

Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

**Caracterización molecular de la resistencia  
a ribavirina en el virus de la fiebre aftosa.  
Implicaciones para mutagénesis letal de virus**

**TESIS DOCTORAL**

Macarena Sierra García

Madrid, 2007

Memoria presentada por la Licenciada en Farmacia Macarena Sierra García para optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Junio, 2007.

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, bajo la dirección del Dr. Esteban Domingo Solans y financiado por una beca Predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia.

## Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi director de Tesis, el Dr. Esteban Domingo el haber confiado en mí desde el principio y haberme concedido la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral en un laboratorio de tan alto nivel científico y bajo su dirección. A la Dra. Cristina Escarmís, por tener siempre mil momentos para ayudarme y aconsejarme en todo lo que he necesitado.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio 303. Gracias a los que ya no están. En especial a Claudia, gracias por ser la mejor post-doctoral que se puede tener, por hacerme sentir tan bien en un sitio nuevo y enseñarme con tanta profesionalidad y cariño. Gracias a Ana, Gema, Clara y Juanillo. Gracias a los que continúan: A mi Moni (mil gracias por estar en el labo), a Vero y Celia (mis mayores favoritas), a Samuel (si al final vas a ser majo...), a Ana y Mercedes, Tania, Mónica (Perú!) Marta y Noemí. Gracias por la ayuda "proteica" de Armando y Rubén (Gracias Rubén, porque te correspondería estar también en otro apartado...). Gracias a todos por haberme ayudado siempre que lo he necesitado. Gracias a todos por los buenos (e incluso los no tan buenos) momentos y haber "soportado" mi escritura de Tesis...

Gracias al laboratorio 207, a toda la gente que conocí allí y que me acogió con tanto cariño en mis comienzos en la capital. Gracias a Alberto, Cristina, Miguel; gracias a Noelia, Esther, Laura (sois geniales) y por supuesto a Pepe. En especial, gracias a Sonia por haber compartido algo mas.

Gracias a Cecilio y M<sup>a</sup> Carmen por todo su apoyo y cariño durante estos años de Tesis (y durante mas tiempo!). Gracias a mi prima Saleta S.A., porque sin ella seguramente yo no estaría aquí.

Gracias a mi gente de Granada. A mis amigos de la facultad, gracias a todos por el recuerdo tan bonito que guardo de aquellos maravillosos años...Juan Diego, gracias porque cada vez que te veo parece que te vi el día anterior (venga, que tu eres el próximo!). A Elena S, Raquel, lejos, pero muy cerca. Gracias a mi prima Saleta por haber compartido tantas experiencias (incluso el plásmido negativo) y tantas risas conmigo. Te voy siguiendo los pasos, ya casi soy Doctora!!! (A ver lo próximo...). Gracias a Carmen porque tu has sido también parte de esta Tesis. Gracias a mis amigas de siempre y para siempre: A Ana D, Ana O, Elena y Malu. Gracias porque en parte soy como soy gracias a vosotras. Gracias porque a pesar de las distancias y distanciamientos se que os tengo cuando os necesite. Os quiero mucho.

Gracias a mi gente de Madrid, a los que he conocido aquí y a los que (gracias a Dios) me traje conmigo a la capital. Gracias a la gente que he conocido en el CBM. Gracias a M<sup>a</sup> Angeles y Nuncia, por tantos desayunos que me habéis aguantado (y tantas puntas autoclavadas!) y a Pepa por hacerme sentir tantas veces mejor. Gracias a todos los "cultiveros" ("pachis", "mauris", y a todo el 202) porque a pesar de tantos plagues me quedo con los buenos momentos. Gracias a Arancha, Elena y Prado, por hacer que tras las comidas y cafés del CBM me apetezcan tintillos fuera de él; me ha encantado haberos conocido. Gracias a Belén y a David porque se que encima del "pop&roll" tengo otra casa. Gracias a Bea y Sara, habéis sido "fundamentales" en mi estancia madrileña. Gracias a Merche, mil gracias por venirme a Madrid. En especial dar las gracias a mi Iván y a mi Mary (María), gracias porque con vosotros he confirmado que la amistad no se la lleva el tiempo, y desde ya, se que la distancia tampoco se la va a llevar. Os voy a echar muchísimo de menos. Os quiero muchísimo.

Gracias a Carola, Gloria y a Mónica. Gracias por haber sido la causa de hacerme sentir en Madrid como en casa y por formar parte de mi familia. Sois sin duda lo mejor de estos cuatro años. Gracias Carola, porque tendría que escribir otra Tesis para dar las gracias por haberte conocido. Gracias, sencillamente por ser como eres.

Gracias a mi graaan familia: tíos, primos, "postizos"...En especial gracias a mi abuela, por estar tan guapa y ser la más joven y mejor abuela del mundo. A mi hermano Manolo por que cada vez te echo mas de menos (I love you too...) y a Davinia por cuidármelo tan bien. Gracias a Curro y Noelia porque sois geniales y gracias porque María es el mejor ejemplo de que pequeñas cosas hacen la vida más grande; María, mil gracias por venir. A mi hermana Sale, gracias por compartir conmigo todo lo que ha significado esta Tesis, tanto lo bueno como lo malo; Otro ejemplo de que las cosas que se desean con fuerza acaban saliendo bien. Os quiero muchísimo a todos.

Me gustaría dar las gracias en especial a mis padres. A ellos les dedico esta Tesis porque sin ellos no sería como soy ni estaría donde estoy. Gracias por vuestra educación, apoyo, cariño, ternura y comprensión. Gracias por que me encanta quereros tanto y por esta razón, esta Tesis es por y para vosotros.

## Abreviaturas

ACM	Anticuerpo monoclonal
ADP	Adenosina-5'-difosfato
AMP	Adenosina-5'-monofosfato
APRT	Adenina fosforibosiltransferasa
AK	Adenosina kinasa
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
AZC	5-azacitidina
BHK	Células de riñón de hamster
BSA	Seroalbúmina bovina
cDNA	DNA copia
cis	Elemento que actúa en <i>cis</i>
<i>cre</i>	Elemento de replicación en <i>cis</i>
C-terminal	Carboxi-terminal
CVB3	Virus coxsackie B3
dATP	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
DEAE	Dietilaminoetil
dGTP	2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
DMEM	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
e.c.p.	Efecto citopático
EDTA	Etilén diamino tetraacetato
FA	Fiebre aftosa
FU	5-fluorouracilo
FUTP	5-fluoruridina-5'-trifosfato
Fr.	Frecuencia
G	Cloruro de guanidino
GBV-B	Virus GB-B

GDP	Guanosina-5'-difosfato
GMP	Guanosina-5'-monofosfato
GUHCl	Hidrocloruro de guanidino
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HAART	Terapia antirretroviral altamente activa
HPGRT	Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa
h.p.i.	Horas post-infección
IFN	Interferon
IL	Interleukina
IMP	Inosín monofosfato
IMPDH	Inosín monofosfato deshidrogenasa
IPTG	Isopropiltio- $\beta$ -D-galactósido
IRES	Sitio interno de entrada de ribosomas
<i>lacZ</i>	Gen que codifica para $\beta$ -galactosidasa
LB	Luria-Bertani
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocítica
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
Mn <sup>2+</sup>	Manganeso
MPA	Ácido micofenólico
m.d.i.	Multiplicidad de infección
MOPS	Ácido 3N-morfolín-propil-sulfónico
Ni-NTA	Níquel-Ácido nitriloacético
NPP	Nucleósido de purina fosforilasa
N-terminal	Amino-terminal
NTP	Ribonucleósido-5'-trifosfato
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PDB	Banco de datos de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> )
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PEI	polietilendiamina
PEG	Pegilado
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Poli(A)	Poliadenilato
Poli(C)	Policitidilato
poli-His	Polihistidinas

Poli(U)	Poliuridilato
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PPi	Pirofosfato
PV	Poliovirus
R	Ribavirina
RDP	Ribavirina-5'-difosfato
RMP	Ribavirina-5'-monofosfato
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RpRd	RNA polimerasa dependiente de RNA
RR	Ribonucleótido reductasa
RT	Retrotranscriptasa
RTP	Ribavirina-5'-trifosfato
RT-PCR	Reacción de transcripción inversa seguida de amplificación por PCR
SARS	Síndrome respiratorio severo agudo
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sn	Entropía normalizada de Shannon
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Sym/sub	<i>Symmetrical substrate</i>
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletilenediamina
TLC	Cromatografía en capa fina ( <i>Thin layer chromatography</i> )
Th1/2	T-helper 1/2
UFPs	Unidades formadoras de placa
UMP	Uridina-5'-monofosfato
UTP	Uridina-5'-trifosfato
UTR	Región genómica no codificante
VFA	Virus de la fiebre aftosa
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
WT	“wild-type”
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactósido

## Códigos de una y tres letras de los aminoácidos

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V



# Índice

## Página

<b>1.- Resumen en inglés (Summary).....</b>	<b>1</b>
<b>2.- Introducción.....</b>	<b>3</b>
2.1.- Variabilidad genética de virus RNA. Cuasiespecies víricas.....	3
2.1.1.- Bases moleculares de la variabilidad genética de virus RNA.....	3
2.1.2.- Eficacia biológica relativa de virus (“fitness”).....	6
2.1.2.1.- Concepto de “fitness”.....	6
2.1.2.2.- Procesos de pérdida de “fitness”.....	6
2.1.2.3.- Procesos de ganancia de “fitness”.....	8
2.1.2.4.- Perturbaciones del “fitness” durante la replicación viral: influencia del espectro de mutantes.....	8
2.1.3.- Implicaciones biológicas de la estructura en cuasiespecies.....	9
2.2.- Catástrofe de error y mutagénesis letal como nueva estrategia antiviral.....	11
2.2.1.- Concepto de catástrofe de error.....	11
2.2.2.- Evidencias experimentales de la entrada de virus en catástrofe de error.....	11
2.2.2.1.- Evidencias en cultivos celulares.....	12
2.2.2.2.- Evidencias <i>in vivo</i> .....	12
2.2.2.3.- Evidencias experimentales de catástrofe de error con el virus de la fiebre aftosa, virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón y virus de la inmunodeficiencia humana .....	13
2.3.- El virus de la fiebre aftosa (VFA) como modelo para investigaciones sobre mutagénesis letal.....	13
2.3.1.- La fiebre aftosa y el virus causal.....	13
2.3.2.- Organización genómica y proteínas codificadas por el virus de la fiebre aftosa.....	14
2.4.- Traducción del genoma viral y procesamiento proteolítico de la poliproteína viral...	18
2.5.- Replicación del genoma del virus de la fiebre aftosa.....	19
2.6.- Las polimerasas de ácidos nucleicos.....	20
2.6.1.- La polimerasa del virus de la fiebre aftosa.....	21
2.7.- La ribavirina y su acción mutagénica sobre el virus de la fiebre aftosa.....	26
2.7.1.- Metabolismo de la ribavirina.....	28

2.7.2.- Mecanismo de acción de la ribavirina.....	30
2.7.2.1.- Inhibición de la inosín monofosfato deshidrogenasa.....	30
2.7.2.2.- Inhibición del “capping”.....	31
2.7.2.3.- Inhibición directa de la polimerasa viral.....	31
2.7.2.4.- Inmunomodulación.....	32
2.7.2.5.- Mutagénesis letal.....	32
2.7.2.5.1.- Apareamientos incorrectos originados por la ribavirina..	33
2.7.3.- Resistencia a ribavirina.....	34

### **3.- Objetivos.....** 37

### **4.- Materiales y Métodos.....** 39

4.1.- Cultivo de células eucarióticas.....	39
4.1.1.- Descongelación de células.....	39
4.1.2.- Congelación de células.....	40
4.2.- Virus.....	40
4.3.- Agentes mutagénicos y agentes antivirales.....	41
4.4.- Infecciones de células BHK-21 por el virus de la fiebre aftosa.....	42
4.4.1.- Infecciones en medio líquido en ausencia de agentes mutagénicos y agentes antivirales.....	42
4.4.2.- Infecciones en medio líquido en presencia de agentes mutagénicos y antivirales.....	42
4.4.3.- Plaqueo de virus en medio de agar semisólido en células BHK-21.....	43
4.5.- Extracción de RNA vírico.....	43
4.6.- Obtención de cDNA y amplificación por RT-PCR de RNA vírico.....	44
4.7.- Purificación de fragmentos de PCR.....	46
4.8.- Secuenciación de DNA.....	46
4.9.- Cuantificación de moléculas de RNA vírico mediante PCR a tiempo real.....	47
4.10.- Determinación de la eficacia biológica relativa de pMT28-3D(M-M296I) con respecto a pMT28-3D(M) .....	48
4.11.- Clonaje molecular.....	49
4.11.1.- Clonaje molecular para el análisis de cuasiespecie del virus de la fiebre aftosa.....	49
4.11.2.- Mutagénesis dirigida mediante PCR.....	53

4.12.- Transcripción de plásmidos.....	56
4.13.- Transfección con RNA de transcrito de clones infecciosos.....	56
4.14.- Determinación de la frecuencia de mutación y la entropía normalizada de Shannon de los espectros de mutantes de las poblaciones virales analizadas.....	56
4.15.- Clonaje de polimerasas mutantes del virus de la fiebre aftosa en el vector de expresión pET-28a.....	57
4.15.1.- Obtención de 3D(M) y 3D(M-M296I) .....	57
4.15.2.- Obtención de 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I) .....	58
4.16.- Expresión en <i>E. coli</i> de polimerasas recombinantes del virus de la fiebre aftosa.....	59
4.17.- Purificación de polimerasas del virus de la fiebre aftosa expresadas en bacterias.....	60
4.18.- Ensayos de actividad de la polimerasa del virus de la fiebre aftosa (3D).....	61
4.19.- Ensayos de uridilación del péptido VPg.....	62
4.20.- Preparación de complejos heteropoliméricos molde-iniciador.....	63
4.20.1.- Purificación de complejos molde-iniciador.....	63
4.20.2.- Marcaje en 5' de complejos molde-iniciador.....	64
4.20.3.- Hibridación de complejos molde-iniciador.....	64
4.21.- Ensayos de retardo en gel.....	64
4.22.- Ensayos de extensión de moldes heteropoliméricos.....	65
4.22.1.- Análisis de los productos.....	66
4.23.- Ensayos de extensión de moldes homopoliméricos.....	67
4.23.1.- Análisis de los productos.....	68
4.24.- Localización de los cambios de aminoácido en la estructura tridimensional de la polimerasa del virus de la fiebre aftosa.....	69
4.25.- Disoluciones y Tampones.....	69
<b>5.- Resultados.....</b>	<b>71</b>

5.1.- Selección y caracterización biológica de variantes del virus de la fiebre aftosa con menos sensibilidad a ribavirina.....	71
5.1.1.- Pases seriados de poblaciones del virus de la fiebre aftosa en presencia de concentraciones crecientes de ribavirina.....	71
5.1.2.- Efecto de la ribavirina en la producción viral de poblaciones del virus de la fiebre aftosa.....	72

5.1.3.- Secuenciación de la región que codifica la polimerasa y evolución de la infectividad de poblaciones del virus de la fiebre aftosa.....	74
5.1.4.- Curvas de crecimiento viral de pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I) en ausencia y presencia de ribavirina.....	78
5.1.5.- Ensayos de “fitness” entre pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I) en ausencia y presencia de ribavirina.....	79
5.1.6.- Efecto de la ribavirina en la producción viral de pMT28 y pMT28-3D(M296I) en un único ciclo de infección .....	82
5.1.7.- Comparación de la reducción de infectividad y de la cantidad de RNA de pMT28 y pMT28-3D(M296I) en presencia de cantidades crecientes de ribavirina...	83
5.1.8.- Análisis del espectro de mutantes de poblaciones del virus de la fiebre aftosa obtenidas tras infecciones citolíticas en presencia de ribavirina.....	85
5.1.9.- Análisis del mecanismo de resistencia a ribavirina del virus de la fiebre aftosa M296I.....	88
5.1.9.1.- Análisis del espectro de mutantes de poblaciones generadas por pMT28 y pMT28-3D(M296I) en ausencia y presencia de ribavirina.....	88
5.1.9.2.- Efecto de los mutágenos 5-fluorouracilo y 5-azacitidina en la producción viral de pMT28 y pMT28-3D(M296I).....	92
5.1.9.3.- Efecto del agente antiviral cloruro de guanidinio sobre la viral de pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I).....	93
5.1.9.4.- Generación de mutaciones en presencia de cloruro de guanidinio por pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I).....	94
5.1.10.- Pases seriados de poblaciones del virus de la fiebre aftosa que expresan 3D M296I en presencia de 5-fluorouracilo.....	96
5.2.- Polimerasa del virus de la fiebre aftosa con la sustitución M296I. Caracterización Bioquímica y efecto de la sustitución.....	99
5.2.1.- Actividad enzimática de la polimerasa mutante M296I.....	99
5.2.2.- Capacidad de unión de la polimerasa M296I a un molde heteropolimérico de RNA.....	100
5.2.3.- Efecto de la sustitución M296I en la polimerasa del virus de la fiebre aftosa en la incorporación de ribavirina-5´-monofosfato.....	102
5.2.3.1.- Ensayos de extensión de moldes heteropoliméricos.....	102
5.2.3.2.- Ensayos de extensión de moldes homopoliméricos.....	106
5.3.- Caracterización biológica y bioquímica de las variantes G62S y G62S-M296I de la	

polimerasa del virus de la fiebre aftosa.....	110
5.3.1.- Caracterización biológica de pMT28-3D(G62S) y pMT28-3D(G62S-M296I)	111
5.3.1.1.- Efecto de la mutación G62S en la replicación viral.....	112
5.3.2.- Caracterización bioquímica de las polimerasas 3D(G62S) y	
3D(G62S-M296I) del virus de la fiebre aftosa.....	115
<b>6.- Discusión.....</b>	<b>121</b>
6.1.- Mutagénesis letal: una nueva estrategia antiviral basada en el entendimiento de la	
dinámica de las cuasiespecies.....	121
6.2.- 3D(M296I): una nueva polimerasa de picornavirus con menor sensibilidad a	
ribavirina.....	122
6.3.- Análisis del mecanismo de resistencia a ribavirina en el virus de la fiebre aftosa.....	124
6.4.- El comportamiento evolutivo del virus de la fiebre aftosa en respuesta al	
tratamiento con ribavirina y su concordancia con los datos bioquímicos.....	126
6.5.- Localización estructural de la posición M296 en la polimerasa del virus de la fiebre	
aftosa. Implicaciones en resistencia a ribavirina.....	127
6.6.- Mutantes de la polimerasa del virus de la fiebre aftosa en el proceso de entrada en	
catástrofe de error.....	130
6.7.- Las polimerasas de picornavirus incluyen al menos dos sitios que afectan a la	
incorporación de ribavirina-5'-monofosfato.....	131
6.8.- Efecto de la mutación G62S en la polimerasa del virus de la fiebre aftosa.....	132
6.9.- Perspectivas de la catástrofe de error como estrategia antiviral.....	133
<b>7.- Conclusiones.....</b>	<b>137</b>
<b>8.- Bibliografía.....</b>	<b>139</b>
<b>9.- Anexo.....</b>	<b>163</b>
<b>10.- Publicaciones.....</b>	<b>165</b>

## 1.- Resumen en inglés (Summary)

RNA virus populations are complex distributions of closely related but non-identical variant genomes termed quasispecies. The large heterogeneity in quasispecies is due to the low fidelity of viral RNA polymerases and the lack of error-repair activities during replication. Studies on genome replication with high error rates predict the existence of an error threshold above which the maintenance of the genetic information would not be possible. The quasispecies structure would be lost when the error rate of replication crosses the error threshold, in a process that has been termed entry into error catastrophe. This fact opens interesting possibilities for the design of a new antiviral strategy based on inducing viral error catastrophe by forcing viruses to replicate in the presence of mutagens. The term *lethal mutagenesis* is referred to as viral extinction through error catastrophe. A critical question for the application of error catastrophe is whether mutations can occur that render viruses resistant to mutagenic agents. The main objective of this Ph. D. Thesis is to understand the mechanisms underlying resistance of RNA viruses to mutagenic agents and the evolutionary implications of quasispecies dynamics.

The nucleoside analogue ribavirin (R) is mutagenic for foot-and-mouth disease virus (FMDV). We have selected FMDV with amino acid substitution M296I in the viral polymerase (3D) by passaging FMDV in the presence of increasing concentrations of R. Measurements of progeny production and viral fitness with chimeric viruses in the presence and absence of R documented that 3D substitution M296I conferred FMDV a selective replicative advantage in the presence of R but not in the absence of R. Purified mutant polymerase with I296 showed a decreased capacity to use ribavirin triphosphate (RTP) as substrate as compared with the wild type enzyme. The results suggest that M296I has been selected because it attenuates the mutagenic activity of R on FMDV. Replacement M296I is located within a highly conserved stretch in picornaviral polymerases, which includes residues that interact with template-primer and with the incoming nucleotide, according to the three-dimensional structure of FMDV 3D. Given that a 3D substitution, distant from M296I, was associated with resistance to R in poliovirus, the results indicate that picornaviral polymerases include different sites that can alter the interaction of the enzyme with mutagenic nucleoside analogues. Implications for lethal mutagenesis are discussed.

## **2.- Introducción**

### **2.1.- Variabilidad genética de virus RNA. Cuasiespecies víricas.**

#### **2.1.1.- Bases moleculares de la variabilidad genética de virus RNA**

Los virus que poseen RNA como material genético son los más abundantes en la biosfera, constituyendo más del 70% de los virus patógenos que infectan organismos superiores. Son los causantes de un gran número de enfermedades en el hombre como gripe, sarampión, varias formas de hepatitis, poliomielitis, SIDA, enfermedades de gran importancia veterinaria como la fiebre aftosa (FA), y otras denominadas “emergentes” como las fiebres hemorrágicas asociadas a hantavirus, arenavirus o filovirus (Nichol y cols. 1993; Morse 1994; Duarte y cols. 1994b; Murphy 1994; Murphy y Nathanson 1994; Weaver 1998).

Los virus RNA se caracterizan por tener una elevada variabilidad genética. Esta variabilidad se debe principalmente a la velocidad con la que replican y a las altas tasas de error durante la replicación (Batschelet y cols. 1976; Drake 1993; Drake y Holland 1999). Estudios cinéticos han determinado que se producen del orden de  $10^{10}$  a  $10^{11}$  nuevos viriones por día en un individuo infectado por VIH-1 o VHC (Coffin y cols. 1995; Ho y cols. 1995; Neumann y cols. 1998).

Los valores de tasa de mutación en la replicación de virus RNA se han estimado en  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  errores por nucleótido copiado (Batschelet y cols. 1976; Drake y Holland 1999; Domingo 2007), un valor muy superior a los  $10^{-8}$  a  $10^{-11}$  errores por nucleótido copiado estimados para los procesos normales de replicación de DNA celular (Kunkel y Alexander 1986; Drake 1991; Echols y Goodman 1991).

Los procesos de recombinación (especialmente en virus RNA de polaridad positiva) (Agol 2006; Simmons y cols. 2006) proveen a los virus RNA de un mecanismo adaptativo adicional a las altas tasas de mutación (Mikkelsen y Pedersen 2000; Domingo 2007).

Los reordenamientos génicos en virus de genoma segmentado también son un factor de la variabilidad. El reordenamiento de segmentos procedentes de diferentes cepas del virus de la gripe ha sido la causa de las grandes epidemias de esta enfermedad a lo largo del siglo XX (Webster 1999).

Existen al menos tres factores que contribuyen a la mayor tasa de mutación de los virus RNA:

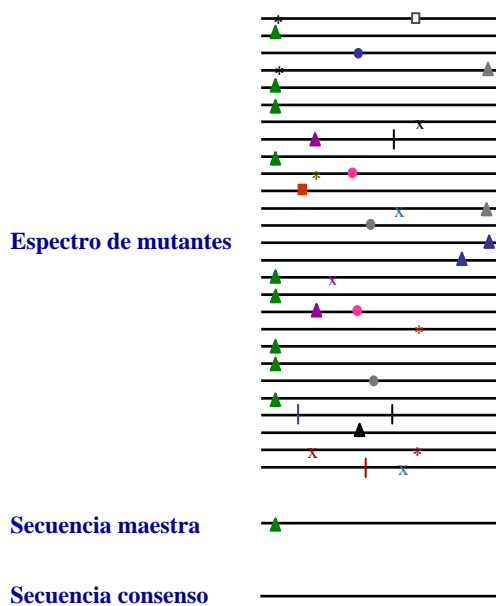
(1) Limitada fidelidad de copia (incorporación de nucleótido correcto) de las RNA replicasas y retrotranscriptasas.

(2) Ausencia de actividad correctora de errores de las replicasas de RNA (actividad exonucleasa 3'→5'), presente en varias DNA polimerasas celulares (Bernad y cols. 1989). La ausencia de esta actividad en RNA replicasas ha sido documentada tanto por métodos bioquímicos (Steinhauer y cols. 1992; Coffin y cols. 1997) como estructurales (Kohlstaedt y cols. 1992; Hansen y cols. 1997; Bressanelli y cols. 1999; Ferrer-Orta y cols. 2006b).

(3) Ausencia de mecanismos celulares de reparación post-replicativa que actúan sobre DNA de doble banda pero no sobre híbridos RNA-DNA o intermediarios replicativos de RNA bicatenarios (Friedberg y cols. 2006).

Como consecuencia de su elevada variabilidad genética, las poblaciones de virus RNA son distribuciones dinámicas complejas de mutantes diferentes aunque relacionados entre sí. Estas distribuciones se denominan cuasiespecies virales (**Figura 2.1**) y los mutantes que las componen están sometidos a un continuo proceso de variación genética, competición y selección. El concepto teórico de cuasiespecies fue propuesto inicialmente por Eigen, Schuster y sus colaboradores como un nuevo modelo de evolución molecular para describir la estructura poblacional y adaptabilidad de replicones primitivos (Eigen 1971; Eigen y Schuster 1979; Eigen y cols. 1988; Biebricher y Eigen 2006). Las primeras demostraciones de la organización en cuasiespecies de virus RNA fueron la del fago Q $\beta$ , la del virus de la fiebre aftosa (VFA) y la del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Domingo y cols. 1978; Domingo y cols. 1980; Holland y cols. 1982; Sobrino y cols. 1983). Hasta el momento, los virus RNA examinados a nivel poblacional muestran un complejo espectro de mutantes y evolucionan tal como predice la dinámica de cuasiespecies (Domingo 2006; Domingo y cols. 2001; Domingo y cols. 2003; Figlerowicz y cols. 2003; Domingo 2007). Se han descrito casos de virus DNA que parecen también tener un comportamiento de cuasiespecies al igual que los virus RNA (Isnard y cols. 1998; López-Bueno y cols. 2006; Ge y cols. 2007).





**Figura 2.1. Esquema de la estructura en cuasiespecies de los virus RNA.** Se representa una distribución heterogénea de genomas, típica de los virus RNA. Las líneas representan genomas virales y los símbolos sobre las líneas representan mutaciones. Debajo del espectro de mutantes se indica la secuencia maestra y la secuencia consenso o promedio de la distribución.

Las cuasiespecies virales se representan mediante una secuencia consenso y un espectro de mutantes (**Figura 2.1**). La secuencia consenso es la que presenta en cada posición el nucleótido más frecuente en el conjunto de genomas de la población y puede no estar representada en el espectro de mutantes de la población. Las cuasiespecies estables suelen estar dominadas por una secuencia más frecuente en el espectro de mutantes, de mayor eficacia biológica, que se denomina secuencia maestra y que puede o no coincidir con la secuencia consenso (Biebricher y Eigen 2006).

La evolución de las cuasiespecies víricas está dirigida por la selección positiva, que promueve la imposición de los variantes más ventajosos para un determinado entorno, por la selección negativa, que elimina o mantiene en baja proporción los mutantes menos aptos de la población, y por efectos de deriva genética, por los que un variante puede ser amplificado y llegar a ser dominante, independientemente de su eficacia biológica (Domingo y Holland 1994; Domingo 2006).

## **2.1.2.- Eficacia biológica relativa de virus (“fitness”)**

### **2.1.2.1.- Concepto de “fitness”**

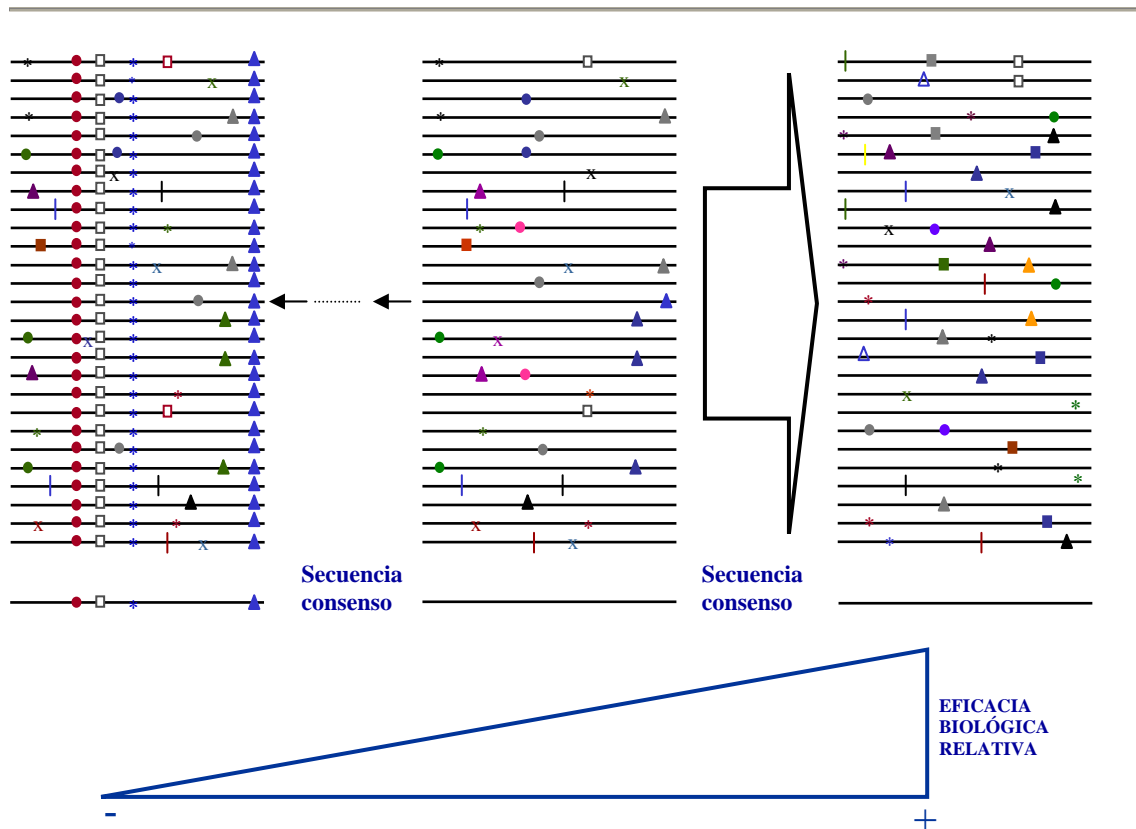
Se denomina eficacia biológica (“fitness”) al grado de adaptación de un organismo a su entorno. Para los virus RNA, se ha definido la eficacia biológica como su capacidad para producir progenie infecciosa en un determinado ambiente (Holland y cols. 1991; Martínez y cols. 1991; Domingo y Holland 1997; Domingo y cols. 2003; Quiñones-Mateu y cols. 2006). Esta aproximación permite establecer valores de eficacia biológica relativa realizando experimentos de competición mediante infecciones con mezclas de dos virus que se distinguen fenotípicamente o genotípicamente. El valor de eficacia biológica siempre es relativo a un virus de referencia y se refiere a un contexto ambiental definido.

### **2.1.2.2.- Procesos de pérdida de “fitness”**

Cuando el tamaño poblacional que participa en la siguiente ronda de replicación de un virus es muy reducido respecto al tamaño total disponible (cuello de botella poblacional), se produce la amplificación de subpoblaciones de genomas independientemente de su adaptación o ventaja selectiva en el entorno, lo que puede dar lugar a la fijación de genomas con mutaciones en la secuencia consenso de la población viral. Dado que la probabilidad de fijar mutaciones deletéreas es mayor que la probabilidad de fijar mutaciones beneficiosas, sucesivos cuellos de botellas poblacionales ocasionarán descensos en la eficacia biológica. Este proceso se conoce como trinquete de Muller (Muller 1964), que establece que en organismos asexuales se producirán pérdidas en la eficacia biológica como resultado de la acumulación de mutaciones deletéreas cuando los mecanismos compensatorios, como el sexo o la recombinación, estén impedidos (**Figura 2.2**).

La actuación del trinquete de Muller se ha demostrado experimentalmente con el bacteriófago  $\Phi 6$  (Chao 1990), el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Duarte y cols. 1992; Clarke y cols. 1993), el VFA (Escarmís y cols. 1996, 1999, 2002; Lázaro y cols. 2002, 2003), el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (Yuste y cols. 1999, 2000), y el virus del grabado del tabaco (de la Iglesia y Elena 2007) (revisión en

Escarmís y cols. 2006). Otro mecanismo por el cual las poblaciones virales pierden eficacia biológica y se acercan a la extinción es el aumento en la frecuencia de mutación durante la replicación mediante el empleo de agentes mutagénicos. Este concepto se denomina mutagénesis letal y se detalla en el apartado 2.2.



**Figura 2.2. Influencia del tamaño poblacional en la eficacia biológica de las poblaciones virales.**

Se representa una cuasi-especie inicial en el centro, la cual puede evolucionar hacia aumentos de eficacia biológica (flecha ancha) al ser sometida a replicación con grandes tamaños poblacionales, o hacia disminuciones de eficacia biológica (flechas pequeñas) al ser sometida a cuellos de botella poblacionales sucesivos (que experimentalmente se realizan mediante pases placa a placa). Las líneas representan genomas virales y los símbolos sobre las líneas representan mutaciones. Las secuencias consenso se muestran debajo de los correspondientes espectros de mutantes. Los pases con grandes tamaños poblacionales favorecen una optimización de la población viral con el consiguiente incremento de la eficacia biológica relativa del virus, mientras que los pases placa a placa dan lugar a una acumulación de mutaciones deletéreas y una bajada de la eficacia biológica relativa del virus, como se representa en el triángulo de la parte inferior de la figura. (Esquema basado en numerosos estudios revisados en Domingo y cols. 2001; Domingo 2006).

### **2.1.2.3.- Procesos de ganancia de “fitness”**

En el caso de infecciones con elevado tamaño poblacional de virus en un ambiente constante, la selección positiva de los variantes más eficaces que se generan durante la replicación permite la ganancia de eficacia biológica (Novella y cols. 1995; Escarmís y cols. 1999) (**Figura 2.2**).

