados en la región de VP1, siendo las tasas de traducción de los clones de VP3 significativamente más bajas que las encontradas en VP1, tanto en presencia como en ausencia de las mutaciones.

Así, como conclusión general se podría hipotetizar que las disminuciones de las tasas de traducción en presencia de las mutaciones del IRES, serían debidas a la existencia de colisiones (impedimento del paso de un ribosoma por otro) y/o colas de ribosomas (colisiones múltiples), debido a una mayor tasa de iniciación de la traducción. Estas colisiones y colas de ribosomas, aumentarían los tiempos de traducción, y podrían inducir a que algunos ribosomas se liberasen de forma espontánea del ARNm que están traduciendo. Estas situaciones estarían favorecidas por un aumento de la densidad de ribosomas sobre el ARNm debido a la existencia de un IRES más eficiente, la presencia de varios codones poco frecuentes y por el hecho de introducir cambios de codones a más frecuentes cercanos a codones poco frecuentes.

4.4 DISCUSIÓN

Los elementos IRES son los responsables de dirigir la iniciación interna de la traducción en el ARN de todos los miembros de la familia *Picornaviridae*, así como también de otros virus de ARN como hepacivirus, pestivirus, dicistrovirus, retrovirus, y algunos virus de ARN que infectan plantas y protozoarios. Estos elementos están bien diferenciados en términos de secuencia nucleotídica, estructura de ARN y requerimientos de factores que actúan en trans [Martínez-Salas *et al.*, 2015]. Los elementos IRES actúan a través de una combinación de dominios estructurales, organizados de un modo complejo que permiten interacciones estructurales terciarias y que inducen una orientación espacial correcta de aquellos motivos específicos que van a interactuar con el ribosoma. A su vez, la interacción IRES-ribosoma requiere también del reconocimiento de motivos específicos, por parte de los factores del hospedador [Fernández-Miragall *et al.*, 2009].

El VHA posee el IRES con la actividad más baja entre los picornavirus. Estudios de comparación entre el IRES del VHA y el del EMCV, demostraron que el IRES de este último tiene una actividad 25 veces superior a la del IRES del VHA, en dirigir la iniciación de la traducción. Este resultado es probablemente debido a que el IRES del EMCV es capaz de unir los factores de traducción celulares de forma más eficiente que el VHA, ya que la traducción dirigida por el IRES de este último se vio inhibida en presencia del IRES del EMCV [Brown *et al.*, 1994; Schultz *et al.*, 1996].

La hipótesis de que el lento crecimiento del VHA en cultivo celular estaría relacionado con una traducción ineficiente por parte de su IRES, ha sido demostrada experimentalmente con la emergencia de mutaciones en la región 5'NCR, en variantes adaptadas a cultivo celular de la cepa HM175, las cuales tenían una influencia positiva, aumentando la replicación viral. Las variantes del VHA HM175/p16 y HM175/p35, adaptadas a replicar en cultivos celulares continuos de células de riñón de mono verde africano (BS-C-1) presentaron la sustitución de una A por G en la posición 152 de su genoma, y la delección de uno o dos residuos U dentro de una región corta de oligo-U en las bases 203 a 207. También, en estas 2 variantes del VHA encontraron una tercera mutación que es una sustitución de una U por una G en la posición 687.

Probablemente, la mutación en la posición 152 al estar ubicada previo al inicio del elemento IRES cumpliría un rol menos importante en incrementar la traducción en células BS-C-1. Sin embargo, al estar presente en ambas variantes adaptadas a cultivo celular, sugerirían que podrían tener un rol en la adaptación a replicar en cultivo celular [Day *et al.*, 1992; Schultz *et al.*, 1996]. No obstante, este aumento en la replicación se observó en cultivos continuos de células BS-C-1, las cuales son derivadas de riñón de mono verde africano, y no se vio en células FRhK-4, las cuales como se ha comentado en apartados anteriores son derivadas de riñón fetal de mono Rhesus [Day *et al.*, 1992]. Tampoco se observó un aumento en la replicación de estas variantes adaptadas a cultivo en presencia de las mutaciones en la región 5'NCR mencionadas anteriormente, en células Huh7 (derivadas de carcinoma hepatocelular humano, y permisivas para la replicación del VHA), y en lisados de reticulocitos de conejo *in vitro* [Schultz *et al.*, 1996]. Por lo tanto, las mutaciones en la región 5'NCR actuarían en un modo célula-específico. Ésto estaría en acuerdo con lo que Borman y colaboradores (1997) posteriormente observaron, donde los elementos IRES mostraban una actividad diferencial dependiendo del tipo celular, siendo la composición de los factores celulares que se unían al IRES los responsables de la eficiencia de traducción [Borman *et al.*, 1997b].

Por otra parte, Mackiewicz y colaboradores (2010) encontraron que las mutaciones G a A en la posición 324, y C a T en la posición 372 en un IRES proveniente de una cepa aislada de una hepatitis A aguda, aumentaban la actividad del mismo con respecto a otros IRES de cepas aisladas de hepatitis A agudas y también de hepatitis A fulminantes en células Huh7, aunque no de una forma muy significativa [Mackiewicz, *et al.*, 2010]. En otros virus también se han observado efectos beneficiosos de mutaciones en el IRES, sobre los niveles de traducción. Un ejemplo de esto es la selección de 2 mutaciones en el IRES del EMCV, que permite mejorar la eficiencia de una construcción bicistrónica de flavivirus. Se vio que las mutaciones de U a A y de A a C, en las posiciones 769 y 771 del IRES de EMCV adquiridas luego de algunos pasajes en cultivo celular, eran capaces de incrementar en un orden de 7 a 9 veces la expresión de las proteínas de superficie prM y E del virus de la encefalitis

transmitido por garrapatas en células BHK-21 (células de riñón bebé de hámster) [Orlinger *et al.*, 2007].

Sin embargo, no siempre las mutaciones en el IRES conllevan a efectos beneficiosos. Por ejemplo, la presencia de mutaciones en el IRES de poliovirus son capaces de atenuar la neuropatogenicidad del mismo, como lo es el caso de la cepa de poliovirus 1 presente en las vacunas Sabin contra la poliomielitis. Ésta posee un cambio en la posición 480 de su IRES, que tiene como consecuencia un descenso dramático de su capacidad para replicar en células neuronales [Gromeier *et al.*, 1996]. Otro ejemplo, son los cambios de U a C en las posiciones 255 y 278 en el IRES de una cepa aislada de una hepatitis A aguda, que indujeron a una dramática reducción de la actividad del mismo en células Huh7 [Mackiewicz, *et al.*, 2010].

Las 3 mutaciones del IRES U359C, U590C y U726C del VHA, son capaces de inducir una mayor tasa de traducción y ello es beneficioso para nuestros intereses de conseguir una población del VHA de replicación rápida. Se vio que estas mutaciones en cuestión causaban un aumento de la tasa de traducción de algunos haplotipos de poblaciones del VHA adaptadas a crecer en células FRhK-4. Se observó que las mutaciones U359C, U590C y U726C en el IRES influenciaban positivamente, y de forma muy significativa la traducción de aquellos clones cuya tasa de traducción ya se había visto previamente favorecida en ausencia de las mutaciones. Es decir, aquellos clones que habían evolucionado para obtener una combinación óptima de codones poco frecuentes y abundantes, que les permitiera traducir de una forma más rápida. De esta manera, en condiciones de silenciamiento celular moderado (0.05 µg/ml de AMD), el clon λ7 de la región de VP1 presente en las poblaciones de F0.05LA (26%) y HM175-HP (89%) pasó de tener una tasa de traducción expresada como la media ± error estándar de 0.632 ± 0.183 en ausencia de las mutaciones, a una de 11.818 ± 0.285 en presencia de las mismas. A su vez, el clon λ14 aislado en la población HM175-HP (1%) pasó de valores de 0.424 ± 0.059 en ausencia de mutaciones, a tener un valor de 13.358 ± 0.717 en presencia de las mismas. Estas diferencias se volvieron aún más relevantes en un ambiente con alto grado de silenciamiento celular (0.20 µg/ml de AMD) debido a un mayor aumento de los recursos y de la maquinaria traduccional de la célula disponibles para el virus. Para los clones λ7 y λ14 se obtuvieron

valores de la tasa de traducción de 2.978 ± 0.335 y 2.486 ± 0.295 , respectivamente, en ausencia de las mutaciones del IRES, y valores de 31.402 ± 1.000 y 37.414 ± 1.391 , respectivamente, en presencia de las mismas. Sin embargo, en prácticamente el resto de los clones de la región de VP1, estas 3 mutaciones en el IRES no tuvieron mucho efecto. En $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD en presencia de las mutaciones del IRES, para algunos haplotipos se vio un efecto de recuperación de las tasas de traducción disminuídas, para otros no tuvieron ningún efecto, y para unos pocos se vio una disminución de las tasas de traducción. A nivel poblacional, en L0 en presencia de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD y con las 3 mutaciones del IRES, la tasa de traducción era significativamente más baja (0.792 ± 0.001) que en ausencia de las mutaciones (1.372 ± 0.004). En el caso de la población F0.2LA, si bien el valor de la media en presencia de las mutaciones (0.920 ± 0.003) era más bajo que en ausencia de las mismas (1.158 ± 0.009), la variabilidad existente en dicha cuasiespecie hizo que las diferencias no resultaran significativas. En los casos de F0.05LA y HM175-HP debido a que ambas poseían el clon $\lambda 7$, y HM175-HP también a $\lambda 14$, tuvo como consecuencia que las medias de las tasas de traducción en presencia de las mutaciones del IRES fueran significativamente superiores (8.953 ± 0.243 y 30.096 ± 0.117 , respectivamente), que en ausencia de las mutaciones (1.561 ± 0.017 y 2.886 ± 0.006 , respectivamente).

En cuanto a la región de VP3 estudiada, se observó un patrón un poco diferente al encontrado en la región de VP1. Algunos clones presentaban tasas de traducción similares a la media de traducción de los clones de L0, mientras otros tenían tasas de traducción inferiores. Las diferencias en las tasas de traducción encontradas en los clones de VP3 no eran semejantes a las encontradas en la región de VP1, debido al efecto “rampa” en los constructos. Sin embargo, se vio que tanto la población L0 como HM175-HP, tenían tasas medias de traducción superiores a las poblaciones de F0.05LA y F0.2LA en $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD, y más incrementadas aún en $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD, principalmente debido a la presencia del clon $\theta 1$. Este clon se vio beneficiado por la presencia de las mutaciones del IRES, en comparación a su tasa de traducción obtenida en ausencia de las mismas. Esto pone en evidencia la tendencia de HM175-HP a tener una mayor tasa de traducción tanto en VP3 como en VP1.

Los clones tanto de la región de VP3 como de VP1 que se vieron desfavorecidos por la presencia de las 3 mutaciones, corroborarían el hecho de que al VHA no le confiere ninguna ventaja tener un IRES más eficiente, si simultáneamente no ha optimizado el uso de codones (ver Figura 62A). Asimismo, tampoco sería beneficioso optimizar toda la secuencia codificante sin mantener las pausas necesarias para permitir un correcto plegamiento, ya que si bien se produciría más proteínas, éstas no tendrían la conformación adecuada y por tanto perderían sus funciones o parte de ellas (ver Figura 62B). Por lo tanto, el uso de codones adquirido por los clones $\lambda 7$ y $\lambda 14$ en VP1 y $\theta 1$ en VP3, serían los óptimos para obtener un beneficio significativo de las 3 mutaciones del IRES.

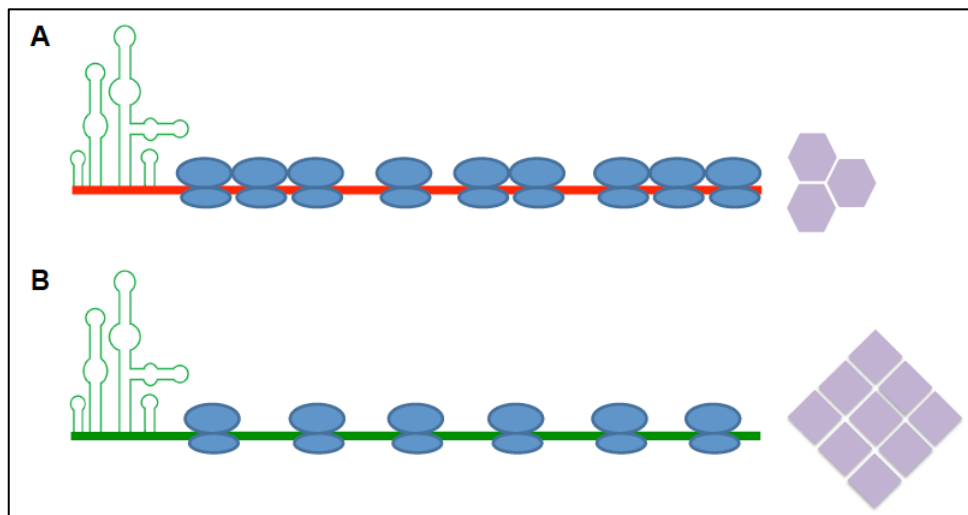


Figura 62. (A) IRES más eficiente y un uso deoptimizado de codones inducen a una baja producción proteica pero plegada correctamente; así como también hay secuestro de ribosomas. (B) IRES más eficiente y un uso optimizado de codones inducen a un aumento en la síntesis proteica pero sin el plegamiento adecuado y por tanto con pérdida de función.

Estos resultados obtenidos sugerirían que las mutaciones del IRES correlacionarían con la selección traduccional de codones. Es decir, tendrían un efecto positivo en aquellos individuos que habían optimizado sus usos de codones adquiriendo codones abundantes y disminuyendo la presencia de codones pocos frecuentes. Sin embargo, es importante destacar que en conjunto la optimización de codones e IRES, no tenía un efecto perjudicial en la eficiencia de producción vírica, indicando que existía un correcto plegamiento de la cápside. Por lo tanto, también la selección por una fina sintonía de la

traducción jugó un rol importante en la selección de HM175-HP. La secuenciación masiva de la región 5'NCR de la población HM175-HP y de las cepas parentales F0.05LA y F0.2LA, permitieron trazar el origen del nuevo IRES en F0.05LA (tesis doctoral de Francisco Pérez-Rodríguez, en preparación). Ello sugiere que individuos haplotipo $\lambda 7/\theta 1$ /IRES eficiente presentes en F0.05LA, fueron seleccionados en el proceso de *molecular breeding*.

La desventaja de tener un IRES más eficiente en algunos haplotipos tanto de VP1 como de VP3, podría explicarse por el hecho de que se reclutarían ribosomas a intervalos cortos de tiempo, lo cual combinado con paradas transitorias de los mismos en la región codificante podría ocasionar colisiones, así como también colas o amontonamientos de ribosomas. Por tanto, esto traería como consecuencia el hecho de que muchos ribosomas estarían secuestrados en pocas moléculas de ARN [Mitarai *et al.*, 2008]. También, es importante tener en cuenta que cuanto más avanzadas se encuentran las regiones de traducción lenta en la secuencia codificante, más largas serán las colas o amontonamientos de ribosomas (colisiones múltiples), y por tanto más desventajoso será para el virus (ver Figura 63A). Contrariamente, cuanto más cerca al inicio de la traducción se encuentran las regiones de traducción lenta, la probabilidad de formación de colas de ribosomas disminuye considerablemente, optimizándose la traducción posterior a la zona de traducción lenta (ver Figura 63B). Ésto quedaría muy bien ejemplarizado en el caso de la posición 12 en VP3 y 85 en VP1 en las construcciones bicistrónicas.

Por otra parte, las paradas transitorias de los ribosomas podrían ocasionar que algunos de los ribosomas se liberasen de forma espontánea de la cadena de ARN que están traduciendo, generando proteínas truncadas, lo cual implicaría un gasto energético y de recursos innecesario [Mitarai *et al.*, 2008].

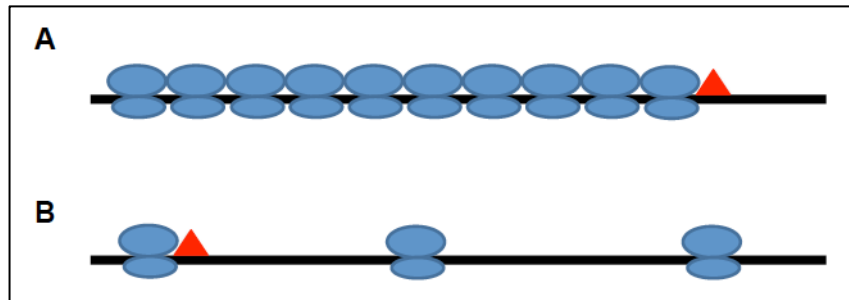


Figura 63. (A) Cuando las regiones de traducción lenta, simbolizadas con un triángulo rojo, se encuentran lejanas al sitio de inicio de la traducción, se favorece la formación de colas de ribosomas o colisiones múltiples, repercutiendo negativamente en la eficiencia de traducción. (B) Cuando las regiones de traducción lenta se encuentran próximas al sitio de inicio de la traducción, la probabilidad de la existencia de colas de ribosomas disminuye considerablemente, optimizándose la traducción en la zona posterior a la zona de traducción lenta.

Para finalizar, es importante resaltar que el hecho de que el VHA posea un IRES ineficiente no debería ser considerado una desventaja, sino que sería el resultado de la evolución de este virus para optimizar su sistema de traducción/replicación, de acuerdo a sus necesidades. De esta forma, la estrategia del VHA de tener una lenta traducción/replicación contribuiría a la modulación de la respuesta antiviral de la célula, al pasar desapercibido por ésta, manteniendo así los sitios existentes de replicación y permitiendo el inicio de nuevos sitios. Es por esta razón que su baja producción viral se vería compensada, y se aseguraría la existencia de un reservorio de variantes, necesario para la adaptabilidad de la población viral frente a cambios en el ambiente [Pintó *et al.*, 2007].