### **2.1.2.4.- Perturbaciones del “fitness” durante la replicación viral: influencia del espectro de mutantes**

Los clones biológicos aislados a partir de una cuasiespecie suelen presentar un valor de “fitness” inferior al de la cuasiespecie en su conjunto (Domingo y cols. 1978; Duarte y cols. 1994a). Asimismo, la selección de mutantes virales a partir de una población puede generar subpoblaciones virales que mostrarán menor eficacia biológica en ausencia de la presión selectiva. Un ejemplo es la dramática pérdida de eficacia biológica que se produjo en el VFA cuando se seleccionaron mutantes resistentes a anticuerpos policlonales (Borrego y cols. 1993). La eficacia biológica de una cuasiespecie no es la eficacia media de sus componentes, sino que la población viral en su conjunto se comporta como una unidad de selección. Ello ha sido documentado con distintos sistemas experimentales, tanto en cultivo celulares como *in vivo*, que han apoyado las predicciones teóricas sobre la importancia del espectro de mutantes para determinar las propiedades biológicas de los virus (Eigen y Biebricher 1988; Eigen 1993, 1996; Domingo y cols. 2001; Borrego y cols. 1993; Baranowski y cols. 2000; Ruíz-Jarabo y cols. 2000, 2002; Miller y Larder 2001; Pariente y cols. 2003; Pfeiffer y Kirkegaard 2003, 2005a; Vignuzzi y cols. 2006; Perales y cols. 2007).

La evolución de un mutante dentro de una cuasiespecie puede estar condicionada por el espectro de mutantes que le rodea. Experimentos con VSV pusieron de manifiesto que un clon mutante de alta eficacia biológica sólo pudo llegar a imponerse en la cuasiespecie cuando su frecuencia superó un valor mínimo; si su frecuencia era inferior a un valor umbral, el mutante era suprimido por el espectro de mutantes circundante (de la Torre y Holland 1990). Se han descrito otros casos de supresión de

mutantes individuales por el espectro de mutantes tanto *in vivo* como en cultivos celulares (recopilado en Domingo 2006).

### **2.1.3.- Implicaciones biológicas de la estructura en cuasiespecies**

Las cuasiespecies víricas representan importantes reservorios de variantes, tanto por su cantidad en el espectro de mutantes de la población, como por el potencial para generar nuevos mutantes durante la replicación viral. Esta característica de la estructura en cuasiespecies fue destacada tanto en los estudios teóricos iniciales (Eigen 1971; Eigen y Schuster 1979) como en las primeras descripciones de los virus como cuasiespecies (Domingo y cols. 1985; Domingo cols. 1988; Wimmer y cols. 1993). De este modo, la alta tasa de error proporciona a los virus RNA un poderoso mecanismo para evadir situaciones ambientales adversas, como son la respuesta inmune, o presencia de agentes antivirales, entre otras.

La rápida evolución antigénica de los virus RNA obliga a la actualización de vacunas para prevenir la enfermedad causada por sucesivas variantes virales, siendo la vacunación contra la gripe el caso más representativo (Webster y cols. 1982; Domingo y cols. 1997; Lemon 1997a, b).

Las mutaciones asociadas a resistencia a agentes antivirales se generan como componentes del espectro de mutantes y pueden convertirse en dominantes en presencia del agente inhibidor. El ejemplo más dramático es la creciente dominancia de mutantes de VIH-1 resistentes (o con menor sensibilidad) a inhibidores antirretrovirales (Larder 1994; Richman 1994; Coffin 1995; Domingo y cols. 2001). Estos mutantes preexisten en la población, incluso antes de la exposición al inhibidor (Nájera y cols. 1995; Coffin y cols. 1995). Para tratar de contrarrestar la capacidad del VIH-1 de generar mutantes resistentes a inhibidores, se están empleando en la actualidad terapias combinadas, como la terapia antiviral altamente activa (HAART) (Ho 1995; Furtado y cols. 1999; Rezende y Prasad 2004).

Otro ejemplo de la flexibilidad biológica que confieren las altas tasas de mutación y los complejos espectros de mutantes de las cuasiespecies víricas se manifiesta en la capacidad de adaptación a diferentes tipos celulares mediante el uso de receptores alternativos (De Jong y cols. 1992; Schuitemaker y cols. 1992; Fouchier y cols. 1995; Jackson y cols. 1996; Björndal y cols. 1997; Sa-Carvalho y cols. 1997;

Baranowski y cols. 1998, 2000a, b; Hsu y cols. 1998, 2001; Wang y cols. 1998; Berger y cols. 1999; Fry y cols. 1999; Tatsuo y cols. 2000; Núñez y cols. 2001; Zhang y cols. 2002; revisado en Baranowski y cols. 2001, 2003). En otros casos la afinidad de un virus por su receptor se altera por cambios de aminoácido en una proteína de superficie del virus, como se ha descrito para el virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón (LCMV) (Ahmed y cols. 1991; Matloubian y cols. 1993; Borrow y cols. 1995; Cao y cols. 1998; Sevilla y cols. 2000; Kunz y cols. 2001).

Recientemente se ha descrito que dos mutaciones en la hemaglutinina del virus de la gripe española de 1918 son necesarios para abolir la transmisión del virus (Tumpey y cols. 2007).

Las alteraciones del tropismo celular pueden contribuir a modificar la patogenicidad viral (Kai y Furuta 1984; Masuda y cols. 1992; Bae y Yoon 1993; Masuda y cols. 1996a, b; Escarmís y cols. 1998). Los cambios de virulencia se pueden asociar también a mutaciones en zonas reguladoras de los genomas virales o a sustituciones de aminoácidos en proteínas no estructurales (Tu y cols. 1995; Herrera y cols. 2007).

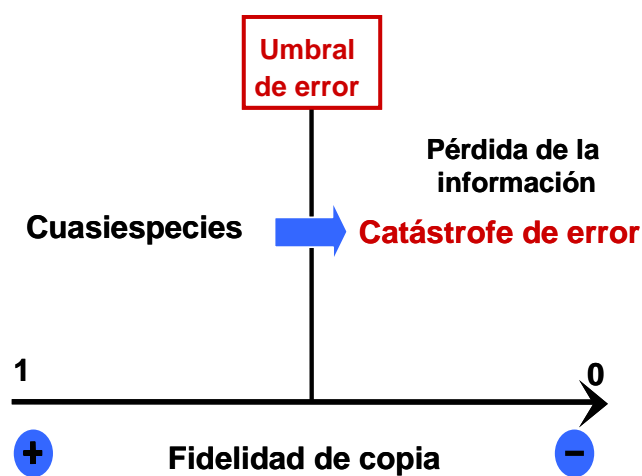
Sin embargo, además de la presencia de mutantes específicos con propiedades alteradas en los espectros de mutantes, la complejidad del espectro de mutantes puede influir en el comportamiento de un virus. Así, una mayor complejidad de la cuasiespecie de VHC en pacientes crónicamente infectados se corresponde con una menor probabilidad de eliminación del virus mediante tratamiento combinado de interferón- $\alpha$  con ribavirina y con la progresión hacia la persistencia del virus (Pawlotski y cols. 1998; Pawlotski 2000; Farci y cols. 2000). El incremento de fidelidad de copia de unas 3-5 veces de un mutante de PV se asoció a una disminución del “fitness” viral y de la virulencia para ratones (Pfeiffer y Kirkegaard 2005a; Vignuzzi y cols. 2006). El mutante de alta fidelidad generó un espectro de mutantes restringido que condujo a la pérdida de neurotropismo y a un fenotipo patogénico atenuado. La expansión de la diversidad de la cuasiespecie mediante mutagénesis química restauró el neurotropismo y la patogenicidad (Vignuzzi y cols. 2006). Estos resultados establecen una relación directa entre la tasa de mutación, la complejidad del espectro de mutantes y la patogenicidad y confirman el valor adaptativo de las altas tasas de error de los virus.

La capacidad adaptativa de los virus mediada tanto por mutación como por recombinación es también uno de los factores considerados relevantes para la emergencia y reemergencia de enfermedades víricas (Smolinsky y cols. 2003, Van Regenmortel y Mahy 2004), uno de los grandes desafíos actuales en salud pública.

## 2.2.- Catástrofe de error y mutagénesis letal como nueva estrategia antiviral

### 2.2.1.- Concepto de catástrofe de error

Estudios teóricos sobre replicación de genomas con altas tasas de error predijeron la existencia de un umbral de error en la copia de material genético por encima del cual no es posible mantener la información genética de modo estable (Swetina y Schuster 1992; Eigen y Biebricher 1988; Schuster y Stadler 1999; Eigen 2002). La violación de ese umbral de error se conoce como entrada en catástrofe de error (Figura 2.3). Esta transición irreversible se puede visualizar como resultado de la acumulación de mutaciones deletéreas de manera que todos los genomas pasan a estar sometidos a una selección negativa infinita, sin posibilidad de escape, lo que conduce a una pérdida de la información genética y, en consecuencia, a la extinción.



**Figura 2.3.** Esquema de la transición a catástrofe de error en un sistema replicativo. El mantenimiento de la información de cualquier sistema replicativo requiere un valor mínimo de la fidelidad de copia del mensaje genético (Eigen 2002). Si se disminuye la fidelidad de copia y se supera el umbral de error no es posible transmitir la información genética de forma estable y el sistema entra en catástrofe de error.

### 2.2.2.-Evidencias experimentales de la entrada de virus en catástrofe de error

Aumentos de la tasa de error durante la replicación de virus RNA, debidos a la acción de agentes mutagénicos, pueden conducir a la extinción viral. Ello ha sido corroborado con estudios tanto en cultivos celulares como *in vivo*.

### **2.2.2.1.- Evidencias en cultivos celulares**

El tratamiento de virus con mutágenos provoca descensos de la producción viral o incluso la extinción del virus (Holland y cols. 1990; Lee y cols. 1997; Loeb y cols. 1999; Loeb y Mullins 2000; Sierra y cols. 2000; Crotty y cols. 2001; Lanford y cols. 2001; Pariente y cols. 2001; Airaksinen y cols. 2003; Grande-Pérez y cols. 2002, 2005; Tapia y cols. 2005). Loeb y cols. denominaron mutagénesis letal al proceso de extinción de virus por mutagénesis incrementada (Loeb y cols. 1999; Loeb y Mullins 2000; revisado en Anderson y cols. 2004 y en Domingo 2005). La ribavirina (R) (sección 2.7) y el 5-fluorouracilo (FU) han sido los dos agentes mutagénicos más empleados en estas investigaciones.

### **2.2.2.2.- Evidencias “in vivo”**

La administración de FU a ratones evitó el establecimiento de una infección persistente con virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón (LCMV) (Ruiz-Jarabo y cols. 2003). Se ha observado un aumento en la complejidad de la cuasiespecie de individuos crónicamente infectados con el virus de la hepatitis C (VHC) tras el tratamiento con ribavirina (Asahina y cols. 2005; Hofmann y cols. 2007) y se han identificado mutaciones que mapean en la polimerasa de VHC asociadas a resistencia a R en pacientes tratados con la droga (Young y cols. 2003). Aunque no hay acuerdo sobre el mecanismo de actuación de la ribavirina sobre VHC, es posible que la mutagénesis tenga una participación (apartado 2.7.2.5). El inicio en 2005 de un ensayo clínico consistente en el tratamiento con un análogo de nucleósido (KP-1212 o 5-aza-5,6,-dihidro-2-deoxicidina) en pacientes con SIDA (Harris y cols. 2005) (ensayo que entrará en fase 2 durante 2007) ilustra el potencial de aplicación de la mutagénesis letal como nueva estrategia antiviral.



### **2.2.2.3.- Evidencias experimentales de catástrofe de error con el virus de la fiebre aftosa, virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón y virus de inmunodeficiencia humana**

En nuestro laboratorio estamos empleando VFA, LCMV y VIH como sistemas modelo para estudio de dinámica de cuasiespecies y mutagénesis letal. Las principales conclusiones de estos estudios (revisados en Domingo 2005) han sido:

(i) Los agentes mutagénicos FU, 5-azacitidina (AZC) y R, pueden producir la extinción de virus durante infecciones citolíticas o persistentes en cultivos celulares. (ii) Una baja capacidad replicativa (“fitness”) y bajas cargas virales (bajo tamaño poblacional) favorecen la extinción viral. (iii) La combinación de agentes mutagénicos con inhibidores de la replicación viral es más efectiva que los agentes mutagénicos administrados aisladamente en provocar la extinción del virus. (iv) La transición hacia catástrofe de error ocurre con descensos de  $10^2$  a  $10^3$  veces en la infectividad específica y sin modificación de la secuencia consenso de la población. En cambio, se producen aumentos en la complejidad del espectro de mutantes de hasta 10 veces (medidos por frecuencia de mutación) y de hasta 7 veces (medidos por entropía de Shannon). (v) RNA preextinción interfiere con la infectividad de RNA infeccioso presente en la misma población. (vi) Datos experimentales e *in silico* sugieren una importante participación de genomas defectivos en el proceso de extinción.

En la presente Tesis Doctoral se ha abordado como asunto principal la respuesta de VFA a la acción mutagénica de R y la selección de mutantes de la polimerasa viral que muestran sensibilidad disminuida a R.

## **2.3.- El virus de la fiebre aftosa (VFA) como modelo para investigaciones sobre la mutagénesis letal**

### **2.3.1.- La fiebre aftosa y el virus causal**

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad muy contagiosa que afecta a animales de pezuña hendida, fundamentalmente a ganado bovino y porcino, y cuyo agente causal es el virus de la fiebre aftosa (VFA). Históricamente la FA fue la primera enfermedad animal que se asoció a un agente replicante de tamaño inferior a una bacteria (Loeffler y Frosch 1898). Es la enfermedad animal que causa más pérdidas económicas y, como

ejemplo, el brote de FA en el Reino Unido en 2001 supuso pérdidas de 30 mil millones de euros (Sutmoller y cols. 2003) (revisiones en Sobrino y cols. 2001; Sobrino y Domingo 2004).

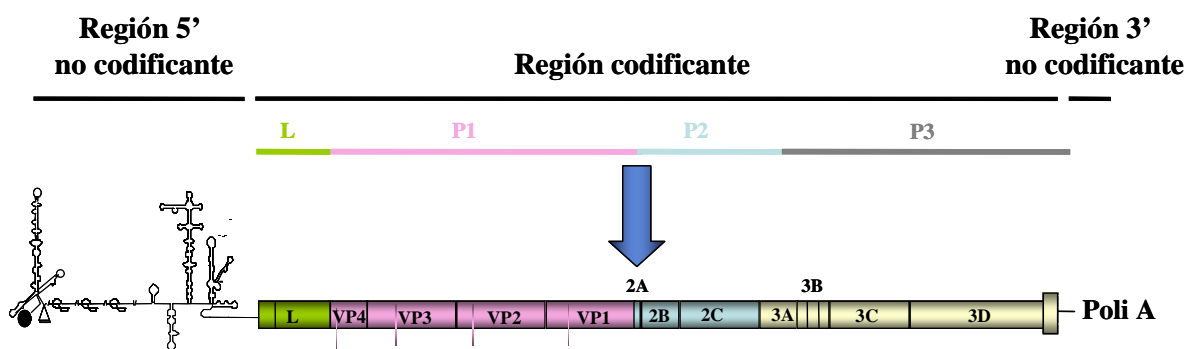
Existen múltiples vías de transmisión del virus, incluidas el contacto directo, transporte mecánico, aerosoles, ingestión, etc. El virus penetra en el organismo a través de los epitelios causando una infección aguda caracterizada por fiebre y aftas, principalmente en lengua, boca y pezuñas. En animales adultos afectados de la enfermedad vesicular típica, la mortalidad no suele superar el 5%, mientras que en animales jóvenes afectados de miocarditis asociada al VFA, la tasa de mortalidad se aproxima al 50% (Timoney y cols. 1988; Sobrino y Domingo 2004). Tras la fase aguda de la enfermedad se puede establecer una infección asintomática en rumiantes en que el virus persiste en el esófago y garganta por periodos prolongados de tiempo. Estos animales portadores constituyen una reserva natural de virus y pueden originar brotes de la enfermedad aguda, dificultando el control de la enfermedad (van Bekkum y cols. 1959; Pereira 1981; Gebauer y cols. 1988; Salt 1993, 2004). Las estrategias de control de la enfermedad utilizadas tradicionalmente se basan en la vacunación o el sacrificio de los animales infectados y sus contactos.

### **2.3.2.-Organización genómica y proteínas codificadas por el virus de la fiebre aftosa**

El VFA pertenece al género aftovirus de la familia *Picornaviridae*, y como tal posee un genoma RNA de cadena simple y de polaridad positiva, carece de envuelta, y su cápsida es de simetría icosaédrica. Se han descrito siete serotipos distintos del VFA (A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2 y SAT3), más de 65 subtipos y numerosos variantes antigénicos (Pereira 1977; Mateu y cols. 1988; Carrillo y cols. 2005). Esta grandísima diversidad antigénica es un reflejo de la alta variabilidad genética del VFA.

El VFA de referencia empleado en nuestro laboratorio es el C-S8c1, un clon biológico obtenido a partir de un virus proveniente de un cerdo enfermo, aislado en Sta. Pau, Girona, en 1970 (virus C-Sta Pau Spain/1970) (Sobrino y cols. 1983). Pertenece al subtipo europeo C<sub>1</sub> dentro del serotipo C. El genoma del VFA C-S8c1 tiene 8115 nucleótidos de longitud, sin contar los tramos homopoliméricos de policitidilato, poli(C) y poliadenilato, poli(A), que son heterogéneos en longitud (Escarmís y cols. 1992,

1996; Toja y cols. 1999) (**Figura 2.4**). El genoma de C-S8c1 se divide en una región central que contiene un único marco de lectura abierta comprendida entre los nucleótidos 1039 y 8023, que codifica una poliproteína de 2328 aminoácidos que es procesada por proteasas virales durante el ciclo de infección. La zona de lectura abierta está flanqueada dos regiones más cortas no codificantes (5'UTR de 1038 nucleótidos y 3'UTR de 91 nucleótidos, excluyendo los tramos homopoliméricos), situadas en los extremos de la molécula de RNA y que incluyen elementos reguladores con complejas estructuras secundarias y terciarias (Flint y cols. 2004; Martínez-Salas y cols. 2002)



**Figura 2.4. Organización del genoma del VFA y proteínas que codifica.** El genoma de VFA se organiza en una región codificante de la poliproteína viral flanqueada por dos regiones no codificantes, 5' UTR y 3' UTR, en el extremo 5' y 3', respectivamente. Mediante el procesamiento de la poliproteína viral se libera una proteína L y se generan las proteínas estructurales (P1), que incluyen las proteínas de la cápsida VP4, VP2, VP3 y VP1 y las proteínas no estructurales (P2 y P3), que incluyen las proteínas 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D. VPg (3B) está unida covalentemente al extremo 5' del genoma viral. 3D es la RNA polimerasa dependiente de RNA.

La región 5' UTR está formada por varias subregiones que del sentido 5' al 3' son las siguientes:

- Fragmento S, de 367 nucleótidos, está muy estructurado, se encuentra muy conservado entre distintos VFAs, y se predice que tiene un papel importante en replicación (Escarmís y cols. 1992; Belsham 1993; Witwer y cols. 2001).
- Poli C, de función desconocida, con una longitud variable de 100 a 400 nucleótidos, que se encuentra también presente en cardiovirus pero no en otros picornavirus.
- Pseudonudos: son una serie de repeticiones con una estructura terciaria típica (Pleij y cols. 1985), de función desconocida (Escarmís y cols. 1992, 1995).

▪ Cre: elemento replicativo que actúa en *cis* (*cis acting replication element*) que tiene una función importante en la síntesis de RNA (Mason y cols. 2002; Nayak y cols. 2005) (apartado 2.5). Se ha observado complementación de la función de *cre* en *trans* (Tiley y cols. 2003).

▪ IRES: región interna altamente estructurada del RNA genómico que permite la entrada del ribosoma para la iniciación interna de la síntesis de la poliproteína viral de una forma independiente de *cap* (Pelletier y Sonenberg 1988; Jang y cols. 1990; Kuhn y cols. 1990; Belsham y Sonenberg 1996; Martínez-Salas y cols. 2001; Sarnow 2003; Martínez-Salas y Fernández-Miragall 2004).

La poliproteína está dividida en 4 regiones, que del extremo amino(N)-terminal al carboxilo(C)-terminal son las siguientes:

▪ La región L (“leader”) codifica las proteínas Lab y Lb, según comience la lectura en el primer o segundo AUG funcional (Devaney y cols. 1988). L es una proteasa activa en *cis* y *trans* que cataliza su propia separación de la poliproteína e inicia la proteólisis del factor eIF4F de iniciación de la traducción dependiente de *cap*, lo que contribuye a una parada de la síntesis de proteínas celulares (“shut-off”) en las células infectadas (Devaney y cols. 1988; Glaser y Skern 2000). Los residuos catalíticos esenciales de la enzima han sido identificados (Piccone y cols. 1995; Roberts y Belsham 1995), y se ha determinado su estructura tridimensional (Guarné y cols. 1998). Recientemente se ha descrito una inhibición de la respuesta inmune mediada por L (de los Santos y cols. 2006).

▪ La región P1 codifica las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4, que forman la cápsida del virus, de simetría icosaédrica y de unos 30 nm de diámetro (Acharya y cols. 1989; Lea y cols 1994). VP1, VP2 y VP3 están parcialmente expuestas al exterior mientras que VP4 forma la superficie interna y está en contacto con el RNA viral. Algunos de los bucles y láminas de las proteínas de la cápsida del VFA se encuentran expuestos al exterior e interaccionan con anticuerpos. El bucle G-H de la proteína VP1 (aminoácidos 140-160) muestra movilidad en la superficie de la cápsida y contiene uno de los principales determinantes antigénicos del VFA que se ha denominado sitio A (Mateu 1995; Mateu y cols. 1989, 1990) y el triplete RGD que interacciona con integrinas celulares que actúan como receptores para la entrada del virus (Berinstein y cols. 1995; Baranowski y cols. 2003; Baxt y Rieder 2004; Fry y cols.

2005). Se conoce la estructura tridimensional de varios aislados de VFA, incluido el C-S8c1 (Lea y cols. 1994).

▪ La región P2 codifica las proteínas no estructurales 2A, 2B y 2C:

- 2A es un péptido de 16 aminoácidos que cataliza en *cis* la escisión de P1-2A de 2BC, mediante un proceso de parada y reiniciación del ribosoma (Ryan y Flint 1997; de Felipe y cols. 2003; de Felipe y Ryan 2004).

- La proteína 2B ha sido asociada en VFA al bloqueo de secreción de proteínas junto con 2C (Moffat y cols. 2007). Según estudios con otros picornavirus, podría estar implicada en permeabilidad de membranas (van Kuppeveld y cols. 1997) y en el bloqueo de la secreción de proteínas (Doedens y Kirkegaard 1995).

- La proteína 2C está implicada en replicación del RNA y podría inducir la proliferación de vesículas de membranas (Argos y cols. 1984; Bienz y cols. 1990; Rodríguez y Carrasco 1993, 1995; Tolskaya y cols. 1994; Xiang y cols. 1995a, b; Gromeier y cols. 1999; Pfister y Wimmer 1999; Pariente y cols. 2003). 2C incluye dos motivos de unión a nucleótido trifosfato (NTPs) que poseen actividad ATPasa y GTPasa, y un dominio helicasa. 2C es la diana del inhibidor de la replicación cloruro de guanidinio (Pincus y cols. 1986; Pincus y Wimmer 1986; Pincus y cols. 1987; de la Torre y cols. 1990; Saunders y King 1982; Saunders y cols. 1985; Pfister y Wimmer 1999; Mason y cols. 2003; Pariente y cols. 2003). Algunas mutaciones asociadas a una mayor virulencia en VFA para células BHK-21 mapean también en 2C (Herrera y cols. 2007).

▪ La región P3 codifica las proteínas no estructurales 3A, 3B, 3C y 3D:

- 3A: En otros picornavirus 3A participa en la síntesis del RNA viral (Takeda y cols. 1986; Gromeier y cols. 1999), en el anclaje a membrana del complejo de replicación (Xiang y cols. 1998), en el efecto citopático y en la inhibición de la secreción de proteínas (Doedens y Kirkegaard 1995). Sustituciones de aminoácidos en la proteína 3A de VFA se han asociado a adaptación de un virus de cerdo a cobayas (Núñez y cols. 2001) y a la atenuación para bovinos (Giraud y cols. 1990; Beard y Mason 2000; O'Donnell y cols. 2001).

- 3B (VPg) está unida covalentemente al extremo 5' del RNA genómico del virus y está implicada en la iniciación de la síntesis de RNA y probablemente también en la encapsidación (Rowlands 1999; Ferrer-Orta y cols. 2006a).

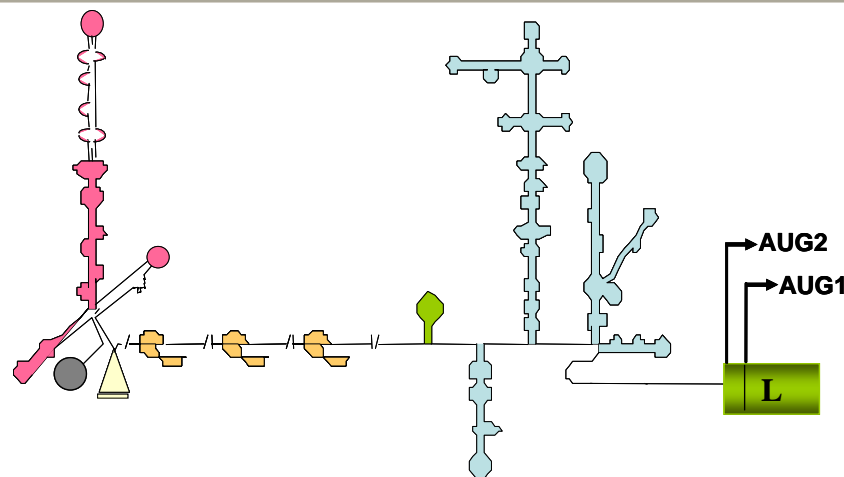
- 3C es una serín proteasa que cataliza la mayor parte de las roturas hidrolíticas de la poliproteína del VFA. 3C también es capaz de romper los factores de iniciación de la traducción eIF4A y eIF4GI (Belsham y cols. 2000).

- 3D es la RNA polimerasa dependiente de RNA (RpRd) encargada de la replicación del virus (replicasa viral) (apartados 2.5 y 2.6.1).

La región 3' no codificante posee una longitud de 91 nucleótidos y está implicada en replicación y en infectividad (Mirmomeni y cols. 1997; Sáiz y cols. 2001). El extremo 3' está constituido por un tramo de poliadenilato, poli(A), de una longitud de 60-90 residuos, típico de un RNA mensajero eucariótico, que interviene en la circularización del genoma, previamente al inicio de la replicación (Herold y Andino 2001; Serrano y cols. 2006).

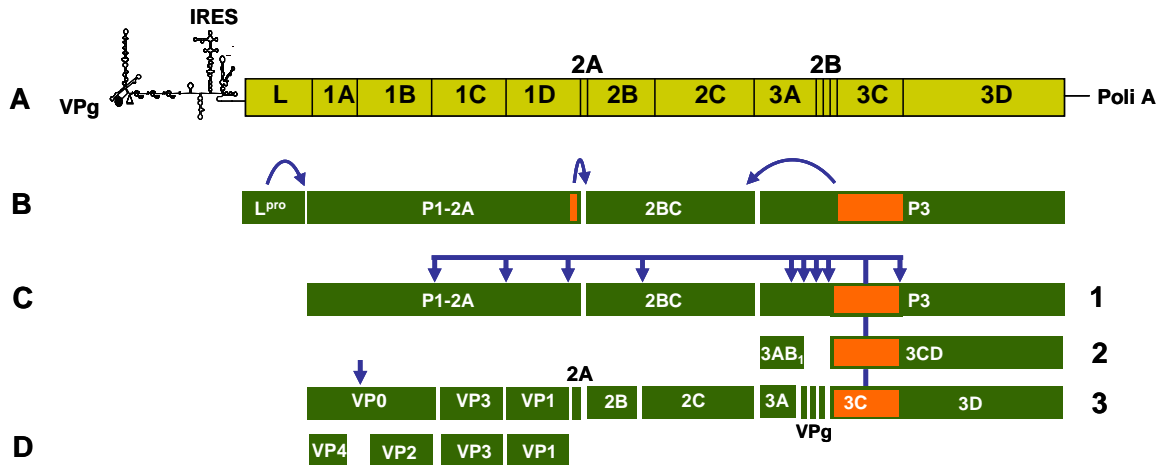
## 2.4.- Traducción del genoma viral y procesamiento proteolítico de la poliproteína viral

El RNA del VFA es infeccioso, y tras la entrada en el citoplasma de la célula, debe ser traducido para dar lugar a las proteínas virales necesarias para la replicación viral y el ensamblaje del RNA en nuevos viriones.



**Figura 2.5.** Esquema de la región 5' del genoma de VFA. Se indican el péptido VPg (círculo gris) unido covalentemente al RNA, el fragmento S (rosa), altamente estructurado, el tramo de poli(C) (amarillo) de longitud variable, una región de 3 ó 4 pseudonudos (naranja), el *cre* (verde), el IRES (azul) y los dos codones AUG de inicio de la traducción de la poliproteína viral.

La traducción se produce a partir de un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES), que precede a los AUGs iniciadores (Figura 2.5). Un esquema simplificado del procesamiento de la poliproteína se muestra en la Figura 2.6.

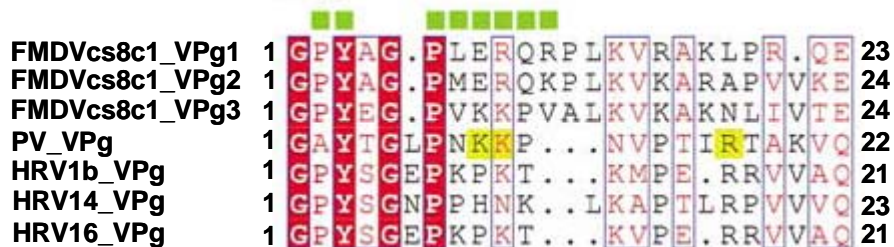


**Figura 2.6. Representación esquemática del procesamiento de la poliproteína viral.** **A.** Genoma del VFA. **B.** Se representan los productos que se generan tras la síntesis de la poliproteína viral. La separación entre L y P1-2A se produce por el corte catalizado por L. El corte entre P1-2A y 2BC se produce por un “salto” de la síntesis de proteína mediado por 2A. El corte entre 2BC y P3 se produce por 3C. **C.** Los polipéptidos obtenidos tras la síntesis de la poliproteína viral (1) se procesan en *trans* dando lugar a los diferentes precursores y proteínas maduras (2, 3). **D.** Procesamiento de VP0 durante la encapsidación. El procesamiento de P1-2A por 3C genera VP0-VP3-VP1 que se ensambla formando pentámeros; 12 pentámeros se ensamblan para formar la partícula vírica. El genoma viral participa en el corte de VP0 en VP4-VP2, como última fase de la maduración de la partícula.

## 2.5.- Replicación del genoma del virus de la fiebre aftosa

Una vez procesada la poliproteína, el RNA genómico sirve de molde para la síntesis de la cadena complementaria de RNA de polaridad negativa, catalizada por la RpRd codificada por la región 3D del genoma (Figuras 2.4 y 2.6). La polimerasa (denominada 3D) utiliza como cebador el péptido VPg y adiciona un residuo de uridina-5'-monofosfato (UMP) a la Tyr que se encuentra en posición 3 del péptido VPg (Paul y cols. 1998; Paul y cols. 2003; Nayak y cols. 2005; Ferrer-Orta y cols. 2006a) (Figura 2.7). Mutantes que carecen de alguna de las tres VPg codificadas por el genoma viral

muestran una desventaja en replicación respecto al virus estándar (Falk y cols. 1992; Mason y cols. 2003). La uridilación de VPg requiere el elemento *cre* y es estimulada por 3CD (Paul y cols. 2000; Yin y cols. 2003; Nayak y cols. 2005, 2006; Marcotte y cols. 2007). En cambio, la iniciación de la síntesis de la cadena negativa no requiere *cre* (Murray y Barton 2003). Varios productos intermediarios del procesamiento de la poliproteína intervienen en el proceso de replicación del virus (revisiones en Racaniello 2001; Semler y Wimmer 2002; Rowlands 2003), apoyando el concepto de que varios precursores y proteínas procesadas son multifuncionales (revisiones en Rowlands 2003; varios capítulos de Sobrino y Domingo 2004).



**Figura 2.7.** Alineamiento de secuencias de la proteína VPg en diferentes picornavirus. Los residuos de VPg-1 de VFA que interaccionan con la 3D están marcados con cuadrados verdes. Los residuos de VPg de poliovirus (PV) que interaccionan con la polimerasa 3D de PV están marcados con cuadrados amarillos. Figura tomada de Ferrer-Orta y cols. 2006a.

La polimerasa 3D es reclutada en la membrana por el péptido 3AB (Lyle y cols. 2002b; Paul y cols. 2003). Se ha propuesto un modelo en el que un tapiz de polimerasas estaría recubriendo la membrana externa del retículo endoplasmático de células infectadas, siendo cada genoma susceptible de ser copiado por diversas polimerasas del tapiz (Lyle y cols. 2002a)

## 2.6.- Las polimerasas de ácidos nucleicos

Las polimerasas que catalizan la síntesis de DNA y RNA son enzimas esenciales para la transferencia de la información genética y su expresión. Las polimerasas de virus animales y bacterianos participan en una gran diversidad de estrategias replicativas, lo



que se pone de manifiesto en la iniciación de la polimerización *de novo* a partir de DNA, RNA o de proteínas iniciadoras. A pesar de ello, todas las polimerasas comparten estructuras y mecanismos de catálisis similares (Steitz 1998). Todas ellas se pliegan en forma de mano y poseen tres dominios denominados “palm”, “fingers” y “thumb” (Jäger y Pata 1999; Albà 2001), con la excepción de la polimerasa X del virus de la peste porcina africana que carece del dominio “fingers” (Maciejewski y cols. 2001; Showalter y cols. 2001). Las DNA y RNA polimerasas presentan cierta identidad de secuencia, con algunos motivos presentes en todas ellas y otros que distinguen a las polimerasas dependientes de DNA de las polimerasas dependientes de RNA (Delarue y cols. 1990; Joyce y Steitz 1995; Willis y cols. 2002; Beard y Wilson 2003).

Las RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp) (E.C. 2.7.7.48) víricas carecen de una actividad exonucleasa 3'-5' presente en varias DNA polimerasas celulares y de virus complejos como adenovirus, herpesvirus y poxvirus (Bernad y cols. 1989) La exonucleasa 3'-5' actúa como actividad correctora de pruebas y su ausencia es uno de los determinantes de las tasas de error elevadas típicas de los virus RNA (Batschelet y cols. 1976, Drake y Holland 1999, Domingo 2007) (sección 2.1.1).