4.5 CONCLUSIONES

- ❖ Las mutaciones U359C, U590C y U726C en el IRES, modifican el efecto del uso de codones en las tasas de traducción.
- ❖ Estas mutaciones benefician de forma muy relevante a aquellos haplotipos, los cuales en ausencia de éstas, habían previamente evolucionado para traducir significativamente más rápido.
- ❖ Estas mutaciones tienen un efecto positivo en los haplotipos que presentan deoptimización del uso de codones, permitiendo recuperar la tasa de traducción disminuída.
- ❖ Dichas mutaciones tienden a disminuir la traducción de aquellos haplotipos que conseguían una tasa de traducción normal por efectos compensatorios de optimización/deoptimización local de codones.
- ❖ En la población HM175-HP las 3 mutaciones del IRES en combinación con un uso de codones optimizado le permite traducir de una forma significativamente más rápido.

**5. CAPÍTULO 3:
Estudio de las características
biológicas de una población de
rápido crecimiento del VHA en
relación a su uso de codones**

5.1 ANTECEDENTES

Tal y como fue mencionado en apartados anteriores, el VHA presenta un uso de codones altamente sesgado, y en muchos casos hasta opuesto al de su célula hospedadora, lo cual se conoce como uso de codones deoptimizado. A pesar de la ausencia de mecanismos de inducción del silenciamiento celular, y teniendo un IRES muy ineficiente, el VHA es capaz de sintetizar sus proteínas adaptando su uso de codones, de forma que se asocian a los ARNt celulares menos abundantes (ya sea porque se encuentran en baja concentración o porque son altamente utilizados por la célula, y por ello en baja disponibilidad para el virus), resultando así en una baja tasa de replicación [Aragonès *et al.*, 2010]. Por tanto, con este uso de codones naturalmente deoptimizado, el rol de la selección traduccional (selección de codones para una traducción rápida y eficiente) perfilando el sesgo en el uso de codones del VHA no parece obvio.

Durante la síntesis proteica del VHA, el plegamiento de la proteína tiene lugar a medida que se va traduciendo y la cadena polipeptídica va abandonando el ribosoma, es decir, es un proceso co-traduccional, y por lo tanto, requiere de un mecanismo que coordine ambos procesos de traducción y plegamiento [Fedorov & Baldwin, 1997]. Se ha propuesto que la velocidad de traducción podría ser uno de estos mecanismos, y sería regulada a través del efecto de estructuras secundarias del ARNm y/o de las combinaciones adecuadas de codones abundantes y raros en el ARNm [Komar, 2009]. Los codones abundantes acostumbran a asociarse con aquellos ARNt que se encuentran en altas concentraciones, y de esta manera contribuyen tanto a la eficiencia de la traducción como a la precisión [Gingold & Pilpel, 2011]. Por el contrario, los codones raros se traducen más lentamente, y son considerados codones de baja fidelidad debido a que aumenta la probabilidad de que sea incorporado un ARNt erróneo, mientras el complejo traduccional espera a que el ARNt apropiado que se encuentra en bajas concentraciones, se sitúe en el sitio A del ribosoma [Gingold & Pilpel, 2011]. En este sentido, las posiciones más importantes, es decir, aquellas más sensibles a errores durante la traducción, suelen estar codificadas por codones abundantes de alta fidelidad. De hecho, la tendencia de la selección natural a lo largo de la evolución, ha sido la de usar codones abundantes de alta fidelidad en aquellas posiciones en

las que una mutación generaría un cambio en la estructura de la proteína, que resultaría en un plegamiento incorrecto de ésta [Zhou *et al.*, 2009]. Por otra parte, los codones raros jugarían un rol importante en el control de la velocidad de traducción, ya que las agrupaciones de codones raros inducen paradas transitorias del complejo traduccional, a la espera de que el aminoacil-ARNt entre en el sitio A del ribosoma. Estas pausas durante la traducción ayudarían a dirigir el proceso de plegamiento de la proteína, el cual como se comentó previamente es co-traduccional, ya que permitiría el plegamiento secuencial e independiente de los diferentes dominios de la cadena polipeptídica, a medida que ésta va emergiendo del ribosoma [Yang & Nielsen, 2008]. Existen diversos ejemplos que demuestran que los codones raros tienen un rol importante en el control de la velocidad de traducción, en los cuales cualquier cambio de éstos por codones más frecuentes, puede afectar el plegamiento de la proteína y por tanto, alterar su función. Por ejemplo, la sustitución de codones raros por codones más abundantes en los genes de *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae* tiene como resultado una traducción más rápida, pero las proteínas que se sintetizan presentan unas actividades específicas reducidas [Zhang *et al.*, 2009]. También, se ha descrito que una mutación silenciosa en el gen humano MDR1, conocido como ABCB1, provoca un plegamiento diferencial de la proteína que codifica, la glicoproteína transportadora de membrana P, afectando la inserción de ésta en la membrana, indicando que el cambio de conformación es causado por un desajuste entre traducción y plegamiento [Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007].

La región P1 del genoma del VHA que codifica para las proteínas estructurales de la cápside, presenta agrupaciones de codones raros altamente conservados, y situados estratégicamente en los extremos C-terminal de las proteínas. La necesidad de mantener estas agrupaciones de codones raros con el objetivo de asegurar el correcto plegamiento de la proteína, podría contribuir a la baja variabilidad de la cápside del VHA. Por tanto, estas restricciones estructurales existentes en la cápside podrían ser una de las causas de la no emergencia de nuevos serotipos, a pesar de que el virus replique siguiendo una dinámica de cuasiespecies [Sánchez *et al.*, 2003c; Aragonès *et al.*, 2008].

Por otra parte, estudios realizados con la finalidad de re-optimizar el uso de codones del VHA, han sugerido que la adaptación del uso de codones a la disponibilidad de ARNt necesita encontrar un equilibrio entre la velocidad de traducción y el correcto plegamiento de las proteínas, con tal de que el virus alcance un *fitness* adecuado [Aragonès *et al.*, 2010]. En estos estudios, el VHA replicaba en diferentes condiciones de *shut-off* celular, gracias a la acción de la AMD, y se observaba una pérdida significativa del *fitness* como una respuesta inmediata del virus al nuevo ambiente, con una mayor disponibilidad de ARNt (ver Figura 64). La recuperación del *fitness* se daba posteriormente durante el proceso de adaptación (ver Figura 64), y se asociaba a una re-deoptimización en el uso de codones y no a una optimización como se esperaba en estas condiciones de menor competencia entre el virus y la célula [Aragonès *et al.*, 2010]. Como esta re-deoptimización se observaba específicamente en la región que codifica para las proteínas de la cápside, afectando sobretudo a los codones raros del virus que son utilizados de forma abundante por la célula, estos resultados sugieren una sintonización fina de la cinética de traducción, como un mecanismo de selección inherente al sesgo en el uso de codones de esta región [Aragonès *et al.*, 2010]. De esta forma, estos resultados son un claro ejemplo de la dinámica de evolución de la Reina Roja, donde el VHA ha evolucionado para re-adaptar su uso de codones a las condiciones cambiantes del ambiente celular, con el fin de recuperar su *fitness* original.

Recientemente, se ha demostrado que en diferentes poblaciones del VHA adaptadas a replicar en diferentes condiciones de silenciamiento celular, el cambio que ocurre en el uso de codones influye directamente en el plegamiento de las proteínas estructurales. Esto se ha puesto en evidencia al observar algunas propiedades físicas de la cápside. Así, durante la adaptación a niveles altos de silenciamiento celular, se observó una tendencia general hacia la pérdida del fenotipo altamente estable del VHA en condiciones de elevada temperatura, bajo pH y presencia de sales biliares. Además, también se han registrado cambios en los valores de las infectividades específicas y en procesos que involucran el inicio del ciclo replicativo, como pueden ser la unión al receptor y el tiempo de desencapsidación [Costafreda *et al.*, 2014].

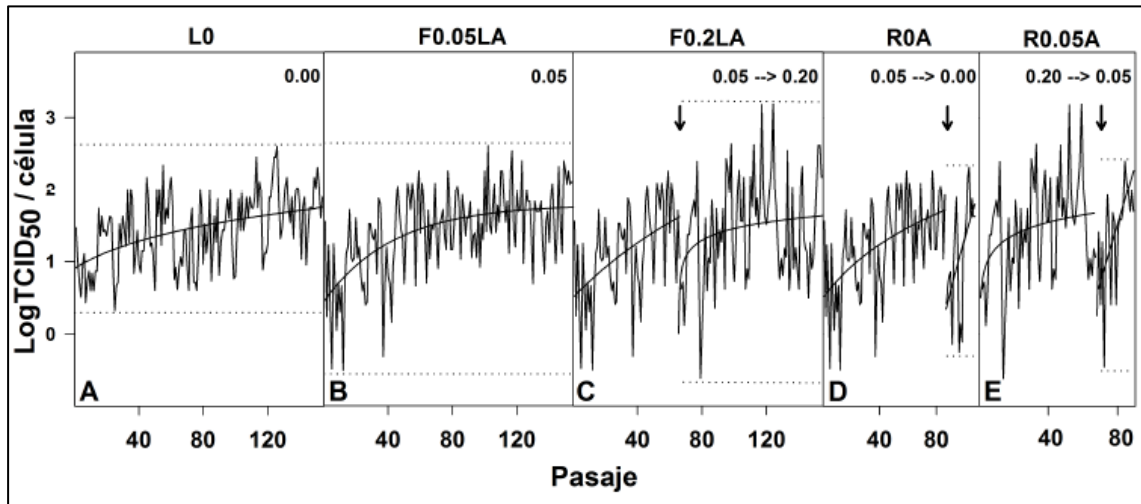


Figura 64. Adaptación del VHA a replicar en diferentes condiciones de AMD. (Panel A) L0 es la población adaptada a replicar en ausencia de AMD; (Panel B) F0.05LA es la población replicando en presencia de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD; (Panel C) F0.2LA es la población que se dejó replicando 65 pasajes en 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD y luego se lo puso a replicar en presencia de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ de AMD; (Panel D) R0A es el pasaje 85 de la población F0.05LA transferida a condiciones de ausencia de AMD; (Panel E) R0.05A es el pasaje 65 de la población F0.2LA transferida a condiciones de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de AMD. Imagen adaptada de Aragonès *et al.*, 2010.

En el presente trabajo se estudió las características biológicas que presenta la población del VHA de rápido crecimiento o HM175-HP, como consecuencia principalmente del uso de codones que posee.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Línea celular

La línea celular utilizada a lo largo de todos los estudios es la FRhK-4 (para más información ver apartado 3.2.1 en el Capítulo 3).

5.2.2 Población de estudio

La población del VHA que se utilizó en todos los estudios realizados fue la HM175-HP (para más información ver apartado 3.2.2 en el Capítulo 3).

5.2.3 Cuantificación del título infeccioso de las suspensiones del VHA: cálculo de la TCID₅₀/ml

La cuantificación del título vírico infeccioso de las diferentes suspensiones del VHA se realizaba según el cálculo de la TCID₅₀, que se define como la dosis vírica que provoca la destrucción del 50% de las monocapas celulares infectadas. Para realizar esta titulación se infectaban monocapas de células FRhK-4 en placas de 96 pocillos, y el protocolo que se seguía era el siguiente:

- Descartar el medio de crecimiento de las placas de 96 pocillos con monocapas confluentes de FRhK-4.
- Inocular en la placa diluciones seriadas 1:10 en PBS de la suspensión vírica a titular. Se inoculaba una columna (8 pocillos) por cada dilución, añadiendo 20 µl a cada pocillo. Como control negativo se añadía el mismo volumen de PBS a los 8 pocillos de una columna de la placa.
- Incubar la placa a 37°C durante 60 minutos en una atmósfera enriquecida con un 5% en CO₂.
- Añadir el medio post-infección, de igual composición que el medio de crecimiento pero con un 2% de SFBi.
- Incubar a 37°C durante 11 días.

- Realizar las lecturas de presencia/ausencia de efecto citopático (ECP) para cada pocillo inoculado de la placa a los 8 a 9 días, y efectuar una lectura adicional y definitiva a los 11 días.
- Calcular la TCID₅₀ según la fórmula descrita en el método de Behrens-Karber [Karber, 1931], y que se detalla a continuación:

$$\text{LogTCID}_{50} = I_r + 1/2d - 1 \sum (p_i + 1)$$

donde:

I_r es el logaritmo en base 10 de la dilución más alta que da el 100% de ECP, es decir, la destrucción de las 8 réplicas.

d es el logaritmo de la serie dilucional.

p_i es la proporción tanto por 1 de respuesta positiva en las diluciones con ECP en menos de las 8 réplicas.

De esta manera, y teniendo en cuenta que el volumen de inóculo era de 20 µl, se obtenía la cuantificación del título viral de las suspensiones expresado como la dosis infecciosa que provoca la destrucción del 50% de las monocapas celulares por mililitro (TCID₅₀/ml).

5.2.4 Obtención de suspensiones concentradas del VHA

Con el fin de obtener *stocks* víricos concentrados, se utilizaba el método descrito por Bishop y colaboradores en 1994, con algunas pequeñas modificaciones:

- Infectar monocapas confluentes de células FRhK-4 crecidas en frascos T-175 cm². La infección se realizaba de la misma forma como se ha detallado en el apartado 3.2.2.1 del Capítulo 3.
- Incubar durante 5 a 6 días a 37°C, hasta la aparición de los primeros signos del ECP.
- Tripsinizar el o los frascos con tripsina-EDTA al 0.25 y 0.02% (p/v), respectivamente, recuperando inicialmente en un recipiente estéril el

medio post-infección que se utilizará para bloquear la acción de la tripsina.

- Centrifugar el medio post-infección (MEM 2% SFBi) con la fracción celular obtenida a 3000 g durante 20 minutos.
- Descartar el sobrenadante y resuspender la fracción celular en 10 ml de MEM 0% SFBi. Centrifugar a 3000 g durante 20 minutos.
- Descartar el sobrenadante y resuspender la fracción celular en tampón isotónico Tris-Cloruro sódico (tampón NT) a razón de 500 µl por frasco.
- Lisar las membranas celulares mediante la adición de detergente Nonidet P40 a una concentración final del 1% (v/v) (10 µl por cada ml).
- Mixotubar vigorosamente e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 2000 g durante 5 minutos para eliminar los núcleos celulares.
- Transferir el sobrenadante de la centrifugación a nuevos microtubos estériles y centrifugar a 14000 g durante 5 minutos, para eliminar otros restos celulares.
- Recuperar el sobrenadante y guardarlo a -80°C.

SOLUCIONES NECESARIAS:

MEM 0% SFBi:

L-Glutamina (400 mM).....4 mM
NEAA (100X).....1X
HEPES (1 M).....15 mM
Bicarbonato (7.5% (p/v)).....2% (v/v)
Penicilina/Estreptomocina.....100 U/ml/100 µg/ml
En MEM 1X con sales de Earle autoclavado 15 minutos.
Suplementar en condiciones de esterilidad.

Tampón NT:

Tris-HCl (10 mM).....0.121 g
NaCl (100 mM).....0.584 g
En 100 ml de agua Milli-Q.
pH 7.4.
Esterilizar en autoclave durante 15 minutos.
Conservar a temperatura ambiente.

5.2.5 Análisis de la productividad vírica mediante una curva *one-step growth*

Para estudiar la productividad y eficiencia de la población HM175-HP se realizó la técnica de *one-step growth*. El protocolo que se llevó a cabo se detalla a continuación:

- Preparar monocapas confluentes de células FRhK-4 en placas de 6 pocillos (5 ml de células/pocillo). Preparar tantas placas como tiempos a analizar; en nuestro caso se analizaron 6 tiempos (12, 24, 48, 72, 120 y 168 horas).
- Infectar las monocapas con la población HM175-HP con una m.o.i. de 5, a razón de 200 μ l/pocillo.
- Incubar las placas a 37°C durante 60 minutos en una atmósfera enriquecida con un 5% en CO₂, para que se lleve a cabo la adsorción de los virus.
- Añadir el medio post-infección con un 2% de SFBi y 0.05 μ g/ml de AMD, a razón de 5 ml/pocillo, y volver a poner las placas a 37°C en una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂.
- Al tiempo correspondiente (12, 24, 48, 72, 120 y 168 horas) se congela la placa a -80°C, para luego una vez alcanzado todos los tiempos a estudiar obtener los respectivos extractos celulares.
- Lisar las células mediante 3 ciclos de congelación (-80°C) / descongelación (37°C).
- Centrifugar el cultivo lisado a 4000 g durante 20 minutos para obtener una suspensión vírica libre de restos celulares.
- Cuantificar los virus infecciosos en las diferentes suspensiones víricas recogidas a cada uno de los tiempos a analizar, utilizando el cálculo de la TCID₅₀ (ver apartado 5.2.3 del presente Capítulo).
- Realizar un gráfico de la TCID₅₀/ml en función de los tiempos analizados.

Este estudio se realizó 3 veces de forma independiente, realizando 2 réplicas en cada caso.

5.2.6 Análisis del reconocimiento de la población HM175-HP por anticuerpos monoclonales

El reconocimiento de la población HM175-HP por los anticuerpos monoclonales K34C8 y K24F2 (adquiridos en Commonwealth Serum Laboratories (Victoria, Australia) dirigidos contra el sitio inmunodominante, y el H7C27 (cedido por el Dr. R. Decker de Abbot Laboratories, Illinois, Estados Unidos), dirigido contra el sitio de unión a glicoforina A (proteína transmembrana, altamente glicosilada, presente en los eritrocitos), se analizó mediante un ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) de captura. En dicho ensayo, el VHA se capturaba con un suero convalesciente, HCS-2 (cedido por el Dr. R. Lluna del Hospital Militar de Barcelona, España) con el cual previamente se había sensibilizado la placa, y se detectaba mediante los MAbs K34C8, K24F2 o H7C27. El protocolo que se seguía se detalla a continuación:

- Añadir a una placa de 96 pocillos (Sarstedt) de base chata 50 µl/pocillo del anticuerpo policlonal HCS-2 diluido 1:10000 en tampón de recubrimiento o *coating buffer*. Dejar incubando durante una noche a 4°C.
- Realizar 3 lavados con 50 µl/pocillo de tampón de ELISA.
- Bloquear la placa con 50 µl/pocillo de tampón de ELISA e incubar a 37°C durante 1 hora.
- Realizar 3 lavados con 50 µl/pocillo de tampón de ELISA.
- Añadir 50 µl/pocillo de la suspensión vírica concentrada (para su obtención ver apartado 5.2.4 del presente Capítulo), e incubar a 37°C durante 2 horas. En cada ensayo se realizaban 8 réplicas por cada MAb.
- Realizar 3 lavados con 50 µl/pocillo de tampón de ELISA.
- Añadir 50 µl/pocillo del MAb diluido en tampón de ELISA e incubar a 37°C durante 3 horas. Los MAbs K34C8 y H7C27 se utilizaban a una dilución 1:10000, en cambio el MAb K24F2 a una dilución 1:250. Todos los MAbs eran de ratón.
- Realizar 3 lavados con 50 µl/pocillo de tampón de ELISA.
- Añadir 50 µl/pocillo del anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón (Sigma®) conjugado con peroxidasa, diluido 1:10000 en tampón de ELISA

(siguiendo las instrucciones del fabricante). Incubar a 37°C durante 1 hora.

- Realizar 3 lavados con 50 µl/pocillo de tampón de ELISA.
- Añadir 50 µl/pocillo de la solución de revelado, tampón citrato-OPD (1,2, fenilendiamina) e incubar a 37°C hasta la aparición de color (aproximadamente 10 minutos).
- Neutralizar la reacción cromogénica con 25 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1 M.
- Lectura de la absorbancia a 492 nm con un lector automático ASYS UVM 340.

Todas las incubaciones con la excepción de la incubación cuando se añadió la solución de revelado, se hicieron en un recipiente cerrado con una tapa con agua en su interior para mantener la humedad. Este ensayo se realizó 3 veces de forma independiente.

SOLUCIONES NECESARIAS:

Tampón de Recubrimiento:

NaCO₃.....15 mM
NaHCO₃.....35 mM
En agua Milli-Q.
pH 9.6.
Conservar a 4°C durante un máximo de 15 días.

Tampón de ELISA:

BSA.....3 mg/ml
Tween 20.....0.05% (v/v)
En PBS.
Conservar a -20°C.

Tampón citrato:

Citrato sódico.....30 mM
Ácido cítrico.....20 mM
En agua Milli-Q.
Conservar a -20°C.

Tampón citrato-OPD:

OPD.....4 mM
H₂O₂ (30%).....0.1% (v/v)
En tampón citrato.
Uso inmediato.

5.2.7 Análisis de las propiedades físicas de la cápside

Con el fin de estudiar la resistencia de la cápside de la población HM175-HP del VHA, el virus fue incubado a alta temperatura, a pH ácido y en presencia de sales biliares. El tratamiento a alta temperatura se realizó incubando el virus a una temperatura de 61°C durante 5 minutos; el de pH ácido se realizó incubando el virus a 37°C durante 1 hora a pH de 2; y para el tratamiento con sales biliares, el virus se incubó a 37°C con 1% de sales biliares (*Bile salts mixture*, Sigma[®]) durante 4 horas. Como control se utilizaba la misma población viral que en el caso de los diferentes tratamientos, pero en este caso sólo era sometida a incubación a 37°C, sin ningún tipo de tratamiento, durante los tiempos correspondientes.

Posteriormente a las diferentes incubaciones, se cuantificaba el título viral infeccioso de la población, según el método de la TCID₅₀ que se detalló en el apartado 5.2.3 del presente Capítulo. Comparando las cuantificaciones de la población con y sin tratamiento, se calculaban las caídas de los títulos después de los respectivos tratamientos, expresándolas como $\text{Log}_{10}(N_t/N_0)$, donde N_0 era el título infeccioso sin tratamiento, y N_t era el título infeccioso después del tratamiento. Los diferentes tratamientos se realizaron 3 veces de forma independiente.

5.2.8 Análisis de la eficiencia de unión al receptor

El estudio de la eficiencia de unión al receptor de la población HM175-HP se realizó cuantificando los virus infecciosos que quedaban en el sobrenadante 60 minutos después de que la población de estudio se inoculase sobre monocapas de FRhK-4. El protocolo que se seguía se detalla a continuación:

- Preparar monocapas confluentes de células FRhK-4 en placas de 24

- pocillos (1 ml de células/pocillo).
- Aspirar con pipeta el medio de crecimiento de los pocillos e infectar las monocapas con la población HM175-HP a razón de 200 μ l/pocillo utilizando una m.o.i. de 1. Se hicieron 4 réplicas de la población de estudio.
 - Inmediatamente de añadido el virus en los pocillos, se toman alícuotas de 20 μ l de cada una de las réplicas, lo cual correspondería a tiempo 0 minutos, y se pone a incubar la placa a 37°C durante 60 minutos en una atmósfera enriquecida con un 5% en CO₂.
 - Luego de transcurridos los 60 minutos tomar una nueva alícuota de 20 μ l de cada una de las réplicas.
 - Cuantificar los virus infecciosos en las diferentes alícuotas recogidas utilizando el cálculo de la TCID₅₀ (ver apartado 5.2.3 del presente Capítulo).
 - Comparar los niveles de virus infecciosos obtenidos a los tiempos 0 y 60 minutos, para calcular el porcentaje de virus unido al receptor.

Este estudio se realizó 3 veces de forma independiente.

5.2.9 Análisis de la cinética de desencapsidación

Para los estudios de la cinética de desencapsidación se utilizaba la técnica clásica del rojo neutro [Crowther & Melnick, 1961]. Esta técnica se basa en hacer replicar el virus en presencia de rojo neutro, de manera que las partículas víricas que se producen contienen rojo neutro en el interior de la cápside. De esta manera, los virus se vuelven fotosensibles ya que a la luz visible el rojo neutro sufre una reacción de fotooxidación que daña el genoma del virus. Pero solamente son fotosensibles hasta el momento en que tiene lugar la desencapsidación del ARN, porque a partir de este momento el rojo neutro queda diluido en el citoplasma de la célula, y entonces el ARN puede continuar el ciclo replicativo con normalidad. A continuación se detalla el protocolo que se siguió:

- Preparar monocapas confluentes de células FRhK-4 en frascos de cultivo de 25 cm².

- Decantar el medio de crecimiento de los frascos e infectar la monocapa con la población HM175-HP con una m.o.i. de 1.
- Incubar los frascos infectados a 37°C durante 60 minutos para permitir la adsorción del virus a las células.
- Incorporar el medio post-infección con un 2% de SFBi, con 0.05 µg/ml de AMD y un 0.001% de rojo neutro (*Neutral Red Solution*, Sigma®).
- Tapar los frascos infectados con papel de aluminio e incubar a 37°C durante 7 días.
- Lisar las células mediante 3 ciclos de congelación (-80°C) / descongelación (37°C), manteniendo siempre los frascos protegidos de la luz.
- En una habitación oscura, iluminada sólo con luz roja, pasar los lisados a tubos de 10 ml y taparlos con papel de aluminio.
- Centrifugar el cultivo lisado a 4000 g durante 20 minutos para obtener una suspensión vírica libre de restos celulares.
- En una habitación oscura, con ayuda de una luz roja, inocular placas de 96 pocillos con diluciones seriadas 1:10 en PBS de la suspensión vírica de HM175-HP, tal y como se describió para el cálculo de la TCID₅₀ en el apartado 5.2.3 de este Capítulo. Como control negativo se añadía el mismo volumen de PBS a los 8 pocillos de una columna en cada placa.
- Incubar las placas a 37°C durante 60 minutos en una atmósfera enriquecida con un 5% en CO₂, y tapadas con papel de aluminio, para que se de la adsorción de los virus.
- En una habitación oscura, añadir el medio post-infección con un 2% de SFBi y volver a poner las placas tapadas con papel de aluminio a 37°C en una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂.
- Exponer las placas bajo la luz blanca durante 15 minutos a los tiempos de 1, 3, 6, 12 y 24 horas después de la inoculación, teniendo en cuenta que inicialmente se infectaban tantas placas como tiempos a analizar. Como control se infectaba una placa que se mantenía siempre tapada y protegida de la luz hasta el momento de la lectura, y una placa que se exponía a la luz a tiempo 0 hora.
- Volver a poner las placas expuestas a la luz blanca a 37°C en una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂, sin necesidad de taparlas con

papel de aluminio.

- Dejar incubando las placas durante 11 días.
- Realizar las lecturas de presencia/ausencia de ECP para cada pocillo infectado a los 8 a 9 días, y efectuar una lectura adicional y definitiva a los 11 días, momento en el que se consideraba que la lectura ya no cambiaría.
- Calcular la TCID₅₀ en cada uno de los tiempos estudiados.
- Calcular el tiempo necesario para la desencapsidación del 50% de los virus (UT₅₀) a partir de la cinética de desencapsidación de HM175-HP.

Este estudio se realizó 3 veces de forma independiente.

5.2.10 Análisis de la infectividad específica

Para llevar acabo este análisis, se infectaban frascos de cultivo de T-25 cm² utilizando una m.o.i. de 1 de la población HM175-HP, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.2.2.1 del Capítulo 3. Las monocapas infectadas se incubaban 7 días a 37°C, tiempo en el cual se recogían los sobrenadantes sin lisar las células con 3 ciclos de congelación / descongelación. Las infectividades específicas se determinaban utilizando el título de virus infecciosos y genomas presentes en el sobrenadante de las células infectadas a los 7 días post-infección. La cuantificación de los virus infecciosos, obtenida a través del cálculo de la TCID₅₀/ml descrito en el apartado 5.2.3 del presente Capítulo, se comparaba con la cuantificación de las copias genómicas/ml, obtenida mediante la RT-PCR a tiempo real de la región 5'NCR de la población HM175-HP. El protocolo de la RT-PCR a tiempo real de la región 5'NCR era similar al descrito por Costafreda y colaboradores [Costafreda *et al.*, 2006], pero en este caso se utilizó el *kit Platinum[®] qRT-PCR ThermoScript[™] One-Step System* (Invitrogen).

La RT-PCR a tiempo real se llevó a cabo siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

1) Conformación de la siguiente mezcla de reacción por cada muestra:

- 6.525 µl de agua destilada libre de DNasa/RNasa (Gibco[®], Life Technologies[™])

- 12.5 µl de *ThermoScript Reaction Mix 2X* (Invitrogen) (concentración final 1X)
- 0.125 µl del *primer* HAV 68 (ver Tabla 16) a una concentración de 100 µM (concentración final 0.5 µM)
- 0.225 µl del *primer* HAV 240 (ver Tabla 16) a una concentración de 100 µM (concentración final 0.9 µM)
- 0.125 µl de la sonda HAV 150 (-) (ver Tabla 16) a una concentración de 50 µM (concentración final 0.25 µM)
- 0.5 µl de *Taq Enzyme Mix* (Invitrogen)

2) A la mezcla de reacción se le añadieron 5 µl del extracto de ácidos nucleicos, obteniendo así un volumen final de 25 µl.

3) El volumen final se incubó:

- 55°C durante 60 minutos (realización de la RT)
- 95°C durante 5 minutos (desnaturalización inicial)
- 45 ciclos de 95°C / 15 segundos, 60°C / 1 minuto y 65°C / 1 minuto (desnaturalización, hibridación y extensión, respectivamente), en el termociclador de *real-time Mx3000P* (Stratagene). La fluorescencia se medía al final de cada ciclo.

Este estudio se realizó 3 veces de forma independiente.

La determinación de la infectividad específica en sobrenadante luego de 7 días post-infección, sin forzar la lisis celular, servía como una estimación del número de virus necesarios para llevar a cabo un ciclo infeccioso, y no como una medida de los virus infecciosos producidos a partir de cada genoma.

Tabla 16. *Primers* y sonda utilizados para la realización de la RT-PCR a tiempo real de la región 5'NCR.

| Primer | Secuencia |
|---------------|-----------------------------|
| HAV 68 | 5' TCACCGCCGTTTGCCTAG 3' |
| HAV 240 | 5' GGAGAGCCCTGGAAGAAAG 3' |
| HAV 150 (-) | 5' TTAATTCCTGCAGGTTTCAGG 3' |

5.2.11 Análisis de la morfología de las calvas

Con el objetivo de observar la velocidad de replicación de la población HM175-HP, se realizó un ensayo de unidades formadoras de calvas o *PFUs* (*plaque forming unit*), con la intención de analizar la morfología y especialmente el tamaño de las calvas generadas por esta población, ya que en general, calvas más grandes indican una mayor velocidad de replicación. El protocolo utilizado, descrito inicialmente por Cromeans y colaboradores [Cromeans *et al.*, 1987], era el siguiente:

- Preparar monocapas confluentes de FRhK-4 en placas de 6 pocillos (3 ml de células/pocillo).
- Aspirar con pipeta el medio de crecimiento de los pocillos e infectar las monocapas con diluciones seriadas 1:10 en PBS de la población HM175-HP, a razón de 200 μ l/pocillo. Se infectó con las diluciones 10^{-3} a 10^{-7} del virus y un pocillo con PBS como control negativo.
- Incubar las placas de 6 pocillos infectadas a 37°C durante 60 minutos para permitir la adsorción de los virus a las células.
- Añadir 3 ml/pocillo de medio post-infección conocido como “*overlay*” que está formado a partes iguales de medio MEM 2% SFBi 2X y agarosa 1% (*SeaPlaque[®] GTG[®] Agarose*, Lonza) y de 1ml de $MgCl_2$ 1.3 M por cada 50 ml del medio descrito anteriormente (concentración final 26 mM). Se añadió también 0.05 μ g/ml de AMD.
- Dejar las placas a temperatura ambiente hasta que el medio solidifique (10 minutos aproximadamente).
- Incubar a 37°C durante 10 días en una atmósfera enriquecida con 5% de CO_2 .
- Fijar las células con 2 ml/pocillo de formaldehído 4% (Merck) durante 3 horas a temperatura ambiente.
- Descartar el formaldehído con pipeta y retirar la capa de agarosa (“*overlay*”).
- Teñir las calvas añadiendo una solución de cristal violeta a razón de 1 a 2 ml/pocillo y dejar tiñendo unos 30 minutos a temperatura ambiente.
- Descartar el cristal violeta con pipeta y lavar con agua destilada el exceso de colorante.

- Dejar secar las placas y medir el diámetro de las calvas.

Este estudio se realizó 2 veces de manera independiente, haciendo 2 réplicas en cada caso.

SOLUCIONES NECESARIAS:

MEM 2% SFBi 2X:

Se prepara con sales de Earle y de la misma forma que el MEM 1X pero a una concentración 2X y se suplementa con:

SFBi.....4% (v/v)
L-Glutamina (400 mM).....8 mM
NEAA (100 X)..... 2 X
HEPES (1 M).....30 mM
Bicarbonato (7.5% (p/v)).....4% (v/v)
Penicilina/Estreptomicina.....200 U/ml/200 µg/ml
En MEM 2X con sales de Earle autoclavado 15 minutos.
Suplementar en condiciones de esterilidad.

Agarosa 1%:

Se prepara una solución con un 1% de agarosa *SeaPlaque® GTG® Agarose* (Lonza) en PBS. La agarosa se funde al mismo tiempo que se esteriliza por autoclave durante 15 minutos.

MgCl₂:

Se prepara una solución de MgCl₂ 1.3 M en agua Milli-Q, y se esteriliza por autoclave durante 15 minutos.

Medio post-infección “*overlay*”:

Se mezcla a partes iguales el MEM 2% SFBi 2X y la agarosa al 1% con tal de obtener MEM 2% SFBi 1X con un 0.5% de agarosa, y se añade el MgCl₂ 1.3 M para tener una concentración final de 26 mM de MgCl₂.

Solución de cristal violeta:

Cristal violeta.....1.3 g/l
Formaldehído 37%..... 30% (v/v)
Alcohol isopropílico 95%.....5% (v/v)
En agua Milli-Q.
Diluir 1:2 antes de utilizar esta solución.

5.2.12 Análisis estadístico

Para determinar si había diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en los diferentes estudios con la población HM175-HP, y los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio con las poblaciones L0, F0.05LA, F0.2LA, R0.05NA (F0.2LA transferida a multiplicar en 0.05 µg/ml de AMD luego de 5 pasajes) y R0.05A (F0.2LA transferida a multiplicar en 0.05 µg/ml de AMD luego de 20 pasajes), se utilizó el test t-Student. Los resultados de los diferentes estudios se expresaron como la media ± el error estándar.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Origen de la población de rápido crecimiento HM175-HP

Con el objetivo de seleccionar una población de replicación rápida, se llevó a cabo un proceso de *molecular breeding* entre las poblaciones F0.05LA y F0.2LA del VHA en células FRhK-4, en un ambiente con silenciamiento celular moderado (0.05 µg/ml de AMD). De esta forma, al cabo de 30 pasajes se obtuvo una población con una producción vírica expresada como el $\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{célula})$ de 2.27 ± 0.07 , la cual es significativamente superior ($p < 0.05$) a sus poblaciones parentales y a L0, que poseen valores que van desde 1.39 a 1.64 $\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{célula})$ (ver Tabla 17), la cual se denominó HM175-HP. Es importante aclarar que tanto en la Tabla 17 como en la mayoría de los análisis llevados a cabo en este Capítulo, se realizaron comparaciones entre la población HM175-HP y las poblaciones de F0.05LA y F0.2LA por ser las parentales y con L0 porque es la población original a partir de la cual se obtuvo el resto de las poblaciones. Asimismo, se realizaron comparaciones también con las poblaciones R0.05NA y R0.05A que son la población de F0.2LA puesta a replicar nuevamente en condiciones de 0.05 µg/ml de AMD, al cabo de 5 y 20 pasajes, respectivamente, ya que la población HM175-HP se obtuvo en un ambiente de silenciamiento celular moderado inducido por la presencia de 0.05 µg/ml de AMD.