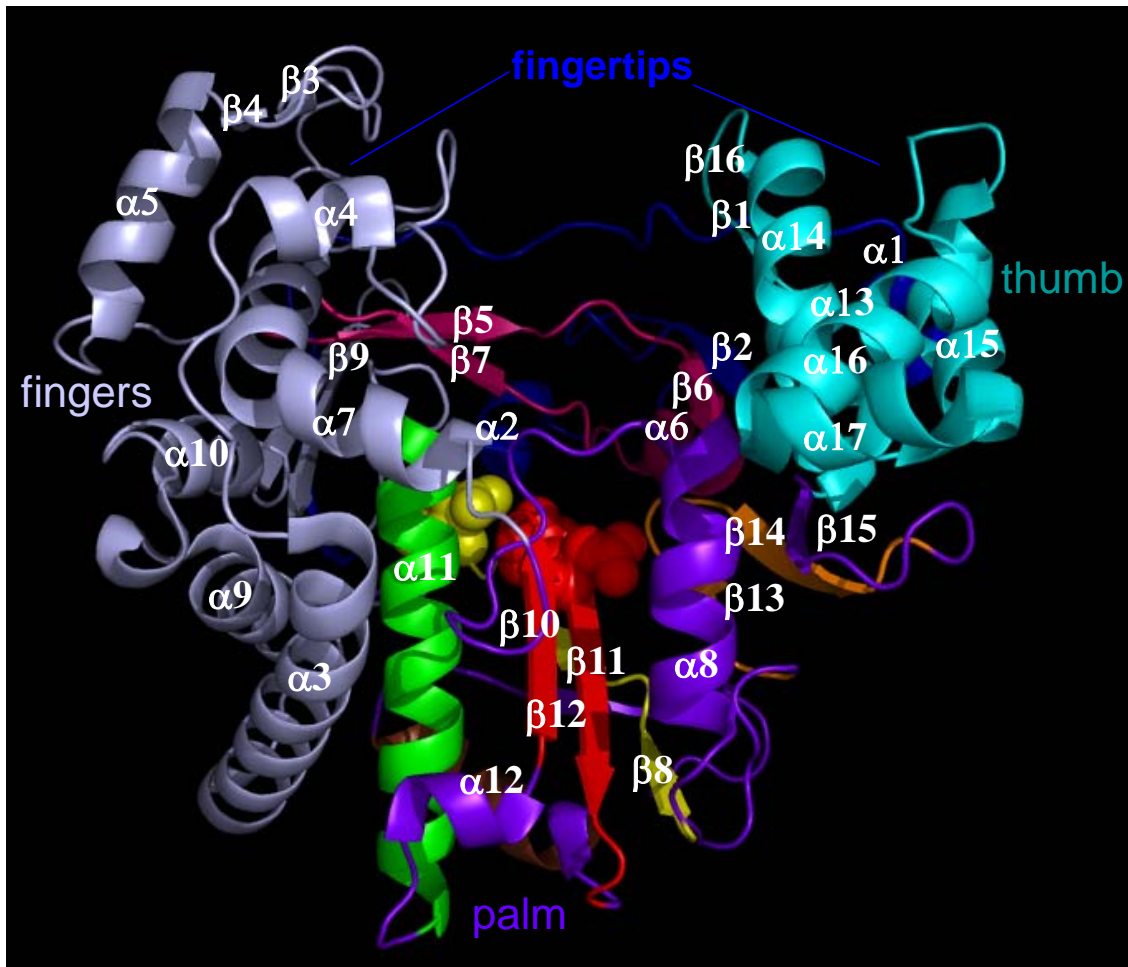
### **2.6.1.- La polimerasa del virus de la fiebre aftosa (3D)**

La replicación del genoma del VFA y de otros picornavirus está catalizada por una RdRp denominada 3D (apartado 2.5 y **Figura 2.4**). La estructura tridimensional de la 3D de VFA (**Figura 2.8**), aislada y en un complejo con una molécula molde-iniciador de RNA se resolvió en el laboratorio de la Dra. Nuria Verdaguer (IBMB, CSIC), en colaboración con nuestro grupo (Ferrer-Orta y cols. 2004).

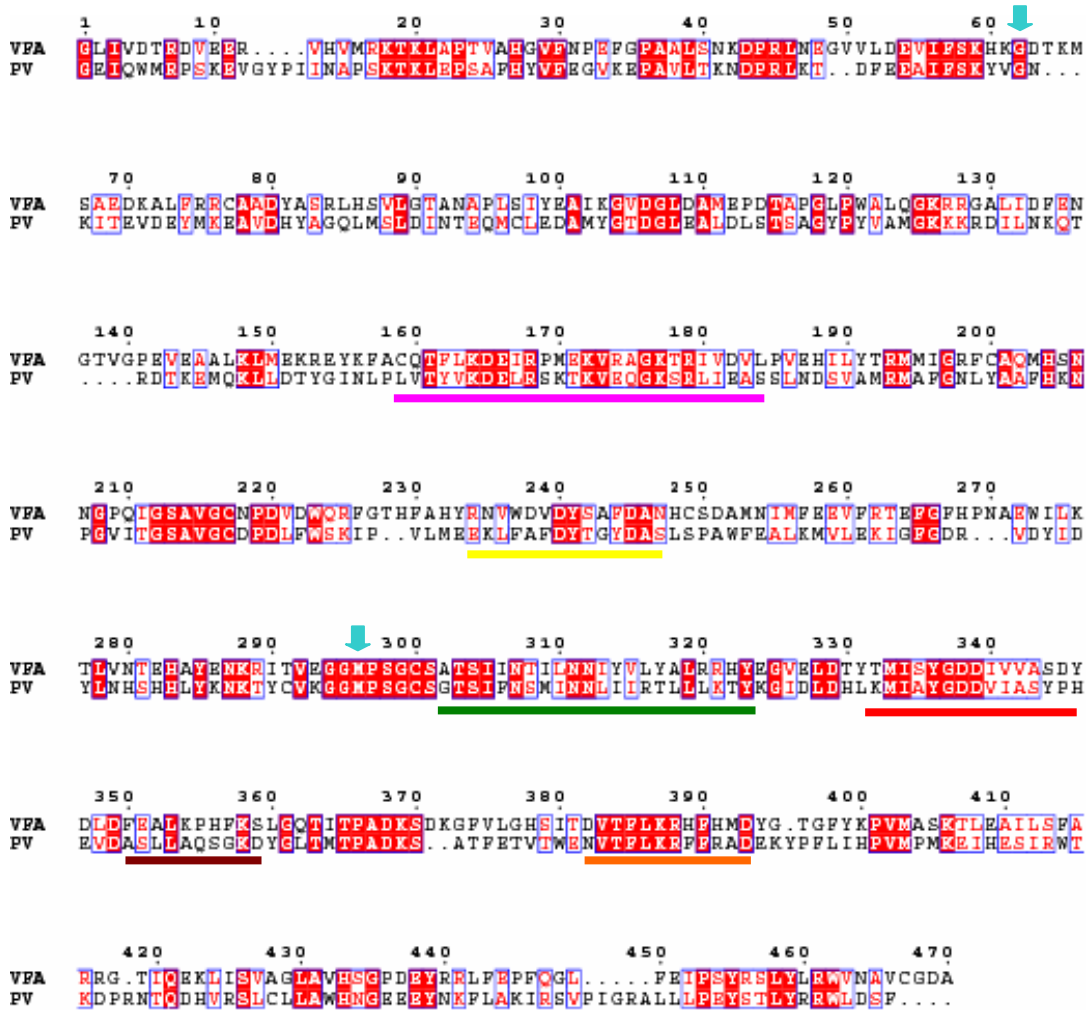
Las RdRp presentan una conformación de mano derecha y cerrada, a diferencia de la mano abierta o en forma de U de las DNA polimerasas (dependientes de RNA o DNA) (Steitz 1999) y de las RNA polimerasas celulares (dependientes de DNA) (Woychilk y Hampsey 2002; Tahirov y cols. 2002; Kettenberger y cols. 2004). Esta circularización completa de la estructura se establece mediante un dominio adicional en las RdRp denominado “punta de los dedos” o “fingertips” (Bressanelli y cols. 1999; Butcher y cols. 2001; Ng y cols. 2002, 2004; Love y cols. 2004; Thompson y Peersen 2004; Ferrer-Orta y cols. 2006b) que hace de puente entre los dominios “fingers” y

“thumb” (**Figura 2.8**). En la polimerasa del VFA (3D) el dominio “fingertips” está compuesto por los residuos 1 al 57, el dominio “fingers” por los residuos 58-207 y 249-302, el dominio “palm” por los residuos 208-248 y 303-343 y el dominio “thumb” por los residuos 404-470 (**Figura 2.8**). Dentro del dominio “fingers” se encuentra el motivo F, conservado en todas las RdRp que forma un túnel cargado positivamente, implicado en unión del NTP entrante y con una posible actividad helicasa sobre RNA de doble banda (Bruenn 2003). En el dominio “palm” se encuentran los motivos A, B, C, D y E, conservados en las RdRp y otras polimerasas como la RT de VIH-1 (Hansen y cols. 1997; Gorbalenya y cols. 2002; Bruenn 2003; Xu y cols. 2003; Ferrer-Orta y cols. 2004, 2006b). El centro catalítico de todas las RdRp se encuentra en el dominio “palm”, que es el más conservado en las polimerasas estudiadas (O’Reilly y Kao 1998). El centro catalítico de la 3D de VFA incluye los residuos D245 (en el motivo A) y los residuos D338 y D339 (en el motivo C) (**Figuras 2.8 y 2.9**).

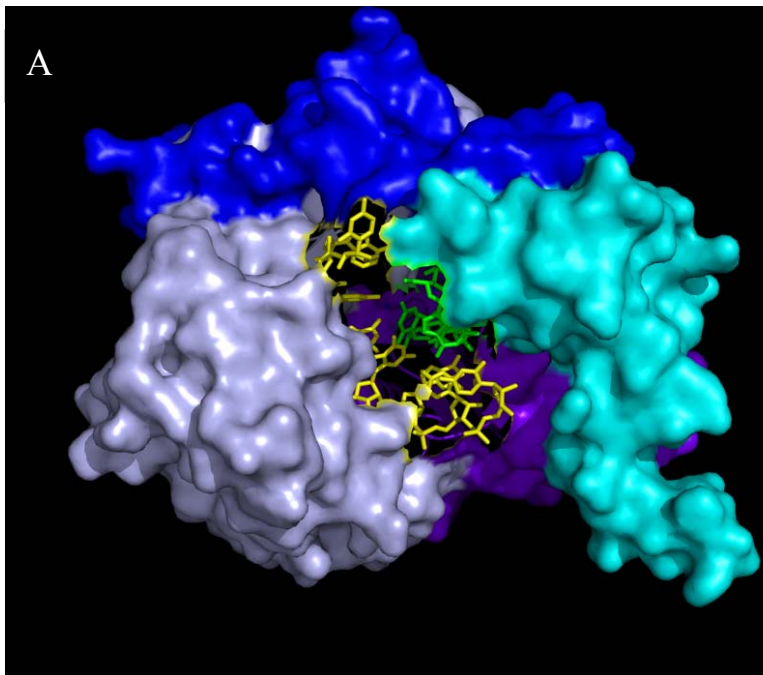
La estructura del complejo de la 3D polimerasa de VFA con una molécula de RNA, que actúa de molde-iniciador (**Figura 2.10A**), proporcionó la primera información de los residuos implicados en la interacción con el RNA de las RdRp de los picornavirus (Ferrer-Orta y cols. 2004). Tanto el complejo con el RNA como con la proteína iniciadora VPg (descrita en 2.3.2) muestra la formación de un amplio túnel central capaz de acomodar el dúplex de RNA durante la fase de elongación o a la proteína VPg durante el inicio de la replicación del RNA (**Figura 2.10B**) (Ferrer-Orta y cols. 2006a, b).



**Figura 2.8. Representación en forma de lazos de la estructura tridimensional de la RdRp de VFA (3D).** Se observa una estructura general en forma de mano derecha como todas las polimerasas descritas (DNA y RNA). En distintas tonalidades de azul se representan los dominios (“fingers”, “palm”, “thumb”) de la polimerasa. La molécula se encuentra cerrada por el dominio de “fingertips”, representado en azul oscuro. Se indican las localizaciones de las estructuras secundarias ( $\alpha$  hélices y láminas  $\beta$ ). Los motivos conservados dentro del dominio “palm” se representan del modo siguiente: A, amarillo; B, verde; C, rojo; D, marrón; E, naranja. El motivo F presente en el dominio “fingers” está representado en rosa. Los aspárticos catalíticos D338 y D339 dentro del motivo A se representan en forma de esferas rojas y el D245, dentro del motivo B, en forma de esfera amarilla. La estructura de 3D se obtuvo a una resolución de 1,9 Å. (Ferrer-Orta y cols. 2004). La figura se ha realizado empleando el programa *pymol* (DeLano Scientific LLC). Las coordenadas cristalográficas empleadas han sido obtenidas de la base de datos de estructura de proteínas (PDB; <http://www.pdb.org>; código 1WNE). La localización de los distintos dominios en la estructura primaria de la proteína y su posición equivalente en PV se representa en la Figura 2.9.



**Figura 2.9.** Alineamiento de secuencia aminoacídica de la 3D de VFA y PV. Los aminoácidos de 3D idénticos entre ambas polimerasas se muestran en cajas rojas. La numeración de los residuos se realiza tomando como origen la glicina del extremo N-terminal. Los residuos G62 y M296 en la 3D de VFA están indicados con flechas azules. Este alineamiento fue realizado con el programa de “swissprotein”, y el resultado fue ajustado manualmente en base a los datos de la estructura tridimensional de 3D de VFA (Ferrer-Orta y cols. 2004). Los motivos conservados en las RdRp están subrayados, empleando los mismos colores que en la Figura 2.8: F, rosa; A, amarillo; B, verde; C, rojo; D, marrón; E, naranja.

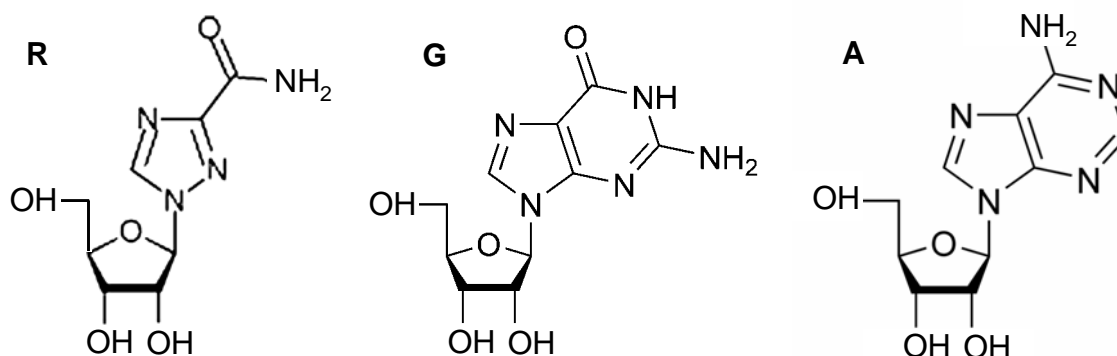


**Figura 2.10. Estructura tridimensional de la polimerasa de VFA formando un complejo con un molde-iniciador (A) o con un péptido iniciador VPg (B).** **A.** Se representa la superficie de la estructura tridimensional de 3D co-cristalizada con una molécula de RNA parcialmente autocomplementaria de 10 nucleótidos, de secuencia 5'-GCAUGGGCCC-3', tal como se ha descrito en Ferrer-Orta y cols. 2004. El oligonucleótido de RNA unido se muestra en amarillo (cadena molde) y en verde (cadena cebadora). La estructura se obtuvo a una resolución de 1,9Å. **B.** Se representa en forma de lazos la estructura tridimensional de 3D formando un complejo con el péptido VPg (rojo), covalentemente unido a través del aminoácido Y3 (amarillo) a una molécula de UMP incorporado (verde). La estructura se obtuvo a una resolución de 3,0 Å. (Ferrer-

Orta y cols. 2006a). Las figura se han realizado empleando el programa *pymol* (DeLano Scientific LLC). Las coordenadas cristalográficas empleadas han sido obtenidas de la base de datos de estructura de proteínas [PDB; <http://www.pdb.org>; código 1WNE (A) y código 1U09].

## 2.7.- La ribavirina y su acción mutagénica sobre el virus de la fiebre aftosa

La ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida), también conocida como Virazol, es un análogo purínico antiviral de amplio espectro para muchos virus RNA y DNA tanto *in vivo* como *in vitro* (Figura 2.11 y Tabla 2.1). En la actualidad es utilizada para el tratamiento de infecciones por el virus de la hepatitis C (VHC), en combinación con interferon-α (Davis y cols. 1998; McHutchison y cols. 1998; Cummings y cols. 2001, Di Bisceglie y cols. 2001) o PEG-interferon-α (interferón pegilado) (Mangia y cols. 2005); se emplea también para el tratamiento de infecciones por el virus respiratorio sincitial (Hall y cols. 1983; Cooper y cols. 2003) en forma de aerosol y de infecciones por virus Lassa (McCormick y cols. 1986; Andrei y De Clercq 1993).



**Figura 2.11.** Estructura química de la ribavirina (R), guanosina (G) y adenosina (A). Los pesos moleculares de R, G y A son 244,21, 283,24 y 267,24 daltons, respectivamente.

Tabla 2.1. La ribavirina como análogo de nucleósido antiviral de amplio espectro

Familia	Género	Especie	Efecto de la ribavirina	Referencias
Arenaviridae	<i>Arenavirus</i>	Virus Junin	↓e.c.p.	Rodríguez y cols.(1986)
		Virus Lassa		Huggins (1989)
		Virus Pinchinde	↓infectividad	Smee y cols. (1992)
		Virus de la coriomeningitis de raton	↓título viral, ↓infectividad	Ruiz-Jarabo y cols. (2003)
Deltaviridae	<i>Deltavirus</i>	Virus hepatitis delta	↓replicación	Choi y cols. (1989) Chang y cols. (2006)
Bornaviridae	<i>Bornavirus</i>	Virus de la enfermedad de Borna y He/80	↓transcripción	Jordan y cols. (1999)
Bunyaviridae	<i>Bunyavirus</i>	San Angelo	↓infectividad	Smee y cols. (1992)
	<i>Hantavirus</i>	Virus Hantaan	↓título viral, ↓síntesis proteínas, ↑fr. mutación	Severson y cols. (2003)
Flaviviridae	<i>Nairovirus</i>	Virus sin nombre	↓focos de virus	Sun y cols. (2006)
		Virus Seoul	↓focos de virus	Medina y cols. (2007)
		Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo	↓producción viral	Murphy y cols. (2001) Watts y cols. (1989)
	<i>Phlebovirus</i>	“fever Sicilian virus” y virus de la fiebre del Valle de Rift	↓detección viral ↓e.c.p.	Garcia y cols. (2001) Crance y cols. (1997)
	<i>Flavivirus</i>	Virus dengue 1,2 y 4	↓e.c.p., ↓replicación viral	Crance y cols. (2003) Takhampunya y cols. (2006)
	<i>Hepacivirus</i>	Virus de la encefalitis japonesa	↓e.c.p.	Crance y cols. (2003)
Virus Langat		↓e.c.p.	Crance y cols. (2003)	
Virus Usutu		↓e.c.p.	Crance y cols. (2003)	
Virus Wesselsbron		↓e.c.p.	Crance y cols. (2003)	
Virus “West Nile”		↓e.c.p. ↓infectividad y ↑fr. mutación	Crance y cols. (2003) Day y cols. (2005)	
			↓replicación	Jordan y cols. (2000)
		Virus de la fiebre amarilla	↓e.c.p.	Crance y cols. (2003)
		Virus zika	↓e.c.p.	Crance y cols. (2003)
		Virus GB-B	↓RNA viral ↓infectividad ↑tasa de error	Lanford y cols. (2000)
		Virus de la hepatitis C	↑tasa de error ↓replicación	Contreras y cols. (2002) Zhou y cols. (2003) Kanda y cols. (2004)
Ortomixoviridae		Influenzaviridae	Virus de la gripe A	↓e.c.p.
Paramyxoviridae	<i>Metapneumovirus</i>	Virus de gripe B	↓e.c.p.	Wray y cols. (1986)
		Metapneumovirus humano	↓e.c.p.	Wyde y cols. (2003)
	<i>Morbillivirus</i>	Virus del sarampión	↓e.c.p.	Wyde y cols. (2000)
	<i>Pneumovirus</i>	Virus respiratorio sincitial bovino	↓replicación	Bartzatt y Anderson (1989)
		Virus respiratorio sincitial humano	↓e.c.p.	Wyde y cols. (2003)

(Continúa en la página 28)

(Continuación de Tabla 2.1)

Familia	Género	Especie	Efecto observado	Referencias
Picornaviridae	<i>Aftovirus</i>	Virus de la fiebre aftosa	↓producción viral ↑fr. mutación	de la Torre y cols. (1987) Airaksinen y cols. (2003) Sierra y cols. (2007)
	<i>Enterovirus</i>	Poliovirus	↓título viral, ↓infectividad, ↑tasa de error y mutación	Crotty y cols. (2000, 2001)
Poxviridae	<i>Orthopoxvirus</i>	Virus vaccinia (de varios hospedadores)	↓formación de placas	Smee y cols. (2001)
Rhabdoviridae		Virus de la septicemia Hemorrágica vírica	↓síntesis de RNA	Marroquí y cols. (2007)
Retroviridae	<i>Lentivirus</i>	VIH Virus visna Maedi	↓replicación viral ↓producción viral	McCormick y cols. (1984) Frank y cols. (1987)
Togaviridae	<i>Alphavirus</i>	Virus Chikungunya	↓e.c.p. ↓título viral	Andrei y De Clercq (1993)
	<i>Coronavirus</i>	Virus Semliki Forest Virus del SARS	↓título viral ↓replicación viral	van Tiel y cols. (1986) Morgenstern y cols. (2005)

Tabla modificada a partir de Vignuzzi y cols (2005). Se muestran los virus para los que se ha descrito que la ribavirina ejerce acción antiviral. Los estudios resaltados en gris atribuyen la actividad antiviral de R al menos en parte a su acción mutagénica. Símbolos: e. c. p., efecto citopático en cultivos celulares; fr. mutación, frecuencia de mutación; ↑, ascenso; ↓, descenso.

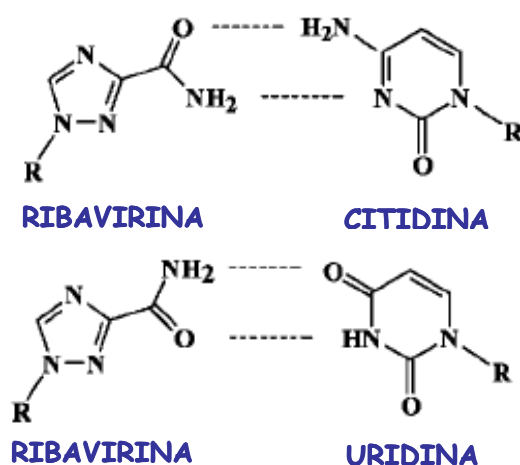
### 2.7.1.- Metabolismo de la ribavirina

La ribavirina es un análogo de ribonucleósido capaz de competir con la adenina y con la guanina, apareando tanto con la citosina como con el uracilo (**Figura 2.12**).

Los análogos de nucleósido son una importante clase de compuestos utilizados en terapia del cáncer y en el tratamiento de varias enfermedades microbianas. Normalmente, estos compuestos se administran como pro-drogas que necesitan convertirse dentro de las células en metabolitos activos para ejercer su actividad antiviral. La R es un agente citostático y causa una reducción en la síntesis de DNA, RNA y proteínas en las células expuestas (Muller y cols. 1977). La adenosina kinasa convierte R en ribavirina monofosfato (RMP) (Willis y cols. 1978; Balzarini y cols. 1993), que a su vez es convertida a ribavirina trifosfato (RTP) por acciones sucesivas de nucleósido mono- y di-fosfato kinasas (Gallois-Montbrun y cols. 2003) (**Figura 2.13**). La fosforilación se produce rápidamente, de modo que tras pocas horas de tratamiento (con dosis farmacológicas relevantes, 10-100  $\mu\text{M}$ ) los valores de RTP intracelulares alcanzan concentraciones parecidas (más de 100  $\mu\text{M}$ ) a las de ATP y GTP en



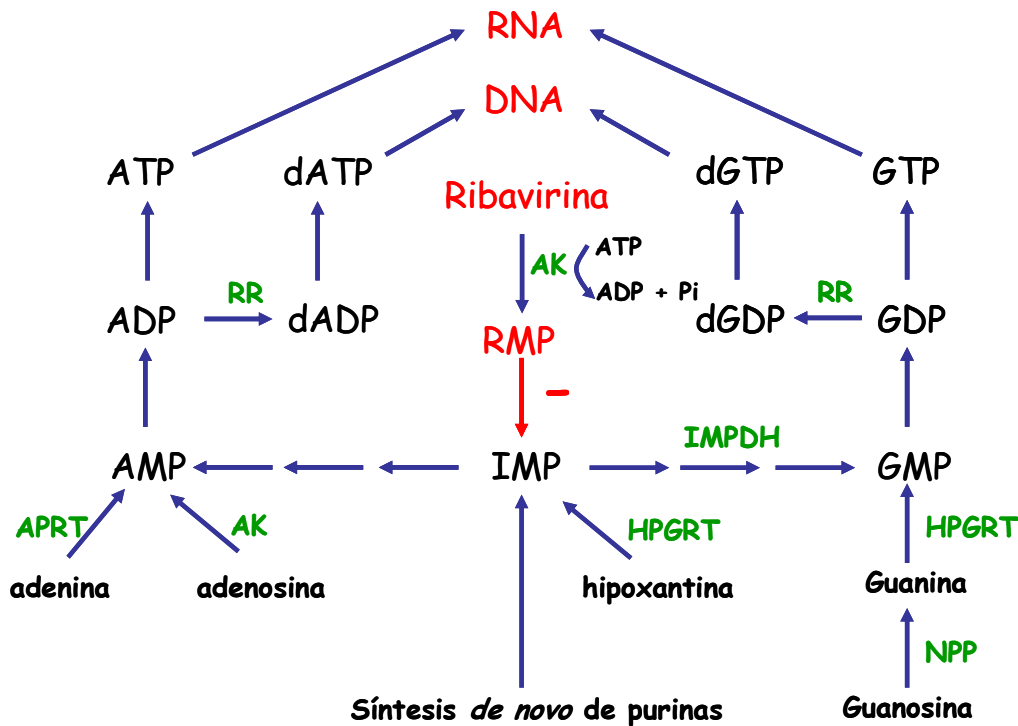
condiciones fisiológicas (Page y Connor 1990). RTP es el principal metabolito intracelular de R en células de mamífero (Smee y cols. 2001). El tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de R en el medio de cultivo de células BHK-21 persistentemente infectadas con VFA alcanzó el máximo valor de acumulación de RTP intracelular (1,5-2 mM) (Airaksinen y cols. 2003). No se han detectado formas desoxinucleótido de R, sugiriendo que la ribavirina difosfato (RDP) no es un buen sustrato para la ribonucleótido reductasa (RR). Sin embargo, dado que los niveles intracelulares de desoxinucleótidos son inferiores a los de los ribonucleótidos es posible que los desoxinucleótidos de la ribavirina estén presentes en concentraciones difícilmente detectables.



**Figura 2.12. Promiscuidad en el apareamiento de bases por la ribavirina.** La ribavirina puede adoptar 2 configuraciones por rotación del grupo carboxamida. Esta rotación permite el establecimiento de puentes de hidrógeno tanto con la citosina como con el uracilo. R, ribosa. Imagen tomada de Crotty y cols. 2002.

La ribavirina monofosfato (RMP) es un inhibidor competitivo de la inosín monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) (E.C. 1.1.1.205) (Lowe y cols. 1977; Zimmerman y Deeproze 1978; Balzarini y cols. 1993; Sintchak y Nimmersgern 2000). Como consecuencia de la competición entre RMP e IMP (inosín monofosfato, sustrato natural de la IMPDH), los niveles intracelulares de GTP sufren reducciones de aproximadamente de 5 veces en células tratadas con R (**Figura 2.13**). El descenso en los niveles de GTP puede afectar a la replicación viral de dos formas. Por una parte, los niveles fisiológicos de GTP y dGTP son necesarios para la traducción, transcripción y replicación del material genético. Por tanto, el desbalance en las concentraciones relativas de nucleótidos causado por el tratamiento con R puede producir una inhibición de la replicación viral y explicar el amplio espectro de la ribavirina frente a muchos virus (**Tabla 2.1**). Además, el desbalance de concentraciones de nucleótidos puede

favorecer que durante la síntesis del genoma viral las polimerasas sustituyan al GTP por otros nucleótidos, principalmente ATP y/o favorezcan el empleo de RTP como sustrato anómalo. Como consecuencia, la replicación viral en presencia de R puede producir incrementos en la tasa de error tanto mediante mutagénesis directa (por incorporación de R) como indirecta (por desbalance en los niveles de nucleótidos intracelulares (Airaksinen y cols. 2003; Stuyver y cols. 2002).



**Figura 2.13.** Metabolismo de las purinas en las células humanas. Las abreviaturas son: IMPDH, inosín monofosfato deshidrogenasa; RR, ribonucleótido reductasa; APRT, adenina fosforibotransferasa; AK, adenosina kinasa; HPGRT, hipoxantina guanina fosforibosil transferasa; NPP, purín nucleósido fosforilasa; RMP, ribavirina monofosfato. (-), inhibición. Basado en Traut (1994).

## 2.7.2.- Mecanismos de acción de la ribavirina

### 2.7.2.1.- Inhibición de la inosín monofosfato deshidrogenasa

Tras el descubrimiento de su actividad antiviral por ICN Pharmaceuticals (Sidwell y cols. 1972) se propuso que el principal mecanismo de acción de la ribavirina (R) era la inhibición de la inosín monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) por la

ribavirina monofosfato (RMP) (Streeter 1973) (**Figura 2.13**). Debido a esta inhibición, se produce una bajada intracelular en el nivel de nucleótidos de guanosina (GMP, GDP y GTP), lo que supone una disminución de la síntesis de RNA y del nivel de traducción de las proteínas virales (sección 2.7.1). Los niveles de GTP se pueden restaurar, parcial o totalmente, por la adición de guanosina al medio de cultivo de las células, lo que puede alterar o no la actividad antiviral de R, dependiendo del sistema viral (Streeter y cols. 1973; Wray y cols. 1985b; Scheidel y Stollar 1991; Jordan y cols. 1999; Airaksinen y cols. 2003). Se han propuesto otros mecanismos de la actividad antiviral de R, que se resumen a continuación.

### ***2.7.2.2.- Inhibición del “capping”***

La ribavirina monofosfato (RMP) interfiere en la eficacia de “capping” (modificación post-transcripcional del RNA que consiste en la adición en el extremo 5’ de un grupo guanilo por el enzima guanilil-transferasa) (Goswami y cols. 1979; Wray y cols. 1985b; Zhou y cols. 2003; Benarroch y cols. 2004; Bougie y Bisailon 2004). En VFA no hay traducción dependiente de “cap” (sección 2.4), por lo que este efecto no puede intervenir en la actividad anti-VFA de R (Airaksinen y cols. 2003). Dado que la inhibición conlleva la supresión de eIF4E, un factor de iniciación de la traducción dependiente del “capping” cuya sobreexpresión está implicada en varios tumores humanos (De Benedetti y cols. 2004), se ha descrito también un papel anticancerígeno de R (Kentsis y cols. 2004).

### ***2.7.2.3.- Inhibición directa de la polimerasa viral***

Se ha descrito la inhibición directa de algunas polimerasas víricas por la ribavirina trifosfato (RTP), en diversos sistemas virales tales como el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Toltzis y cols. 1988), el virus de la gripe (Wray y cols. 1985a), el virus de La Crosse (Cassidy y Patterson. 1989), el reovirus (Rankin y cols. 1989), el VIH (Fernández-Larsson y cols. 1989), el virus de la diarrea bovina (BVDV) (Stuyver y cols. 2002), el virus GB-B (GBV-B) (Lanford y cols. 2001) o el VHC (Maag y cols. 2003; Vo y cols. 2003).

#### **2.7.2.4.- Inmunomodulación**

Varios estudios han sugerido que R tiene efectos inmunomoduladores (Herrmann y cols. 2003; Feld y Hoofnagle 2005; Parker 2005) como por ejemplo la estimulación de la respuesta de células T durante la infección viral (Peavy y cols. 1981; Tam y cols. 1990; Edell y cols. 1998; Kamal y cols. 2002, 2004). R estimula la producción de citoquinas asociadas a linfocitos T-helper 1 (Th1) (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) y suprime la producción de citoquinas asociadas a linfocitos T-helper 2 (Th2) (Hultgren y cols. 1998; Ning y cols. 1998; Tam y cols. 1999). Durante el tratamiento combinado del VHC con IFN- $\alpha$  y R, se obtuvo una mejor respuesta de células T que con el tratamiento únicamente con IFN, apuntando a una acción sinérgica de ambas drogas (Cramp y cols. 2000). Estos datos sugieren fuertemente que al menos parte de la actividad anti-VHC de R se debe a su capacidad inmunomoduladora.

#### **2.7.2.5.- Mutagénesis letal**

Estudios experimentales más recientes han proporcionado evidencia de que uno de los principales mecanismos de la actividad antiviral de R para algunos virus se basa en su capacidad para ser incorporada por las RdRp durante la síntesis del RNA viral, implicando una actividad mutagénica directa (Crotty y cols. 2000, 2001; Maag y cols. 2001; Lanford y cols. 2001; Amaraa y cols. 2003; Severson y cols. 2003; Freistadt y cols. 2004; Day y cols. 2005). La inhibición de la IMPDH (apartado 2.7.2.1) (**Figura 2.13**) contribuiría a potenciar este efecto mutagénico, reduciendo la concentración del GTP intracelular, favoreciendo la incorporación de RMP en vez de GMP en el RNA producto. Trabajos de nuestro laboratorio con células persistentemente infectadas con VFA y tratadas con R, han indicado que la inhibición de IMPDH no es por sí sola suficiente para explicar el nivel mutagénico asociado a R. Se comparó el efecto que tenían R y el ácido micofenólico (MPA, un inhibidor de IMPDH no incorporable a ácidos nucleicos) en los niveles de nucleótidos intracelulares y en la complejidad de los espectros de mutantes del VFA. Los niveles de nucleótidos disminuyeron por igual tras tratamientos con R y MPA, pero R mostró mayor actividad antiviral, con valores de hasta cinco veces superiores en la frecuencia de mutación con respecto al tratamiento con MPA. La adición de guanosina al medio abolió el efecto mutágeno asociado a MPA, pero no el asociado a R. Los resultados sugieren que el principal mecanismo de

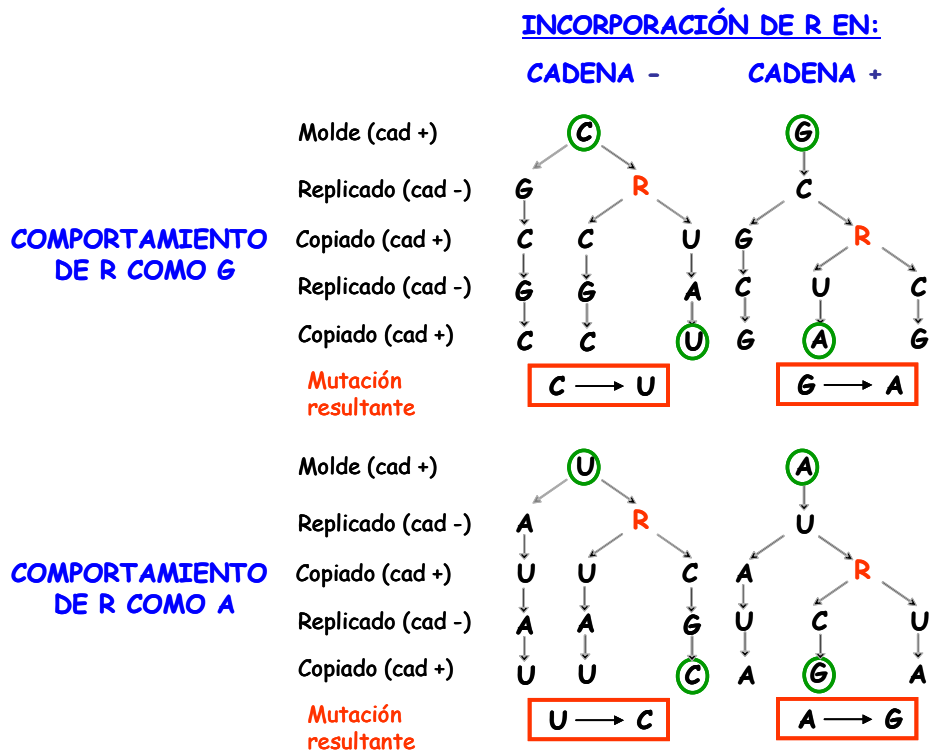
acción de la ribavirina para VFA, al menos durante una infección persistente, es la mutagénesis letal (Airaksinen y cols. 2003).

En algunos pacientes infectados con VHC tratados con R se ha observado un aumento en la frecuencia de mutación en las proteínas NS5A, NS5B y NS3 que se ha correlacionado con una mejor respuesta al tratamiento (Asahina y cols. 2005; Hofmann y cols. 2007), lo que sugiere una acción mutagénica de la R *in vivo*. Un análisis teórico del efecto de R sobre niveles de VHC cuantificados *in vivo* ha sugerido que la principal acción de R consistiría en disminuir la infectividad de los viriones de VHC durante la terapia combinada con IFN- $\alpha$ , lo que fue interpretado por los autores como reflejo de una transición del VHC hacia catástrofe de error (Dixit y cols. 2004). Este modelo para VHC es coherente con el modelo de defeción letal propuesto para LCMV (Grande-Pérez y cols. 2005) (Discusión, apartado 6.9). En cambio, otros estudios no han revelado una acción mutagénica de R *in vivo* (Schinkel y cols. 2003; Chevaliez y cols. 2007) por lo que el mecanismo antiviral de R en infecciones de VHC es una cuestión abierta (revisión en Domingo y Gómez 2007).

Atendiendo a estos antecedentes, lo más probable es que la ribavirina no tenga un mecanismo universal de actuación, sino que su acción antiviral dependa del sistema viral y su maquinaria replicativa, de los tipos celulares en los que replique el virus y de la respuesta del hospedador.

#### *2.7.2.5.1.- Apareamientos incorrectos originados por la ribavirina*

La ribavirina puede aparearse tanto con la citosina como con el uracilo (**Figura 2.12**). El tipo de transiciones que se esperan tras la incorporación de la R por la polimerasa de un ribovirus de cadena positiva como el VFA se detallan en la **Figura 2.14**. Así cuando R se comporte como análogo de G, dará lugar a las transiciones C-U o G-A cuando se incorpora a la cadena negativa o positiva, respectivamente. Cuando la R actúe como A y se incorpora a la cadena negativa, dará lugar a las transiciones U-C y cuando se incorpora a la cadena positiva, dará lugar a transiciones A-G.



**Figura 2.14. Mutagénesis inducida por apareamientos incorrectos ocasionados por la ribavirina.** Esquema de las mutaciones que se inducen en el RNA viral debido al apareamiento incorrecto de R con C o U. A la izquierda se indica la hebra de RNA en que se encuentra cada nucleótido. Los nucleótidos presentes en cadena positiva (cad +) o cadena negativa (cad -) se representan con la letra correspondiente a la base nitrogenada; (R, ribavirina). La base inicial y final de una vía mutagénica se indican mediante círculos y las mutaciones resultantes se resaltan mediante cuadros.

### 2.7.3.- Resistencia a ribavirina

Existen pocos casos descritos en la literatura de resistencia a R. Pases masivos de virus Sindbis en presencia de ácido micofenólico (MPA) seleccionaron variantes virales que mostraron resistencia a MPA y a R (Scheidel y Stollar 1987). El análisis genético identificó una mutación de resistencia en la región nsP1, presuntamente relacionada con la actividad guanilil transferasa. Además se ha identificado una mutación asociada con resistencia a R en pacientes crónicamente infectados con VHC y tratados con ribavirina. La mutación de resistencia mapea en el dominio “thumb” de la polimerasa de VHC (NS5B) (Young y cols. 2003). Por otro lado también se han

encontrado mutaciones en la región NS5A que confieren resistencia a R en el replicón de VHC propagado en cultivos celulares (Pfeiffer y Kirkegaard 2005b).

Recientemente, en dos laboratorios distintos se ha seleccionado un variante de poliovirus (PV) con el cambio de aminoácido G64S en la polimerasa, al replicar el virus en presencia de cantidades crecientes de R (Pfeiffer y Kirkegaard 2003; Arnold y cols. 2005). Por aplicación de métodos genéticos y bioquímicos se observó una menor capacidad de la enzima mutante para usar RTP como sustrato y un aumento en la fidelidad de copia en relación con el virus “wild-type”. El mutante G64S de PV ha sido importante en varios campos: (i) Las RdRp son el producto génico viral responsable de replicación de baja fidelidad y de la dinámica de cuasiespecies de los virus RNA. Por tanto, los mutantes de fidelidad son esenciales en el estudio de las bases moleculares de la fidelidad de copia del molde, así como en el diseño de drogas que permitan disminuir la fidelidad. También abren la posibilidad de explorar la influencia de las tasas de mutación en el comportamiento viral. (ii) Los estudios con el mutante de poliovirus G64S han demostrado que un espectro de mutantes amplio es esencial para la adaptación de los virus a un ambiente complejo (en este caso representado por un ratón susceptible) y que un mutante individual incapaz de alcanzar un órgano puede hacerlo cuando es complementado por un espectro de mutantes acompañante (Pfeiffer y Kirkegaard 2005a; Vignuzzi y cols. 2006). (iii) La selección de mutantes como G64S de PV podría comprometer la eficacia de la mutagénesis letal como estrategia antiviral. El hecho de que dos grupos trabajando independientemente hayan seleccionado el mismo mutante de PV sugiere que las polimerasas de picornavirus tienen posibilidades limitadas de escapar a la actividad mutagénica de la ribavirina, por la desventaja selectiva asociada con las mutaciones de resistencia (ver Discusión, apartado 6.9).

El reciente descubrimiento de virus resistentes a R y el mayor conocimiento del mecanismo mutagénico de R han abierto nuevos abordajes para el entendimiento de la genética de los virus RNA y la aplicación de la mutagénesis letal como nueva estrategia antiviral. En esta Tesis Doctoral hemos investigado los posibles mecanismos moleculares de resistencia a R del VFA. Para ello hemos diseñado experimentos enfocados en seleccionar mutantes del VFA con una menor sensibilidad a R y estudiar sus propiedades biológicas y de replicación en la célula y sus propiedades bioquímicas mediante ensayos con polimerasas purificadas.

### **3.- Objetivos**

Los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido:

1. Selección y caracterización biológica de variantes del virus de la fiebre aftosa (VFA) con menor sensibilidad a ribavirina (R) mediante el tratamiento con concentraciones crecientes de R.
2. Caracterización bioquímica de la polimerasa del VFA con la sustitución M296I y efecto de la sustitución M296I en la discriminación de ribavirina-5'-trifosfato.
3. Análisis biológico y bioquímico de la polimerasa de VFA con la sustitución G62S.



## **4.- Materiales y Métodos**

### **4.1.- Cultivo de células eucarióticas**

Para las infecciones con el virus de la fiebre aftosa (VFA) se ha empleado la línea celular establecida BHK-21. Las células BHK-21 son fibroblastos de riñón de hamster (Stocker y MacPherson 1964) que fueron clonadas por dilución límite (de la Torre y cols. 1988). Se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Dulbecco y Freeman 1959), con 5% de suero fetal de ternera (SBF; Gibco, BRL), aminoácidos no esenciales (Sigma), 50 µg/ml de gentamicina (Sigma) y 0,00002% de parahidroxibenzoato de butilo (Sigma) como antimicótico. Las células se cultivaron hasta confluencia a 37°C, 7% de CO<sub>2</sub> y 98% de humedad. Se separaron de la placa por tratamiento con tripsina-EDTA durante 2 minutos y se sembraron a la dilución apropiada.

#### **4.1.1.- Descongelación de células**

Para su cultivo, se descongelaron en un baño de 37°C las células contenidas en criotubos almacenados en nitrógeno líquido, y se transfirieron a tubos de plástico (Falcon) de 15 ml que contenían 9 ml de DMEM calentado a 37°C. Tras breve agitación se centrifugaron las células a 1.500 r.p.m. durante 15 min a temperatura ambiente en una centrífuga de mesa *Rotina* 46R (Hettich). Se eliminó completamente el sobrenadante y se disgregó el sedimento de células mediante suave agitación del tubo. Se añadieron 2 ml de DMEM suplementado con SBF al 10%, se resuspendieron las células, y a la suspensión se añadieron 13 ml de DMEM con 10% de SBF. Las células se distribuyen en placas Petri de 100 mm de diámetro (P100, Nunc) y se incubaron en las condiciones ya descritas. Habitualmente las células alcanzaron la confluencia de las 40 h a 48 h.

#### **4.1.2.- Congelación y almacenamiento de células**

Para su almacenamiento, las células se congelaron lentamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  en una mezcla de 90% de SBF y un 10% de dimetil silfóxido (DMSO, Sigma) a una densidad de  $10^6$  células/ml, en criotubos (Nunc), y se mantuvieron en nitrógeno líquido.

#### **4.2.- Virus**

Se han empleado los siguientes VFA de serotipo C:

- **C-S8c1**: es un clon biológico procedente del aislado natural C<sub>1</sub> Santa Pau Sp/70 (Santa Pau, Girona, 1970) y obtenido mediante tres aislamientos sucesivos de placa en células BHK-21 (Sobrino y cols. 1983).
- **C-S8c1p213MARLS** (denominado a lo largo de esta Tesis Doctoral virus MARLS): es un clon mutante de escape al anticuerpo monoclonal (ACM) SD6 [ACM neutralizante que se une al bucle G-H de la proteína VP1 del VFA de serotipo C (Mateu y cols. 1990)] seleccionado a partir de la población C-S8c1p213 (clon C-S8c1 pasado 213 veces en células BHK-21) (Charpentier y cols. 1996). Presenta el cambio de aminoácido L144S en el sitio antigénico A del bucle G-H de la proteína VP1 (Baranowski y cols. 1998). Presenta además, el cambio de aminoácido Q232H en la región que codifica la polimerasa (3D). La eficacia biológica (“fitness”) relativa de este clon es de 25 veces la del clon C-S8c1 (García-Arriaza y cols. 2005).

Clones infecciosos que expresan virus con mutaciones en la polimerasa de VFA:

- **pMT28-3D(M)**: es un virus que contiene la sustitución Q232H en la proteína 3D, en el contexto del genoma de C-S8c1.
- **pMT28-3D(M-M296I)**: es un virus que contiene las sustituciones Q232H y M296I en la proteína 3D, en el contexto del genoma de C-S8c1.
- **pMT28-3D(M296I)**: es un virus que contiene la sustitución M296I en la proteína 3D, en el contexto del genoma de C-S8c1.
- **pMT28-3D(G62S)**: es un virus que contiene la sustitución G62S en la proteína 3D, en el contexto del genoma de C-S8c1.

- **pMT28-3D(G62S-M296I):** es un virus que contiene las sustituciones G62S y M296I en la proteína 3D, en el contexto del genoma de C-S8c1.

Algunos mutantes de la polimerasa han sido aislados a partir de poblaciones víricas y otros han sido producidos por mutagénesis dirigida, tal y como se describe en los apartados 4.11.1 y 4.11.2.

### **4.3.- Agentes mutagénicos y agentes antivirales**

Los agentes mutágenos empleados fueron 5-fluorouracilo (FU) (Sigma), 5-azacitidina (AZC) (Sigma) y ribavirina (R) (donación de J.C de la Torre). El agente antiviral empleado fue el cloruro de guanidinio (G) (Sigma). Para preparar los medios correspondientes se partió de disoluciones de FU, AZC, y G en DMEM (5 mg/ml) y de disoluciones de R en PBS (0,2 M). Las disoluciones se esterilizaron por filtración, se diluyeron convenientemente en DMEM y se suplementaron con 2% de SBF. Los medios con FU, R, y G se guardaron a 4°C durante un periodo máximo de 15 días. Los medios de AZC se prepararon frescos para cada experimento. Las condiciones normales para el tratamiento con cada uno de los mutágenos o antivirales, se basaron en estudios anteriores sobre toxicidad celular y acción antiviral específica (Pringle 1970; Holland y cols. 1990; Sierra y cols. 2000; Pariente y cols. 2003; Airaksinen y cols. 2003). Así, previamente a la infección con agentes mutagénicos (apartado 4.4.2), las monocapas celulares se preincubaron durante 6-13 horas con el mutágeno para permitir su absorción e incorporación a las vías metabólicas celulares. La concentración utilizada en la preincubación fue la misma que se utilizó durante la infección. Las concentraciones de cada uno de los mutágenos o agentes antivirales empleados y los periodos de preincubación con las células BHK-21 fueron los siguientes:

- R: 200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M y 800  $\mu$ M; preincubación durante 6-8 horas.
- AZC: 10  $\mu$ g/ml; preincubación durante 6-8 horas.
- FU: 50 y 200  $\mu$ g/ml; preincubación durante 8-13 horas.
- G: 4 mM; sin preincubación.

#### **4.4.- Infecciones de células BHK-21 por el virus de la fiebre aftosa**

##### **4.4.1.- Infecciones en medio líquido en ausencia de agentes mutagénicos y antivirales**

Los métodos de infección de células BHK-21 en medio líquido y los controles para asegurar ausencia de contaminaciones (mantenimiento de cultivos no infectados en paralelo, periódicos análisis por secuenciación para la identificación de virus, etc.) han sido descritos previamente (Domingo y cols. 1980; Sobrino y cols. 1983; Baranowski y cols. 1998). Cuando es relevante para el objetivo del experimento, se dan las condiciones de infección (multiplicidad de infección, m.d.i; número de células infectadas, tiempo de recogida de virus, etc.) en los correspondientes apartados de Resultados.

##### **4.4.2.- Infecciones en medio líquido en presencia de agentes mutagénicos y antivirales**

Se llevaron a cabo infecciones en presencia de mutágeno o agente antiviral, con los diferentes clones y poblaciones de VFA estudiados, en las condiciones descritas en el apartado 4.3. Se infectaron células con los diferentes clones y poblaciones de VFA correspondientes dejando una hora de adsorción a 37°C; las monocapas de células se lavaron con tampón fosfato 0,1 M de pH 6,0 y con DMEM para eliminar las partículas no absorbidas y se añadió el medio de infección (que contenía el mutágeno o antiviral). Las infecciones se mantuvieron hasta observar efecto citopático completo o se recogieron alícuotas de sobrenadante a distintos tiempos post-infección, dependiendo del objetivo del experimento. Siempre se llevó en paralelo una infección en medio DMEM (sin mutágeno ni antiviral) como control. Los virus recogidos fueron titulados mediante plaqueo (apartado 4.4.3).

Se realizaron asimismo infecciones seriadas (pases), para los cuales se utilizaron 0,2 ml del sobrenadante de la infección previa para infectar una monocapa de  $2-4 \times 10^6$  células BHK-21, pretratadas con el mutágeno como se ha descrito anteriormente.

Normalmente para cada experimento se realizaron dos infecciones seriadas en paralelo, que denominamos serie A y serie B, además de pases en DMEM (sin mutágeno ni antiviral) como control.

La nomenclatura para designar un virus pasado un determinado número de veces en presencia del mutágeno o antiviral consiste en el nombre del virus o su abreviatura, seguida de la abreviatura del mutágeno o antiviral seguido de A o B para designar la serie; “p” seguido de un número indica el número de pase. Las poblaciones de VFA pasadas en ausencia de agentes mutagénicos o antivirales se describen indicando el nombre del virus o su abreviatura, la serie y el número de pase. Por ejemplo, MARLS-RAp25 indica una población proveniente del virus MARLS sometido a 25 pases en presencia de ribavirina, en la serie A; MARLS-Bp35 indica la población resultante de un virus MARLS sometido a 35 pases en ausencia de mutágeno, en la serie B.

#### **4.4.3.- Plaqueo de virus en medio de agar semisólido en células BHK-21.**

Los títulos virales fueron determinados por ensayos de plaqueo. Los métodos de plaqueo de virus en medio de agar semisólido en células BHK-21 han sido descritos previamente (Domingo y cols. 1980; Sobrino y cols. 1983; Baranowski y cols. 1998). Se infectaron  $2-4 \times 10^6$  células con diluciones crecientes de virus en DMEM, que siempre se mantuvieron en hielo. Tras una hora de adsorción a 37°C en una atmósfera con 7% de CO<sub>2</sub>, 98% de humedad, se lavaron las monocapas dos veces con DMEM y se añadió agar semisólido a una concentración final del 0,5% en medio DMEM con 2% de SBF y 1% de dietilaminoetil (DEAE)-dextrano. A continuación se incubó en las mismas condiciones de adsorción durante 16 a 30 horas, dependiendo del variante viral. Después de la incubación se fijaron las células con formaldehído al 2% y se tiñeron las monocapas fijadas con cristal violeta (2% cristal violeta en formaldehído al 2%).

#### **4.5.- Extracción de RNA vírico**

La extracción del RNA viral se llevó a cabo por tratamiento con Trizol (Gibco). Se mezcló un volumen de sobrenadante de células infectadas con 3 volúmenes de Trizol. La mezcla se agitó y se le añadieron dos volúmenes de cloroformo respecto al

volumen de sobrenadante de virus empleado. Se agitó la mezcla con vórtex y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Tras centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 15 min se separaron las dos fases y los ácidos nucleicos se recuperaron de la fase acuosa por precipitación con isopropanol (Merck). Finalmente el RNA se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua estéril libre de nucleasas y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

#### **4.6.- Obtención de cDNA y amplificación por RT-PCR de RNA vírico**

RNA de VFA fue amplificado mediante retrotranscripción seguida de amplificación por PCR (RT-PCR). Para la reacción de retrotranscripción del RNA vírico (obtención del cDNA del RNA del VFA) se empleó la retrotranscriptasa del virus de la mieloblastosis aviar AMV-RT (Promega). Se utilizó Ampli *Taq* DNA polimerasa (Roche) en el caso de que el objeto fuera determinar secuencias consenso de poblaciones; se utilizó *Pfu* DNA-polimerasa (Promega) en el caso de que el objetivo fuera determinar secuencias de clones moleculares (Arias y cols. 2001), debido a que la *Pfu* DNA-polimerasa presenta mayor fidelidad de copia gracias a la presencia de una actividad correctora de errores (Cline y cols. 1996). El empleo de *Pfu* DNA-polimerasa evita que las frecuencias de mutación determinadas para una población vírica se desvíen significativamente debido a mutaciones introducidas durante el proceso de amplificación *in vitro* (Airaksinen y cols. 2003). En ambos casos se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante, realizando el proceso de amplificación por RT-PCR en un solo paso en el tampón y concentración óptima para la polimerasa. En el caso de algunas poblaciones sometidas al tratamiento con mutágeno, debido a la cantidad limitante de RNA, las reacciones de RT-PCR se realizaron en dos pasos. Para la reacción de transcripción inversa del RNA vírico se empleó la RT Transcriptor (Roche).

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de RNA por RT-PCR se detallan en la **Tabla 4.1**.

**Tabla 4.1.** Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación, secuenciación y cuantificación de RNA y cDNA víricos

Región <sup>a</sup>	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3') <sup>b</sup>	Orientación <sup>c</sup>	Posición <sup>d</sup>
VP3	3R1EcoRI	CTGGCCGAA <b><i>ITC</i></b> GACGTGTCGCTG	s	2767
	3R2New	CTTTGAGCTCCGGCTACCTGTG	s	3171
VP1	AV1New	GGATTGGTTGTGTTGTTAAGTGC	a	3518
	1R1L	ACACCGTGTGTGGCTACGGCG	s	3572
2A-2B	pU	GAAAGGCCAGGGTTGGACT	a	3888
2B	2BR3	GCCATCAGGACCGGTCTCGATG	s	4027
2C	2CD1	CTCTTCTGAGGCGATCCATGC	a	4458
	2CR1	AGAGCGGGAACGTCCATATTG	s	4580
	2CR2	GGCAAACCCTTCAGCAGTAAG	s	4924
	2CD3	CGCTCACGTCGATGTCAAAGTG	a	5047
	3A	3AR1	AAAGGCCAACACGAGGCAGC	s
	3AR3	GATGACGTGAACCTCTGAGCCCGC	s	5710
3C	3CD1	CATGACCATCTTTTGACAGGTCAG	a	6009
3C-3D	A2Sac I	<b><i>CAGAGCTC</i></b> GACCCTGAACCCACCACGA	s	6581
3D	5'3D	GGGTTGATCGTTGATACCAGAGA	s	6610
	G62Splus	GTCATTTTCTCCAAGCATAAA <b><i>ATC</i></b> AGACACAAAGATGTCTGCGG	s	6772
	G62Sminus	AGACATCTTTGTGTCTG <b><i>ACCTTT</i></b> ATGCTTGGACTTTTACTG	a	6810
	3DR1	GAAACGCCCGGTGCACTTATC	s	6984
	3DR4	ACTCGCATTGTCGACGTTTT	s	7141
	A3	CGTCGACAATGCGAGTCTGCCC	a	7156
	B2New	CACTGCAGCGATGCCATGAACATC	s	7351
	AV3	TTCATGGCATCGCTGCAGTGG	a	7370
	M296Iplus	CGCATCACTGTTGAAGGCCGGATACCATCTGGCTGTTCCGCAAC	s	7473
	FwResA	GAAGCGGGATACCATCTGGCTGTTCCG	s	7486
	MKWT	GGAACAGCCAGATGGCAT	a	7512
	MKRES	GGAACAGCCAGATGGTAT	a	7512
	M296Iminus	GCGGAACAGCCAGATGGTATCCCGCCTTCAACAGTGATGCGC	a	7514
	CR3DIL	CTGGCCGAATTCGACGTGTCGCTG	s	7718
	AV2New	TGTGGAAGTGTCTTTGAGGAAAAG	a	7783
3'UTR	B1New	GTTTGGGATTATGCGTC	a	8032
	C-not-pol	CCAATTGTGATGTTTGG <b><i>CGGCCG</i></b> CTGCGTCGCCGCACACGGCGTTC	a	8043
	ED6EcoRI	GCCCC <b><i>GAATTC</i></b> CATTGTGCCAATTGT	a	8060
	Rend	TTTGGATTAAGGAAGCGGAAAAGCCC	a	8115
pMT28	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	a	Δ

<sup>a</sup> Región genómica a la que corresponde el oligonucleótido (Introducción, sección 2.3.2).

<sup>b</sup> Las mutaciones presente introducidas mediante los oligonucleótidos están en negrita. La diana de restricción presente en los oligonucleótidos utilizados está subrayada y en cursiva.

<sup>c</sup> Orientación del oligonucleótido iniciador: s significa “sentido” (de la misma polaridad que el RNA genómico del VFA); a significa “antisentido” (de la polaridad de la cadena negativa del VFA).

<sup>d</sup> Se indica la posición en el genoma del VFA (Escarmís y cols. 1999) del nucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido iniciador.

Δ La secuencia del oligonucleótido T7 hibrida en una región fuera del genoma de VFA, en el plásmido pMT28.

#### **4.7.- Purificación de fragmentos de PCR**

Los productos de amplificación de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (NuSieve, Sea-Plaque) (FMC), en tampón TAE (sección 4.25). El DNA de la banda deseada se purificó usando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA se cuantificó en un espectrofotómetro de amplio espectro (Nanodrop 1000) o mediante tinción con bromuro de etidio o SYBR SAFE en geles de agarosa y comparación de la intensidad de la banda con marcadores de concentración conocida. Cuando no fue necesario purificar el DNA por electroforesis en gel de agarosa y para eliminar oligonucleótidos y dNTPs no incorporados, los fragmentos de DNA sintetizados se purificaron bien por filtración a través de membranas de Microcon (Millipore) o bien mediante el tratamiento con fosfatasa alcalina (Amersham) y exonucleasa I (Amersham) (15 min a 37°C, seguido de la inactivación de las enzimas durante 15 minutos a 80°C).

#### **4.8.- Secuenciación de DNA**

La secuenciación de nucleótidos se efectuó mediante técnicas de secuenciación automática en los secuenciadores ABI373 y ABI3730 (Applied Biosystems). La reacción se efectuó con el kit *Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). El análisis de secuencias se llevó a cabo con el paquete DNA Star 4.0 (Lasergene), GeneDoc, y los programas del GCC (Universidad de Wisconsin) mediante el análisis de un cromatograma. Cada secuencia se determinó con al menos dos reacciones independientes de secuenciación. Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación de DNA se detallan en la **Tabla 4.1**.



#### 4.9.- Cuantificación de moléculas de RNA vírico mediante PCR a tiempo real

La cuantificación de RNA vírico se realizó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real con el aparato “LightCycler” (Roche). Este método permitió medir la cantidad de producto de RNA amplificado en cada ciclo de la reacción de PCR mediante la unión de una sonda fluorescente (SYBR *Green* I) que se une específicamente al surco menor del DNA bicatenario. De esta forma, la fluorescencia emitida aumenta de forma proporcional a la cantidad del producto amplificado. Se utilizó el kit “Light Cycler RNA Master SYBR Green I” (Roche) y se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante. La enzima utilizada fue la *Tth* polimerasa, que es una enzima termoestable que posee actividad retrotranscriptasa y polimerasa (Myers y Gelfand 1991), que permite realizar retrotranscripción y la amplificación por PCR en una sola reacción. La región amplificada para la cuantificación de RNA vírico fue la codificante de 2C y los oligonucleótidos empleados fueron 2CD3 y 2CR2 (**Tabla 4.1**). El RNA de las muestras se cuantificó por extrapolación de los valores de fluorescencia obtenidos en una curva patrón realizada en paralelo con RNA de pMT28 (RNA transcrito a partir del plásmido pMT28), cuya concentración fue determinada por espectrofotometría mediante densidad óptica a 260 nm y por electroforesis en gel de agarosa. El plásmido pMT28 es un clon infeccioso de C-S8c1 derivado del pMT15 (Toja 1997), que contiene 35 residuos de citidina en el poli(C), 25 adenosinas en el poli(A), no contiene ningún nucleótido entre el inicio del genoma de C-S8c1 y el promotor de la SP6 polimerasa, y su secuencia corresponde a la del genoma de C-S8c1 (García-Arriaza y cols. 2004).

La especificidad de las reacciones de amplificación se comprobó con el análisis de la curva de fusión del DNA amplificado. Las curvas de fusión permiten distinguir entre productos de amplificación específica y productos artefactuales de bajo peso molecular (como dímeros de oligonucleótidos), ya que los productos específicos presentan una temperatura de fusión más alta. En algunos casos, los productos de las amplificaciones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el producto tenía la longitud esperada. Se determinó el número mínimo de moléculas de RNA que pueden ser cuantificadas en estas condiciones experimentales

utilizando diluciones seriadas de RNA de pMT28 de concentración conocida. El límite de detección de esta RT-PCR fue de  $1,8 \times 10^2$  moléculas de RNA por muestra.

#### **4.10.- Determinación de la eficacia biológica relativa de pMT28-3D(M-M296I) con respecto a pMT28-3D(M)**

Para estudiar la eficacia biológica relativa en un ambiente determinado de poblaciones de VFA con la sustitución M296I en la 3D, se realizaron experimentos de competición en pases seriados con los virus pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I).

Se coinfectaron células BHK-21 con aproximadamente igual cantidad de los virus pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I), a una multiplicidad de infección (m.d.i.) de 0,1 UFPs por célula ( $2-4 \times 10^6$  células infectadas con un total de  $4 \times 10^5$  UFPs en el primer pase). Cuando el efecto citopático fue completo, el sobrenadante de la infección fue diluido 10 veces y utilizado para infectar una nueva monocapa celular. Se llevaron a cabo un total de cuatro infecciones seriadas en ausencia y en presencia de R (800  $\mu$ M) o FU (200  $\mu$ g/ml). Se extrajo RNA del inóculo inicial y del sobrenadante de la infección de cada uno de los pases y la región que codifica 3D fue amplificada por RT-PCR y analizada por secuenciación, tal y como se describe en los apartados 4.5, 4.6 y 4.8, respectivamente.

La cuantificación de la proporción de los dos virus competidores en cada pase se realizó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (descrito en el apartado 4.9). La mutación G7497A está presente sólo en los genomas de VFA con resistencia a R y corresponde a la sustitución de aminoácido M296I en 3D. Se diseñaron oligonucleótidos capaces de discriminar entre las secuencias que difieren en la posición 7497 (**Tabla 4.2**). La cuantificación de RNA con la mutación M296I de cada uno de los pases se determinó por extrapolación de los valores de fluorescencia obtenidos en una curva patrón realizada en paralelo con RNA de pMT28-3D(M-M296I) con una temperatura de hibridación de 72°C. En estas condiciones no se detectó amplificación de RNA correspondiente a virus “wild-type” (G7497; M296). Para la cuantificación de virus M296 se procedió de la misma forma a excepción de que el oligonucleótido “antisentido” utilizado en este caso era 100% homólogo a la secuencia de pMT28-3D(M) y que la curva patrón se construyó con pMT28-3D(M) con una temperatura de

hibridación de 68°C (Tabla 4.2). En estas condiciones se obtuvieron diferencias de al menos dos logaritmos a favor de la amplificación del virus M296. En ambas cuantificaciones se utilizó 3DR4 como oligonucleótido sentido (Tabla 4.1).

**Tabla 4.2. Condiciones de la cuantificación a tiempo real de RNA de VFA M296 y VFA M296I**

Variante de VFA	Oligonucleótido antisentido	Curva estándar
SENSIBLE A R (M296)	MK WT: GGAACAGCCAGATGGCAT	pMT28-3D(M)
RESISTENTE A R (M296I)	MK RES: GGAACAGCCAGATGGTAT	pMT28-3D(M-M296I)

La cuantificación de RNA de las muestras se determinó por extrapolación de los valores de fluorescencia obtenidos en una curva patrón realizada en paralelo con RNA transcrito a partir de pMT28-3D(M), en el caso de la cuantificación de genomas de virus sensible a ribavirina (R), y RNA transcrito a partir de pMT28-3D(M-M296I), en el caso de cuantificación de genomas de virus resistente a R. Se especifica la secuencia del oligonucleótido antisentido empleado en cada tipo de cuantificación; el nucleótido en rojo indica la posición 7497 del genoma de VFA (según Escarmís y cols. 1999), que codifica M, en el caso de virus “wild-type” (sensible a R), o I, en el caso de virus mutante (resistente a R), en la posición 296 de la 3D de VFA (según Ferrer-Orta y cols. 2004).

La representación del logaritmo de la proporción de los dos genomas que compiten frente al número de pases da el vector de eficacia biológica (Holland y cols. 1991; Duarte y cols. 1992; Escarmís y cols. 1996, 1999). El antilogaritmo de la pendiente es el valor numérico de eficacia biológica de un virus con respecto a otro.

## 4.11.- Clonaje molecular

### 4.11.1.- Clonaje molecular para el análisis de cuasiespecies del virus de la fiebre aftosa

Con objeto de asegurar un exceso de molde en los productos de amplificación que fueron clonados, solamente se utilizaron las muestras para las cuales una amplificación con 1/100 del molde inicial fue positiva. Para evitar introducir mutaciones durante el proceso de amplificación de PCR previo al clonaje, se utilizó la *Pfu* DNA-polimerasa en lugar de *Ampli Taq*. La *Pfu* DNA-polimerasa presenta una frecuencia de mutación de  $1,3 \times 10^{-6}$  sustituciones por nucleótido copiado y ronda de

amplificación por  $8,0 \times 10^{-6}$  que presenta la *Taq* polimerasa (Cline y cols. 1996). Las cuasiespecies de las poblaciones analizadas se detallan en la **Tabla 4.3**.

**Tabla 4.3. Poblaciones estudiadas para el análisis de las cuasiespecies**

Población <sup>a</sup>	Región del Genoma <sup>b</sup>	Vector de Clonaje <sup>c</sup>
MARLS-RAp30-5	3D (7150-8020)	pMT28
MARLS-RBp30-5	3D (7004-8020)	pMT28
MARLS-Ap35	3D (7150-8020)	pMT28
MARLS-Bp35	3D (7004-8020)	pMT28
pMT28-p5	VP1 (3210-3830)	pGEM-T Easy
	3D (6620-8020)	pGEM-T Easy
pMT28-3D(M296I)-p5	VP1 (3210-3830)	pGEM-T Easy
	3D (6620-8020)	pGEM-T Easy
pMT28-Rp5	VP1 (3210-3830)	pGEM-T Easy
	3D (6620-8020)	pGEM-T Easy
pMT28-3D(M296I)-Rp5	VP1 (3210-3830)	pGEM-T Easy
	3D (6620-8020)	pGEM-T Easy

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas se describen en los apartados 5.1.1 y 5.1.9.1 de Resultados.