Tabla 17. Producción vírica expresada como la media \pm error estándar del $\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{célula})$ de poblaciones del VHA. En negrita se señala el valor correspondiente a la población de rápido crecimiento o HM175-HP. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las poblaciones, se señalan utilizando el criterio de letras a=ab; ab=b; a≠b; etc,...

| Población | $\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{célula})$ |
|------------------|---|
| L0 | 1.43 \pm 0.04 a |
| F0.05LA | 1.64 \pm 0.05 a |
| F0.2LA | 1.39 \pm 0.14 a |
| R0.05NA | 0.85 \pm 0.25 b |
| R0.05A | 1.60 \pm 0.18 a |
| HM175-HP | 2.27 \pm 0.07 c |

Para estudiar la velocidad de replicación de la población HM175-HP, se realizó una curva de *one-step growth*, midiendo los títulos virales expresados

como la TCID₅₀/ml a las 12 horas y 1, 2, 3, 5 y 7 días post-infección, tal como se detalló en el apartado 5.2.5 del presente Capítulo. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos previamente para la población de L0, que es la población adaptada a cultivo celular creciendo en ausencia de AMD (ver Figura 65). Al observar los resultados de la *one-step growth* se vio claramente como el título viral expresado como la TCID₅₀/ml, era superior para la población HM175-HP que para la población L0, a lo largo de los diferentes días en los cuales se llevó a cabo el experimento. Además, se observó que la población HM175-HP llega antes a alcanzar su valor máximo de título viral, consiguiéndolo a los 3 días post-infección, mientras que L0 lo consigue a los 5 días post-infección. Esta reducción en los tiempos para la obtención de un mayor título viral es muy importante y útil, ya que el VHA como se ha comentado en apartados anteriores, es un virus que replica muy lento (días en vez de horas) y produce poca cantidad de antígeno.

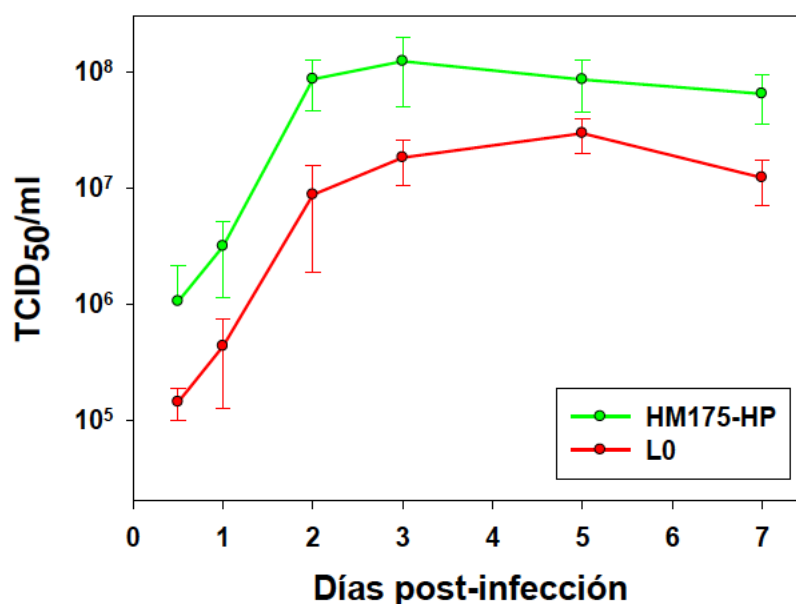


Figura 65. Curva *one-step growth* en células FRhK-4 de las poblaciones HM175-HP y L0. Los títulos víricos se expresan como la TCID₅₀/ml.

Como estudio complementario a la curva *one-step growth*, se realizó un ensayo de unidades formadoras de calvas o PFUs, con la intención de analizar su tamaño en el caso de la población HM175-HP, ya que en general, calvas más grandes indican una mayor velocidad de replicación. El resultado fue

sorprendente, ya que se obtuvo una media de diámetro de calvas de 1.07 ± 0.05 cm en presencia de $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD (ver Figura 66). Si bien este valor se encuentra dentro de los rangos obtenidos para otros virus, está muy lejos de parecerse a los valores obtenidos para el VHA, principalmente al valor de 0.20 ± 0.02 cm de la población de L0 en ausencia de AMD (ver Tabla 18). A su vez, todas las poblaciones comparadas tienen un mayor tamaño de calvas que L0, tanto en presencia como en ausencia de AMD. También es interesante destacar el hecho que en condiciones de *shut-off* celular inducido artificialmente, la mayoría de las poblaciones comparadas presentaban unos diámetros de calvas significativamente superiores ($p < 0.05$) a los diámetros de las calvas que generaban en ausencia de AMD.

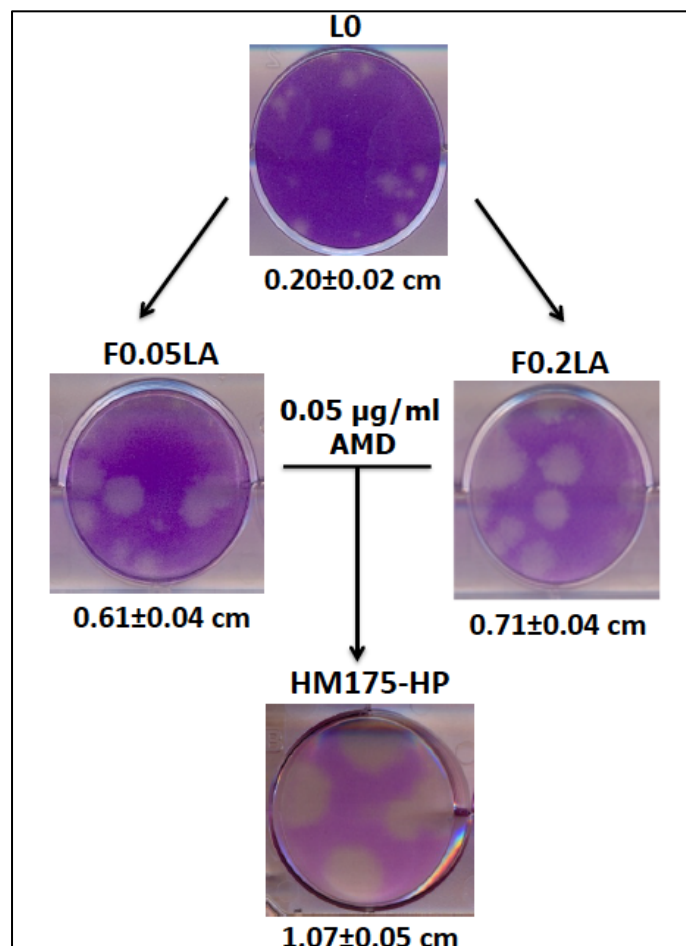


Figura 66. Calvas generadas luego de la infección de células FRhK-4 con las poblaciones L0 ($0.00 \mu\text{g/ml}$ de AMD), F0.05LA ($0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD), F0.2LA ($0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD) y HM175-HP ($0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD).

Tabla 18. _Diámetro de las calvas (en centímetros) generadas por infecciones de células FRhK-4 con poblaciones del VHA, en presencia de 0.05 µg/ml y ausencia de AMD, expresados como la media ± error estándar. En negrita se señala el valor correspondiente a la población HM175-HP. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las poblaciones se señalan utilizando el criterio de letras a=ab; ab=b; a≠b; etc,... y en minúscula. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las condiciones de ausencia y presencia de AMD para una población determinada, se indican siguiendo el mismo criterio de letras pero en mayúscula.

| Población | Diámetro de calva (cm) en ausencia de AMD | Diámetro de calva (cm) en presencia de AMD |
|-----------------|---|--|
| L0 | 0.20 ± 0.02 a A* | 0.28 ± 0.03 a B* |
| F0.05LA | 0.53 ± 0.03 b A* | 0.61 ± 0.04 bc A* |
| F0.2LA | 0.50 ± 0.04 b A* | 0.71 ± 0.04 c B* |
| R0.05NA | 0.50 ± 0.02 b A* | 0.59 ± 0.04 b B* |
| R0.05A | 0.53 ± 0.03 b A* | 0.55 ± 0.06 b A* |
| HM175-HP | 0.80 ± 0.09 c A | 1.07 ± 0.05 d B |

* Valores extraídos de Costafreda *et al.*, 2014.

5.3.2 Características biológicas de la población de rápido crecimiento del VHA en relación a su uso de codones

Desde un punto de vista molecular, analizando las secuencias consenso de las poblaciones parentales (F0.05LA y F0.2LA), L0 y HM175-HP, se vio que la población de rápido crecimiento poseía en su genoma una mezcla de marcadores. Poseía 8 marcadores genéticos provenientes de F0.05LA distribuidos a lo largo de todo su genoma y 8 marcadores provenientes de L0, de los cuales 7 eran compartidos con F0.05LA también. En tanto, no se encontraron marcadores genéticos provenientes de F0.2LA. Además en HM175-HP se encuentran las 3 mutaciones en el IRES en las posiciones 359, 590 y 726 (de las cuales se habló en el Capítulo 2) (ver Figura 67), y que le confieren una mayor actividad al mismo. Las poblaciones F0.05LA y F0.2LA difieren entre si en tan sólo 9 posiciones a lo largo de todo su genoma, lo cual representaría aproximadamente un 0.2% de sus secuencias completas.

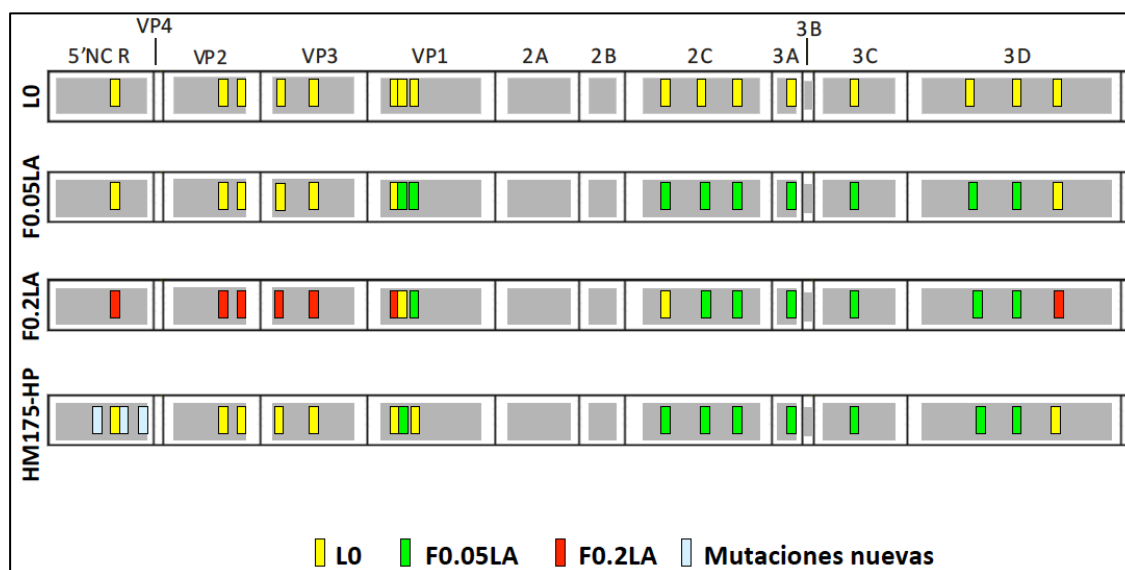


Figura 67. Marcadores genéticos en las secuencias consenso de los genomas de las poblaciones de L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP, que permiten diferenciarlas entre sí. Imagen adaptada de la tesis doctoral en preparación de Francisco Pérez-Rodríguez.

Tal y como se estudió en los capítulos anteriores, al analizar las cuasiespecies de L0, F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP se encontró una variabilidad de clones con diferentes cambios en el uso de codones para las regiones de VP1 y VP3, siendo la variabilidad encontrada en VP1 mucho más relevante. A su vez, dentro de las 4 poblaciones estudiadas, fue en HM175-HP donde se observaron diferencias significativas más relevantes en sus tasas de traducción respecto a L0. Por tanto, con el fin de saber si los cambios en el uso de codones de HM175-HP, que le brindan una mayor tasa de traducción, pueden afectar el plegamiento de las proteínas estructurales y ocasionar cambios en la conformación de la cápside, se estudiaron diversas características. En primer lugar, se analizó la estructura antigénica de la población HM175-HP mediante el reconocimiento con los anticuerpos monoclonales K34C8 y K24F2, que reconocen un epítipo sólo presente en la cápside y el epítipo inmunodominante presente en la cápside y protómeros, respectivamente, y el H7C27, que interacciona con el sitio de unión a la glicoforina A (ver Tabla 19). Se encontró que los valores de reconocimiento por parte del MA b H7C27 en HM175-HP, no presentaban diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto a L0 y F0.2LA. Sin embargo, su reconocimiento (0.23 ± 0.036) era significativamente inferior a los valores obtenidos para F0.05LA, R0.05NA y R0.05A (0.37 ± 0.005 , 0.37 ± 0.010 y 0.36 ± 0.009 ,

respectivamente). En cuanto al reconocimiento con el Mab K34C8, el valor obtenido de 0.11 ± 0.031 para HM175-HP, era significativamente inferior al resto de las poblaciones. Y en lo que respecta al reconocimiento por parte del MAb K24F2, el valor de 0.13 ± 0.028 obtenido para HM175-HP fue significativamente inferior ($p < 0.05$) a los valores obtenidos para L0 y F0.2LA, pero no se encontró diferencias significativas con F0.05LA, R0.05NA y R0.05A.

Tabla 19. Reconocimiento de poblaciones del VHA por los anticuerpos monoclonales H7C27, K34C8 y K24F2. Los valores se expresan como la media \pm error estándar. En negrita se señala el valor correspondiente a la población HM175-HP. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las poblaciones se señalan utilizando el criterio de letras a=ab; ab=b; a#b; etc,...

| Población | Absorbancia 492 nm de H7C27 | Absorbancia 492 nm de K34C8 | Absorbancia 492 nm de K24F2 |
|-----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| L0 | 0.20 ± 0.001 a* | 0.22 ± 0.001 a* | 0.28 ± 0.002 a* |
| F0.05LA | 0.37 ± 0.005 b* | 0.89 ± 0.030 b* | 0.12 ± 0.005 b* |
| F0.2LA | 0.25 ± 0.004 a* | 0.25 ± 0.002 a* | 0.18 ± 0.006 c* |
| R0.05NA | 0.37 ± 0.010 b* | 0.99 ± 0.006 b* | 0.12 ± 0.002 b* |
| R0.05A | 0.36 ± 0.009 b* | 1.02 ± 0.004 b* | 0.11 ± 0.003 b* |
| HM175-HP | 0.23 ± 0.036 a | 0.11 ± 0.031 c | 0.13 ± 0.028 b |

* Valores extraídos de Costafreda *et al.*, 2014.

Teniendo en cuenta el hecho de que los clones encontrados en las diferentes cuasiespecies poseen reemplazamientos de aa, podría explicar la existencia de cambios en el reconocimiento por los diferentes MAbs entre las poblaciones. Sin embargo, ninguno de los reemplazos de aa detectados estaba localizado en los epítomos descritos para el VHA. Asimismo, el replicar en condiciones de silenciamiento celular también podría afectar el plegamiento de la cápside. De hecho, la población R0.05NA que proviene de F0.2LA luego de replicar 5 pasajes en presencia de $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD y es prácticamente idéntica a ella a nivel genómico, mostró un comportamiento muy diferente en cuanto al reconocimiento por los diferentes anticuerpos en comparación a F0.2LA (ver Tabla 19). Por lo tanto, el plegamiento se vería influenciado por las concentraciones de ARNt presentes, y por consiguiente de la duración de las pausas ribosomales durante la síntesis proteica.

Además, se calcularon las *ratio* entre el reconocimiento de los MAbs H7C27 y K24F2, y entre K34C8 y K24F2, para normalizar las diferencias en la producción de antígeno entre las poblaciones, así como también entre las

variaciones interensayo (ver Tabla 20). Para la población HM175-HP se vio que la *ratio* H7C27/K24F2 era significativamente superior al resto de las poblaciones, y que la *ratio* K34C8/K24F2 era similar a la encontrada en R0.05NA, pero significativamente superior a L0, F0.05LA y F0.2LA, y significativamente inferior a R0.05A (ver Tabla 20). Estos resultados nos estarían indicando que a excepción de L0, en el resto de las poblaciones el epítipo H7C27 y en menor media el de K34C8 son más accesibles que el de K24F2.

Tabla 20. *Ratio* entre el reconocimiento de los MAbs H7C27 y K24F2 y entre K34C8 y K24F2. Los valores se expresan como la media \pm error estándar. En negrita se señala el valor correspondiente a la población HM175-HP. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las poblaciones se señalan utilizando el criterio de letras a=ab; ab=b; a#b; etc,...

| Población | <i>Ratio</i> H7C27/K24F2 | <i>Ratio</i> K34C8/K24F2 |
|------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| L0 | 0.702 \pm 0.010 a* | 0.783 \pm 0.020 a* |
| F0.05LA | 3.001 \pm 0.070 b* | 1.833 \pm 0.050 b* |
| F0.2LA | 1.380 \pm 0.050 c* | 1.397 \pm 0.050 c* |
| R0.05NA | 3.032 \pm 0.050 b* | 2.045 \pm 0.050 d* |
| R0.05A | 3.232 \pm 0.060 d* | 2.300 \pm 0.060 e* |
| HM175-HP | 3.930 \pm 0.170 e | 2.090 \pm 0.090 d |

* Valores extraídos de Costafreda *et al.*, 2014.

En segundo lugar, se analizó la estabilidad de la población de rápido crecimiento en condiciones extremas de temperatura (61°C durante 5 minutos), pH (pH 2 durante 1 hora), y sales biliares (1% durante 4 horas). Los análisis se llevaron a cabo calculando el Log₁₀ de la reducción entre los títulos infecciosos antes y después del tratamiento, obtenidos según el cálculo de la TCID₅₀ (ver apartado 5.2.3 del presente Capítulo) (ver Tabla 21). Al comparar los resultados obtenidos de la población HM175-HP con los previamente obtenidos para las poblaciones parentales y L0, se observó que HM175-HP tiene una estabilidad similar a la que posee la población de L0, ya que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en las caídas de título vírico en las 3 condiciones extremas analizadas (ver Tabla 21).