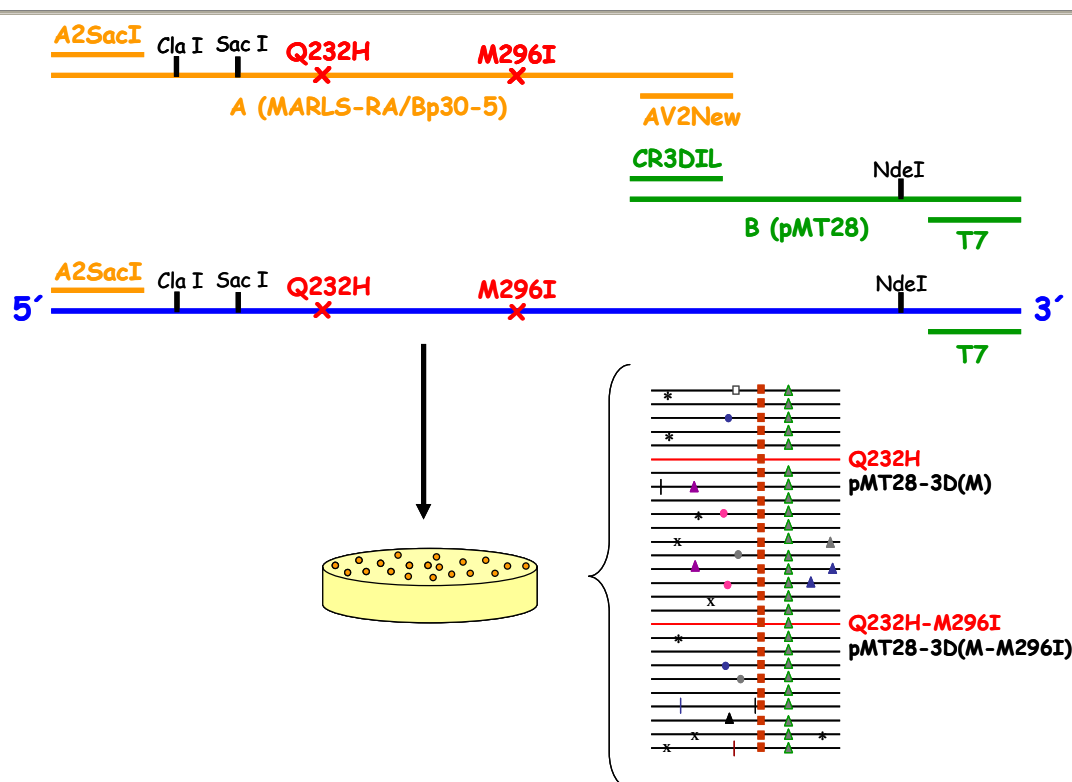
<sup>b</sup> La numeración de los residuos del genoma del VFA es la descrita en Escarmís y cols. (1999).

<sup>c</sup> Se indica el vector de clonaje utilizado.

Se siguieron dos estrategias de clonaje:

- **Clonaje en pMT28:** Para las poblaciones de VFA MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5 (que se describen en Resultados, sección 5.1.1) se clonó parte de la región codificante de la polimerasa (3D) en el plásmido pMT28 (**Figura 4.1**). Por un lado el objetivo fue el análisis de cuasiespecies y por otro, la obtención de transcritos infecciosos portadores de la mutación M296I. Se realizó una RT-PCR del RNA de las poblaciones MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5 (con la mutación M296I impuesta en la secuencia consenso; ver Tabla 5.1), tal y como se describe en la sección 4.6, utilizando los oligonucleótidos A2SacI y AV2New (**Tabla 4.1**). Esta amplificación originó en los dos casos el fragmento A, que abarca desde la posición 6580 a la 7783 del genoma de VFA. El fragmento A incluye la zona que codifica 3D con M296I y las dianas de restricción para *Cl*aI (sitio de corte 7004 del genoma de C-S8c1) y *S*acI (sitio de corte 7150 del genoma de C-S8c1). Por otro lado se amplificó el DNA del pMT28

con los oligonucleótidos T7 y CR3DIL (Tabla 4.1), dando lugar al fragmento B, que abarca desde los nucleótidos 7718 del genoma de C-S8c1 hasta una región dentro del plásmido pMT28. Este fragmento contiene una diana de restricción para *NdeI* [sitio de restricción diseñado en el extremo 3' del poli(A) viral]. Los fragmentos A y B fueron recombinados en una reacción de PCR "shuffling" (Núñez y cols. 2001), utilizando cantidades equimolares de A y B y los oligonucleótidos externos, T7 y A2*SacI*.



**Fig. 4.1.** Representación esquemática de la estrategia de clonaje de RNA de las poblaciones MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5. El fragmento A (arriba, en naranja) proviene de una RT-PCR del RNA de las poblaciones MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5 y contiene las mutaciones Q232H y M296I, representadas por una cruz roja. El fragmento B (debajo del A, en verde) proviene de una PCR del DNA de pMT28. Los oligonucleótidos empleados para obtener los fragmentos A y B están representados en naranja y verde, respectivamente. Los fragmentos A y B obtenidos fueron recombinados en una reacción de PCR "shuffling" empleando los oligonucleótidos externos (A2*SacI* y T7). El producto final (representado por una línea azul), y que incluye la mutación deseada, fue digerido en MARLS-RAp30-5 con *SacI* y *NdeI* (que cortan, respectivamente, en el nucleótido 7150 y en un sitio de restricción diseñado en el extremo 3' del poli(A) viral) y en MARLS-RBp30-5 con *ClaI* (que corta en el nucleótido 7004) y *NdeI*. Tras la transformación de las ligaciones correspondientes en *E. coli* DH5α, se obtuvo una batería de clones moleculares, uno de los cuales no tenía la mutación M296I, y que denominamos pMT28-3D(M) y otro que únicamente contenía M296I en el contexto de secuencia de MARLS, y que denominamos pMT28-3D(M-M296I).

Los productos finales de PCR que comprenden la región 3D, y que contienen la mutación M296I, fueron purificados tal y como se describe en la sección 4.7, y digeridos con *ClaI* y *NdeI*, en el caso de MARLS-RAp30-5 y con *SacI* y *NdeI*, en el caso de MARLS-RBp30-5. Los productos de digestión fueron también purificados, y se ligaron con el plásmido pMT28, previamente digerido con las correspondientes enzimas de restricción utilizadas para cada DNA. El tratamiento de DNA con enzimas de restricción (New England Biolabs) se llevó a cabo siguiendo los consejos del proveedor. En los casos en los que cada enzima requiriese un tampón distinto, el DNA se filtró a través de membranas de Microcon (Millipore) entre las digestiones. Para eliminar las enzimas de restricción del vector, se realizó una extracción con la mezcla fenol-cloroformo-isoamílico-hidroxiquinoleína (proporción 50:50:1:0,1) (Escarmís y cols. 1996). Para impedir la religación del vector, previamente se eliminó el grupo 5' fosfato de los extremos del vector por tratamiento con fosfatasa alcalina (USB).

Los productos de ligación se clonaron en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  [F-,  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF), U169, recA1, endA1, hsdR17 (r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub><sup>+</sup>), phoA, supE44,  $\lambda$ -, thi-1, gyrA96, relA1] (Woodcock y cols. 1988) y las colonias de bacterias se aislaron en placas Petri con medio Luria-Bertani (LB). (Sambrook y Russell 2001) conteniendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml, Sigma). DNA de las colonias se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos de la PCR y fueron analizadas mediante secuenciación (apartado 4.8). De este clonaje se obtuvieron 69 clones moleculares, de los cuales uno contenía únicamente la mutación M296I en la 3D (en el contexto de secuencia de MARLS, y por tanto, contenía también la mutación Q232H); este clon se denomina **pMT28-3D(M-M296I)** (Figura 4.1 y apartado 4.2). Del mismo clonaje, se obtuvo también un clon molecular que no contenía la mutación M296I (pero mantenía la mutación Q232H, de la secuencia de MARLS); este clon se denomina **pMT28-3D(M)** (Figura 4.1 y apartado 4.2).

Para las poblaciones de VFA MARLS-Ap35 y MARLS-Bp35 se realizó la misma estrategia de clonaje que la empleada para MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5, a excepción de que la RT-PCR fue realizada a partir de RNA de las poblaciones MARLS-Ap35 y MARLS-Bp35, respectivamente.

- **Clonaje en pGEM-T Easy:** Para el resto de clonajes, cuyo objetivo era el análisis de cuasiespecies, se utilizó el plásmido pGEM-T Easy (Promega), en el que el sitio de clonación está compuesto por dos extremos romos con dos colas de poli T. De

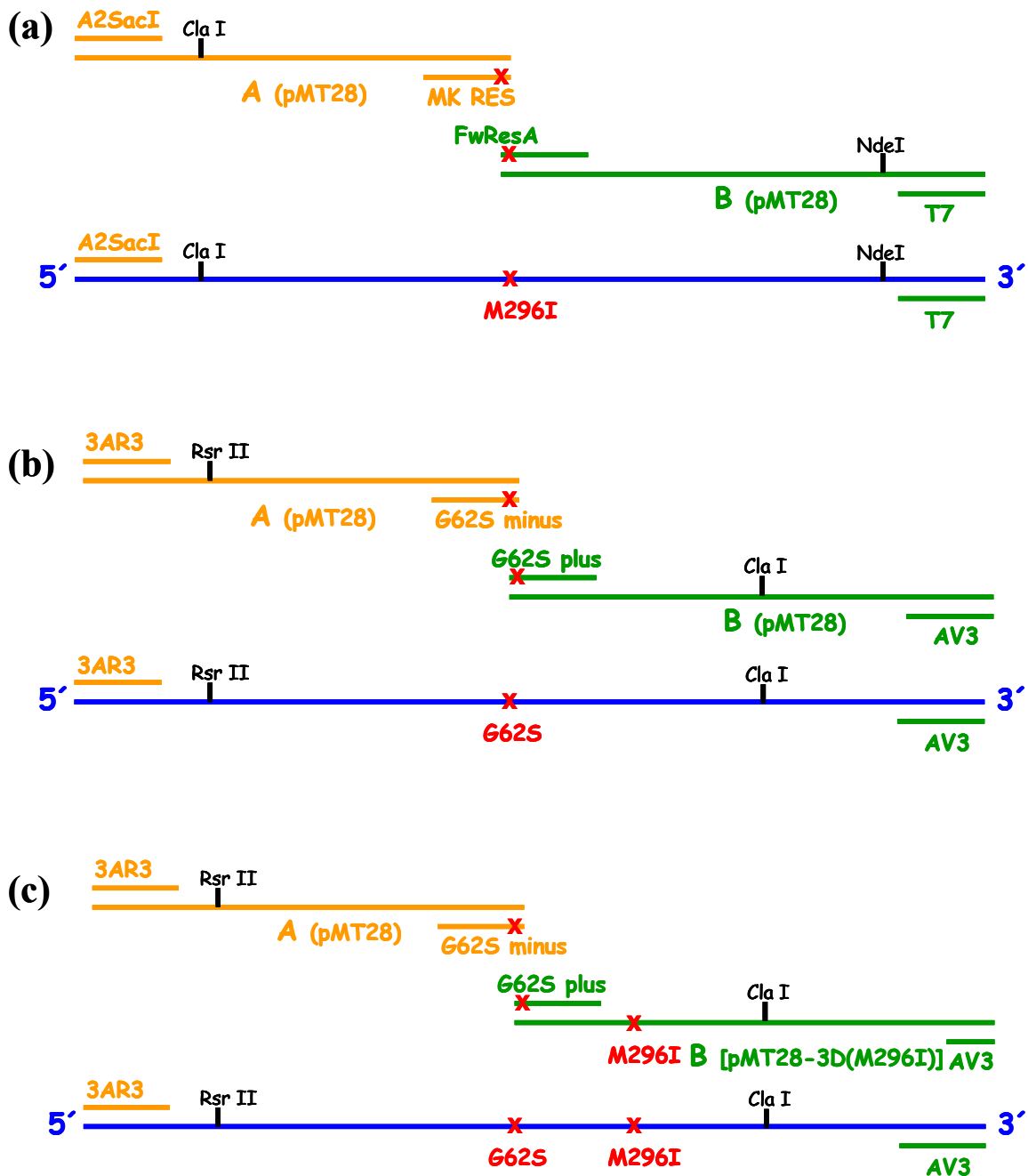
esta forma se ligó con productos de PCR terminados en residuos de adenina. Se analizaron dos regiones genómicas completas: 3D y VP1. Los oligonucleótidos empleados para amplificar VP1 fueron pU y 3R2New, y los oligonucleótidos utilizados para amplificar 3D fueron 5'3D y Rend (**Tabla 4.1**). 5 µl del producto de PCR (amplificado usando *Pfu* DNA polimerasa) purificado se utilizó en una reacción de elongación (“tailing”) con 5U de *Taq* DNA polimerasa (Roche), dATP 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM en un volumen final de 10 µl. La mezcla se incubó durante 15-30 min a 70°C. A continuación 1-2 µl del producto se ligó con el vector pGEM-T Easy. Se transformó el producto de ligación en células competentes de *E. coli* DH5α. El vector PGEM-T incluye un gen cuya expresión confiere resistencia a ampicilina y el gen *LacZ*, que permite la selección por color en presencia de X-gal e IPTG (Sambrook y Russell 2001). El DNA de las colonias positivas identificadas por ausencia de color se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos de la PCR y fueron analizadas mediante secuenciación (apartado 4.8).

#### 4.11.2.- Mutagénesis dirigida mediante PCR

Las construcciones de plásmidos para obtener transcritos infecciosos con mutaciones únicas puntuales se hicieron tomando como genoma de partida el plásmido pMT28 (**Fig 4.2ab**). La introducción de la mutación M296I, en la posición 296 de la 3D (en el contexto de C-S8c1), originó el plásmido **pMT28-3D(M296I)**, en el que se reemplazó el codón ATG, que codifica M, por el codón ATA, que codifica I en la posición 296. Para ello, se utilizaron los siguientes pares de oligonucleótidos: A2SacI y MK RES para obtener el fragmento A y FwResA y T7 para obtener fragmento B (**Fig 4.2a**).

Para introducir la mutación G62S, se reemplazó el codón GGA que codifica G, por el codón que codifica S, TCA, en la posición 62. El plásmido resultante se denominó **pMT28-3D(G62S)**. En este caso se empleó la pareja de oligonucleótidos 3AR3 y G62Sminus para obtener el fragmento A, y la pareja G62Splus y AV3 para obtener el fragmento B (**Fig 4.2b**).

Para la construcción del plásmido infeccioso con una doble mutación, **pMT28-3D(G62S-M296I)**, se realizó de la misma forma que para pMT28-3D(G62S), a excepción de que se tomó como genoma de partida pMT28-3D(M296I) (**Fig 4.2c**).



**Fig. 4.2.** Representación esquemática de la estrategia de mutagénesis dirigida. Los oligonucleótidos empleados para obtener los fragmentos A y B están representados en naranja y verde, respectivamente. Las líneas azules representan el clon infeccioso resultante con las mutaciones deseadas. En (a) y (b), el fragmento B se amplificó utilizando pMT28 como molde y en (c), se partió de pMT28-3D(M296I). Las mutaciones están representadas por una cruz roja. La parte (a) representa la estrategia empleada para obtener el mutante pMT28-3D(M296I). Los oligonucleótidos MKRES y FwResA presentan el cambio de nucleótido necesario para originar M296I.

(Leyenda de Figura 4.2 en página 55)



**Continuación de Figura 4.2.** La parte **(b)** representa la estrategia empleada para obtener el mutante pMT28-3D(G62S). Los oligonucleótidos G62Splus y G62Sminus presentan los cambios de nucleótidos necesarios para originar G62S. La parte **(c)** representa la estrategia empleada para obtener el doble mutante pMT28-3D(G62S-M296I), en la que se usaron los mismos oligonucleótidos que en **(b)**. Los fragmentos A y B obtenidos fueron recombinados en una reacción de PCR “shuffling” empleando los oligonucleótidos externos [A2SacI y T7 en **(a)**; 3AR3 y AV3 en **(b)** y **(c)**]. El producto final, que incluye la secuencia de 3D con las mutaciones deseadas, fue digerido en A con *ClaI* y *NdeI* (que cortan, respectivamente, en el nucleótido 7004 y en un sitio de restricción diseñado en el extremo 3' del poli A viral) y en **(b)** y **(c)** con *RsrII* y *ClaI* (que corta en el nucleótido 5839 y 7004, respectivamente).

Los productos finales de PCR fueron recombinados en una reacción de PCR “shuffling” (Núñez y cols. 2001), utilizando cantidades equimoleculares de dichos fragmentos (A y B) y los oligonucleótidos externos adecuados (**Tabla 4.1**). Las amplificaciones de la región 3D, que incluyen las mutaciones adecuadas, se realizaron con la DNA polimerasa termoestable EHF (Expand High fidelity) (Roche).

En el caso de pMT28-3D(M296I), el producto final (que abarca desde los nucleótidos 6580 del genoma de C-S8c1 hasta una región dentro del plásmido pMT28), fue digerido con *ClaI* y *NdeI* (que cortan en el nucleótido 7004 y en un sitio de restricción diseñado en el extremo 3' del poli A viral, respectivamente). En el caso de pMT28-3D(G62S) y pMT28-3D(G62S-M296I), los productos finales (nucleótidos 5705 al 7360 del genoma de C-S8c1) fueron digeridos con *RsrII* y *ClaI* (que cortan en el nucleótido 5839 y 7004, respectivamente).

Los fragmentos de DNA obtenidos se purificaron como se describe en la sección 4.7 y se ligaron al plásmido pMT28, para el caso de los mutantes simples, pMT28-3D(M296I) y pMT28-3D(G62S) o al plásmido pMT28-3D(M296I), para el caso del doble mutante, pMT28-3D(G62S-M296I) (digeridos con las mismas enzimas que los productos de PCR), empleando la T4 DNA ligasa (Roche); previamente se eliminó el grupo 5' fosfato de los extremos del vector por tratamiento con fosfatasa alcalina (USB).

#### **4.12.- Transcripción de plásmidos**

El DNA de los clones infecciosos fue linearizado por digestión con *NdeI*. Los procedimientos para la transcripción *in vitro* fueron los descritos en Baranowski y cols. (1998). La concentración de RNA obtenida se estimó mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio por comparación con cantidades conocidas de RNA ribosómico.

#### **4.13.- Transfección con RNA transcrito de clones infecciosos**

Se transfectaron células BHK-21 subconfluentes (70% confluentes) con RNA viral (0,1-1µg) y lipofectina (Gibco) (Sambrook y Russell 2001). Los virus recogidos del sobrenadante de las células transfectadas a las 72 horas post-transfección se multiplicaron mediante dos pases en células BHK-21 ( $2-4 \times 10^6$  células) con 200 µl de sobrenadante. Se extrajo RNA del virus procedente del último pase y la región codificante de la proteína 3D fue amplificada y secuenciada para comprobar la presencia de las mutaciones introducidas en el clon infeccioso.

#### **4.14.- Determinación de la frecuencia de mutación y la entropía normalizada de Shannon de los espectros de mutantes de las poblaciones virales analizadas**

El efecto mutagénico de R se cuantificó con parámetros derivados de la comparación de secuencias. La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones distintas encontradas en un conjunto de secuencias dividido por el número total de nucleótidos secuenciados (Domingo 2007). La frecuencia de mutación máxima es el número total de mutaciones encontradas (incluyendo las mutaciones repetidas) dividido por el número total de nucleótidos secuenciados. Las frecuencias de mutación se calcularon tal como fue descrito por Arias y cols. (2001).

La entropía de Shannon normalizada es una medida de la similitud existente entre los genomas que constituyen un espectro de mutantes; toma valores entre 0 y 1, siendo

0 el valor que corresponde a la homogeneidad máxima (todas las moléculas analizadas son iguales entre sí) y 1 el valor de la máxima heterogeneidad (todas las moléculas estudiadas son distintas entre sí). La justificación teórica de este concepto se describe en Volkenstein (1994) y una aplicación al estudio de las cuasiespecies víricas puede encontrarse en Pawlotsky y cols. (1998), Sierra y cols. (2000), Ruiz-Jarabo y cols. (2002), Airaksinen y cols. (2003), Pariente y cols. (2003) y Sierra y cols. (2007). La entropía normalizada de Shannon ( $S_n$ ) se calcula a partir de la ecuación (1):

$$S_n = -[ \sum_i (p_i \times \ln p_i) ] / \ln N \quad (1)$$

en la que  $p_i$  es la frecuencia de cada secuencia en la cuasiespecie y  $N$  es el número total de secuencias analizadas.

#### **4.15.- Clonaje de polimerasas mutantes del virus de la fiebre aftosa en el vector de expresión pET-28a**

Con el fin de caracterizar bioquímicamente la resistencia a ribavirina en el VFA se construyeron las siguientes RNA polimerasas dependientes de RNA del VFA (3D): 3D(M), 3D(M-M296I), 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I); el paréntesis indica la presencia de las sustituciones de aminoácidos indicadas, en el contexto de la secuencia de aminoácidos de la 3D del virus MARLS (M) o del virus C-S8c1. Todas las variantes de 3D se clonaron en el plásmido pET-28a (Novagen), en el que previamente se había eliminado una diana de restricción *NcoI*, tal y como se ha descrito en Ferrer-Orta y cols. (2004). Tras el clonaje, la secuencia de 3D queda fusionada a una secuencia propia del plásmido, de manera que tras la expresión de la proteína, el último aminoácido de 3D está unido a 11 aminoácidos suplementarios de los que 5 actúan de espaciador y 6 son una cola de polihistidina (poli-His) (secuencia AAALHHHHHHH). Para introducir las mutaciones en la región codificante de la 3D de VFA, se emplearon dos sistemas diferentes de clonaje, como se describe en los apartados siguientes.

##### **4.15.1.- Obtención de 3D(M) y 3D(M-M296I)**

Para la obtención de 3D(M) y 3D(M-M296I) se partió de los plásmidos pMT28-3D(M) y 3D(M-M296I), respectivamente (sección 4.2). La región codificante para la 3D se amplificó con los oligonucleótidos A2*SacI* y C-*not-pol* (Tabla 4.1). El producto

se cortó con *Hind*III (sitio de restricción en la región genómica de C-S8c1 6667) y *Not*I (posición 8020) y se clonó en el plásmido de expresión pET-28a (Novagen). Los procedimientos de digestión, purificación y ligación se realizaron tal y como se ha descrito previamente (apartado 4.11). El producto de ligación se utilizó para transformar *E. coli* BL21 DE3 [B F-*dcm ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal λ* (DE3)].

Se analizó la presencia del plásmido en las colonias resistentes a kanamicina (Sigma) (70 µg/ml) mediante extracción del DNA plasmídico mediante el kit “Wizard Plus SV Minipreps” (Promega). Se analizó si los plásmidos presentaban un inserto del tamaño esperado y, en tal caso, el DNA se secuenció, comprobando que contenían la secuencia deseada. El plásmido que codifica la 3D de VFA MARLS, se denomina pET-28a3D(M). La 3D de MARLS se diferencia de la 3D de C-S8c1, en tener H en lugar de Q en la posición 232. La presencia de H o Q en la posición 232 de 3D no causó efecto detectable ni en la capacidad replicativa de VFA (datos no mostrados) ni en las actividades enzimáticas estándar ensayadas con las 3Ds purificadas (ver sección 5.2.1 de Resultados). El plásmido que codifica 3D con la sustitución M296I en el contexto de 3D de MARLS (con Q323H) se denominó pET-28a3D(M-M296I). Las 3Ds expresadas se denominaron 3D(M) y 3D(M-M296I).

#### 4.15.2.- Obtención de 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I)

Para la obtención de 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I) se empleó el “Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit” de Stratagene. Este método se basa en la utilización de un plásmido molde, que para 3D(M296I) y 3D(G62S) fue el vector de expresión pET-28a, en el que se introdujeron mutaciones mediante reacciones de amplificación por PCR con oligonucleótidos con la mutación (Tabla 4.1). La reacción de mutagénesis se llevó a cabo en 50 µl con un tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, que contenía KCl 10 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, MgSO<sub>2</sub> 2 mM, Triton X-100 al 0,1%, seroalbúmina bovina (BSA) libre de nucleasa a 0,1 mg/ml, 150 ng de los dos oligonucleótidos mutagénicos, 50 ng de plásmido pET-28a, dNTPs a una concentración de 200 µM cada uno, y 5 U de DNA polimerasa *Pfu* Ultra (Roche). La amplificación se inició con una incubación de 1 min a 95°C seguida de 18 ciclos de 40 s a 95 °C, 1 min a 50 °C y 15 min a 68 °C. El producto se trató a 37°C durante 1 h con 10 U de *Dpn*I, una endonucleasa que actúa sobre DNA metilado o hemimetilado, degradando el DNA molde (en este caso metilado, al utilizarse plásmidos amplificados en *E. coli*), quedando

protegido el DNA sintetizado de *novο* durante la PCR y que contiene la mutación deseada.

Se transformó 1  $\mu$ l del producto de reacción en células competentes *E. coli* XL1-blue MRF [ $\Delta(mcrA)$  183,  $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$  173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*,  $\lambda$ -, [*F'*,*proAB*, *lac<sup>q</sup>* Z $\Delta$ M15, *Tn10* (*Tet<sup>r</sup>*)]. A continuación, se identificaron las mutaciones mediante secuenciación del DNA plasmídico extraído mediante el kit “Wizard Plus SV Minipreps” (Promega). El plásmido que codifica 3D con la sustitución M296I en el contexto de 3D de C-S8c1 se denominó pET-28a3D(M296I) y el plásmido que codifica la 3D con la sustitución G62S en el mismo contexto de 3D se denominó pET-28a3D(G62S). Las 3Ds expresadas se denominaron 3D(M296I) y 3D(G62S). Para la obtención de 3D(G62S-M296I), el procedimiento fue el mismo que el utilizado para construir pET-28a3D(M296I), a excepción de que el molde inicial en la amplificación fue el plásmido pET-28a3D(G62S) que contenía ya la mutación G62S. El plásmido resultante que contenía las mutaciones G62S y M296I en el contexto de 3D de C-S8c1 se denominó pET-28a3D(G62S-M296I).

#### **4.16.- Expresión en *E. coli* de polimerasas recombinantes del virus de la fiebre aftosa**

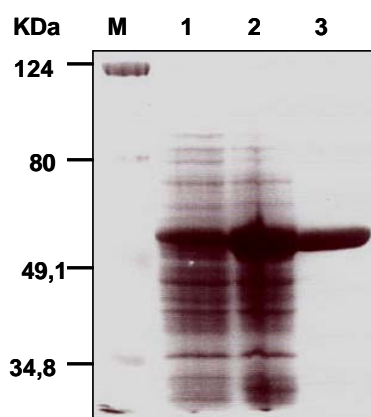
El plásmido de expresión pET-28a contiene un gen de resistencia a kanamicina. Las colonias aisladas, que previamente se había comprobado que contenían el plasmido pET-28a con la mutación deseada en la región 3D, se crecieron durante la noche en medio LB en presencia de kanamicina (70  $\mu$ g/ml). De igual forma se creció plásmido pET-28a3D (que expresa polimerasa 3D en el contexto de secuencia de C-S8c1). Los cultivos se diluyeron 20 veces en medio LB (70  $\mu$ g/ml kanamicina) y se crecieron hasta alcanzar una densidad óptica (595 nm) de entre 0,8 y 1,2. En este momento, en la fase exponencial, se añadió IPTG (Isopropiltio- $\beta$ -D-galactósido) (Fermentas) a una concentración final de 0,5 mM. Los cultivos se crecieron entonces durante 2 horas más. Las células se centrifugaron a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos en un rotor S3 (Sorvall) obteniéndose un sedimento de células que se congeló a -20 °C. Se analizó si los plásmidos presentaban un inserto del tamaño esperado y en tal caso se secuenciaron, comprobando que contenían la secuencia esperada.

#### **4.17.- Purificación de polimerasas del virus de la fiebre aftosa expresadas en bacterias**

La cola de histidinas en el extremo C-terminal de las 3D expresadas en *E. coli* (apartado 4.16) se utiliza para la purificación de 3D por cromatografía de afinidad por Níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA)-agarosa (“ProBond Resin”, Invitrogen).

El sedimento de bacterias (obtenidas tras aplicar el procedimiento descrito en 4.16) se resuspendió en tampón fosfato 50 mM pH 7,8, que contenía NaCl 300 mM (tampón de resuspensión) y se incubó durante 15 minutos a 4°C con agitación en presencia de lisozima (0,1 mg/ml) (Sigma) y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF, Boehringer) (1 mM), que actúa como inhibidor de proteasas. Las células se sonicaron alternando 5 ciclos de sonicación de 30 segundos con 5 ciclos de reposo en hielo. La fracción soluble se recuperó mediante dos centrifugaciones sucesivas de 15 minutos de duración a 10.000 r.p.m. en un rotor SS-34 (Sorvall). La muestra se pasó a través de la columna de Ni-NTA que había sido previamente equilibrada en tampón de resuspensión. La proteína unida se lavó con dos volúmenes de tampón de resuspensión, con 1 volumen de tampón A (tampón fosfato 50mM, pH 6,0, que contenía NaCl 500 mM) y un volumen de tampón A conteniendo 25mM imidazol.

La proteína unida por afinidad a la resina se eluyó de la columna de Ni-NTA con un gradiente de imidazol (entre 50 y 500 mM) en tampón A. Las fracciones se analizaron mediante electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida en presencia de 0,1% SDS (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Las fracciones que contenían la proteína pura según tinción [en “Coomassie Brilliant Blue R250” 0,25% (BioRad), metanol 45%, ácido acético 10% y posterior lavado en etanol 10%, ácido acético 10%] se juntaron y se dializaron frente a un tampón de diálisis (Tris-HCl 50mM pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol 10%, DTT 1mM y EDTA 1mM), utilizando bolsas de diálisis de tipo Visking 20/32 de diámetro 16 mm (Serva). El proceso de diálisis se realizó con tres cambios de tampón, uno después de la noche y los otros dos a intervalos de 2-3 horas. En el caso de las proteínas 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I) se empleó un tampón de diálisis que contenía 500 mM NaCl. La proteína se distribuyó en alícuotas y se congeló a -20°C o -70°C. Todas las polimerasas recombinantes aisladas presentaron una pureza superior al 95%, tal y como se muestra en el ejemplo de la **Figura 4.3**.



**Figura 4.3.** Análisis por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de 3D recombinante expresada en *E. coli* y fusionada a una cola de poli-His en su extremo C-terminal. Carril M: marcador de masa molecular de proteínas. Los carriles 1 y 2 muestran extractos celulares de bacterias *E. coli* BL21 transformadas con un plásmido pET-28a sin inducir (1) o inducido (2) durante 2 horas mediante IPTG 0,5 mM. En el carril 3 se muestra la proteína 3D purificada mediante cromatografía de afinidad por Ni-NTA (Invitrogen). El peso molecular aparente de la proteína que aparece sobreexpresada en el patrón de

bandas del extracto celular es de 55-60 KDa concordante con el peso molecular esperado para 3D (56 KDa). Se muestra un preparado de 3D(M296I). Todas las 3D recombinantes se obtuvieron con un grado de pureza superior al 95%.

La concentración de proteína se determinó mediante el valor de absorbancia de una dilución de 3D en hidrocloreuro de guanidinio (GUHCl; cloruro de guanidinio 8 M en 0,1 M fosfato de sodio, pH 7) y con el coeficiente de extinción molar de 3D de VFA que corresponde a  $51,700 \text{ M}^{-1}$ . Cuando fue necesario la proteína se concentró por filtración en Centricon-30 (Amicon, Millipore), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### **4.18.- Ensayos de actividad de la polimerasa del virus de la fiebre aftosa (3D)**

El ensayo de actividad está basado en la síntesis de poliuridilato mediante la incorporación de sucesivos residuos de uridina-5'-monofosfato (UMP) sobre un cebador de 15 nucleótidos de deoxitimidina [oligo(dT)<sub>15</sub>]. Una molécula de poliadenilato [poli(A)] de 300 residuos de media de longitud (Amersham) actúa como molde de la reacción; el ensayo se realizó tal y como fue descrito en Ferrer-Orta y cols. (2004).

Las reacciones se realizaron en tampón MOPS 30 mM, pH 7,0, NaCl 33 mM, Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 5 mM, poli(A) 40 ng/μl (115 residuos de adenilato), oligo(dT)<sub>15</sub> 2,4 μM (35 μM residuos de deoxitimidina). La concentración final de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP fue 500 μM

(0,01mCi/ml). La cantidad de enzima empleada varió entre 0,5 y 2  $\mu\text{g}$  (200-800 nM final). Cuando fue necesario, las enzimas fueron diluidas justo antes de su uso en el tampón de diálisis utilizado en la purificación. La reacción se inició al añadir un décimo del volumen de enzima sobre de una mezcla precalentada a 37°C que contenía todos los reactivos indicados. La reacción se paró a los 5 minutos añadiendo 10  $\mu\text{l}$  de 500 mM EDTA (83 mM EDTA final). El producto se aplicó sobre una membrana DE81 (Whatmann). El UMP no incorporado se eliminó mediante 4 lavados de la membrana con un exceso de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M (Merck). Se hizo un quinto lavado en etanol absoluto y se secó 15 minutos a 55°C. Las membranas se expusieron a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S). La radiactividad incorporada se midió por análisis en un Densitómetro BAS-1500 (Fujifilm) usando el programa Tina versión 2.09 (Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Staubenhardt, Alemania).

#### **4.19.- Ensayos de uridilación del péptido VPg**

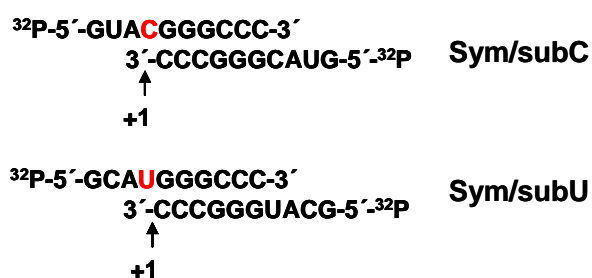
Para el ensayo de uridilación de VPg se empleó un péptido sintético elaborado por el Servicio de Química de Proteínas y Síntesis de Péptidos del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM). Este péptido tiene la secuencia de aminoácidos GPYAGPLERQRPLKVRAKLPRQE, correspondiente a la VPg-1 del VFA C-S8c1 (Introducción, apartado 2.5 y Figura 2.7). La mezcla de uridilación contenía tampón MOPS 30 mM, pH 7,0, NaCl 33 mM,  $\text{MnCl}_2$  0,6 mM, poli(A) 40 ng/ $\mu\text{l}$ , VPg 150  $\mu\text{M}$ , BSA 0,4 mg/ml (Boehringer), glicerol 8% y [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] UTP 50 $\mu\text{M}$  (0,01mCi/ml; 200 mCi/mmol); 46  $\mu\text{l}$  de una mezcla con todos los reactivos se preincubó durante 2 minutos a 37°C. La reacción se inició añadiendo 4  $\mu\text{l}$  de enzima y se paró a los 30 min por la adición de 10  $\mu\text{l}$  de 500 mM EDTA (83 mM final).

Los productos de reacción se resolvieron en geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Como tampón se utilizó Tris-tricina (sección 4.25), ya que tiene mayor capacidad de resolución de moléculas de bajo peso molecular que el tampón Tris-glicina (Paul y cols. 1998; Lyle y cols. 2002a; Murray y Barton 2003). El gel concentrador se preparó con 4% de acrilamida y el gel de resolución con 16% de acrilamida más 10% de glicerol). Los geles se expusieron a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S) y la radiactividad incorporada se midió por análisis en un densitómetro BAS-1500 (Fujifilm).



## 4.20.- Preparación de complejos heteropoliméricos molde-iniciador

Los complejos heteropoliméricos molde-iniciador utilizados en los ensayos bioquímicos son moléculas simétricas de RNA autocomplementarias de 10 nucleótidos, que actúan como molde e iniciador de la reacción (Arnold y Cameron 2000). Se denominan sym/subC y sym/subU, dependiendo de la primera base que sirve como molde de la reacción (Figura 4.4). Estos RNA forman un dúplex de 6 pares de bases flanqueado por dos salientes de cuatro nucleótidos idénticos en el extremo 5', de tal forma que dos grupos hidroxilos en 3' del RNA son competentes para la extensión. Fueron suministrados por Dharmacon Research.