Tabla 21. Estabilidad de diferentes poblaciones del VHA en condiciones de alta temperatura, pH ácido y sales biliares. Las caídas del título vírico en las diferentes condiciones se expresan como el $\text{Log}_{10}(N_t/N_0)$, donde N_0 corresponde al título infeccioso antes del tratamiento, y N_t al título infeccioso después del tratamiento. Los valores se expresan como la media \pm error estándar. En negrita se señala el valor correspondiente a la población HM175-HP. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las poblaciones se señalan utilizando el criterio de letras a=ab; ab=b; a**≠**b; etc.,...

| Población | 61°C 5 minutos | pH 2 1 hora | 1% sales biliares 4 horas |
|-----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| L0 | -1.30 \pm 0.15 a* | -0.64 \pm 0.05 a* | 0.12 \pm 0.11 a* |
| F0.05LA | -1.50 \pm 0.25 a* | -1.38 \pm 0.11 b* | -0.69 \pm 0.18 bc* |
| F0.2LA | -2.60 \pm 0.10 b* | -2.93 \pm 0.11 c* | -1.06 \pm 0.13 b* |
| R0.05NA | -1.25 \pm 0.25 a* | -0.31 \pm 0.04 d* | -0.75 \pm 0.21 bc* |
| R0.05A | -1.81 \pm 0.56 ab* | -3.49 \pm 0.10 e* | -0.44 \pm 0.03 c* |
| HM175-HP | -1.21 \pm 0.08 a | -0.46 \pm 0.04 a | 0.042 \pm 0.04 a |

* Valores extraídos de Costafreda *et al.*, 2014.

Si bien a altas temperaturas sólo se observaron diferencias significativas de estabilidad entre todas las poblaciones con respecto a F0.2LA, siendo el valor de caída de título de esta última mucho mayor que el resto, con un valor de -2.60 ± 0.10 , en las otras 2 condiciones sí se encontraron más diferencias. En presencia de pH 2, los fenotipos de L0 y HM175-HP fueron los segundos más estables con una caída de -0.64 ± 0.05 y -0.46 ± 0.04 , respectivamente, siguiendo al de la población R0.05NA con un valor de -0.31 ± 0.04 . Además, en esta condición se vio que los fenotipos menos estables eran los correspondientes a F0.2LA y R0.05A, con valores de -2.93 ± 0.11 y -3.49 ± 0.10 , respectivamente (ver Tabla 21). En presencia de sales biliares el fenotipo de L0 era el más estable junto al de HM175-HP en comparación con el resto de las poblaciones, no encontrándose una caída en sus títulos virales respectivos. Por tanto, las sales biliares a una concentración del 1% no tenían efecto negativo en las cápsides de L0 y HM175-HP, pero sí en el resto de las poblaciones. Se encontró una vez más que la población F0.2LA tiene un fenotipo poco estable, siendo en esta condición la que posee una mayor caída de su título viral al tener un valor de -1.06 ± 0.13 (ver Tabla 21).

En tercer lugar, con el fin de estudiar si los cambios observados en la conformación de la cápside de la población HM175-HP podían tener algún efecto en el inicio del ciclo replicativo, lo cual colaborase a explicar una mayor producción viral, se llevaron a cabo algunos ensayos. Por un lado, se analizó la capacidad de unión al receptor de las células FRhK-4 de esta población, y se la

comparó con los valores previamente obtenidos para las poblaciones parentales y L0 (ver Figura 68).

Tal y como se puede observar en la Figura 68, la población HM175-HP posee una eficiencia de unión al receptor del $45.21 \pm 8.91\%$, la cual es significativamente inferior ($p < 0.05$) a L0, F0.05LA, F0.2LA y R0.05NA que tienen eficiencias que van desde el 63.5 al 73.1%. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con la población R0.05A.

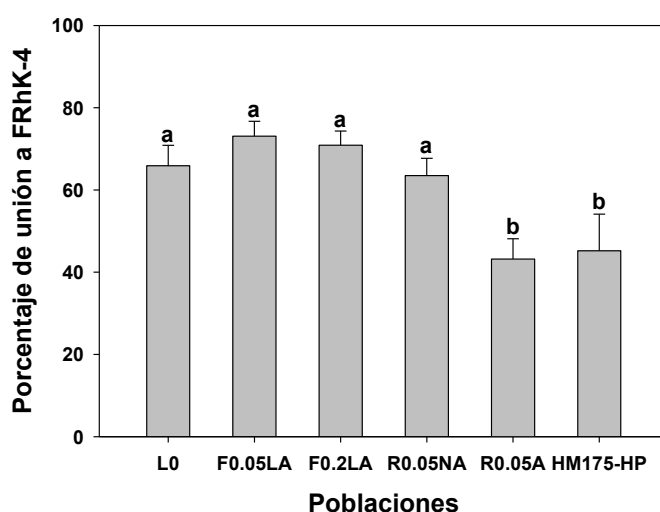


Figura 68. _Porcentaje de unión al receptor de células FRhK-4 de diferentes poblaciones del VHA. Cada población era inoculada en monocapas confluentes de células FRhK-4, y a tiempo 0 y 60 minutos se recogían y titulaban alícuotas de 20 μ l de inóculo según el método de la TCID₅₀/ml. La diferencia en el título de virus infeccioso entre 0 y 60 minutos correspondía a los virus que se habían unido al receptor. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las poblaciones se señalan utilizando el criterio de letras a=ab; ab=b; a**b**.

Por tanto, la mayor productividad viral observada en HM175-HP no se puede explicar por una unión al receptor más eficiente, ya que su valor es significativamente inferior al de sus parentales. No obstante, el cambio en el uso de codones que posee con respecto a sus parentales, estaría influyendo para que haya una pérdida de eficiencia en la unión al receptor.

Otra característica de la población HM175-HP que se estudió fue su eficiencia de desencapsidación, ya que cambios en el plegamiento de las proteínas de la cápside podrían interferir en este proceso. Por tanto, con este objetivo se llevó a cabo un ensayo para calcular el tiempo que necesitaba la población HM175-HP para conseguir la desencapsidación del 50% de las

partículas víricas (UT_{50}), y se lo comparó con los valores de las poblaciones parentales y L0 obtenidos previamente (ver Tabla 22).

Tabla 22. Tiempo necesario para conseguir la desencapsidación del 50% de los virus (UT_{50}) en diferentes poblaciones del VHA. Los valores se expresan como la media \pm error estándar. En negrita se señala el valor correspondiente a HM175-HP. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las poblaciones se señalan utilizando el criterio de letras a=ab; ab=b; a**b**; etc,...

| Población | UT_{50} (horas) |
|------------------|--------------------------------------|
| L0 | 18.53 \pm 0.55 a* |
| F0.05LA | 17.51 \pm 1.76 a* |
| F0.2LA | 8.18 \pm 2.79 b* |
| R0.05NA | 12.10 \pm 1.09 bc* |
| R0.05A | 14.11 \pm 1.29 c* |
| HM175-HP | 13.71 \pm 1.15 c |

* Valores extraídos de Costafreda *et al.*, 2014.

Tal y como se puede ver en la Tabla 21, la población HM175-HP ha evolucionado para tener un tiempo de desencapsidación de 13.71 ± 1.15 horas, el cual es significativamente inferior ($p < 0.05$) a los valores obtenidos para L0 (18.53 ± 0.55) y F0.05LA (17.51 ± 1.76). Este resultado podría compensar la pérdida de eficiencia de unión al receptor que posee HM175-HP en comparación a estas poblaciones, como se vio anteriormente. Por tanto, sólo podría contribuir parcialmente al mayor título viral encontrado en HM175-HP. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a los valores de UT_{50} de R0.05NA y R0.05A; y el valor de HM175-HP fue significativamente superior ($p > 0.05$) al obtenido para F0.2LA (8.18 ± 2.79) en condiciones de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD (ver Tabla 22). Este último caso es coherente y esperable, ya que una alta eficiencia de unión al receptor, en combinación con tiempos de desencapsidación más cortos, permitiría su supervivencia en condiciones de viabilidad celular reducida, como lo es en presencia de $0.20 \mu\text{g/ml}$ de AMD.

Finalmente, a partir de las cuantificaciones de los virus infecciosos y las copias genómicas en los sobrenadantes de cultivo de las células infectadas, se calculó la infectividad específica de la población HM175-HP y se la comparó

con las obtenidas para las poblaciones parentales y L0 (ver Tabla 23). Se entiende como infectividad específica a la relación entre el número de partículas infecciosas y el de partículas físicas (genomas), lo cual también puede interpretarse como el número de partículas necesarias para llevar a cabo un ciclo replicativo infeccioso.

Tabla 23. Infectividad específica de diferentes poblaciones del VHA. Se calcula como el número de partículas víricas necesarias para llevar a cabo un ciclo replicativo. Los valores se expresan como la media \pm error estándar. En negrita se señala el valor correspondiente a HM175-HP. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las poblaciones se señalan utilizando el criterio de letras a=ab; ab=b; a**b**.

| Población | Infectividad específica | |
|------------------|-------------------------------------|--------------|
| L0 | 0.04 \pm 0.01 a* | 1/25 a* |
| F0.05LA | 0.07 \pm 0.03 a* | 1/14 a* |
| F0.2LA | 0.04 \pm 0.02 a* | 1/25 a* |
| R0.05NA | 0.32 \pm 0.05 b* | 1/3 b* |
| R0.05A | 0.26 \pm 0.01 b* | 1/4 b* |
| HM175-HP | 0.25 \pm 0.05 b | 1/4 b |

* Valores extraídos de Costafreda *et al.*, 2014.

Analizando la Tabla 23, se ve que la población HM175-HP posee un valor de infectividad específica de 0.25 ± 0.05 , el cual es significativamente superior ($p < 0.05$) a los valores obtenidos para L0 (0.04 ± 0.01) y las poblaciones parentales F0.05LA y F0.2LA (0.07 ± 0.03 y 0.04 ± 0.02 , respectivamente). Es decir, la relación entre las partículas infecciosas y físicas pasaba de ser 1/25 en las poblaciones de L0 y F0.2LA, y 1/14 en F005LA, a valores de 1/4 en la población HM175-HP. A su vez, no se encontraron diferencias significativas entre las infectividades específicas de R0.05NA (1/3), R0.05A (1/4) y HM175-HP (1/4). Por tanto, teniendo en cuenta que la infectividad específica nos informa de cuántas partículas víricas son necesarias para completar un ciclo infeccioso, estos resultados estarían indicando que la población HM175-HP requiere de menos partículas víricas que sus poblaciones parentales y que L0. De esta forma, estos resultados ayudarían a explicar en parte, la mayor producción vírica que posee la población HM175HP, que la convierte en una población de rápido crecimiento.

5.4 DISCUSIÓN

El lento crecimiento del VHA en cultivo celular (días en vez de horas) y la baja producción de antígeno, tiene como consecuencia que las vacunas existentes contra este virus, tengan un costo altamente elevado. Por esta razón, durante los últimos 10 años, en nuestro laboratorio se ha venido trabajando para obtener una población de crecimiento rápido del VHA que permitiese la obtención de una mayor producción de antígeno viral. De esta forma, se llevó a cabo un proceso de *molecular breeding* entre las poblaciones F0.05LA y F0.2LA del VHA, en células FRhK-4 con un ambiente de silenciamiento celular moderado (0.05 µg/ml de AMD). El propósito de este proceso era tratar de inducir algún evento de recombinación y/o cooperación entre ambas poblaciones parentales, de modo que se seleccionara una población que adquiriese las características ventajosas de cada una de ellas. Esto sería, una alta eficiencia de unión al receptor que posee la población de F0.05LA (73.1 ± 3.6 %) y un tiempo de desencapsidación relativamente bajo para los estándares del VHA (12.10 ± 1.09 horas), que posee la población F0.2LA cuando se la pone a multiplicar nuevamente en condiciones de 0.05 µg/ml de AMD (R0.05NA) [Costafreda *et al.*, 2014]. De lo contrario, de no conseguir recombinación, intentar lograr que la población F0.05LA se beneficiase al comienzo de su ciclo infectivo de la población F0.2LA en las células co-infectadas con ambos virus, ya que al desencapsidar más rápido, empieza con la traducción de su genoma antes. Esto permitiría que la población F0.2LA produjese polimerasa antes de que F0.05LA sintetice la suya, y de esta manera poder obtener una mayor producción viral por parte de F0.05LA al utilizar en primera instancia la enzima producida por F0.2LA. Así, al cabo de 30 pasajes se obtuvo una población de replicación rápida que se denominó HM175-HP, y que posee un valor de Log₁₀(TCID₅₀/célula) de 2.27 ± 0.07 (ver Tabla 17). Este valor es significativamente superior a los obtenidos para las poblaciones parentales F0.05LA (1.64 ± 0.05) y F0.2LA (1.39 ± 0.14), así como para la población L0 (1.43 ± 0.04), y las poblaciones R0.05NA (0.85 ± 0.25) y R0.05A (1.60 ± 0.18) que corresponden a la población F0.2LA puesta a replicar nuevamente en condiciones de 0.05 µg/ml de AMD al cabo de 5 y 20 pasajes, respectivamente (ver Tabla 17). Estas 2 últimas poblaciones fueron

tenidas en cuenta a la hora de hacer comparaciones de las diferentes características, ya que la población HM175-HP se obtuvo en un ambiente con silenciamiento celular moderado.

Estos altos títulos virales relativos para la población HM175-HP, están en acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de unidades formadoras de calvas. La población HM175-HP fue la que presentó un mayor diámetro de calva, con un valor de 1.07 ± 0.05 cm en presencia de $0.05 \mu\text{g/ml}$ de AMD (ver Figura 66 y Tabla 18), en comparación a las poblaciones parentales, y R0.05NA y R0.05A para las que se obtuvieron valores que oscilan entre los 0.55 a 0.71 cm, y más significativamente aún con respecto a la población L0 que sólo presentó un diámetro de 0.28 ± 0.03 cm (ver Tabla 18). Estos resultados ponen en evidencia la importancia del silenciamiento celular en la modulación de las concentraciones relativas de los diferentes ARNt, lo cual permite una mayor velocidad de traducción dada la mayor disponibilidad de ARNt, que conlleva por tanto a una mayor tasa de traducción, y por ende de replicación.

Desde un punto de vista molecular, se vio que la población HM175-HP en su secuencia consenso además de las 3 mutaciones en el IRES que como se vio en el Capítulo 2, le confieren a éste una mayor actividad para dirigir la traducción, poseía una mezcla de marcadores genéticos distribuidos a lo largo de su genoma. Esta población no posee marcadores genéticos provenientes de la población F0.2LA, pero sí tiene 8 marcadores provenientes de F0.05LA, y 8 marcadores provenientes de L0 (ver Figura 67). De los marcadores provenientes de L0, 7 de ellos eran compartidos también por la población F0.05LA, por lo tanto se puede decir que la población HM175-HP es genotípicamente muy similar a la población parental F0.05LA. Estos resultados están en acuerdo con el hecho de que la población de rápido crecimiento se obtuvo a partir de la selección de un clon presente en la población F0.05LA, tal y como se comentó en los 2 Capítulos previos.

A nivel de cuasiespecies, las poblaciones F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP presentaban variabilidad respecto a L0 en el uso de codones entre los diferentes clones de regiones de proteínas estructurales, principalmente en la región de VP1, tal como se detalló en el Capítulo 1. En cuanto al reconocimiento por los anticuerpos monoclonales H7C27, K34C8 y K24F2 se

observaron variaciones en el reconocimiento de las cápsides de las diferentes poblaciones en estudio (ver Tablas 19 y 20). Estas observaciones sugerirían la existencia de cambios en las estructuras de las cápsides, causadas por los distintos usos de codones de las diferentes poblaciones, y en especial HM175-HP. El uso de codones de HM175-HP ha evolucionado para permitir una mayor tasa de traducción, en al menos las regiones de VP1 y VP3 estudiadas de su genoma. Además, la presencia de AMD en el ambiente, y su influencia indirecta en las concentraciones relativas de ARNt, tendría también un efecto en los cambios en las estructuras de las cápsides encontrados.

La patogénesis viral está determinada en parte por la capacidad que tiene el virus de propagarse hacia los órganos y células diana [Vignuzzi *et al.*, 2006]. Por lo tanto, el VHA para llevar a cabo su ciclo biológico y la consecuente infección, debe ser capaz de superar diferentes condiciones adversas en el organismo hospedador. Éstas serían, el pH ácido presente en el estómago durante la fase de entrada; factores de depuración durante la fase de viremia; y la acción de detergentes, particularmente las sales biliares durante la fase de salida. Este fenotipo altamente resistente, que le permita sobrevivir a las condiciones adversas sólo puede ser conseguido gracias a la existencia de una cápside extremadamente cohesiva, obtenida por un correcto plegamiento, lo cual también explicaría la alta persistencia del VHA en el ambiente [Abad *et al.*, 1994], y su transmisión a través de agua de bebida y alimentos contaminados [Bosch *et al.*, 1991]. Por estas razones se analizó la estabilidad de la población HM175-HP en condiciones extremas de temperatura (61°C durante 5 minutos), pH (pH2 durante 1 hora), y sales biliares (1% durante 4 horas). Sorprendentemente, se encontró que la población HM175-HP posee un fenotipo tan resistente como el de la población L0 (ver Tabla 21), no encontrándose diferencias significativas, a pesar de que poseen diferencias entre si en cuanto al reconocimiento de la cápside por parte de los diferentes MAbs utilizados. A excepción de la población R0.05NA a pH2, las cápsides de L0 y HM175-HP eran las más resistentes en las 3 condiciones extremas analizadas, siendo algo sensibles a 61°C durante 5 minutos, poco sensibles a pH2 durante 1 hora y nada sensibles en presencia de 1% de sales biliares durante 4 horas. Estos resultados estarían sugiriendo que si bien existen diferencias en el uso de codones entre las poblaciones L0 y HM175-HP, el

plegamiento de la cápside conseguido se podría considerar de cierta forma equivalente, ya que ambas poblaciones poseen niveles de resistencia similares. De esta forma, no sólo hemos conseguido una población del VHA con una mayor tasa de replicación, sino también con un fenotipo más estable que sus poblaciones parentales.