**Figura 4.4. Secuencia de los complejos molde-iniciador empleados.** Los sustratos sym/sub permiten el ensamblaje productivo de la 3D. Cada saliente de cuatro nucleótidos es competente para actuar de molde para la elongación, permitiendo la evaluación de uno o múltiples ciclos de incorporación si se seleccionan el nucleótido o nucleótidos apropiados como sustratos.

### 4.20.1.- Purificación de complejos molde-iniciador

Los iniciadores son suministrados en presencia de grupos protectores del RNA, 2'-ACE [2'bis(Acetoxietoxi)-metil eter], que confieren resistencia a la degradación por nucleasas y minimizan la formación de estructuras secundarias durante el periodo de síntesis antes de su uso. Para eliminar los grupos 2'-ACE protectores y desproteger así el RNA para su posterior uso, se resuspendió el RNA en 400 µl de ácido acético 100 mM ajustado a pH 3,8 con TEMED y se incubó a 60°C durante 30 minutos.

En algunos casos, los iniciadores se purificaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (23%) y urea (8M), eluyéndose las bandas del tamaño requerido

mediante incubación a 37°C en una disolución de acetato magnésico 10 mM, acetato amónico 0,5 M y SDS al 0,1 %, seguida de precipitación con etanol (Sambrook y cols. 1989).

#### **4.20.2.- Marcaje en 5' de complejos molde-iniciador con <sup>32</sup>P**

Los iniciadores se marcaron en el extremo 5' con [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP (5  $\mu\text{Ci}$ , 10 mCi/ml) (Amersham) y 10 U de polinucleótido quinasa de T4 (NEB). La reacción de marcaje se realizó en presencia de un tampón Tris-HCl 70 mM, pH 7,6, que contenía  $\text{MgCl}_2$  10 mM y DTT 5 mM. Tras incubar durante 45 minutos a 37°C, se verificó la incorporación de fósforo radiactivo al oligonucleótido mediante cromatografía en placas de PEI-celulosa (TLC 20x20 cm; Merck), utilizando como tampón de separación  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5 M. Posteriormente, se inactivó la polinucleótido quinasa mediante incubación durante 10 minutos a 90°C. Los nucleótidos sin incorporar fueron eliminados tras pasar la muestra por columnas de Sephadex G-25 equilibradas con Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM ("Mini Quick Spin Oligo Columns"; Roche).

#### **4.20.3.- Hibridación de complejos molde-iniciador**

Los complejos molde-iniciador marcados en 5' con <sup>32</sup>P se hibridaron tras incubación a 90°C durante 1 minuto y posterior enfriamiento lento en un termociclador (Eppendorf) hasta alcanzar temperatura ambiente. Previamente a su uso, todos estos complejos se diluyeron a la concentración deseada en tampón TE (sección 4.25). La concentración que se especifica en las leyendas de las figuras corresponde a la concentración final del híbrido en la mezcla de reacción.

#### **4.21.- Ensayos de retardo en gel**

Los ensayos de retardo en gel permitieron caracterizar *in vitro* la interacción de la 3D con RNA. Se utilizó como molde el oligonucleótido sym/subU (5'GCAUGGGCCC 3') (**Figura 4.4**) marcado en su extremo 5' con [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP, tal y como se describe en 4.20.2. El ensayo se llevó a cabo en un volumen de 10  $\mu\text{l}$  en presencia de tampón MOPS 100 mM pH 7,0, NaCl 20 mM,  $\text{MnCl}_2$  25 mM,

polietilenglicol 5% (p/v), [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] sym/subU 20 nM y concentraciones crecientes de 3D (0-1800 nM). Tras 5 min de incubación a 37°C los productos de reacción se resolvieron en geles no desnaturizantes de poli(acrilamida) al 10 % en presencia de SDS (SDS-PAGE) en el tampón TB (sección 4.25) y se sometieron a electroforesis con un voltaje de 100 V, a 4°C, durante 1 hora en tampón TB. El gel se fijó con etanol-ácido acético 10 % (v/v) durante 5 min y se secó durante 45 min a 80°C. Los geles se expusieron a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S). La radiactividad del RNA libre y de los complejos 3D-RNA se midió por análisis en un densitómetro BAS-1500 (Fujifilm).

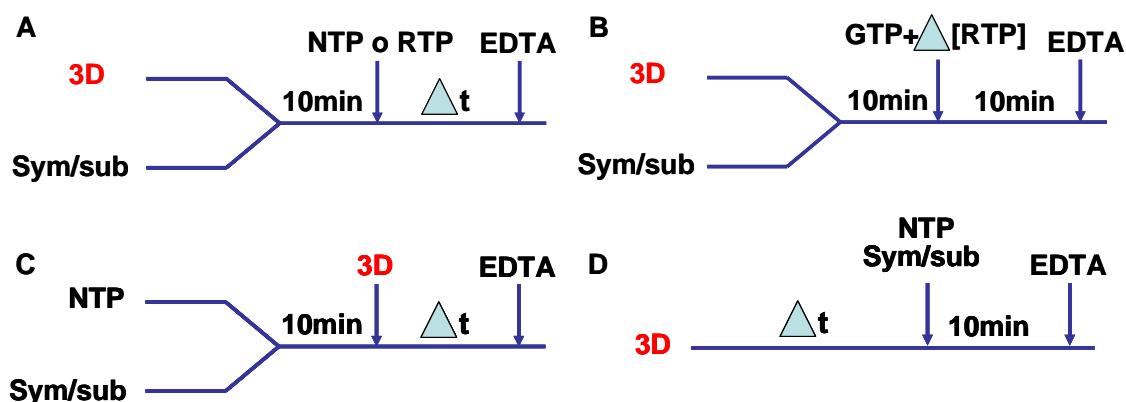
#### 4.22.- Ensayos de extensión de moldes heteropoliméricos

Se han realizado diversos ensayos de extensión con moldes heteropoliméricos (**Figura 4.5**). Las reacciones (25  $\mu\text{l}$ ) se llevaron a cabo en presencia de MOPS 30 mM, pH 7,0, NaCl 33 mM y  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  15 mM o  $\text{MnCl}_2$  5 mM, la enzima 3D (3  $\mu\text{M}$ ), y un molde-iniciador (sym/subC o sym/subU) marcado en el extremo 5'  $^{32}\text{P}$ , tal y como se especifica en 4.20.2. Todas las reacciones se realizaron a 37°C y se pararon con EDTA 83 mM final. En algunos casos se realizaron ensayos a tiempos variables utilizando un único nucleótido (ATP o GTP, designado como NTP; Amersham) o ribavirina-5'-trifosfato (RTP, Moraveck Biochemicals, Inc.) (**Figuras 4.5A,C,D**). En otros ensayos de competición se utilizaron mezclas de RTP y GTP (**Figura 4.5B**) con concentraciones crecientes de RTP, manteniendo la concentración de GTP constante durante un tiempo fijo (10 min). Por problemas técnicos no pudieron realizarse ensayos de competición entre RTP y ATP. Las concentraciones del molde-iniciador (concentración final del híbrido) así como la de los nucleótidos empleados se especifican en las correspondientes leyendas de las figuras de Resultados.

Cuando se quiso medir la incorporación de NTP y/o RTP en un molde sym/sub, se preincubó la enzima con el molde-iniciador sym/sub durante 10 min a 37°C para permitir la formación del complejo binario y la reacción se inició con la adición de los nucleótidos adecuados (**Figura 4.5A,B**).

En los ensayos de ensamblaje de 3D al molde-iniciador, la reacción se inició con la adición de 3D a una mezcla que contenía sym/sub y NTP. De esta forma, el paso limitante de la reacción es el ensamblaje de 3D al sym/sub, ya que la incorporación del nucleótido se produce muy rápidamente (**Figura 4.5C**).

En los ensayos de inactivación enzimática, 3D se incubó a 37°C durante distintos tiempos antes del inicio de la reacción con sym/sub y NTP (**Figura 4.5D**).



**Figura 4.5.** Esquema de los tipos de ensayos bioquímicos de extensión de moldes heteropoliméricos. **A.** Cinética de incorporación de nucleótidos (ATP o GTP, designados como NTP) o de RTP. La reacción se inicia mediante la adición de NTP o RTP a una mezcla que contiene 3D y sym/sub, preincubada 10 min.  $\Delta t$  indica incrementos de tiempo. EDTA es el agente quelante para detener la reacción. **B.** Ensayo de competición. GTP+ $\Delta$ [RTP] indica una mezcla conteniendo concentraciones crecientes de RTP, manteniendo constante la concentración de GTP. La reacción se inicia mediante la adición de nucleótidos a una mezcla que contiene 3D y sym/sub, preincubada 10 min. **C.** Cinética de ensamblaje de 3D y sym/sub. La reacción se inicia mediante la adición de 3D a una mezcla que contiene NTP y sym/sub, preincubada 10 min. **D.** Ensayo de inactivación térmica. 3D se incubó durante distintos tiempos antes de iniciar la reacción mediante adición de una mezcla con NTP y sym/sub.

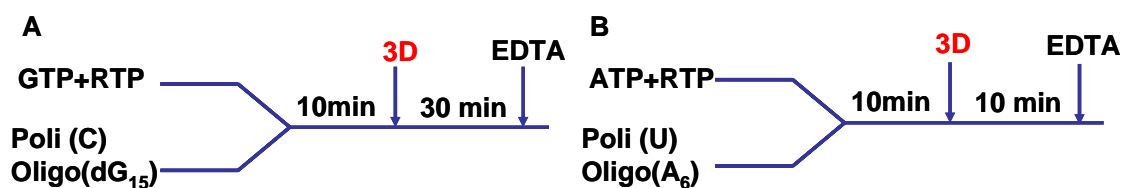
#### 4.22.1.- Análisis de los productos

Una vez completada la reacción, la mezcla se resuspendió en tampón de aplicación a geles de poliacrilamida [formamida 90% (v/v), conteniendo xilen-cianol 0,025% (p/v) y azul de bromofenol 0,025% (p/v)] y se incubó durante 5 min a 90°C. Los productos presentes se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 23% conteniendo urea 7M en TBE (sección 4.25). Los geles se expusieron a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S) y las intensidades de las bandas correspondientes al iniciador elongado y al iniciador no elongado se midieron en un analizador de imagen Fujifilm BAS-1500 usando el programa Tina versión 2.09 (Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Staubenhardt, Alemania).

#### 4.23.- Ensayos de extensión de moldes homopoliméricos

Los ensayos de polimerización empleando moldes homopoliméricos se llevaron a cabo usando como molde de la reacción polinucleótidos poli(C) o poli(U) de 300 residuos de media de longitud (Amersham) (**Figura 4.6**), y sirvieron para realizar competiciones entre RTP y el nucleótido correcto (ATP o GTP).

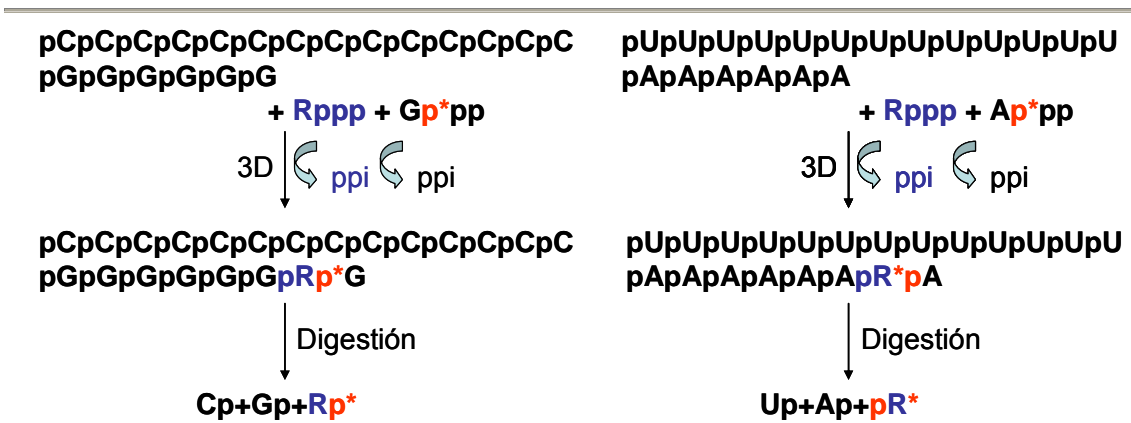
En las extensiones de poli(C), el cebador fue un oligonucleótido de quince residuos de desoxiguanosina [oligo(dG)<sub>15</sub>] (Life Technologies). Las reacciones se realizaron en tampón MOPS 30 mM, pH 7,0, NaCl 33 mM, Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 15mM o MnCl 10 mM, poli(C) 40 ng/μl, oligo(dG)<sub>15</sub> 2,4 μM. Las concentraciones de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] GTP (20 mCi/mmol, 0,01 mCi/ml; Amersham), y RTP variaron dependiendo del tipo de ensayo y se especifican en la correspondientes leyendas de figura de Resultados; 22,5 μl de la mezcla de todos los componentes se preincubaron durante 2 min a 37°C; la reacción se inició por adición de 2,5 μl de 3D (3 μM) y se paró a los 30 min por adición de EDTA 500 mM. Los ensayos de polimerización con poli(U) se realizaron de igual forma que los ensayos con poli(C), a excepción de que el cebador utilizado fue un oligonucleótido de seis adenosinas [(oligo(A)<sub>6</sub>; Dharmacon Research] y que la reacción tuvo lugar en presencia de MnCl<sub>2</sub> 10 mM durante 10 min. En este caso, el marcaje se realizó con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP (20 mCi/mmol, 0,01 mCi/ml; Amersham). La polimerización con un molde de poli(U) en presencia de Mg<sup>2+</sup> fue muy ineficiente tanto empleando oligo(A)<sub>6</sub> como oligo(dA)<sub>6</sub> como cebadores.



**Figura 4.6.** Esquema de los tipos de ensayos bioquímicos de extensión de moldes homopoliméricos. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 3D a una mezcla que contiene la mezcla de nucleótidos (GTP y RTP, en panel A o ATP y RTP, en panel B) y poli(C)-oligo(dG)<sub>15</sub> (panel A) o poli(U)-oligo(A)<sub>6</sub> (panel B) preincubada 10 min. EDTA es el agente quelante para detener la reacción.

#### 4.23.1.- Anál isis de los productos

Los productos de la reacción se sometieron al análisis de nucleótidos del “vecino próximo” (Volckaert y Fiers 1977) (Figura 4.7). Los nucleótidos no incorporados se eliminaron de la mezcla de reacción mediante cromatografía por columnas de Sephadex G25. El RNA se precipitó mediante adición de 1/10 volúmen de acetato de sodio 3M, pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. El precipitado fue disuelto en agua milliQ autoclavada y digerido con una mezcla de RNasa A (500 ng/ $\mu$ l) (Boehringer Mannheim) y RNasa T2 (0,1 U/ $\mu$ l) (Sigma) durante 15 min a 37°C en  $\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})_2$  50 mM, pH 5,0. La resolución de los mononucleótidos resultantes se llevó a cabo mediante separación por cromatografía en placas de PEI-celulosa, previamente pretratadas con HCOOH 2M pH 2,2 (Volckaert y Fiers 1977). Para la resolución, se usó como primer solvente HCOOH 0,5% para los productos obtenidos con poli(C) como molde y HCOOH 0,75% para los productos obtenidos con poli(U) como molde. Posteriormente se llevó a cabo una segunda resolución con formato de Litio 0,15 M, ajustado a pH 3,0 con HCOOH, común para ambos ensayos de polimerización. Los productos de la reacción fueron analizados y cuantificados mediante el analizador de imagen Fujifilm BAS-1500, como se ha descrito anteriormente.



**Figura 4.7. Anál isis por transferencia de marca del vecino próximo.** Izquierda: 3D utiliza ribavirina-5'-trifosfato (Rppp o RTP) como sustrato y cataliza su incorporación en el extremo 3' del oligo(dG)<sub>15</sub>, que apareca con poli(C), liberándose un pirofosfato (ppi). A continuación el GTP marcado en [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] (Gp\*pp) libera ppi al incorporarse la guanosina-5'-monofosfato posterior a R. Tras digestión enzimática se generan nucleósidos monofostato. En este caso, la ribavirina monofostato se encuentra marcada por el fosfato del nucleótido vecino, G. El panel de la derecha es igual que el de la izquierda, pero la incorporación de R se produce sobre una molécula de poli(U) apareada con oligo(A)<sub>6</sub> y el  $\alpha$ -<sup>32</sup>P transferido proviene de ATP (Ap\*pp).

#### **4.24.- Localización de los cambios de aminoácido en la estructura tridimensional de la polimerasa del virus de la fiebre aftosa**

Para el análisis estructural de la 3D de VFA se utilizaron las coordenadas atómicas depositadas en el banco de datos (PDB) (Ferrer-Orta y cols. 2004, 2006a). Las estructuras cristalográficas, residuos de aminoácidos y contactos entre residuos se localizaron, inspeccionaron y analizaron en un ordenador gráfico 02 (Silicon Graphics) utilizando principalmente el programa *InsightII* (Biosym Technologies) o en un ordenador PC mediante el programa *pymol* (DeLano Scientific LLC).

#### **4.25.-Disoluciones y Tampones**

- Solución de Tripsina-EDTA: Tripsina 0,5 mg/ml (Sigma), etilendiaminotetraacetato sódico 0,016% (EDTA, Merck), rojo fenol (Merck) 0,001 %, diluidos en PBS.
- Solución de X-gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido 2% (X-gal, Roche) en dimetilformamida (Merck).
- Solución de IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido en agua destilada
- PBS (solución salina tamponada con fosfato): NaCl 137 mM (Merck), KCl 2,7 mM (Merck), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 6,8 (Merck).
- Tampón de resuspensión: Tampon fosfato 50 mM, pH 7,8, que contenía NaCl 300 mM.
- Tampón fosfato pH 6,0: HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12 mM (Merck), H<sub>2</sub>NaPO<sub>4</sub> 88 mM (Merck).
- TAE: Tris-acetato 40 mM, pH 8,3 (Sigma), EDTA 1 mM (Merck).
- TB: Tris-HCl 85 mM, borato 85 mM, pH 8.0.
- TBE: Tris base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2mM, pH 8,0).
- TE: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 (Sigma), EDTA 1mM.
- Tampón tris-tricina: Tricina 0,2 mol/L, Tris 0,2 mol/L, SDS 0,5 % pH 8,1.

## 5.- Resultados

### 5.1.- Selección y caracterización biológica de variantes del virus de la fiebre aftosa con menor sensibilidad a ribavirina

#### 5.1.1.- Pases seriados de poblaciones del virus de la fiebre aftosa en presencia de concentraciones crecientes de ribavirina

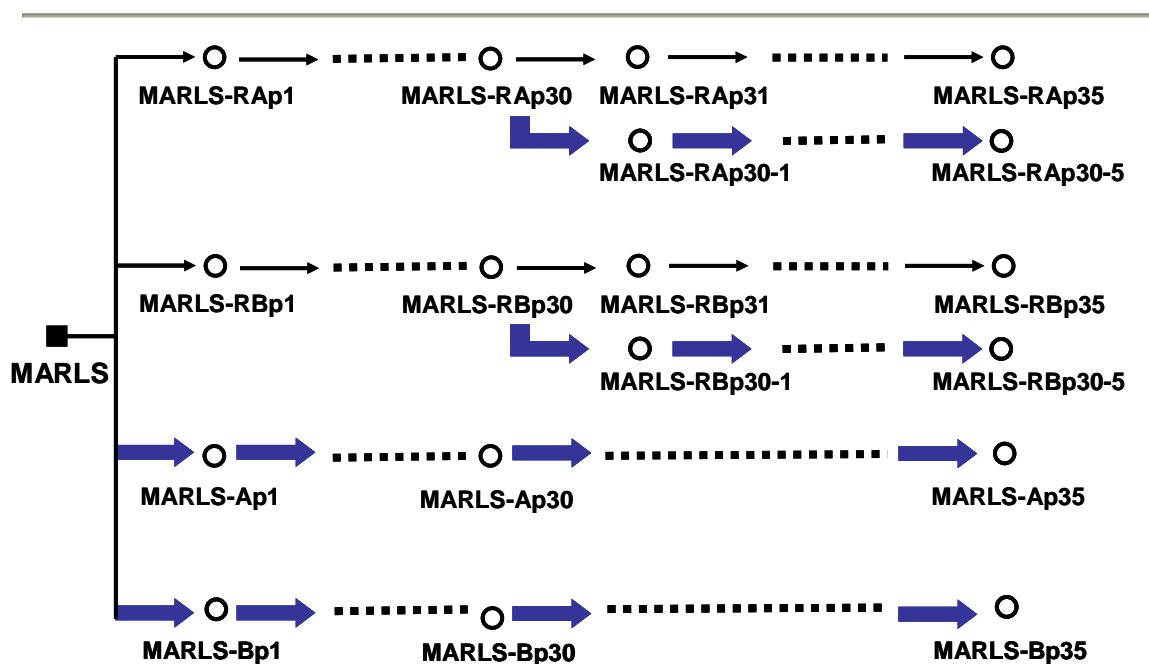
En nuestro laboratorio se describió la actividad antiviral de la ribavirina (R) para el virus de la fiebre aftosa (VFA). El tratamiento con la droga de células BHK-21 persistentemente infectadas con VFA permitió la extinción del virus, manteniendo la viabilidad celular (de la Torre y cols. 1987). Recientemente se ha demostrado que al menos parte de la actividad antiviral de la ribavirina en infecciones persistentes con VFA se debe a una acción mutagénica de la droga (Airaksinen y cols. 2003), lo cual está de acuerdo con resultados obtenidos con poliovirus (PV) (Crotty y cols. 2000).

Basándonos en el reciente aislamiento de variantes de PV con una incrementada resistencia a R (Pfeiffer y Kirkegaard 2003; Arnold y cols. 2005), nos planteamos como uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral la selección de variantes de VFA con menor sensibilidad a R.

Para ello se realizaron infecciones sucesivas (pases) del mutante de VFA MARLS (descrito en 4.2) en células BHK-21, en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de R, tal y como se describe en la sección 4.4.2 de Materiales y Métodos. El esquema de pases de las poblaciones derivadas de MARLS se representa en la **Figura 5.1**. Se escogió el VFA MARLS debido a su alto “fitness”, lo que origina un amplio espectro de mutantes sobre el cual la selección puede actuar, disminuyendo además la probabilidad de extinción del virus durante el tratamiento (Sierra y cols. 2000). El experimento se llevó a cabo en paralelo con cuatro series, MARLS-RA y MARLS-RB, en presencia de R, y MARLS-A y MARLS-B, en ausencia de la droga. Los cinco primeros pases de la serie R (MARLS-RA y MARLS-RB) se realizaron con una concentración de droga de 200  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo, para facilitar una posible acumulación de mutaciones relacionadas con resistencia a R. La concentración de R se aumentó hasta 800  $\mu\text{M}$  en pases sucesivos (leyenda de la **Figura 5.1**). Además, en las



dos series MARLS-RA y MARLS-RB, se realizaron al final y en paralelo, cinco pases adicionales en ausencia de R (para dar MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5) (las dos subramificaciones de la **Figura 5.1**).

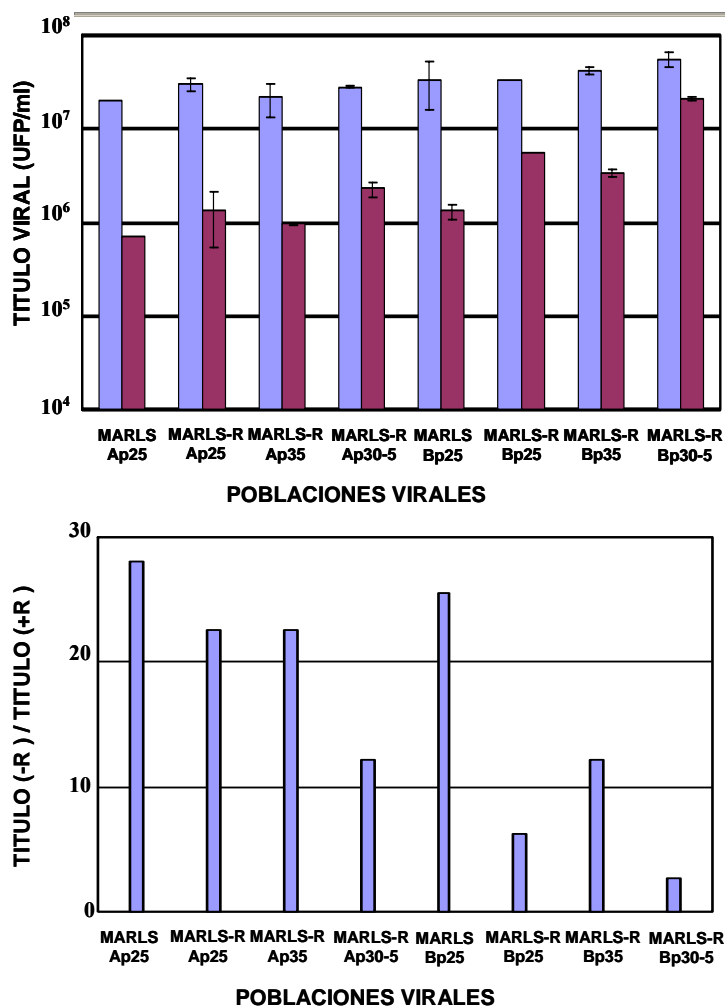


**Figura 5.1.** Esquema de los pases seriados del virus MARLS en presencia y ausencia de ribavirina (R). El clon biológico inicial MARLS se representa con un cuadrado negro y fue sometido a cuatro series de pases paralelos; las poblaciones virales están representadas como círculos vacíos. Las flechas finas indican pases en presencia de R (series por duplicado, MARLS-RA y MARLS-RB; pases 1-5: 200  $\mu\text{M}$  R; pases 6-25: 400  $\mu\text{M}$  R; pases 25-35: 800  $\mu\text{M}$  R). Las flechas azules anchas indican pases en ausencia de R (series por duplicado, MARLS-A, MARLS-B); p seguido de un número indica el número de pase. El origen del virus MARLS y las condiciones de infección sin y con R se describen en las secciones 4.2, 4.4.1, y 4.4.2 de Materiales y Métodos.

### 5.1.2.- Efecto de la ribavirina en la producción viral de poblaciones del virus de la fiebre aftosa

Con el fin de monitorizar una posible adquisición de resistencia a R de variantes de VFA, se estudió el efecto antiviral que ejercía la R sobre algunas poblaciones (representadas en el esquema de la **Figura 5.1**) que habían replicado en presencia de concentraciones crecientes de R. Para ello se determinó la capacidad de producir virus de varias poblaciones de las series MARLS-RA y MARLS-RB, y de las series MARLS-A y MARLS-B en ausencia y presencia de R (800  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 5.2**). La relación entre

la infectividad en ausencia y presencia de R para las poblaciones pasadas en ausencia de R (MARLS-Ap25 y MARLS-Bp25) fue de 25 a 28, mientras que para las poblaciones pasadas en presencia de R dicha relación fue de 2 a 22. Cabe destacar que incluso las poblaciones de la serie R que habían sido sometidas a cinco pases adicionales en ausencia de R (MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5) mantuvieron un valor bajo (12 y 3, respectivamente) de la relación de infectividad en ausencia y presencia de R.



**Figura 5.2. Efecto de la ribavirina en la producción viral de poblaciones de VFA pasadas en ausencia y presencia de ribavirina.** Se infectaron monocapas de células BHK-21 a una m.d.i. de 0,05 UFPs/célula con las poblaciones indicadas en el eje de abscisas (la historia de los pases se describe en la Fig. 5.1). Las condiciones de infección en presencia y ausencia de R se describen en los apartados 4.4.1 y 4.4.2 de Materiales y Métodos. Se recogieron los sobrenadantes de las infecciones cuando se observó e.c.p. completo (16-30 h postinfección). Arriba: las columnas azules representan la producción viral en ausencia de R; las columnas granate indican el título viral en presencia de R (800  $\mu$ M). Las titulaciones se llevaron a cabo por triplicado y se muestran las desviaciones estándar.

Abajo: Relación de los títulos de los sobrenadantes de la progenie viral producida en infecciones en ausencia y presencia de R, calculados a partir de los datos de la gráfica de arriba.

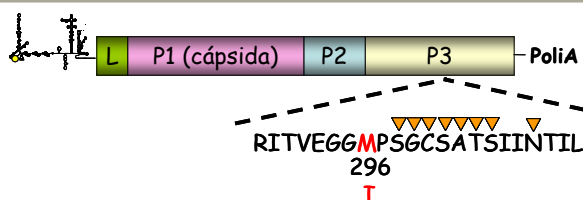
Estos resultados sugieren que poblaciones de VFA que han replicado en presencia de concentraciones crecientes de R tienen mayor capacidad de producir progenie en presencia de R que aquellas poblaciones pasadas en ausencia de R.

Existe una diferencia de sensibilidad entre los virus de las series MARLS-RA y MARLS-RB y además entre MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5 y poblaciones que habían sido siempre sometidas al tratamiento con R. Esta diferencia se discute en 5.1.3 y 6.2. El experimento se repitió con otras poblaciones control (MARLS-Ap30 y

MARLS-Bp30) y con las mismas poblaciones pasadas en presencia de R y se observó una diferencia parecida de sensibilidad a R entre las dos series MARLS-RA y MARLS-RB (experimento no mostrado). De la misma forma, las poblaciones de la serie R sometidas a cinco pases adicionales en ausencia del mutágeno resultaron ser las poblaciones menos sensibles a R.

### 5.1.3.- Secuenciación de la región que codifica la polimerasa y evolución de la infectividad de poblaciones del virus de la fiebre aftosa

Para estudiar si en los pases seriados del virus MARLS en presencia de concentraciones crecientes de R se seleccionaron polimerasas de VFA (3D) alteradas, se extrajeron y se amplificaron por RT-PCR (Materiales y Métodos, secciones 4.5 y 4.6) los genomas virales de las poblaciones MARLS-Ap10, MARLS-Ap25, MARLS-Ap30, MARLS-Ap35, MARLS-RAp10, MARLS-RAp25, MARLS-RAp30, MARLS-RAp35, MARLS-RAp30-5, MARLS-Bp10, MARLS-Bp25, MARLS-Bp30, MARLS-Bp35, MARLS-RBp10, MARLS-RBp25, MARLS-RBp30, MARLS-RBp35 y MARLS-RBp30-5 y se secuenció la región que codifica para la 3D. En todas las poblaciones de las series R analizadas se obtuvieron poblaciones heterogéneas con distintas mutaciones en mezcla que acompañaban a una única mutación dominante. Se trataba del cambio de nucleótido G-7497 → A, que daba lugar a una mutación no sinónima en el residuo 296 de la polimerasa, con cambio de Metionina a Isoleucina (Figura 5.3). Por el contrario, no se encontró ni el cambio M296I ni otras mutaciones en los pases correspondientes de las poblaciones control. Este hecho sugería que la mutación M296I se seleccionaba en el curso de la replicación de VFA en presencia de R.



**Figura 5.3. Representación esquemática de la posición 296 en el genoma de VFA.** Se muestra la secuencia de aminoácidos próximos a la posición 296 en la 3D, destacados con un triángulo amarillo aquellos que interactúan con el RNA molde o con el nucleótido entrante (correcto o ribavirina-5'-trifosfato, RTP), según Ferrer-Orta y cols. (2006b, 2007). La posición 296 se resalta en rojo y es una metionina (M) en poblaciones de VFA pasadas en ausencia de ribavirina o una Isoleucina (I) en las poblaciones de VFA analizadas pasadas en presencia de R.

En las **Tabla 5.1** se muestran las mutaciones sinónimas y no sinónimas encontradas en las secuencias consenso del gen 3D (polimerasa) de todas las poblaciones analizadas. Existe una notable diferencia en el número de mutaciones encontradas entre las secuencias analizadas de la serie MARLS-RA y MARLS-RB. Es probable que esta diferencia repercuta en la complejidad del espectro de mutantes de las poblaciones, y pueda explicar la diferencia de sensibilidad a R que existe para las dos series y que se planteaba al final del apartado 5.1.2 (ver también 6.2).

**Tabla 5.1.** Mutaciones encontradas en las secuencia consenso del gen 3D (polimerasa) de las poblaciones de VFA pasadas en presencia de ribavirina<sup>a</sup>

Poblaciones virales						
Cambio de nucleótido <sup>b</sup>	MARLS RAp10	MARLS RAp25	MARLS RAp30	MARLS RAp35	MARLS RAp30-5	Cambio de aminoácido <sup>c</sup>
C6739C/T		+	+	+	+	P44S
G6814G/A		+	+			E69K
C6831C/T				+	+	
C6849C/T				+	+	
C6874C/T				+		
C6969C/T		+				
C6975C/T					+	
G6981G/A				+		
A7003C/A		+	+	+	+	I132V
G7098G/A				+	+	
G7101G/A		+				
G7251G/A				+		
C7260C/T		+	+	+		
C7303C/A				+		
C7350C/T			+	+	+	
G7389G/A		+	+	+		
C7404C/T				+	+	
C7410C/T		+		+		
C7414C/T		+	+	+	+	P269S
G7453G/A		+	+	+	+	E282K
C7460C/T		+	+	+	+	A284V
<b>G7497A</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>M296I</b>
C7506C/A			+	+	+	
C7548C/T				+	+	
G7584G/A		+	+		+	
C7692C/T		+	+		+	
C7905C/T		+		+		
C7935C/T				+	+	
C7460C/T		+	+	+	+	

(Continúa en la página 76)

(Continuación de Tabla 5.1)

Poblaciones virales						
Cambio de nucleótido <sup>b</sup>	MARLS RBp10	MARLS RBp25	MARLS RBp30	MARLS RBp35	MARLS RBp30-5	Cambio de aminoácido <sup>c</sup>
C6648C/T		+	+	+	+	
C6891C/T		+				
G7077G/A		+				
C7114C/T		+		+	+	P169S
C7260C/T		+	+	+	+	
G7437G/A			+	+	+	
<b>G7497A</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>M296I</b>
G7584G/A		+	+	+	+	
C7599C/T		+		+	+	

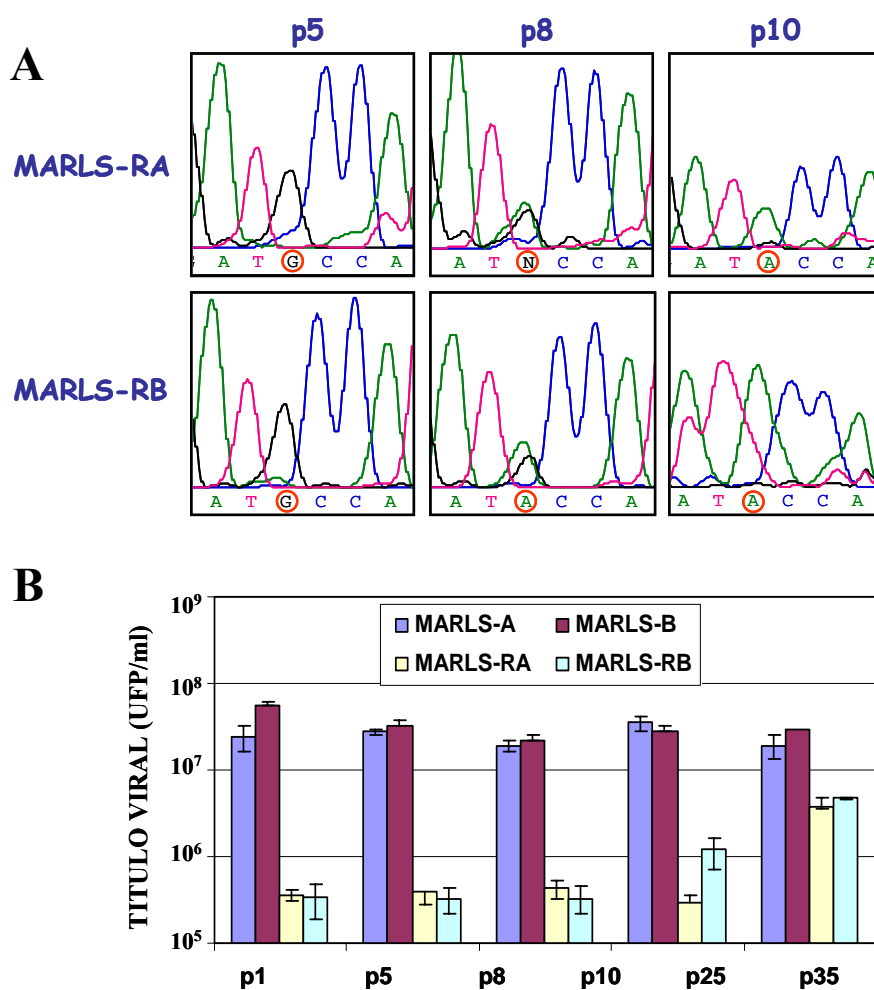
<sup>a</sup> Las poblaciones virales estudiadas y las condiciones de mutagénesis se explican en la Figura 5.1 y en la sección 4.4.2 de Materiales y Métodos, respectivamente.