El plegamiento de la cápside contribuye no sólo al *fitness* o la producción de virus infecciosos, sino también a la infectividad específica. Esta última, se define como la relación entre partículas infecciosas y partículas físicas, lo cual tal y como se ha comentado en apartados previos, se podría interpretar como el número de partículas requeridas para llevar a cabo un ciclo infeccioso. Es generalmente aceptado que todos los virus ARN, y en particular los picornavirus, poseen una infectividad específica baja [Racaniello, 2007]. Se ha sugerido que esta baja infectividad específica sería debido a defectos genéticos letales y/o ciclos infecciosos abortivos, donde fallos en cualquier paso durante el ciclo infeccioso, pueden ocasionar ciclos abortivos [Mueller *et al.*, 2006]. Estos fallos podrían ser a nivel de unión al receptor, entrada viral y desencapsidación, iniciación de la traducción del genoma, elongación de la traducción, replicación del ARN, formación de la cápside, encapsidación del ARN, y maduración de la cápside. A su vez, la infectividad específica es dependiente del ambiente [Domingo *et al.*, 2012], por lo tanto, no es sorprendente encontrar variaciones en presencia de diferentes grados de silenciamiento celular. En el caso de las poblaciones del VHA en estudio mostraron infectividades específicas altas, siendo la correspondiente a la población HM175-HP significativamente más elevada, en comparación a L0 y a las poblaciones parentales, y no encontrándose diferencias significativas con respecto a R0.05NA y R0.05A. Para las poblaciones de L0 y F0.2LA se requerían 25 partículas físicas para completar un ciclo infeccioso, mientras que para F0.05LA se necesitaban 14 partículas físicas. En tanto para la población R0.05NA se requerían sólo 3 partículas físicas y para las poblaciones HM175-HP y R0.05A se necesitaban 4 partículas físicas para completar un ciclo infeccioso. La población HM175-HP en condiciones de silenciamiento celular moderado, sería eficiente en la desencapsidación e iniciación y elongación de la traducción. A pesar de poseer mutaciones en 3C y 3D, éstas no parecerían ser responsables del incremento significativo en la infectividad específica de

HM175-HP con respecto a sus parentales, puesto que las mutaciones localizadas en 3C son compartidas por F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP, y los 3 cambios presentes en 3D son compartidos por F0.05LA y HM175-HP. A su vez, sólo una de las mutaciones encontradas en 3D, la A39V, se encontraba cerca de la mutación F42L, que se asocia con un incremento de la replicación del ARN [Konduru & Kaplan, 2010]. Sin embargo, A39V al encontrarse en F0.05LA, F0.2LA y HM175-HP, no correlacionaría con los cambios de infectividad específica observados. El uso de codones deoptimizado que posee el VHA contribuye a la baja tasa de traducción y de replicación, que le permitiría al virus pasar desapercibido frente a las defensas antivirales celulares. Esto podría contribuir también a la alta infectividad específica que presenta el VHA, a pesar de su uso de codones naturalmente deoptimizado, que sugeriría la ausencia de infecciones abortivas debido a la respuesta antiviral celular; en contraste a lo que ha sido sugerido para poliovirus [Mueller *et al.*, 2006]. Aunque la población HM175-HP al replicar más eficientemente sería detectada más fácilmente por la célula, lo que podría incidir en una mayor respuesta anti-viral, dicha respuesta se anticipa ineficiente en condiciones de silenciamiento celular.

Para finalizar y teniendo en cuenta los diferentes resultados obtenidos en los estudios de las características biológicas de HM175-HP, es interesante destacar que si bien desde un punto de vista genómico esta población es más similar a la población parental F0.05LA, y desde un punto de vista fenotípico se comporta de un modo más parecido a R0.05A, tiene la particularidad de tener una mayor tasa de replicación que ambas. Por lo tanto, la mayor producción vírica se podría explicar por una co-evolución entre el uso de codones y la actividad del IRES (adquisición de las mutaciones U359C, U590C y U726C), donde una correcta combinación de codones abundantes y raros, (tal y como se vio en los Capítulos anteriores) sería lo que prevalecería, permitiendo así una optimización en cuanto a su infectividad específica.

5.5 CONCLUSIONES

- ❖ Los cambios en el uso de codones de la población HM175-HP traen como consecuencia modificaciones de la estabilidad de la cápside, que la hacen semejante a la población L0, y por ende, de mayor estabilidad que las poblaciones parentales.
- ❖ En la población HM175-HP, la evolución entre el uso de codones y la mayor actividad del IRES como consecuencia de la incorporación natural de las mutaciones U359C, U590C y U726C, le permiten tener una mayor infectividad específica.
- ❖ La combinación de unión al receptor más desencapsidación, podrían tener sólo un cierto rol en la obtención de la población de rápido crecimiento.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdi, H. (2007).** Bonferroni Test. In: Encyclopedia of Measurement and Statistics. Ed. Salkind, N.J. *Thousand Oaks Sage, CA, USA* pp 103.107.
- Abad, F. X., Pintó, R. M. & Bosch, A. (1994).** Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3704-3710.
- Adzhubei, A. A., Adzhubei, I. A., Krasheninnikov, I. A. & Neidle, S. (1996).** Non-random usage of “degenerate” codons is related to protein three-dimensional structure. *FEBS Lett* **399**, 78-82.
- Akashi, H. (2003).** Translational selection and yeast proteome evolution. *Genetics* **164**, 1291-1303.
- Ali, I. K., McKendrick, L., Morley, S. J. & Jackson, R. J. (2001).** Activity of the hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G. *J Virol* **75**, 7854-7863.
- Ambrosch, F., Wiedermann, G., Jonas, S., Althaus, B., Finkel, B., Glück, R. & Herzog, C. (1997).** Immunogenicity and protectivity of a new liposomal hepatitis A vaccine. *Vaccine* **15**, 1209-1213.
- Anderson, D. A. & Ross, B. C. (1990).** Morphogenesis of hepatitis A virus: isolation and characterization of subviral particles. *J Virol* **64**, 5284-5289.
- Aragonès, L., Bosch, A. & Pintó, R. M. (2008).** Hepatitis A mutant spectra under selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *J Virol* **82**, 1688-1700.
- Aragonès, L., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A. & Pintó, R. M. (2010).** Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the hepatitis A virus capsid. *PLoS Pathog* **6**, e1000797.
- Asher, L. V. S., Binn, L. N., Mensing, T. L., Marchwicki, R. H., Vassell, R. A. & Young, G. D. (1995).** Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J Med Virol* **47**, 260-268.
- Ashur, Y., Adler, R., Rowe, M. & Shouval, D. (1999).** Comparison of immunogenicity of two hepatitis A vaccines -VAQTA and HAVRIX- in young adults. *Vaccine* **17**, 2290-2296.
- Babendure, J. R., Babendure, J. L., Ding, J. H. & Tsien, R. Y. (2006).** Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA* **12**, 851-861.
- Bahir, I., Fromer, M., Prat, Y. & Linial, M. (2009).** Viral adaptation to host: a proteome-based analysis of codon usage and amino acid preferences. *Mol Syst Biol* **5**, 311.
- Bedard, K. M. & Semler, B. L. (2004).** Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes and Infection* **6**, 702-713.

- Belsham, G. J. & Sonenberg, N. (2000).** Picornavirus RNA translation: roles for cellular proteins. *Trends Microbiol* **8**, 330-335.
- Belsham, G. J. (2009).** Divergent picornavirus IRES elements. *Virus Research* **139**, 183-192.
- Bishop, N. E., Hugo, D. L., Borovec, S. V. & Anderson, D. A. (1994).** Rapid and efficient purification of hepatitis A virus from cell culture. *J Virol Methods* **47**, 203-216.
- Bishop, N. E. & Anderson, D. A. (2000).** Uncoating kinetics of hepatitis A virus virions and provirions. *J Virol* **74**, 3423-3426.
- Borman, A. M. & Kean, K. M. (1997).** Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for hepatitis A virus internal initiation of translation. *Virology* **237**, 129-136.
- Borman, A. M., LeMercier, P., Girard, M. & Kean, K. M. (1997b).** Comparison of picornaviral-IRES driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res* **25**, 925-932.
- Borman, A. M., Michel, Y. M. & Kean, K. M. (2001).** Detailed analysis of the requirements of hepatitis A virus internal ribosome entry segment for the eukaryotic initiation factor complex eIF4F. *J Virol* **75**, 7864-7871.
- Bosch, A., Lucena, F., Díez, J. M., Gajardo, R., Blasi, M. & Jofre, J. (1991).** Human enteric viruses and indicator microorganism in a water supply associated with an outbreak of infectious hepatitis. *J Am Water Works Assoc* **83**, 80-83.
- Bower, W. A., Nainan, O. V., Han, X. & Margolis, H. S. (2000).** Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis* **182**, 12-17.
- Brack, K., Berk, I., Magulski, T., Lederer, J., Dotzauer, A. & Vallbracht, A. (2002).** Hepatitis A virus inhibits cellular antiviral defense mechanisms induced by double-stranded RNA. *J Virol* **76**, 11920-11930.
- Brown, E. A., Day, S. P., Jansen, R. W. & Lemon, S. M. (1991).** The 5' nontranslated region of hepatitis a virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro. *J Virol* **65**, 5828-5838.
- Brown, E. A., Zajac, A. J. & Lemon, S. M. (1994).** *In vitro* characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *J Virol* **68**, 1066-1074.
- Bulmer, M. (1991).** The selection-mutation-drift theory of synonymous codon usage. *Genetics* **129**, 897-907.

Caballero, S., Guix, S., El-Senousy, W. M., Calicó, I., Pintó, R. M. & Bosch, A. (2003). Persistent gastroenteritis in children infected with astrovirus: association with serotype-3 strains. *J Med Virol* **71**, 245-250.

Castillo de Febres, O., Chacon de Petrola, M., Casanova de Escalona, L., Naveda, O., Naveda, M., Estopinan, M., Bordonos, G., Zambrano, B., Garcia, A. & Dumas, R. (1999). Safety, immunogenicity and antibody persistence of an inactivated hepatitis A vaccine in 4 to 15 year old children. *Vaccine* **18**, 656-664.

Chan, M. C. W., Sung, J. J. Y., Lam, R. K. Y., Chan, P. K. S., Lee, N. L. S., Lai, R. W. M. & Leung, W. K. (2006). Fecal viral load and Norovirus-associated gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* **12**, 1278-1280.

Chaney, J. L. & Clark, P. L. (2015). Roles for synonymous codon usage in protein biogenesis. *Ann Rev Biophysics* **44**, No1.

Chevance, F. F. V., Le Guyon, S. & Hughes, K. T. (2014). The effects of codon context on *in vivo* translation speed. *PLoS Genet* **10**, e1004392. doi:101371.

Chiparelli, H. (2002). Diagnóstico Viroológico de las Hepatitis virales. *Monografías del Instituto de Higiene, Virus y Virología Médica en Uruguay*, N°2.

Cianciara, J. (2000). Hepatitis A shifting epidemiology in Poland and Eastern Europe. *Vaccine* **18**, 68-70.

Cladel, N. M., Budgeon, L. R., Hu, J., Balogh, K. K. & Christensen, N. D. (2013). Synonymous codon changes in the oncogenes of the cottontail rabbit papillomavirus lead to increased oncogenicity and immunogenicity of the virus. *Virology* **438**, 70-83.

Clarke, T. F. & Clark, P. L. (2010). Increased incidence of rare codon clusters at 5' and 3' gene termini: implications for function. *BMC Genom* **11**, 118-127.

Cockayne, E. A. (1912). Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *QJM* **6**, 1-29.

Cohen, J. I., Rosenblum, B., Feinstone, S. M., Ticehurst, J. & Purcell, R. H. (1989). Attenuation and cell culture adaptation of hepatitis A virus (HAV): a genetic analysis with HAV cDNA. *J Virol* **63**, 5364-5370.

Cohen, L., Bénichou, D. & Martin, A. (2002). Analysis of deletion mutants indicates that the 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. *J Virol* **76**, 7495-7505.

Coleman, J. R., Papamichail, D., Skiena, S., Fitcher, B., Wimmer, E. & Mueller, S. (2008). Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias. *Science* **320**, 1784-1787.

Costafreda, M. I., Bosch, A. & Pintó, R. M. (2006). Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3846-3855.

Costafreda, M. I., Pérez-Rodríguez, F. J., D'Andrea, L., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A. & Pintó, R. M. (2014). Hepatitis A virus adaptation to cellular shut-off is driven by dynamic adjustments of codon usage and results in the selection of populations with altered capsids. *J Virol* **88**, 5029-5041.

Costa-Mattioli, M., Cristina, J., Romero, H., Pérez-Bercoff, R., Casane, D., Colina, R., García, L., Vega, I., Glikman, G., Romanowsky, V., Castello, A., Nicand, E., Gassin, M., Billaudel, S. & Ferré, V. (2002). Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol* **76**, 9516-9525.

Costa-Mattioli, M., Di Napoli, A., Ferré, V., Billaudel, S., Pérez-Bercoff, R. & Cristina, J. (2003). Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* **84**, 3191-3201.

Costa-Mattioli, M., Domingo, E. & Cristina, J. (2006). Analysis of sequential hepatitis A virus strains reveals coexistence of distinct viral subpopulations. *J Gen Virol* **87**, 115-118.

Cox, E. M., Emerson, S. U. & Lemon, S. M. (1991). Use of oligonucleotide-direct mutagenesis to define the immunodominant neutralization site of HAV. In: *Vaccines 90: Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS*. Eds. Brown, F., Chanock, R. M. & Ginsberg, H. S. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, pp 169-173.

Cristina, J. & Costa-Mattioli, M. (2007). Genetic variability and molecular evolution of Hepatitis A virus. *Virus Res* **127**, 151-157.

Cromeans, T., Sobsey, M. D. & Fields, H. A. (1987). Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J Med Virol* **22**, 45-56.

Crowther, D. & Melnick, J. L. (1961). The incorporation of neutral red and acridine orange into developing poliovirus making them photosensitive. *Virology* **14**, 11-21.

Cuthbert, J. (2001). Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev* **14**, 38-58.

Dagan, R., Leventhal, A., Anis, E., Slater, P., Ashur, Y., Shouval, D. (2005). Incidence of hepatitis A in Israel following universal immunization of toddlers. *JAMA* **294**, 202-210.

D'Andrea, L., Pintó, R. M., Bosch, A., Musto, H. & Cristina, J. (2011). A detailed comparative analysis on the overall codon usage patterns in Hepatitis A virus. *Virus Research* **157**, 19-24.

- D'Andrea, L., Pérez-Rodríguez, F. J., de Castellarnau, M., Manzanares, S., Lite, J., Guix, S., Bosch, A. & Pintó, R. M. (2015).** Hepatitis A virus genotype distribution during a decade of universal vaccination of preadolescents. *Int J Mol Sci* **16**, 6842-6854.
- Day, S. P., Murphy, P., Brown, E. A. & Lemon, S. M. (1992).** Mutations within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA which enhance replication in BS-C-1 cells. *J Virol* **66**, 6533-6540.
- de la Torre, J. C. & Holland, J. J. (1990).** RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *J Virol* **64**, 6278-6281.
- Devaney, M. A., Vakharia, V. N., Lloyd, R. E., Ehrenfeld, E. & Grubman, M. J. (1988).** Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J Virol* **62**, 4407-4409.
- D'Hondt, E. (1992).** Possible approaches to develop vaccines against hepatitis A. *Vaccine* **10**, 48-52.
- Domingo, E. & Holland, J. J. (1997).** RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* **51**, 151-178.
- Domingo, E. (2005).** Antiviral strategy on the horizon. *Virus Res* **107**, 115-116.
- Domingo, E., Escarmís, C., Lázaro, E. & Manrubia, S. C. (2005).** Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Res* **107**, 129-139.
- Domingo, E., Martin, V., Perales, C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J. & Arias, A. (2006).** Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**, 51-82.
- Domingo, E., Sheldon, J. & Perales, C. (2012).** Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**, 159-216.
- Dong, H., Nilsson, L. & Kurland, C. G. (1996).** Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J Mol Biol* **260**, 649-663.
- Dotzauer, A., Gebhardt, U., Bieback, K., Göttke, U., Kracke, A., Mages, J., Lemon, S. M. & Vallbracht, A. (2000).** Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *J Virol* **74**, 10950-10957.
- Evans, M. S., Clarke IV, T. F & Clark, P. L. (2005).** Conformations of co-translational folding intermediates. *Prot Pept Lett* **12**, 189-195.
- Fedorov, A. N. & Baldwin, T. O. (1997).** Cotranslational protein folding. *J Biol Chem* **272**, 32715-32718.

Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z. & Purcell, R. H. (1973). Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* **182**, 1026-1028.

Feng, Z., Hirai-Yuki, A., McKnight, K. L. & Lemon, S. M. (2014). Naked viruses that aren't always naked: quasi-enveloped agents of acute hepatitis. *Annu Rev Virol* **1**, 539-560.

Feng, Z. & Lemon, S. M. (2014). Peek-a-boo: membrane hijacking and the pathogenesis of viral hepatitis. *Trends in Microbiol* **22**, 59-64.

Fernández-Miragall, O., López de Quinto, S. & Martínez-Salas, E. (2009). Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus Res* **139**, 172-182.

Franco, E., Meleleo, C., Serino, L., Sorbara, D. & Zaratti, L. (2012). Hepatitis A: epidemiology and prevention in developing countries. *World J Hepatol* **4**, 68-73.

Fredrick, K. & Ibba, M. (2010). How the sequence of a gene can tune its translation. *Cell* **141**, 227-229.

Geller, R., Vignuzzi, M., Andino, R. & Frydman, J. (2007). Evolutionary constraints on chaperone-mediate folding provide an antiviral approach refractory to development of drug resistant. *Genes Dev* **21**, 195-205.

Gingold, H. & Pilpel, Y. (2011). Determinants of translation efficiency and accuracy. *Mol Syst Biol* **7**, 1-13.

Gingras, A. C., Svitkin, G. J., Belsham, A., Pause, N. & Sonenberg, N. (1996). Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **11**, 5578-5583.

Glass, M. J., Jia, X. Y. & Summers, D. F. (1993). Identification of the hepatitis A virus internal ribosome entry site: in vivo and in vitro analysis of bicistronic RNAs containing the HAV 5' noncoding region. *Virology* **193**, 842-852.

Glikson, M., Galun, E., Oren, R., Tur-Kaspa, R. & Shouval, D. (1992). Relapsing hepatitis A: review of 14 cases and literature survey. *Medicine (Baltimore)* **71**, 14-23.

Gorochofski, T. E., Ignatova, Z., Bovenberg, R. A. L. & Roubos, J. A. (2015). Trade-offs between tRNA abundance and mRNA secondary structure support smoothing of translation elongation rate. *Nucl Acids Res* **43**, No 6. doi: 10.1093.

Gosert, R., Egger, D. & Bienz, K. A. (2000). A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology* **266**, 157-169.

Gouy, M. & Gautier, C. (1982). Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucl Acids Res* **10**, 7055-7074.