<sup>b</sup> La numeración de los nucleótidos del genoma del VFA C-S8c1 es según Escarmís y cols. (1999). Se muestran con el símbolo + los tipos de mutaciones encontradas en la región que codifica la 3D de cada población. La única mutación dominante en todas las poblaciones, M296I, se muestra en rojo.

<sup>c</sup> Cambios de aminoácido en 3D encontrados en las poblaciones estudiadas. Los aminoácidos se representan según el código de una letra (explicado en Abreviaturas) y se numeran desde el aminoácido N-terminal al C-terminal. La estructura tridimensional de 3D se describe en 2.6.1 y en la Figura 2.8.

Con el fin de averiguar en qué pase la mutación M296I pasó a ser dominante, se secuenció la región que codifica 3D de los genomas virales de los primeros pases de las series MARLS-RA y MARLS-RB (**Figura 5.4A**). Durante los cinco primeros pases, donde únicamente se había empleado 200  $\mu$ M R, la mutación M296I aun no se detectaba en la población. El pase 8, en el que se había aumentado la concentración de R a 400  $\mu$ M, fue el primer pase donde se observó la mutación M296I en mezcla en las 2 series. Sin embargo, no fue hasta el pase 10 cuando se impuso en las 2 series. Este resultado sugiere que se necesita un aumento gradual de la presión selectiva ejercida por la R para la adquisición de resistencia a R por el VFA.

Se analizó la evolución de la producción viral de las poblaciones de las series MARLS-RA y MARLS-RB. En la **Figura 5.4B** se observa que el título viral de las poblaciones pasadas en presencia de R aumenta con el número de pase, a pesar del incremento gradual de concentración de la droga.

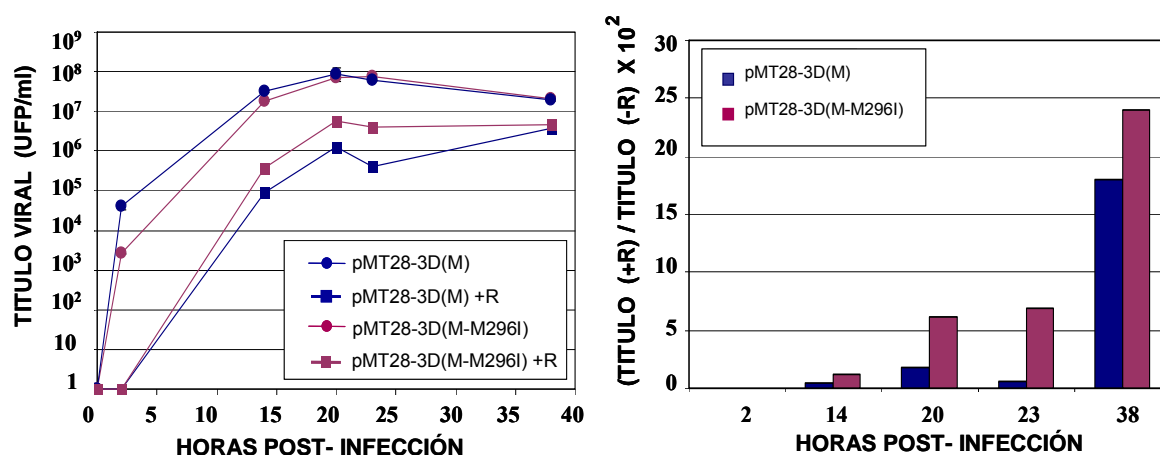


**Figura 5.4.** Evolución de la adquisición de resistencia a ribavirina en poblaciones de VFA. **A:** Se muestra el cromatograma correspondiente a las secuencias consenso de las poblaciones de la serie MARLS-RA y MARLS-RB pasadas 5 (p5), 8 (p8) y 10 (p10) veces en presencia de R (pases 1-5: 200  $\mu$ M R; pases 6-25: 400  $\mu$ M R; pases 25-35: 800  $\mu$ M R). Las mutaciones de las secuencias consenso de las poblaciones estudiadas se identificaron por comparación con la secuencia consenso del virus parental MARLS (origen descrito en 4.2). La posición 7497 del genoma, que es G para virus “wild-type” y A para virus mutante, se resalta con un círculo rojo. El RNA de los sobrenadantes de infección de los pases 5, 8 y 10 fueron extraídos, amplificados y secuenciados tal y como se describe en los apartados 4.5, 4.6 y 4.8 de Materiales y Métodos. **B:** Títulos virales de poblaciones de MARLS pasadas en ausencia (MARLS-A y MARLS-B) o en presencia de ribavirina (MARLS-RA y MARLS-RB) descritas en la Figura 5.1. Los sobrenadantes de infección se titularon y 200  $\mu$ l se usaron para reinfectar una nueva monocapa de células para el siguiente pase. Se muestran los títulos virales de los pases (eje de abscisas) de dos series por separado, A y B. p indica número de pase. Las condiciones del tratamiento mutagénico, infecciones en medio líquido en presencia de mutágeno y determinación del título viral se describen en el apartado 4.4 de Materiales y Métodos.

#### 5.1.4.- Curvas de crecimiento viral de pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I) en ausencia y presencia de ribavirina

Un aumento en la capacidad de VFA de producir progenie en presencia de R podía estar asociado a la mutación M296I en la polimerasa 3D. Sin embargo, este efecto podía deberse a otras modificaciones genéticas del virus que interfiriesen en la activación intracelular de R, o que disminuyesen la concentración efectiva de los metabolitos activos de la droga en el complejo de replicación, o bien a otros mecanismos indirectos que compensasen el efecto antiviral de R.

Para estudiar la posible implicación de la mutación M296I en una menor sensibilidad a R, se sometieron a análisis los clones infecciosos pMT28-3D(M-M296I) y pMT28-3D(M), cuyo origen se describe en la sección 4.2 de Materiales y Métodos. Los transcritos infecciosos de estos plásmidos se transfectaron en células BHK-21 para obtener VFA que codificasen 3D(M-M296I) o 3D(M) en el mismo contexto de secuencia de C-S8c1. Por tanto, estos virus quiméricos no contienen ninguna zona del genoma de VFA que haya evolucionado en presencia de R, excepto la zona 3D en la construcción pMT28-3D(M-M296I). Se comparó la producción viral a partir de los dos clones infecciosos en ausencia y en presencia de R. Los resultados de una infección a baja multiplicidad de infección (**Figura 5.5**) muestran un ligero, pero significativo aumento, de la producción viral del virus pMT28-3D(M-M296I) en presencia de R con respecto al virus pMT28-3D(M). En otro experimento independiente realizado de la misma manera con otros transcritos de los mismos RNA víricos se obtuvo un resultado idéntico. En ausencia de R, pMT28-3D(M-M296I) alcanza títulos similares al pMT28-3D(M), lo cual sugiere que esta mutación no altera significativamente la capacidad replicativa del VFA en cultivos celulares. Sin embargo, a las 2 horas post-infección, pMT28-3D(M-M296I) mostró un menor título viral que pMT28-3D(M), sugiriendo que M296I en 3D puede enlentecer las etapas iniciales de producción viral [ver también Resultados apartado 5.3.1 (**Figura 5.20**) y Discusión 6.4].



**Figura 5.5.** Cinética de la producción viral en infecciones de pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I) en ausencia y presencia de ribavirina. Izquierda: Cinética de producción viral en una infección de células BHK-21 a una m.d.i. de 0,05 UFPs/célula con pMT28-3D(M), representado en azul y pMT28-3D(M-M296I), representado en granate, en ausencia (círculos) y presencia de 800  $\mu$ M de ribavirina (+R, cuadrados). Se recogieron alícuotas del medio de cultivo a distintos tiempos post-infección y se titularon por triplicado mediante ensayo de plaqueo. El origen de los virus empleados, así como los procedimientos de infecciones en medio líquido y determinación del título viral se describen en los apartados 4.2 y 4.4 de Materiales y Métodos. Se muestran las desviaciones estándar. Derecha: Relación de los títulos en presencia y ausencia de R a distintas horas post-infección de pMT28-3D(M) (azul) y pMT28-3D(M-M296I) (granate); relaciones calculadas a partir de los datos del panel de la izquierda.

### 5.1.5.- Ensayos de “fitness” entre pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I) en ausencia y presencia de ribavirina

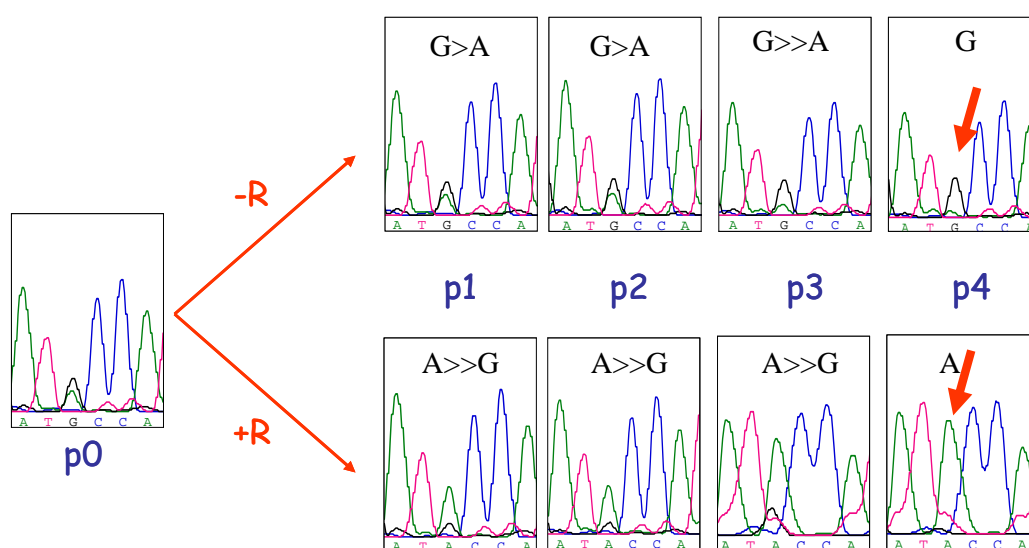
Con el fin de analizar el efecto que tenía la mutación M296I en el “fitness” viral y si pMT28-3D(M-M296I) tenía una ventaja selectiva en presencia de R en relación a pMT28-3D(M), se coinfectaron células BHK-21 con ambos virus en un ensayo de competición descrito en la sección 4.10 de Materiales y Métodos. Este ensayo se realizó tanto en presencia de R como en ausencia de droga, y por duplicado.

En una primera aproximación, el RNA de cada pase de la competición fue extraído, la región que codifica 3D amplificada por RT-PCR y analizada mediante secuenciación, tal y como se describe en los apartados 4.5, 4.6 y 4.8 de Materiales y



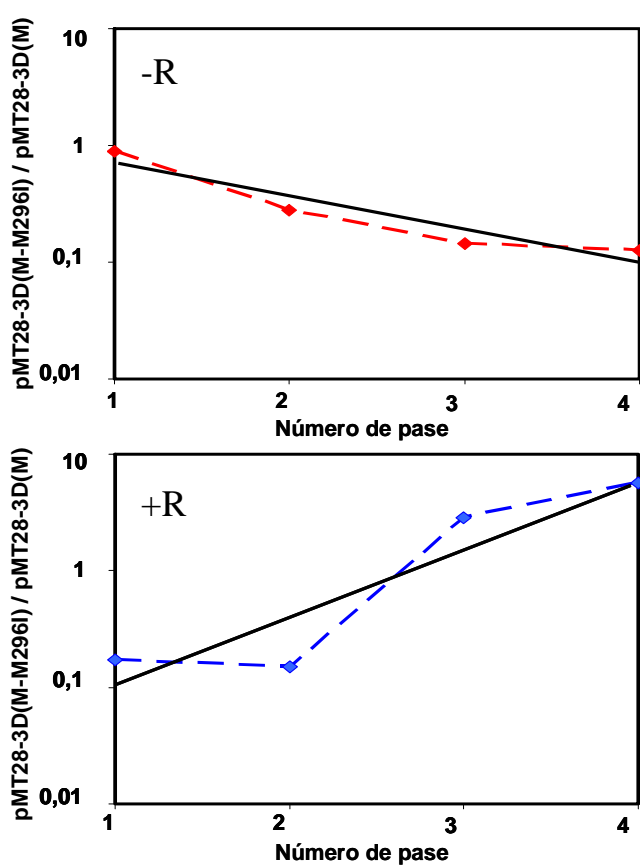
Métodos. Los resultados se muestran en los cromatogramas de la **Figura 5.6**. En ausencia de R, el virus “wild-type” (con una G en la posición 7497) se impone rápidamente sobre el mutante (con una A en la posición 7497). La capacidad del virus “wild-type” de desplazar al mutante en ausencia de R indica que el mutante presenta una menor adaptación en ausencia de la droga.

En presencia de R, sin embargo, a medida que se dan los pases en presencia de la droga, aumenta la proporción del virus mutante en la mezcla, y los niveles del virus “wild-type” en el último pase son casi indetectables. Estos resultados indican que la mutación M296I confiere al VFA una ventaja selectiva en presencia de R.



**Figura 5.6.** Pases seriados de una mezcla de pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I) en ausencia y presencia de R. Se realizó una coinfección con aproximadamente la misma proporción de un clon que codificaba la mutación M296I en su 3D [pMT28-3D(M-M296I)] y de un clon “wild-type” [pMT28-3D(M)] a una m.d.i. de 0,1 UFPs/célula (p0). Cuando se observó efecto citopático completo la progenie fue diluida 10 veces y fue utilizada para infectar una nueva monocapa celular. Se llevaron a cabo un total de cuatro infecciones seriadas (representadas como p1, p2, p3 y p4) en ausencia de R (- R, cuatro paneles superiores) y en presencia de 800  $\mu$ M de R (+R, cuatro paneles inferiores). La flecha roja resalta en el pase 4 el pico del cromatograma en la posición 7497 del genoma de VFA (G para el virus “wild-type” o A para el virus mutante) que se impone en cada ambiente.

Para determinar de una forma más precisa el efecto de la mutación M296I en la capacidad replicativa de VFA, se calculó el “fitness” del virus pMT28-3D(M-M296I) con respecto al virus pMT28-3D(M) (sección 4.10) (Figura 5.7). Los resultados muestran un valor de “fitness” relativo del virus de pMT28-3D(M-M296I) con respecto al virus pMT28-3D(M) de 3,8 en presencia de R, pero de 0,5 en ausencia de R. Estos valores confirman los resultados de secuenciación y junto con los resultados de producción viral de ambos virus por separado, sugieren que la sustitución M296I en 3D confiere al virus una ventaja selectiva al virus solamente en presencia de R. En ausencia de R, la sustitución M296I disminuye la capacidad replicativa del VFA.



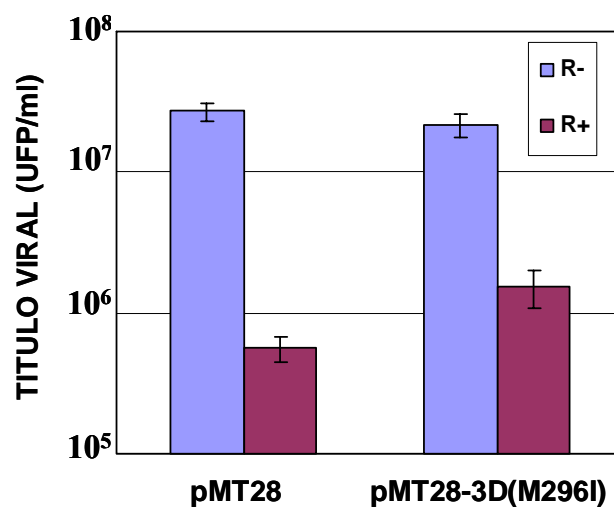
**Figura 5.7.** Proporción de pMT28-3D(M-M296I) y pMT28-3D(M) en competición en ausencia (-R) y presencia (+R) de ribavirina. La ecuación obtenida en -R fue  $y = 1,3305 \times e^{-0,6524x}$  ;  $R^2=0,8916$ . La ecuación obtenida en +R fue  $y = 0,0283 \times e^{1,3395x}$  ;  $R^2= 0,8488$ . El antilogaritmo de la pendiente de cada vector da el valor de eficacia biológica. Se obtuvieron valores de “fitness” similares en otro experimento de competición realizado en paralelo. La proporción relativa de los dos virus para cada pase se cuantificó mediante oligonucleótidos discriminatorios descritos en la sección 4.10 de Materiales y Métodos.

En otro experimento realizado en las mismas condiciones descritas anteriormente se obtuvo un valor de eficacia biológica de pMT28-3D(M-M296I) relativa a pMT28-3D(M) de 3,1 y 0,5 en presencia y ausencia de R, respectivamente.

Para analizar si la sustitución M296I en 3D revertía por sí sola en ausencia de la droga, pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I) se sometieron por separado a cuatro pases en ausencia y presencia de R en células BHK-21. No se produjo reversión de A a G en la posición 7497 cuando pMT28-3D(M-M296I) se pasó de manera independiente en ausencia de R. Este hecho sugiere que esta mutación produce una bajada modesta de “fitness” (**Figura 5.7**) que resulta insuficiente para producir una reversión detectable tras cuatro pases en células BHK-21. Además, este resultado confirma que la evolución de la proporción de G y A en la posición 7497 en los ensayos de competición (**Figura 5.6**), no debió influirse de modo significativo por una posible reversión A7497G del mutante durante los pases.

#### **5.1.6.- Efecto de la ribavirina en la producción viral de pMT28 y pMT28-3D(M296I) en un único ciclo de infección**

El aminoácido en la posición 232 de la 3D es H en el virus MARLS y Q en el virus C-S8c1. Los clones infecciosos pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I) provienen del clonaje molecular de las poblaciones MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5 (sección 4.11.1 de Materiales y Métodos), que incluyen H232 en la polimerasa. No se podía excluir que la mutación Q232H tuviese algún efecto en la capacidad replicativa del virus en ausencia y/o presencia de R. Para investigar si el cambio de aminoácido M296I confería una ventaja selectiva en presencia de R también en el contexto de secuencia de la 3D de C-S8c1 (sin la sustitución Q232H), se rescataron los virus pMT28 y pMT28-3D(M296I) a partir de los transcritos infecciosos, tal y como se describe en las secciones 4.12 y 4.13 de Materiales y Métodos. Se estudió el efecto de la mutación M296I en un ciclo único de infección en ausencia y presencia de R. La relación entre la producción viral en presencia y ausencia de R fue 3 veces superior para el virus que expresaba la 3D con M296I, que para el virus “wild-type” (**Figura 5.8**). De nuevo, la 3D con la sustitución M296I confirió a VFA C-S8c1 una ventaja selectiva en presencia de R, confirmando que la mutación M296I era responsable directa de la disminución de sensibilidad a R en VFA.

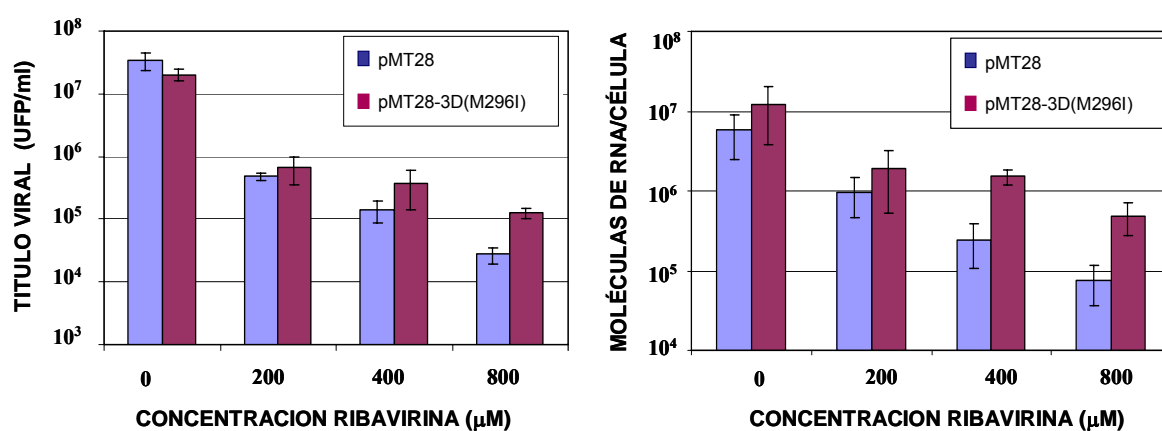


**Figura 5.8.** Producción viral de clones infecciosos pMT28 y pMT28-3D(M296I) en ausencia y presencia de R. Las columnas azules representan la producción viral en ausencia de R y las columnas granate muestran la producción viral en presencia de R. Las infecciones se realizaron a una m.d.i. de 2 UFPs/célula y se titularon los sobrenadantes cuando se observó efecto citopático total. Los plaqueos se realizaron por triplicado y se muestran en la figura los valores medios con indicación de las desviaciones estándar. Las condiciones de infección en ausencia y presencia de mutágeno y determinación de título viral se describen en el apartado 4.4 de Materiales y Métodos.

### 5.1.7.- Comparación de la reducción de infectividad y de la cantidad de RNA de pMT28 y pMT28-3D(M296I) en presencia de cantidades crecientes de ribavirina

El efecto antiviral de la R en células BHK-21 persistentemente infectadas con VFA se ejerce al menos mediante dos mecanismos, uno vía mutagénesis directa y otro por mutagénesis indirecta mediada por un descenso en los niveles de GTP tras la inhibición de la inosín monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) (Airaksinen y cols. 2003) (Introducción, apartados 2.7.1 y 2.7.2.1). El efecto antiviral de R debe verse reflejado también en el nivel de RNA viral producido. Consideramos interesante estudiar si la inhibición de la síntesis de RNA viral era menos patente para el virus con la sustitución M296I que para el virus parental “wild-type”. Para ello, se estudió el efecto de cantidades crecientes de R sobre la producción de partículas infecciosas y de RNA viral

para los virus pMT28 y pMT28-3D(M296I) (con todo el genoma en el contexto de secuencia de C-S8c1). Se infectaron monocapas de células BHK-21 en presencia de 0  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M y 800  $\mu$ M de R. Se cuantificaron el RNA viral y las UFPs en los sobrenadantes de las infecciones cuando se observó e.c.p. total. Los resultados (Figura 5.9) mostraron que la actividad antiviral de R tenía un efecto dependiente de dosis, tanto en la capacidad de producir partículas infecciosas, como en el número de moléculas de RNA. Ambos efectos fueron menos patentes en el pMT28-3D(M296I) que en el pMT28, lo cual indica de nuevo que la ribavirina ejerce menos su acción inhibitoria sobre un virus con una polimerasa mutada en la posición M296I.



**Figura 5.9.** Producción de partículas infecciosas y de RNA viral durante infecciones de pMT28 y pMT28-3D(M296I) en presencia de cantidades crecientes de R. Se realizaron infecciones a una m.d.i. de 0,05 UFPs/célula con pMT28 (columnas azules) y con pMT28-3D(M296I) (columnas granate) en presencia de cantidades crecientes de R (0  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M y 800  $\mu$ M). Los sobrenadantes se recogieron y analizaron cuando se observó e.c.p. total. Izquierda: Título viral tras los tratamientos indicados en el eje de abscisas. Las titulaciones se realizaron por triplicado y se muestran las desviaciones estándar. Los procedimientos utilizados para infecciones en medio líquido y determinación de título viral se describen en el apartado 4.4 de Materiales y Métodos. Derecha: Niveles de RNA viral en los sobrenadantes tras la infecciones en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de R. Se representa el número de moléculas de RNA/célula. Los métodos de extracción y cuantificación de RNA están descritos en la sección 4.5 y 4.9 de Materiales y Métodos. Las cuantificaciones se realizaron por triplicado y se muestran las desviaciones estándar.

### 5.1.8.- Análisis del espectro de mutantes de poblaciones del virus de la fiebre aftosa obtenidas tras infecciones citolíticas en presencia de ribavirina

Análisis previos de poblaciones de VFA pasadas en células BHK-21 en ausencia de mutágenos indicaban frecuencias de mutación, calculadas para los componentes del espectro de mutantes, que oscilaban entre  $0,7 \times 10^{-4}$  y  $5,9 \times 10^{-4}$  sustituciones por nucleótido (Sierra y cols. 2003; Pariente y cols. 2003; Airaksinen y cols. 2003), con una modesta dominancia de las mutaciones  $C \rightarrow A$ ,  $C \rightarrow U$  y  $U \rightarrow C$ . Cuando se trataron con R células BHK-21 persistentemente infectadas con VFA, la frecuencia de mutación entre los componentes del espectro de mutantes del VFA alcanzó valores de  $5,7 \times 10^{-4}$  hasta  $2,1 \times 10^{-3}$  sustituciones por nucleótido (Airaksinen y cols. 2003). Las mutaciones favorecidas tras el tratamiento con R fueron  $C \rightarrow U$  y  $G \rightarrow A$  [32 de un total de 40 mutaciones identificadas].

Para investigar si R en infecciones citolíticas por VFA producía un aumento en la frecuencia de mutación y una misma desviación en el tipo de mutaciones que en infecciones persistentes, se analizaron los espectros de mutantes de las poblaciones control, MARLS-Ap35 y MARLS-Bp35, y de las poblaciones pasadas en presencia de R, MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5, descritas en el apartado 5.1.1 de Resultados. La complejidad del espectro de mutantes se cuantificó por análisis de la secuencia de nucleótidos de la región de la polimerasa de clones moleculares individuales de cada población (apartado 4.11.1). Los valores de frecuencia de mutación y de complejidad de la cuasiespecie de las poblaciones virales pasadas en presencia de R se incrementaron respecto a los de las poblaciones virales pasadas en ausencia de mutágeno (Tabla 5.2). Los aumentos de complejidad para la línea de pases A fueron algo superiores que para la línea B, con aumentos de 6,5 veces para la frecuencia de mutación mínima, de 18,1 veces para la frecuencia de mutación máxima y de 5 veces para la entropía de Shannon. Los incrementos correspondientes para la línea B fueron 2,2, 6,8 y 0,2 veces, respectivamente (incrementos calculados a partir de la Tabla 5.2). Estos resultados están de acuerdo con los aumentos de complejidad previamente descritos para el VFA de células persistentemente infectadas tras el tratamiento con R (Airaksinen y cols. 2003).

**Tabla 5.2.** Heterogeneidad genética de poblaciones de VFA pasadas con y sin ribavirina

Población <sup>a</sup>	Región del genoma <sup>b</sup>	Núm. de clones analizados	Núm. de nucleótidos <sup>c</sup>	Frecuencia de mutación mínima <sup>d</sup>	Frecuencia de mutación máxima <sup>e</sup>	Entropía de Shannon <sup>f</sup>
MARLS-Ap35	3D (7150-8020)	21	18270	$2,7 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$	0,2
MARLS-Bp35	3D (7004-8020)	21	21336	$7,9 \times 10^{-4}$	$7,9 \times 10^{-4}$	0,6
MARLS-RAp30-5	3D (7150-8020)	23	20100	$17,5 \times 10^{-4}$	$49,0 \times 10^{-4}$	1
MARLS-RBp30-5	3D (7004-8020)	47	47752	$17,6 \times 10^{-4}$	$53,6 \times 10^{-4}$	1

<sup>a</sup> Las poblaciones analizadas se describen en apartado 5.1.1 de Resultados y en la Figura 5.1.

<sup>b</sup> La numeración de los residuos del genoma del VFA es la descrita en Escarmís y cols (1999). La zona codificante de la 3D abarca del nucleótido 6610 al 8020, pero se analizó la secuencia de nucleótidos de la región indicada entre paréntesis.

<sup>c</sup> Número de nucleótidos secuenciados de cada población.

<sup>d</sup> La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones distintas encontradas (las mutaciones repetidas se cuentan una sola vez) dividido por el número total de nucleótidos secuenciados para cada población (apartado 4.14. de Materiales y Métodos).

<sup>e</sup> La frecuencia de mutación máxima es el número total de mutaciones encontradas dividido por el total de nucleótidos secuenciados en cada población (apartado 4.14. de Materiales y Métodos).

<sup>f</sup> La entropía normalizada de Shannon se calcula como  $S_n = -[\sum_i (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$ , donde  $p_i$  es la frecuencia de cada secuencia en la cuasiespecie y  $N$  es el número de genomas comparados (apartado 4.14 de Materiales y Métodos).

El número total de mutaciones encontradas en las poblaciones tratadas con R fue significativamente mayor al número encontrado en las poblaciones control, con una gran dominancia de transiciones frente a transversiones (128 frente a 11) (**Tabla 5.3**). El efecto de cada mutación a nivel de proteína se discute en el apartado 6.6 y están recogidas en el Anexo. Las transiciones mayoritarias asociadas al tratamiento con R fueron C→U (42,5% y 47,5% para las líneas A y B, respectivamente) y G→A (21,2% y 35% para las líneas A y B, respectivamente) (porcentajes calculados a partir de los datos de la **Tabla 5.3**). Estos resultados están de acuerdo con los tipos de mutaciones encontradas en el VFA de células persistentemente infectadas, tras el tratamiento con R (Airaksinen y cols. 2003).

**Tabla 5.3.** Tipos de mutaciones encontradas en las poblaciones de VFA pasadas con y sin ribavirina<sup>a</sup>

Tipo de mutación		Población			
		MARLS-Ap35	MARLS-Bp35	MARLS-RAp30-5	MARLS-RBp30-5
Transiciones	C→U	2(40%)	1 (4,7%)	20 (42,5%)	38 (47,5%)
	G→A	0	0	10 (21,2%)	28 (35%)
	A→G	1 (20%)	5 (23,8%)	1 (2,7%)	5 (6,2%)
	U→C	2(40%)	8 (38,1%)	3 (8,1%)	4 (5,0%)
<b>Núm. total transiciones</b>		<b>5</b>	<b>14</b>	<b>34</b>	<b>75</b>
<b>Transiciones/ nt secuenciado</b>		<b>2,7 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>6,5 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>16,9 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>15,7 x 10<sup>-4</sup></b>
Transversiones	C→A	0	0	1 (2,7%)	1 (8,0%)
	A→C	0	1 (4,7%)	0	0
	G→C	0	0	1 (2,7%)	0
	G→U	0	0	0	4 (5,0%)
	U→G	0	1 (4,7%)	0	0
	A→U	0	1 (4,7%)	1 (2,7%)	0
<b>Núm. total transversiones</b>		<b>0</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
<b>Transversiones/ nt secuenciado</b>		<b>&lt; 0,5 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>1,4 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>1,5 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>1,0 x 10<sup>-4</sup></b>

<sup>a</sup> Las mutaciones son las encontradas en el análisis del espectro de mutantes de la zona codificada para la 3D de las poblaciones indicadas. Los nucleótidos secuenciados y el número de clones analizados se describen en la Tabla 5.2. Los números entre paréntesis indican el porcentaje del tipo de mutación con respecto al número total de mutaciones halladas en la misma población. La historia de pases de los virus se describe en la Figura 5.1.

El análisis de los espectro de mutantes muestra que en el proceso de replicación citolítica de VFA en presencia de R existe una selección sistemática de virus que contienen la mutación M296I en la 3D, acompañada de un aumento en la complejidad del espectro de mutantes y de una dominancia de las transiciones C → U y G → A (96 de 117 mutaciones;  $0,005 > P > 0,001$ ; test  $\chi^2$ ). Estas transiciones son las esperadas tras la incorporación de la ribavirina cuando se comporta como análogo de G en lugar de cómo análogo de A o que el uracilo se incorpora más frecuentemente que la citosina cuando R se encuentra en el molde de RNA (ver apartado 2.7.2.5.1 y Figura 2.14).



### 5.1.9.- Análisis del mecanismo de resistencia a ribavirina del virus de la fiebre aftosa M296I

La resistencia a R de una polimerasa mutante de poliovirus, G64S, ha sido atribuida a una mayor fidelidad en la replicación del RNA (Pfeiffer y Kirkegaard 2003; Arnold y cols. 2005). El residuo M296 se encuentra alejado de la posición G62 (posición equivalente a G64 de PV en VFA) en la polimerasa. Sin embargo, no se podía descartar que el mecanismo de resistencia del mutante M296I del VFA implicase también un aumento de fidelidad de la polimerasa, ya que los determinantes de fidelidad de copia de las polimerasas víricas son poco conocidos. Para investigar el mecanismo de resistencia a ribavirina en VFA M296I, hemos realizado diversos ensayos genotípicos y fenotípicos que se detallan a continuación.