Graff, J., Richards, O. C., Swiderek, K. M., Davis, M. T., Rusnak, F., Harmon, S. A., Jia, X. Y. & Ehrenfeld, E. (1999). Hepatitis A virus capsid protein VP1 has a heterogeneous C terminus. *J Virol* **73**, 6015-6023.

Grantham, R., Gautier, C. & Gouy, M. (1980). Codon frequencies in 119 individual genes confirm consistent choices of degenerate bases according to genome type. *Nucl Acids Res* **8**, 1893-1912.

Gromeier, M., Alexander, L. & Wimmer, E. (1996). Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proc Natl Acad Sci, USA* **93**, 2370-2375.

Guadalupi, C., Armigliato, M., Bortolotti, F. & Realdi, G. (1986). Polyphasic course of hepatitis type A in children. *J Infect Dis* **153**, 378-379.

Gurumurthy, C. B., Sanyal, A., Venkataramanan, R., Tosch, C., George, M. & Hemadri, D. (2002). Genetic diversity in the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus serotype Asia 1. *Arch Virol* **147**, 85-102.

Gust, I. D., Lehmann, N. I., Crowe, S., McCrorie, M., Locarnini, S. A. & Lucas, C. R. (1985). The origin of the HM175 strain of hepatitis A virus. *J Infect Dis* **151**, 365-367.

Hanada, K., Suzuki, Y. & Gojobori, T. (2004). A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol Biol Evol* **21**, 1074-1080.

Harmon, S. A., Johnston, J. M., Ziegelhoffer, T., Richards, O. C., Summers, D. F. & Ehrenfeld, E. (1988). Expression of hepatitis A virus capsid sequences in insect cells. *Virus Res* **10**, 273-280.

Haydon, D. T., Bastos, A. D., Knowles, N. J. & Samuel, A. R. (2001). Evidence for positive selection in foot-and-mouth disease virus capsid genes from field isolates. *Genetics* **157**, 7-15.

Hoekema, A., Kastelein, R. A., Vasser, M. & de Boer, H. A. (1987). Codon replacement in the PGK1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression. *Mol Cell Biol* **7**, 2914-1924.

Hollinger, F. B. & Emerson, S. U. (2001). Hepatitis A virus. In: *Fields Virology*, 4th ed. Eds. Knipe, D. M. & Howley, P. M. *Lippincott Williams & Wilkins, New York, USA*, pp 799-840.

Hollinger, F. B. & Emerson, S. U. (2007). Hepatitis A virus. In: *Fields Virology*, 5th ed. Eds. Knipe, D. M. & Howley, P. M. *Lippincott Williams & Wilkins, PA, USA*, pp 911-947.

- Hunt, R. C., Simhadri, V. L., Iandoli, M., Sauna, Z. E. & Kimchi-Sarfaty, C. (2014).** Exposing synonymous mutations. *Trends Genetics* **30**, 308-321.
- Hurst, L. D. (2002).** The *Ka/Ks* ratio: diagnosing the form of sequence evolution. *Trends Genet* **18**, 486-487.
- Ikemura, T. (1981).** Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *J Mol Biol* **151**, 389-409.
- Innis, B. L., Snitbhan, R., Kunasol, P., Laorakpongse, T., Poopatanakool, W., Kozik, C. A., Suntayakorn, S., Suknuntapong, T., Safary, A., Tang, D. B. & Boslego, J. W. (1994).** Protection against hepatitis A by an inactivated vaccine. *JAMA* **271**, 1328-1334.
- Jaeger, J. A., Turner, D. H. & Zuker, M. (1989).** Improved predictions of secondary structures for RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 7706-7710.
- Jansen, R. W., Siegl, G. & Lemon, S. M. (1990).** Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 2867-2871.
- Jenkins, G. M. & Holmes, E. C. (2003).** The extent of codon usage bias in human RNA viruses and its evolutionary origin. *Virus Research* **92**, 1-7.
- Kabrane-Lazizi, Y., Emerson, S. U., Herzog, C. & Purcell, R. H. (2001).** Detection of antibodies to HAV 3C proteinase in experimentally infected chimpanzees and in naturally infected children. *Vaccine* **19**, 2878-2883.
- Kaplan, G. G., Totsuka, A., Thompson, P., Akatsuka, T., Moritsugu, Y. & Feinstone, S. M. (1996).** Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J* **15**, 4282-4296.
- Karber, G. (1931).** Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch Exp Path Pharm* **162**, 480.
- Kew, O. M., Sutter, R. W., Nottay, B. K., Mc Donough, M. J., Prevots, D. R., Quick, L. & Pallansch, M. A. (1998).** Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J Clin Microbiol* **36**, 2893-2899.
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J. M., Kim, I. W., Sauna, Z. E., Calcagno, A. M., Ambudkar, S. U., Gottesman, M. M. (2007).** A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* **315**, 525-528.
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.

Komar, A. A., Lesnik, T. & Reiss, C. (1999). Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during *in vitro* translation. *FEBS Lett* **462**, 387-391.

Komar, A. A. (2009). A pause for thought along the co-translational folding pathway. *Trends Biochem Sci* **34**, 16-24.

Konduru, K. & Kaplan, G. G. (2010). Determinants in 3Dpol modulate the rate of growth of hepatitis A virus. *J Virol* **84**, 8342-8347.

Kozak, M. (1986). Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 2850-2854.

Krugman, S., Giles, J. P., & Hammond, J. (1967). Evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *JAMA* **200**, 365-373.

Kuechler, E., Seipelt, J., Liebig, H. D. & Sommergruber, W. (2002). Picornavirus proteinase-mediated shutoff of host cell translation: direct cleavage of a cellular initiation factor. In: *Molecular Biology of Picornaviruses*. Eds. Semler, B. L. & Wimmer, E. *ASM Press, Washington, DC*, pp. 301-311.

Lemon, S. M. (1994). The natural history of hepatitis A: the potential for transmission by transfusion of blood or blood products. *Vox Sang* **67**, 19-23.

Lemon, S. M., Murphy, P. C., Provost, P. J., Chalikonda, I., Davide, J. P., Schofield, T. L., Nalin, D. R. & Lewis, J. A. (1997). Immunoprecipitation and virus neutralization assays demonstrate qualitative differences between protective antibody responses to inactivated hepatitis A vaccine and passive immunization with immune globulin. *J Infect Dis* **176**, 9-19.

Leong, L. E., Cornell, C. T. & Semler, B. L. (2002). Processing determinants and functions of cleavage products of picornavirus. In: *Molecular Biology of Picornavirus*. Eds. Semler, B. L. & Wimmer, E. *ASM Press, Washington, DC*, pp. 187-198.

Liu, H. & Naismith, J. H. (2008). An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotech* **8**, doi : 10.1186/1472-6750-8-91.

Lu, L., Ching, K. Z., Salet de Paula, V., Nakano, T., Siegl, G., Weitz, M. & Robertson, B. H. (2004). Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J Gen Virol* **85**, 2943-2952.

Ma, X. X., Feng, Y. P., Liu, J. L., Chen, L., Zhao, Y. Q., Guo, P. H., Guo, J. Z., Ma, L. Y. & Ma, Z. R. (2014). Characteristics of synonymous codon usage bias in the beginning region of West Nile virus. *Genet Mol Res* **13**, 7347-7355.

- Mackiewicz, V., Dussaix, E., Le Petitcorps, M. F. & Roque-Afonso, A. M. (2004).** Detection of hepatitis A virus RNA in saliva. *J Clin Microbiol* **42**, 4329-4331.
- Mackiewicz, V., Cammas, A., Desbois, D., Marchadier, E., Pierredon, S., Beaulieux, F., Dussaix, E., Vagner, S. & Roque-Afonso, A. M. (2010).** Nucleotide variability and translation efficiency of the 5' untranslated region of hepatitis a virus: update from clinical isolates associated with mild and severe hepatitis. *J Virol* **84**, 10139-10147.
- Man, O. & Pilpel, Y. (2007).** Differential translation efficiency of orthologous genes is involved in phenotypic divergence of yeast species. *Nat Genet* **39**, 415-421.
- Martin, A., Escriou, N., Chao, S. F., Lemon, S. M., Girard, M. & Wychowski, C. (1995).** Identification and site-directed mutagenesis of the primary (2A/2B) cleavage site of the hepatitis A virus polyprotein: functional impact on the infectivity of HAV RNA transcripts. *Virology* **213**, 213-222.
- Martin, A., Bénichou, D., Chao, S. F., Cohen, L. M. & Lemon, S. M. (1999).** Maturation of the hepatitis A virus capsid protein VP1 is not dependent on processing by the 3Cpro proteinase. *J Virol* **73**, 6220-6227.
- Martin, A. & Lemon, S. M. (2002).** The molecular biology of hepatitis A virus. In: *Hepatitis Viruses*. Ed. Ou, J. H. Norwell, MA, *Kluwer Academic Publishers*, pp 23-50.
- Martin, A. & Lemon, S. M. (2006).** Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology* **43**, 164-172.
- Martínez-Salas, E., Francisco-Velilla, R., Fernández-Chamorro, J., Lozano, G. & Díaz-Toledano, R. (2015).** Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions. *Virus Res* (in press) <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.012>.
- Martus, G., Nevot, M., Andres, C., Clotet, B. & Martinez, M. A. (2013).** Changes in codon-pair bias of human immunodeficiency virus type 1 have profound effects on virus replication in cell culture. *Retrovirology* **10**, 78. doi: 10.1186/1742-4690-10-78
- Midthun, K., Ellerbeck, E., Gershman, K., Calandra, G., Krah, D., Mc Caughy, M., Nalin, D. & Provost, P. (1991).** Safety and immunogenicity of a live attenuated hepatitis A virus vaccine in seronegative volunteers. *J Infect Dis* **163**, 735-739.
- Mitarai, N., Sneppen, K. & Pedersen, S. (2008).** Ribosome collisions and translation efficiency: optimization by codon usage and mRNA destabilization. *J Mol Biol* **382**, 236-245.

Moratorio, G., Costa-Mattioli, M., Piovani, R., Romero, H., Musto, H. & Cristina, J. (2007). Bayesian coalescent inference of hepatitis A virus populations: evolutionary rates and patterns. *J Gen Virol* **88**, 3039-3042.

Mueller, S., Papamichail, D., Coleman, J. R., Skiena, S. & Wimmer, E. (2006). Reduction of the rate of poliovirus protein synthesis through large-scale codon deoptimization causes attenuation of viral virulence by lowering specific infectivity. *J Virol* **80**, 9687-9696.

Nainan, O. V., Brinton, M. A. & Margolis, H. S. (1992). Identification of aminoacids located in the antibody binding sites of human hepatitis A virus. *Virology* **191**, 984-987.

Nainan, O. V., Xia, G., Vaughan, G. & Margolis, H. S. (2006). Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev* **19**, 63-79.

Ni, Y. Y., Zhao, Z., Opriessnig, T., Subramaniam, S., Zhou, L., Cao, D., Cao, Q., Yang, H. & Meng, X. J. (2014). Computer-aided codon-pairs deoptimization of the major envelope GP5 gene attenuates porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* **450**, 132-139.

Novoa, E. M. & Ribas de Pouplana, L. (2012). Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes. *Trends Gen* **28**, 574-581.

Orlinger, K. K., Kofler, R. M., Heinz, F. X., Hoenninger, V. M. & Mandl, C. W. (2007). Selection and analysis of mutations in an encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site that improve the efficiency of a bicistronic flavivirus construct. *J Virol* **81**, 12619-12629.

Parker, J. (1989). Errors and alternatives in reading the universal genetic code. *Microbiol Rev* **53**, 273-298.

Parmley, J. L. & Huynen, M. A. (2009). Clustering of codons with rare cognate tRNAs in human genes suggests an extra level of expression regulation. *PLoS Genet* **5**, e1000548.

Pérez-Sautu, U., Costafreda, M. I., Caylà, J., Tortajada, C., Lite, J., Bosch, A. & Pintó, R. M. (2011). Hepatitis A virus vaccine escape variants and potential new serotype emergence. *Emerg Infect Dis* **17**, 734-737.

Pestova, T. V., Lorsch, J. R. & Hellen, C. U. T. (2007). The mechanism of translation initiation in eukaryotes. In: *Translational Control in Biology and Medicine*. CSHL Press, New York, USA, pp 87-128.

Ping, L. H. & Lemon, S. M. (1992). Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J Virol* **66**, 2208-2216.

- Pintó, R. M., González-Dankaart, J. F., Sánchez, G., Guix, S., Gómara, M. J., García, M., Haro, I. & Bosch, A. (1998).** Enhancement of the immunogenicity of a synthetic peptide bearing a VP3 epitope of hepatitis A. *FEBS Lett* **438**, 106-110.
- Pintó, R. M., Aragonès, L., Costafreda, M. I., Ribes, E. & Bosch, A. (2007).** Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res* **127**, 158-163.
- Pintó, R. M., D'Andrea, L., Pérez-Rodríguez, F. J., Costafreda, M. I., Ribes, E., Guix, S. & Bosch, A. (2012).** Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines. *Future Microbiol* **7**, 331-346.
- Pisarev, A. V., Chard, L. S., Kaku, Y., Johns, H. L., Shatsky, I. N. & Belsham, G. J. (2004).** Functional and structural similarities between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and porcine teschovirus, a picornavirus. *J Virol* **78**, 4487-4497.
- Plant, E. P., Nguyen, P., Russ, J. R., Pittman, Y. R., Nguyen, T., Quesinberry, J. T., Kinzy, T. G. & Dinman, J. D. (2007).** Differentiating between near- and non-cognate codons in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **6**: e517.
- Powdrill, T. F. & Johnston, J. M. (1991).** Immunologic priming with recombinant hepatitis A virus capsid proteins produced in *Escherichia coli*. *J Virol* **65**, 2686-2690.
- Provost, P. J. & Hilleman, M. R. (1979).** Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* **160**, 213-221.
- Racaniello, V. R. (2007).** *Picornaviridae*, the viruses and their replication. In: *Fields Virology*. 5th ed. Eds. Knipe, D. M. & Howley, P. M. *Lippincott Williams & Wilkins, PA, USA*, pp 795-838.
- Ramakrishnan, V. (2002).** Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**, 557-572.
- Reich, E., Franklin, R. M., Shatkin, A. J. & Tatum, E. L. (1962).** Action of actinomycin D on animal cells and viruses. *Biochemistry* **48**, 1238-1245.
- Rico-Hesse, R., Pallansch, M. A., Nottay, B. K. & Kew, O. M. (1987).** Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotype. *Virology* **160**, 311-322.
- Robertson, B. H., Khanna, B., Nainan, O.V. & Margolis, H. S. (1991).** Epidemiologic patterns of wild-type hepatitis A virus determined by genetic variation. *J Infect Dis* **163**, 286-292.

Robertson, B. H., Jia, X. Y., Tian, H., Margolis, H. S., Summers, D. F. & Ehrenfeld, E. (1992a). Serological approaches to distinguish immune response to hepatitis A vaccine and natural infection. *Vaccine* **10**, S106-S109.

Robertson, B. H., Jansen, R. W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O.V., Siegl, G. & otros autores. (1992b). Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* **73**, 1365-1377.

Robertson, B. H., Jia, X. Y., Tian, H., Margolis, H. S., Summers, D. F. & Ehrenfeld, E. (1993). Antibody response to nonstructural proteins of hepatitis A virus following infection. *J Med Virol* **40**, 76-82.

Rosen, E., Stapleton, J. T. & McLinden, J. (1993). Synthesis of immunogenic hepatitis A virus particles by recombinant baculoviruses. *Vaccine* **11**, 706-712.

Sánchez, G., Pintó, R. M., Vanaclocha, H. & Bosch, A. (2002). Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J Clin Microbiol* **40**, 4148-4155.

Sánchez, G., Caballero, S., Guix, S., Bosch, A. & Pintó, R. M. (2003a). Antigenic hepatitis A virus structures may be produced in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1840-1843.

Sánchez, G., Bosch, A. & Pintó, R. M. (2003b). Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J Virol* **77**, 452-459.

Sánchez, G., Bosch, A., Gómez-Mariano, G., Domingo, E. & Pintó, R. M. (2003c). Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* **315**, 34-42.

Sánchez, G., Aragonès, L., Costafreda, M. I., Ribes, E., Bosch, A. & Pintó, R. M. (2004). Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycoporphin A of the erythrocyte membrane. *J Virol* **78**, 9807-9813.

Sanfaçon, H., Gorbalenya, A. E., Knowles, N. J. & Chen, Y. P. (2012). Order Picornavirales. In: *Virus Taxonomy, Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Eds. King, A. M., Adams, M. J., Carstens, E. B. & Lefkowitz, E. J. *Elsevier, United States of America*, 835-839.

Shah, P., Ding, Y., Niemczyk, M., Kudla, G. & Plotkin, J. B. (2013). Rate-limiting steps in yeast protein translation. *Cell* **153**, 1589-1601.

Schultz, D. E., Honda, M., Whetter, L. E., McKnight, K. L. & Lemon, S. M. (1996). Mutations within the 5' nontranslated RNA of cell culture-adapted hepatitis A virus which enhance cap-independent translation in cultured African green monkey kidney cells. *J Virol* **70**, 1041-1049.

Siegl, G. & Lemon, S. M. (1990). Recent advances in hepatitis A vaccine development. *Virus Res* **17**, 75-92.

Sjogren, M. H., Tanno, H., Fay, O., Sileoni, S., Cohen, B. D., Burke, D. S. & Feighny, R. J. (1987). Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. *Ann Intern Med* **106**, 221-226.

Skinhoj, P., Mathiesen, L. R., Kryger, P. & Moller, A. M. (1981). Faecal excretion of hepatitis A virus in patients with symptomatic hepatitis A infection. *Scand J Gastroenterol* **16**, 1057-1059.

Sobell H. M. (1985). Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci* **82**, 5328-5331.

Soerensen, M. A. & Pedersen, S. (1991). Absolute in vivo translation rate of individual codons in *Escherichia coli*: the two glutamic acid codons GAA and GAG are translated with a threefold difference in rate. *J Mol Biol* **222**, 265-280.

Sugiyama, T., Gursel, M., Takeshita, F., Coban, C., Conover, J., Kaisho, T., Akira, S., Klinman, D. M. & Ishii, K. J. (2005). CpG RNA: identification of novel single-stranded RNA that stimulates human CD14⁺ CD11c⁺ monocytes. *J Immunol* **174**, 2273-2279.

Sweeney, T. R., Dhote, V., Yu, Y. & Hellen, C. U. T. (2012). A distinct class of internal ribosomal entry site in members of the kobuvirus and proposed salivirus and paraturdivirus genera of the *Picornaviridae* **86**, 1468-1486.

Takeda, N., Tanimura, M. & Miyamura, K. (1994). Molecular evolution of the major capsid protein VP1 of enterovirus 70. *J Virol* **68**, 854-862.

Tami, C., Silberstein, E., Manangeeswaran, M., Freeman, G., Umetsu, S. E., DeKruyff, R. H., Umetsu, D. T. & Kaplan, G. G. (2007). Immunoglobulin A (IgA) is a natural ligand of hepatitis A virus cellular receptor 1 (HAVCR1), and the association of IgA with HAVCR1 enhances virus-receptor interactions. *J Virol* **81**, 3437-3446.

Tarrant, D. & von der Haar, T. (2014). Synonymous codons, ribosome speed, and eukaryotic gene expression regulation. *Cell Mol Life Sci* **71**, 4195-4206.

Tassopoulos, N. C., Papaevangelou, G. J., Ticehurst, J. R. & Purcell, R. H. (1986). Faecal excretion of Greek strains of hepatitis A virus in patients with hepatitis A and in experimentally infected chimpanzees. *J Infect Dis* **154**, 231-237.

Tenson, T. & Ehrenberg, M. (2002). Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel. *Cell* **108**, 591-594.

Teppakdee, A., Tangwitoon, A., Khemasuwan, D., Tangdhanakanond, K., Suramaethakul, N., Sriratanaban, J. & Poovorawan, Y. (2002). Cost-benefit analysis of hepatitis A vaccination in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **33**, 118-127.

Tesar, M., Harmon, S. A., Summers, D. F. & Ehrenfeld, E. (1992). Hepatitis A virus polyprotein synthesis initiates from two alternative AUG codons. *Virology* **186**, 609-618.

Tuller, T., Carmi, A., Vestsigian, K., Navon, S., Dorfan, Y., Zaborske, J., Pan, T., Dahan, O., Furman, I. & Pilpel, Y. (2010). An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation. *Cell* **141**, 344-354.

Tuller, T., Veksler-Lublinsky, I., Gazit, N., Kupiec, M., Ruppin, E. & Ziv-Ukelson, M. (2011). Composite effects of gene determinants on the translation speed and density of ribosomes. *Genome Biol* **12**, R110.

Tulloch, F., Atkinson, N. J., Evans, D. J., Ryan, M. D. & Simmonds, P. (2014). RNA virus attenuation by codon pair deoptimisation is an artefact of increases in CpG/UpA dinucleotide frequencies. *eLife* **3**, e04531. doi:10.7554.

van Weringh, A., Ragonnet-Cronin, M., Pranckeviciene, E., Pavon-Eternod, M., Kleiman, L. & Xia, X. (2011). HIV-1 modulates the tRNA pool to improve translation efficiency. *Mol Biol Evol* **28**, 1827-1834.

Vento, S., Garofano, T., Renzini, C., Cainelli, F., Casali, F., Ghironzi, G., Ferraro, T. & Concia, E. (1998). Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* **338**, 286-290.

Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E. & Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**, 344-348.

Wang X. Y., Xu, Z., Yao, X., Tian, M., Zhou, L., He, L. & Wen, Y. (2004). Immune responses of anti-HAV in children vaccinated with live attenuated and inactivated hepatitis A vaccines. *Vaccine* **22**, 1941-1945.

Wang, X., Ren, J., Gao, Q., Hu, Z., Sun, Y., Li, X., Rowlands, D. J., Yin, W., Wang, J., Stuart, D. I., Rao, Z. & Fry, E. E. (2015). Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. *Nature* **517**, 85-88.

Wasley, A., Samandari, T. & Bell, B. P. (2005). Incidence of hepatitis A in the United States in the era of vaccination. *JAMA* **294**, 194-201.

Wasley, A., Fiore, A. & Bell, B. P. (2006). Hepatitis A in the Era of Vaccination. *Epidemiol Rev* **28**, 101-111.

Weitz, M., Baroudy, B. M., Maloy, W. L., Ticehurst, J. R. & Purcell, R. H. (1986). Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. *J Virol* **60**, 124-130.

Werzberger, A., Mensch, B., Kuter, B., Brown, L., Lewis, J., Sitrin, R., Miller, W., Shouval, D., Wiens, B., Calandra, G., Ryan, J., Provost, P. & Nalin, D. (1992). A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children. *N Engl J Med* **327**, 453-457.

Whetter, L. E., Day, S. P., Elroy-Stein, O. Brown, E. A. & Lemon, S. M. (1994). Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *J Virol* **68**, 5253-5263.

WHO/IVB/10.01. (2010). The global prevalence of hepatitis A virus infection and susceptibility: a systematic review. *Immunization, vaccines and biological, World Health Organization*.

Wimmer, E., Mueller, S., Tumpey, T. M. & Taubenberger, J. K. (2009). Synthetic viruses: a new opportunity to understand and prevent viral disease. *Nature Biotech* **27**, 1163-1172.

Winokur, P. L., McLinden, J. H. & Stapleton, J. T. (1991). The hepatitis A virus polyprotein expressed by a recombinant vaccinia virus undergoes proteolytic processing and assembly into virus-like particles. *J Virol* **65**, 5029-5036.

Woolhead, C. A., McCormick, P. J. & Johnson, A. E. (2004). Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins. *Cell* **116**, 725-736.

Worobey, M., Rambaut, A. & Holmes, E. C. (1999). Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 7352-7357.

Wright, F. (1990). The effective number of codons used in a gene. *Gene* **87**, 23-29.

Yang, Z. & Nielsen, R. (2008). Mutation-Selection models of codon substitution and their use to estimate selective strengths on codon usage. *Mol Biol Evol* **25**, 568-579.

Yang, Y., Yi, M., Evans, D. J., Simmonds, P. & Lemon, S. M. (2008). Identification of a conserved RNA replication element (cre) within the 3D^{pol}-coding sequence of hepatoviruses. *J Virol* **82**, 10118-10128.

Zhang, G., Hubalewska, M. & Ignatova, Z. (2009). Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 274-280.

Zhou, T., Weems, M. & Wilke, C. O. (2009). Translationally optimal codons associate with structurally sensitive sites in proteins. *Mol Biol Evol* **26**, 1571-1580.

Zhou, Y., Callendret, B., Xu, D., Brasky, K. M., Feng, Z., Hensley, L.L., Guedj, J., Perelson, A. S., Lemon, S. M., Lanford, R. E. & Walker, C. M. (2012). Dominance of the CD4+ T helper cell response during acute resolving hepatitis A virus infection. *J Exp Med* **209**, 1481-1492.

Zouridis, H. & Hatzimanikatis, V. (2008). Effects of codon distributions and tRNA competition on protein translation. *Biophysical J* **95**, 1018-1033.

Zuker, M. & Jacobson, A. B. (1998). Using reliability information to annotate RNA secondary structures. *RNA* **4**, 669-679.

**7. ANEXO:
Artículos relacionados con
el trabajo de tesis**

Article

Hepatitis A Virus Genotype Distribution during a Decade of Universal Vaccination of Preadolescents

Lucía D'Andrea ^{1,†}, Francisco J. Pérez-Rodríguez ^{1,†}, Montserrat de Castellarnau ¹,
Sandra Manzanares ², Josep Lite ³, Susana Guix ¹, Albert Bosch ¹ and Rosa M. Pintó ^{1,*}

¹ Enteric Virus Laboratory, Department of Microbiology and Institute of Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain;

E-Mails: luciadandrea@ub.edu (L.D.); fjperez@ub.edu (F.J.P.-R.); mdecastellarnau@ub.edu (M.C.); susanaguix@ub.edu (S.G.); abosch@ub.edu (A.B.)

² Public Health Agency of Barcelona, Plaça Lesseps 1, 08023 Barcelona, Spain;

E-Mail: smanzana@aspb.cat

³ Microbiology Unit, CatLab, 08232 Viladecavalls, Spain; E-Mail: jlite@catlab.cat

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: rpinto@ub.edu;

Tel.: +34-93-4034-621; Fax: +34-93-4034-629.

Academic Editor: Tatsuo Kanda

Received: 2 February 2015 / Accepted: 23 March 2015 / Published: 25 March 2015

Abstract: A universal vaccination program among preadolescents was implemented in Catalonia, Spain, during the period of 1999–2013 and its effectiveness has been clearly demonstrated by an overall significant attack rate reduction. However, reductions were not constant over time, and increases were again observed in 2002–2009 due to the occurrence of huge outbreaks. In the following years, in the absence of large outbreaks, the attack rate decreased again to very low levels. However, an increase of symptomatic cases in the <5 age group has recently been observed. This is an unexpected observation since children younger than 6 are mostly asymptomatic. Such a long vaccination campaign offers the opportunity to analyze not only the effectiveness of vaccination, but also the influence of the circulating genotypes on the incidence of hepatitis A among the different age groups. This study has revealed the emergence of genotype IC during a foodborne outbreak, the short-lived circulation of vaccine-escape variants isolated during an outbreak among the men-having-sex-with-men group, and the association of genotype IIIA with the increase of symptomatic cases among the very young. From a public health perspective, two conclusions may be drawn: vaccination is better at an early age, and the vaccination schedule must be complete and include all recommended vaccine doses.

Keywords: hepatitis A; HAV genotypes; age-group; children; MSM; vaccine-escape variants; vaccination

Molecular Basis of the Behavior of Hepatitis A Virus Exposed to High Hydrostatic Pressure

Lucía D'Andrea,^{a,b} Francisco J. Pérez-Rodríguez,^{a,b} M. Isabel Costafreda,^{a,b} Nerea Beguiristain,^{a,b} Cristina Fuentes,^{a,b} Teresa Aymerich,^c Susana Guix,^{a,b} Albert Bosch,^{a,b} Rosa M. Pintó^{a,b}

Enteric Virus Laboratory, Department of Microbiology, School of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain^a; Enteric Virus Laboratory, Institute of Nutrition and Food Safety, Campus Torribera, University of Barcelona, Santa Coloma de Gramenet, Spain^b; CENTA, IRTA, Monells, Spain^c

Food-borne hepatitis A outbreaks may be prevented by subjecting foods at risk of virus contamination to moderate treatments of high hydrostatic pressure (HHP). A pretreatment promoting hepatitis A virus (HAV) capsid-folding changes enhances the virucidal effect of HHP, indicating that its efficacy depends on capsid conformation. HAV populations enriched in immature capsids (125S provirions) are more resistant to HHP, suggesting that mature capsids (150S virions) are more susceptible to this treatment. In addition, the monoclonal antibody (MAb) K24F2 epitope contained in the immunodominant site is a key factor for the resistance to HHP. Changes in capsid folding inducing a loss of recognition by MAb K24F2 render more susceptible conformations independently of the origin of such changes. Accordingly, codon usage-associated folding changes and changes stimulated by pH-dependent breathings, provided they confer a loss of recognition by MAb K24F2, induce a higher susceptibility to HHP. In conclusion, the resistance of HAV to HHP treatments may be explained by a low proportion of 150S particles combined with a good accessibility of the epitope contained in the immunodominant site close to the 5-fold axis.

Received 23 May 2014 Accepted 5 August 2014

Published ahead of print 8 August 2014

Editor: K. E. Wommack

Address correspondence to Rosa M. Pintó, rpinto@ub.edu.

L.D. and F.J.P.-R. contributed equally to this article.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.01693-14

Hepatitis A Virus Adaptation to Cellular Shutoff Is Driven by Dynamic Adjustments of Codon Usage and Results in the Selection of Populations with Altered Capsids

M. Isabel Costafreda,^{a,c} Francisco J. Pérez-Rodríguez,^{a,c} Lucía D'Andrea,^{a,c} Susana Guix,^{a,c} Enric Ribes,^b Albert Bosch,^{a,c} Rosa M. Pintó^{a,c}

Enteric Virus Laboratory, Department of Microbiology, School of Biology,^a Enteric Virus Laboratory, Department of Cell Biology, School of Biology,^b and Institute of Nutrition and Food Safety,^c University of Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Hepatitis A virus (HAV) has a highly biased and deoptimized codon usage compared to the host cell and fails to inhibit host protein synthesis. It has been proposed that an optimal combination of abundant and rare codons controls the translation speed required for the correct capsid folding. The artificial shutoff host protein synthesis results in the selection of variants containing mutations in the HAV capsid coding region critical for folding, stability, and function. Here, we show that these capsid mutations resulted in changes in their antigenicity; in a reduced stability to high temperature, low pH, and biliary salts; and in an increased efficacy of cell entry. In conclusion, the adaptation to cellular shutoff resulted in the selection of large-plaque-producing virus populations.

Received 10 January 2014 Accepted 13 February 2014

Published ahead of print 19 February 2014

Editor: K. Kirkegaard

Address correspondence to Rosa M. Pintó, rpinto@ub.edu.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.00087-14

Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines

Review
Future Microbiology

Rosa M Pintó^{*1,2,3}, Lucía D'Andrea^{1,2,3}, Francisco J Pérez-Rodríguez^{1,2,3},
M Isabel Costafreda^{1,2,3}, Enric Ribes^{1,4}, Susana Guix^{1,2,3} & Albert Bosch^{1,2,3}

¹Enteric Virus Laboratory, School of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

²Institute of Nutrition & Food Safety, University of Barcelona, Barcelona, Spain

³Department of Microbiology, School of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Department of Cellular Biology, School of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

*Author for correspondence: Department of Microbiology, University of Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain ■ Tel.: +34 934 034 621 ■ Fax: +34 934 034 629 ■ rpinto@ub.edu

Hepatitis A is the most common infection of the liver worldwide and is fecal-orally transmitted. Its incidence tends to decrease with improvements in hygiene conditions but at the same time its severity increases. Hepatitis A virus is the causative agent of acute hepatitis in humans and belongs to the *Hepatovirus* genus in the *Picornaviridae* family, and it has very unique characteristics. This article reviews some molecular and biological properties that allow the virus to live in a very quiescent way and to build an extremely stable capsid that is able to persist in and out of the body. Additionally, the relationship between the genomic composition and the structural and antigenic properties of the capsid is discussed, and the potential emergence of antigenic variants is evaluated from an evolutionary perspective.

10.2217/FMB.12.5 © 2012 Future Medicine Ltd

Future Microbiol. (2012) 7(3), 331–346

Virus Research 157 (2011) 19–24



Contents lists available at ScienceDirect

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres



A detailed comparative analysis on the overall codon usage patterns in Hepatitis A virus

Lucía D' Andrea^a, Rosa M. Pintó^b, Albert Bosch^b, Héctor Musto^c, Juan Cristina^{a,*}

^aLaboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

^bEnteric Virus Laboratory, Department of Microbiology, and Institute of Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain

^cLaboratorio de Organización y Evolución del Genoma, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 September 2010

Received in revised form 21 January 2011

Accepted 28 January 2011

Available online 4 February 2011

Keywords:

Hepatitis A virus

Codon usage

Evolution

ABSTRACT

Hepatitis A virus (HAV) is a hepatotropic member of the family *Picornaviridae*. HAV has several unique biological characteristics that distinguish it from other members of this family. Recent and previous studies revealed that codon usage plays a key role in HAV replication and evolution. In this study, the patterns of synonymous codon usage in HAV have been studied through multivariate statistical methods on 30 complete open reading frames (ORFs) from the available 30 full-length HAV sequences. Effective number of codons (ENC) indicates that the overall extent of codon usage bias in HAV genomes is significant. The relative dinucleotide abundances suggest that codon usage in HAV can also be strongly influenced by underlying biases in dinucleotide frequencies. These factors strongly correlated with the first major axis of correspondence analysis (COA) on relative synonymous codon usage (RSCU). The distribution of the HAV ORFs along the plane defined by the first two major axes in COA showed that different genotypes are located at different places in the plane, suggesting that HAV codon usage is also reflecting an evolutionary process. It has been very recently described that fine-tuning translation kinetics selection also contributes to codon usage bias of HAV. The results of these studies suggest that HAV genomic biases are the result of the co-evolution of genome composition, controlled translation kinetics and probably the ability to escape the antiviral cell responses.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Hepatitis A Virus: State of the Art

Rosa M. Pintó · M. Isabel Costafreda ·
Francisco J. Pérez-Rodríguez · Lucía D'Andrea ·
Albert Bosch

Received: 8 March 2010 / Accepted: 7 April 2010 / Published online: 18 June 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Hepatitis A is the most common among all hepatitis worldwide in spite of an efficient vaccine and improved hygiene. Shellfish-borne outbreaks are still of major concern causing hundreds of cases and huge economical losses in the present context of global food trade. Hepatitis A virus (HAV) is a unique picornavirus with many differences in its molecular biology including both its incapacity to induce the inhibition of the cellular protein synthesis and a highly biased and deoptimized codon usage with respect the cell. The final goal of this intriguing strategy seems to be the need for a fine-tuning control of the translation kinetics, particularly at the capsid coding region, and the underlying mechanism is the use of a right combination of common and rare codons to allow a regulated ribosome traffic rate thus ensuring the proper protein folding. Capsid folding is critical to warrant a high environmental stability for a virus transmitted through the fecal–oral route with long extracorporeal periods.

Keywords Hepatitis A · Picornavirus · Shellfish · Bivalves · Food-borne outbreaks

Introduction

Four hundred years b.c., Hippocrates described an illness characterized by episodes of jaundice that could probably correspond to a viral hepatitis. Two thousand three hundred years later, at the beginning of the twentieth century, the term “infectious hepatitis” was defined and associated to a kind of infectious jaundice occurring in epidemics. In the early 1940s two separate entities were identified “infectious” and “serum” hepatitis, and from 1965 to nowadays the major etiological agents (hepatitis A, B, C, D and E viruses) of viral hepatitis have been identified. While all viral hepatitis are infectious the previously “infectious” and “serum” terms refer to the mode of transmission. The “infectious” type corresponds to those hepatitis transmitted through the fecal–oral route, or enteric hepatitis, and the “serum” hepatitis to those parenterally transmitted. The enteric hepatitis includes two types: hepatitis A and E which can be food borne and waterborne. The present chapter will focus on both the disease and the etiological agent of hepatitis A.