#### 5.1.9.1.- Análisis del espectro de mutantes de poblaciones generadas por pMT28 y pMT28-3D(M296I) en ausencia y presencia de ribavirina

Asumiendo que la fidelidad de copia de una polimerasa se puede reflejar en el espectro de mutantes de la población que genera, cuantificamos el efecto de la mutación M296I en la complejidad del espectro de mutantes del VFA. Para ello, se rescataron virus infecciosos que expresaban tanto 3D “wild-type” como 3D(M296I) a partir de los transcritos pMT28 y pMT28-3D(M296I), respectivamente. Se realizaron cinco pases sucesivos de los dos virus en células BHK-21 a alta multiplicidad de infección en ausencia de R y se determinó tanto la secuencia consenso de nucleótidos como la de clones moleculares individuales de las regiones genómicas que codificaban para la proteína VP1 y 3D (**Tabla 5.4**). No se encontró ninguna diferencia en las secuencias consenso de las poblaciones pMT28-p5 y pMT28-3D(M296I)-p5 comparadas con la de C-S8c1, a excepción de la esperada presencia de la mutación responsable de la sustitución M296I en la 3D de pMT28-3D(M296I)-p5. El análisis por clonaje molecular y secuenciación de los espectros de mutantes mostró que la frecuencia de mutación mínima de pMT28-3D(M296I)-p5 fue 1,5 y 1,6 veces superior a la de pMT28-p5 en la región que codifica VP1 y 3D, respectivamente. La frecuencia de mutación máxima de pMT28-3D(M296I)-p5 fue también superior, 2,1 y 1,5 veces en la región VP1 y 3D, respectivamente, a la observada en pMT28-p5. Los valores de complejidad del espectro de mutantes, medida por la entropía de Shannon (apartado 4.16 de Materiales y

Métodos), fueron 2,0 y 1,7 veces superiores para la población pMT28-3D(M296I)-p5 con respecto a la población pMT28-3D, en VP1 y 3D, respectivamente (calculados a partir de los datos de la [Tabla 5.4](#)). En ambas poblaciones se observó una mayor complejidad del espectro de mutantes, medida tanto por frecuencias de mutación como por entropía de Shannon, para la zona que codifica 3D que para la zona que codifica VP1.

**Tabla 5.4. Heterogeneidad genética de los espectros de mutantes generados por pMT28 y pMT28-3D(M296I)**

Población	Región del genoma y proteína codificada <sup>a</sup>	Núm. de Clones analizados	Núm. de Nucleótidos <sup>b</sup>	Frecuencia mutación mínima <sup>c</sup>	Frecuencia mutación máxima <sup>d</sup>	Entropía de Shannon <sup>e</sup>
pMT28-p5	VP1 (3210-3830)	29	17980	$2,8 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-4}$	0,2
	3D (6620-8020)	29	40600	$3,2 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$	0,4
pMT28-3D(M296I)-p5	VP1 (3210-3830)	29	17980	$4,5 \times 10^{-4}$	$6,0 \times 10^{-4}$	0,4
	3D (6620-8020)	29	40600	$4,7 \times 10^{-4}$	$4,7 \times 10^{-4}$	0,7

<sup>a</sup> La numeración de los residuos del genoma del VFA es la descrita en Escarmís y cols. (1999).

<sup>b</sup> Se indica el número de nucleótidos secuenciados de cada población. Los métodos de extracción de RNA viral, clonaje molecular y secuenciación de nucleótidos se describen en los apartados 4.5, 4.11.1 y 4.8 de Materiales y Métodos, respectivamente.

<sup>c</sup> La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones distintas encontradas (las mutaciones repetidas se cuentan una sola vez) dividido por el número total de nucleótidos secuenciados para cada población (apartado 4.14 de Materiales y Métodos).

<sup>d</sup> La frecuencia de mutación máxima es el número total de mutaciones encontradas dividido por el total de nucleótidos secuenciados en cada población (apartado 4.14 de Materiales y Métodos).

<sup>e</sup> La entropía normalizada de Shannon se calcula como  $S_n = -[\sum_i (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$ , donde  $p_i$  es la frecuencia de cada secuencia en la cuasiespecie y  $N$  es el número de genomas comparados (detallado en el apartado 4.14 de Materiales y Métodos).

Los resultados de la complejidad del espectro de mutantes no muestran evidencias de que el cambio de aminoácido M296I produzca una polimerasa con mayor fidelidad de copia. En todo caso, los datos apuntan a una menor fidelidad de la polimerasa I296 (ver también Discusión, apartado 6.3).

Una posible menor incorporación de R por la polimerasa por el virus M296I debería reflejarse en un menor aumento en la frecuencia de mutación en el espectro de mutantes generado por el virus mutante pMT28-3D(M296I) que por el pMT28, tras su replicación en presencia de R. Para estudiar el efecto mutagénico de R sobre el virus portador de la mutación M296I y el virus “wild-type”, ambos virus fueron sometidos a 5 pases en células BHK-21 en presencia de R (800  $\mu$ M). Se analizaron las secuencias consenso y la complejidad del espectro mutantes mediante secuenciación de clones moleculares individuales.

El análisis (**Tabla 5.5**) indicó que las frecuencias de mutación obtenidas (tanto mínima como máxima) de las poblaciones virales tras 5 infecciones sucesivas en presencia de R se incrementaron con respecto a los valores de las poblaciones virales pasadas en ausencia de R (comparar **Tablas 5.4** y **5.5**). Los mayores incrementos se observaron en la zona que codifica la polimerasa 3D en ambas poblaciones analizadas. Este incremento se observó también en los valores de la entropía de Shannon. En la zona que codifica VP1, los incrementos de frecuencia de mutación mínima tras pases seriados en presencia de R fueron de 2,7 y 4,1 veces para las poblaciones pMT28-3D(M296I) y pMT28, respectivamente. En la zona que codifica 3D, el incremento en frecuencia de mutación fue de 3,2 veces para el virus pMT28-3D(M296I) y de 5,5 para el pMT28. Por tanto, en presencia de R, la población pMT28-3D(M296I) genera espectros de mutantes 1,5-1,7 veces menos heterogéneos en la zona que codifica VP1 y 3D, respectivamente, que una población pMT28, probablemente por la menor incorporación de R por la polimerasa.

**Tabla 5.5. Heterogeneidad genética de los espectros de mutantes generados por pMT28 y pMT28-3D(M296I) en presencia de ribavirina**

Población	Región del genoma y proteína codificada <sup>a</sup>	Núm. de clones analizados	Núm. de nucleótidos <sup>b</sup>	Frecuencia mutación mínima <sup>c</sup>	Frecuencia mutación máxima <sup>d</sup>	Entropía de Shannon <sup>e</sup>
pMT28-Rp5	VP1 (3210-3830)	20	12200	11,5 x 10 <sup>-4</sup>	16,0 x 10 <sup>-4</sup>	0,6
	3D (6620-8020)	18	25200	17,8 x 10 <sup>-4</sup>	19,4 x 10 <sup>-4</sup>	1
pMT28-3D(M296I)-Rp5	VP1 (3210-3830)	32	19840	12,1 x 10 <sup>-4</sup>	15,0 x 10 <sup>-4</sup>	0,8
	3D (6620-8020)	47	71400	15,0 x 10 <sup>-4</sup>	15,4 x 10 <sup>-4</sup>	1

<sup>a</sup> La numeración de los residuos del genoma del VFA es la descrita en Escarmís y cols. (1999).

<sup>b</sup> Se indica el número total de nucleótidos secuenciados de cada población. Los métodos de extracción de RNA viral, clonaje molecular y secuenciación de nucleótidos se describen en los apartados 4.5, 4.11.1 y 4.8 de Materiales y Métodos, respectivamente.

<sup>c</sup> La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones distintas encontradas (las mutaciones repetidas se cuentan una sola vez) dividido por el número total de nucleótidos secuenciados para cada población (apartado 4.14 de Materiales y Métodos).

<sup>d</sup> La frecuencia de mutación máxima es el número total de mutaciones encontradas dividido por el total de nucleótidos secuenciados en cada población (apartado 4.14 de Materiales y Métodos).

<sup>e</sup> La entropía normalizada de Shannon se calcula como  $S_n = -[\sum_i (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$ , donde  $p_i$  es la frecuencia de cada secuencia en la cuasiespecie y  $N$  es el número de genomas comparados (detallado en el apartado 4.14 de Materiales y Métodos).

Los resultados indican que el tratamiento con R en infecciones citolíticas produce un aumento en la complejidad del espectro de mutantes respecto a poblaciones propagadas en paralelo en ausencia de mutágeno. Además, la ribavirina produce un menor efecto en la complejidad de la cuasiespecie del virus con la polimerasa mutante M296I, en coherencia con su menor sensibilidad a R. El tipo de mutaciones encontradas tras realizar cinco pases a los virus pMT28 y pMT28-3D(M296I) en ausencia y presencia de R (Tabla 5.6) muestran aumentos significativos de las transiciones C → U y G → A así como descensos de A → G y U → C en las poblaciones tratadas con R. El efecto de cada mutación a nivel de proteína se discute en el apartado 6.6 y están recogidas en el Anexo.

**Tabla 5.6.** Tipos de mutaciones encontradas en las poblaciones generadas por pMT28 y pMT28-3D(M296I) en ausencia y en presencia de ribavirina <sup>a</sup>

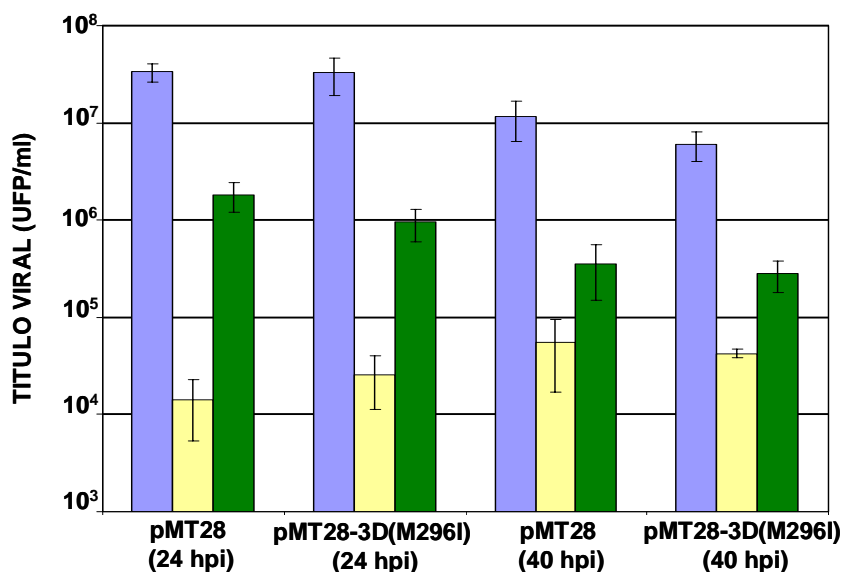
Tipo de mutación		Población			
		pMT28-p5	pMT28-3D(M296I)-p5	pMT28-Rp5	pMT28-3D(M296I)-Rp5
Transiciones	C→U	2 (11,1%)	2 (7,4%)	37 (53,6%)	42 (34,7%)
	G→A	1(5,5%)	4 (14,8%)	15 (21,8%)	29 (24,5%)
	A→G	6 (33,3%)	12 (44,4%)	11 (15,9%)	21 (17,3%)
	U→C	9(50%)	6 (22,2%)	5 (7,2%)	21 (17,3%)
<b>Núm. total transiciones</b>		<b>18</b>	<b>24</b>	<b>68</b>	<b>113</b>
<b>Transiciones/ nt secuenciado</b>		<b>3,1 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>4,1 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>15,0 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>13,5 x 10<sup>-4</sup></b>
Transversiones	C→A	0	1 (3,7%)	0	0
	A→U	0	0	1 (1,4%)	2 (1,6%)
	A→C	0	0	0	1 (0,8%)
	C→G	0	0	0	1 (0,8%)
	U→G	0	2 (7,5%)	0	2(1,6%)
	G→U	0	0	0	2(1,6%)
	<b>Núm. total transversiones</b>		<b>0</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>Transversiones/ nt secuenciado</b>		<b>&lt;0,2 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>0,5 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>0,2 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>0,9 x 10<sup>-4</sup></b>

<sup>a</sup> Las mutaciones son las encontradas en el análisis del espectro de mutantes de la zona codificada para la 3D y VP1 de las poblaciones indicadas. Los nucleótidos secuenciados y el número de clones analizados se describen en la Tabla 5.4. Los números entre paréntesis indican el porcentaje del tipo de mutación con respecto al total de mutaciones halladas en la misma población.

#### 5.1.9.2.- Efecto de los mutágenos 5-fluororruacilo y 5-azacitidina en la producción viral de pMT28 y pMT28-3D(M296I)

Una polimerasa con una mayor fidelidad general de copia, no sólo discriminaría eficientemente la incorporación de R, sino que podría discriminar también en contra de la incorporación de otros análogos de nucleótido. Para explorar esta posibilidad, se determinó el efecto de los análogos mutagénicos FU y AZC (Materiales y Métodos, apartado 4.4.2) sobre la producción de los virus pMT28 y pMT28-3D(M296I). Los resultados (**Figura 5.10**) no mostraron diferencias significativas en la sensibilidad a

AZC o a FU entre pMT28 y pMT28-3D(M296I), en las condiciones utilizadas en este ensayo.

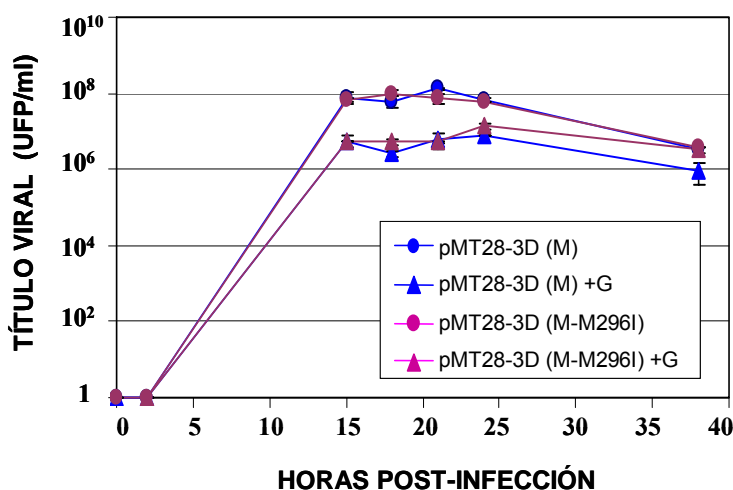


**Figura 5.10.** Producción viral de pMT28 y pMT28-3D(M296I) en ausencia y presencia de FU y AZC. Se realizaron infecciones a una m.d.i. de 0,05 UFPs/célula con pMT28 y con pMT28-3D(M296I) y se recogieron los sobrenadantes a 24 y 40 horas post-infección (tiempo indicado entre paréntesis). Las columnas azules representan la producción viral en ausencia de mutágeno, las columnas amarillas la producción viral en presencia de 10 µg/ml de AZC, y las columnas verdes indican la producción viral en presencia de 200 µg/ml de FU. Las titulaciones se realizaron por triplicado y se muestran las desviaciones estándar. Las condiciones de los tratamientos mutagénicos, infecciones en medio líquido en presencia de mutágeno y determinación del título viral se describen en los apartados 4.4.2 y 4.4.3 de Materiales y Métodos.

### 5.1.9.3.- Efecto del agente antiviral cloruro de guanidinio sobre la producción viral de pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I)

La población generada por un mutante de fidelidad de copia elevada debe reducir el repertorio de mutaciones en su espectro de mutantes y, en consecuencia, debería ser menos adaptable frente presiones selectivas externas, como ha sido documentado recientemente con el mutante G64S de PV (Pfeiffer y Kirkegaard 2005a; Vignuzzi y cols. 2006). Para estudiar si la mutación M296I alteraba la capacidad de VFA de replicar en presencia del inhibidor cloruro de guanidinio (G), se analizó la

cinética de crecimiento de pMT28-3D(M) y de pMT28-3D(M-M296I), en ausencia y presencia de G. Los resultados (Figura 5.11) no mostraron diferencias de la inhibición de la producción viral entre pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I). Este resultado es coherente con el hecho de que la proteína del VFA afectada por G es la 2C (Pariente y cols. 2003) y que 2C es idéntica en los dos virus comparados.



**Figura 5.11.** Cinética de producción viral en infecciones de pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I) en ausencia y presencia de cloruro de guanidinio. Se infectaron células BHK-21 a una m.d.i. de 0,05 UFPs/célula con pMT28-3D(M), representado en azul y con pMT28-3D(M-M296I), representado en rosa, en ausencia (círculos) y presencia de 0,4 mg/ml de cloruro de guanidinio (+G, triángulos). Se recogieron alícuotas del medio de cultivo a distintos tiempos post-infección y se titularon por triplicado mediante ensayo de plaqueo. El origen de los virus empleados, así como los procedimientos de infecciones en medio líquido y determinación del título viral se describen en los apartados 4.2 y 4.4 de Materiales y Métodos. Se muestran las desviaciones estándar.

#### 5.1.9.4.- Generación de mutaciones en presencia de cloruro de guanidinio por pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I)

Un mutante viral con fidelidad de copia incrementada podría retrasar la generación de mutaciones como respuesta a una presión selectiva en el ambiente. Se han descrito sustituciones en la proteína 2C de VFA que confieren resistencia a cloruro de guanidinio (G) (Pariente y cols. 2003). Para analizar si habría diferencias en la cinética de la imposición de mutaciones asociadas a resistencia a G entre un virus con la sustitución M296I en 3D y un virus “wild-type”, se realizaron cinco infecciones seriadas de pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I) en ausencia y presencia de G. El RNA de los sobrenadantes de infección se extrajo y la región codificante de la 2C se

analizó por secuenciación, tal y como se describe en Materiales y Métodos (apartados 4.5, 4.6, 4.7 y 4.8). Los resultados obtenidos (**Tabla 5.7**) mostraron la selección de la mutación A4850G, que da lugar a K169R en 2C, asociada a resistencia a G (Pariente y cols. 2003). Esta mutación se seleccionó antes en el virus pMT28-3D(M-M296I) que en el virus pMT28-3D(M) durante la replicación en presencia de G.

**Tabla 5.7. Cinética de imposición de mutaciones en la secuencia consenso 2C durante la replicación de pMT28-3D(M) y pM28-3D(M-M296I) en presencia de cloruro de guanidinio**

Cambio de aa <sup>a</sup>	virus <sup>b</sup>	Mutaciones encontradas en pases en presencia de G <sup>c</sup>				
		p1	p2	p3	p4	p5
K169R	pMT28-3D(M)	A4850	A4850A/G	A4850G>A	A4850G	A4850G
	pMT28-3D(M-M296I)	A4850	A4850G>A	A4850G>>A	A4850G	A4850G
H84L	pMT28-3D(M)	A4595	A4595	A4595	A4595U	A4595U
	pMT28-3D(M-M296I)	A4595U	A4595U	A4595U	A4595U	A4595U

<sup>a</sup> Cambios de aminoácido en 2C encontrados en las poblaciones generadas por los virus indicados en la segunda columna. Los aminoácidos se representan según el código de una letra (descrito en Abreviaturas). El número indica la posición de cada aminoácido en 2C.

<sup>b</sup> El origen de los clones infecciosos está descrito en la sección 4.2.

<sup>c</sup> p seguido de un número indica el número de pase en presencia de cloruro de guanidinio. Se muestra el cambio en la secuencia de nucleótidos del genoma de C-S8c1 correspondiente al cambio de aminoácido indicado en la primera columna. Las mezclas se indican con los dos nucleótidos presentes separados por una barra o por los símbolos > o >> (A/G, igual proporción de A y G; G>A, G más del 50%; G>>A, G más del 80%).

Además, otra sustitución en 2C, no descrita anteriormente en VFA, H84L (debida a la mutación A4595U), se seleccionó en el primer pase de la población pMT28-3D(M-M296I), mientras que no se impuso en la población pMT28-3D(M) hasta el pase 4. H84L se encontraba ya en el preparado de virus (sobrenadante recogido tras transfección) de pMT28-3D(M-M296I). El hecho de que esta mutación acabe imponiéndose en el pase 4 de pMT28-3D(M) sugiere que puede contribuir a un aumento de “fitness” cuando el virus tiene una desventaja selectiva ya sea la producida por la sustitución M296I 3D o por la presencia de G. Las secuencias consenso de 2C de las poblaciones pasadas cinco veces en ausencia de G fueron “wild-type”, a excepción de la presencia de A4595U en la población generada por pMT28-3D(M-M296I). La



clarificación de la razón de la imposición de H84L en 2C requiere estudios adicionales. Estos resultados son coherentes con los datos de complejidad de los espectros de mutantes de las poblaciones pMT28-p5 y pMT28-3D(M296I)-p5 (ver sección 5.1.9.1 y **Tabla 5.4**). Una población generada por VFA con una polimerasa M296I resultó tener una mayor frecuencia de mutación que una población generada por VFA con una polimerasa “wild-type”. Esta diferencia en el espectro de mutantes podría favorecer la aparición de mutaciones en una población M296I bajo la presión selectiva de G antes que en la población “wild-type”.

#### **5.1.10.- Pases seriados de poblaciones del virus de la fiebre aftosa que expresan 3D M296I en presencia de 5-fluorouracilo**

La mutación M296I no reversionó tras 4 pases seriados de pMT28-3D(M-M296I) en ausencia de droga (apartado 5.1.5) ni tras cinco pases seriados en células BHK-21 de las poblaciones MARLS-RAp30 y MARLS-RBp30 (apartado 5.1.3). Dado que la sustitución M296I origina una disminución de eficacia biológica en el VFA (apartado 5.1.5), resultó interesante estudiar su estabilidad, en condiciones de mutagénesis incrementada. Con este fin, las poblaciones MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5 se pasaron 15 veces en ausencia y presencia de 50 µg/ml y 200 µg/ml de fluorouracilo (FU), tal y como se describe en la sección 4.4.2 de Materiales y Métodos. Las poblaciones MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5 son poblaciones heterogéneas con múltiples mutaciones en mezcla (entre ellas, P169S en la serie A y P44S, en la serie B; ver apartado 5.1.3; Tabla 5.1) que acompañan a M296I como única mutación dominante en las dos poblaciones. Los genomas virales de las poblaciones resultantes fueron extraídos, amplificados por RT-PCR y analizados por secuenciación de la región que codifica para 3D (apartados 4.5, 4.6 y 4.8 de Materiales y Métodos).

Los resultados (**Tabla 5.8**) muestran que tras 15 pases en ausencia del mutágeno, tanto en la población MARLS-RAp30-5 como en la MARLS-RBp30-5, aumenta la proporción de genomas que codifican M296 en 3D, observándose dominancia completa de M296 tras los pases en presencia de 200 µg/ml de FU y dominancia parcial en presencia de 50 µg/ml FU.

El tratamiento con FU contribuyó a la dominancia total del genotipo “wild-type” de P169S, que se hallaba en mezcla en la población inicial. Sin embargo, la mutación

P44S, inicialmente también en mezcla, se impuso en las poblaciones finales independientemente del tratamiento con FU.

**Tabla 5.8. Mutaciones encontradas en la secuencia consenso (3D) de poblaciones de VFA resistentes a ribavirina tratadas con y sin 5-fluorouracilo**

Cambio de aa <sup>a</sup>	Poblaciones y tratamiento <sup>b</sup>			
	MARLS-RAp30-5 inicial	MARLS-RAp30-5 FU(0), p15	MARLS-RAp30-5 FU(50), p15	MARLS-RAp30-5 FU(200), p15
P44S	C6739C/U	C6739U	C6739U	C6739U
M296I	G7497A	G7497G<A	G7497G>A	G7497
K406E	A7825	A7825	A7825	A7825G

Cambio de aa <sup>a</sup>	Poblaciones y tratamiento <sup>b</sup>			
	MARLS-RBp30-5 inicial	MARLS-RBp30-5 FU(0), p15	MARLS-RBp30-5 FU(50), p15	MARLS-RBp30-5 FU(200), p15
P169S	C7114C/U	C7114C/U	C7114C/U	C7114
V173I	G7126	G7126	G7126	G7126A
M296I	G7497A	G7497G/A	G7497G/A	G7497

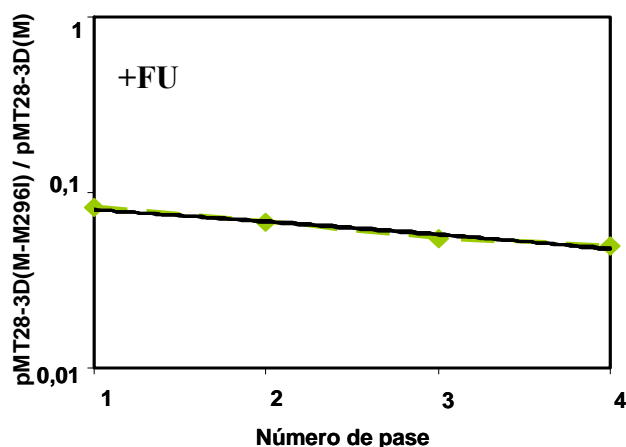
<sup>a</sup>Cambios de aminoácido en 3D encontrados en las poblaciones indicadas. Los aminoácidos se representan según el código de una letra (descrito en Abreviaturas). El número indica la posición de dicho aminoácido en 3D.

<sup>b</sup>El origen de las poblaciones empleadas se detalla en el apartado 5.1.1, y las condiciones de infección en presencia de mutágenos están descritas en el apartado 4.4.2 de Materiales y Métodos. Se indican únicamente las mutaciones que originan cambio de aminoácido. La primera letra corresponde al nucleótido encontrado en el virus parental MARLS; el número indica la posición de dicho nucleótido en el genoma de MARLS. Las mezclas se indican con los dos nucleótidos presentes, separados por una barra. > ó < indican que un nucleótido se encuentra en mayor o menor proporción respectivamente, que el otro nucleótido en la misma posición.

Cabe destacar que los cambios de aminoácido I296M y S169P implican cambios de A-G y U-C, respectivamente, que son transiciones favorecidas por el tratamiento con FU (Sierra y cols. 2000; Pariente y cols. 2003). Estos resultados están de acuerdo con la desventaja selectiva que confiere la sustitución M296I en 3D al VFA y sugiere que el empleo de un agente mutagénico que tiende a favorecer el tipo de mutaciones contrarias a la mutación que confirió una desventaja selectiva, puede contribuir a identificar a las mutaciones deletéreas en el espectro de mutantes. Esta posibilidad se está investigando actualmente (ver también Discusión 6.2). La replicación en presencia con FU seleccionó

dos mutaciones, V173I y K406E, en las poblaciones MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5, respectivamente. Su posible implicación en una potencial menor sensibilidad a FU está siendo investigada actualmente.

La reversión de M296I producida por replicación del VFA en presencia de FU podía ser debida a una desventaja de M296I en presencia de la presión selectiva creada por el FU. Para investigar esta posibilidad se realizó un experimento de competición entre pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I), tal y como se describe en el apartado 5.1.5, pero en presencia de FU. Los resultados obtenidos por secuenciación de la región 3D de todos los sobrenadantes de las infecciones en presencia de FU, mostraron igual proporción de virus M296I y virus “wild-type” a lo largo de los pases (datos no mostrados). Se calculó el valor relativo de “fitness” del virus pMT28-3D(M-M296I) con respecto a pMT28-3D(M) en presencia de FU (**Figura 5.12**).



**Figura 5.12. Proporción de pMT28-3D(M) y pMT28-3D(M-M296I) en competición, en presencia de FU (+FU).** La ecuación obtenida fue  $y = 0,0948 \times e^{-0,1683x}$ ;  $R^2=0,977$ . El antilogaritmo de la pendiente de cada vector da el valor de eficacia biológica. La proporción de los dos virus en análisis para cada pase se cuantificó mediante oligonucleótidos discriminatorios descritos en la sección 4.10 de Materiales y Métodos.

El virus pMT28-3D(M-M296I) presentó un valor de “fitness” relativo al virus pMT28-3D(M) de 0,8 en presencia de FU. Además, estos resultados confirman que la sustitución M296I sólo confiere ventaja selectiva al virus específicamente en presencia de R, y no en presencia de cualquier otro mutágeno, avalando la hipótesis de que se trata de un mutante con sensibilidad disminuida específicamente a R, y quizás a otros análogos de nucleótido no ensayados. Es posible que la aparición en mezcla de M296 y M296I en los sobrenadantes de las coinfecciones fuese resultado de una reversión ejercida por FU y no por una desventaja de M296I. Sin embargo, esta opción es poco probable ya que en cuatro pases en presencia de FU de la población MARLS-RAp30-5 (que contiene 3D de VFA que expresa M296I) no se observó reversión de la mutación.

## 5.2.- Polimerasa del virus de la fiebre aftosa con la sustitución M296I. Caracterización bioquímica y efecto de la sustitución

Estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que el principal mecanismo de acción anti-VFA de R se debía a su acción mutagénica directa, y en menor medida a su acción mutagénica indirecta por disminución de la concentración intracelular de GTP y desbalance en los niveles relativos de los nucleótidos intracelulares (Airaksinen y cols. 2003).

Dado que la ribavirina-5'-trifosfato (RTP) es un sustrato para la polimerasa (3D) de poliovirus (Crotty y cols. 2000; Arnold y cols. 2005), era importante estudiar el comportamiento de RTP como sustrato de la polimerasa (3D) de VFA y las posibles diferencias entre 3D de tipo “wild-type” y la 3D con la sustitución M296I. Para ello, se emplearon distintos ensayos bioquímicos, descritos en Materiales y Métodos, secciones 4.18-4.23.

### 5.2.1.- Actividad enzimática de la polimerasa mutante M296I

Los genes codificantes de las polimerasas 3D(M) y 3D(M-M296I) (en el contexto de secuencia del VFA MARLS, ver apartado 4.15) y de la polimerasa 3D (en el contexto de secuencia de C-S8c1) se clonaron en el vector pET-28a, se expresaron en *E. coli* BL21 y las enzimas se purificaron a partir de los extractos mediante cromatografía de afinidad en Ni-NTA, como se detalla en Materiales y Métodos (apartados 4.15, 4.16 y 4.17, y Figura 4.3).

Se determinó la actividad de las enzimas purificadas mediante ensayos de síntesis de poli(U) que emplean una molécula homopolimérica de RNA, poli(A) de 300 residuos de media de longitud como molde de la reacción y un oligonucleótido cebador de 15 residuos de desoxitimidina [oligo-(dT)<sub>15</sub>] (apartado 4.18). Este es el ensayo estándar que permite comparar unidades de actividad de polimerización. Los resultados (Tabla 5.9) no mostraron diferencias significativas en la actividad de polimerización con este molde homopolimérico entre 3D, 3D(M) y 3D(M-M296I).

También se analizó la uridilación del péptido VPg del VFA por parte de las polimerasas mutantes y “wild-type” purificadas. Este ensayo (apartado 4.19) emplea una molécula de poli(A) como molde y un péptido sintético que presenta la secuencia de

la VPg-1 del VFA como molécula aceptora. No se observaron diferencias significativas en la uridilación del péptido VPg por las polimerasas 3D, 3D(M) y 3D(M-M296I) (Tabla 5.9).

---

**Tabla 5.9. Actividad de las RpRds de VFA 3D, 3D(M) y 3D(M-M296I)**

Polimerasa expresada <sup>a</sup>	Actividad específica (Unidades / $\mu$ g enzima)	
	Ensayo de síntesis de poli-U <sup>b</sup>	Ensayo de uridilación de VPg <sup>c</sup>
3D	159,70 $\pm$ 28,70	0,40 $\pm$ 0,04
3D(M)	172,92 $\pm$ 22,71	0,43 $\pm$ 0,08
3D(M-M296I)	177,31 $\pm$ 29,12	0,47 $\pm$ 0,10

<sup>a</sup> Las polimerasas del VFA fueron expresadas en *E. coli* y purificadas por cromatografía de afinidad (apartados 4.16 y 4.17). 3D es la polimerasa de C-S8c1; 3D(M) es la polimerasa del VFA MARLS; 3D(M-M296I) es la polimerasa de VFA MARLS con la sustitución M296I.

<sup>b</sup> Una unidad enzimática corresponde a la incorporación de un pmol de UMP por minuto de reacción en el ensayo descrito en el apartado 4.18 de Materiales y Métodos.

<sup>c</sup> Ensayo de incorporación de UMP sobre el péptido VPg, descrito en el apartado 4.19 de Materiales y Métodos. Se midió la incorporación de UMP sobre el péptido VPg para dar moléculas poliuridiladas (VPg-poli-U).

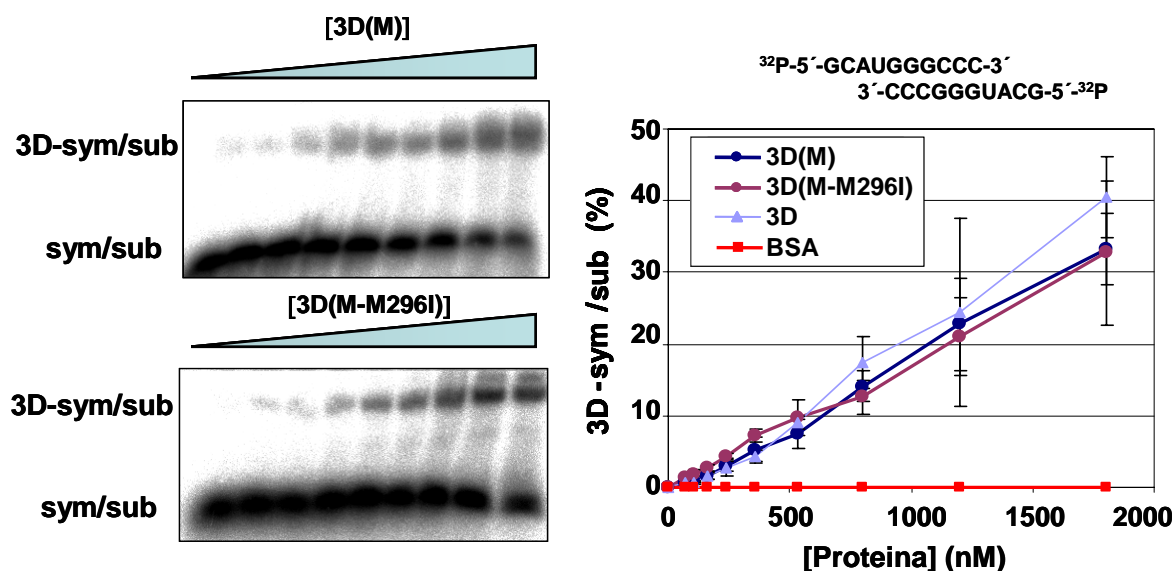
---

Los resultados obtenidos indican que la sustitución M296I no altera la actividad catalítica de la 3D, al menos cuando se cuantifica mediante los ensayos de actividad realizados en nuestro laboratorio. Además, los valores similares de actividad específica obtenidos con 3D y 3D(M) sugieren que la mutación Q232H [incluida en 3D(M) y 3D(M-M296I) pero no en 3D] no tiene un efecto significativo en la actividad enzimática ensayada. En consecuencia, 3D(M) se ha empleado como control “wild-type” en ensayos realizados en paralelo con 3D(M-M296I).

### **5.2.2.- Capacidad de unión de la polimerasa M296I a un molde heteropolimérico de RNA**

Para investigar si una 3D con la mutación M296I muestra algún defecto en la unión a RNA heteropolimérico y por tanto pudiera afectar el primer paso de la síntesis de RNA, se realizaron ensayos de retardo en gel de un RNA “sym/subU” (de “symmetrical substrate”) (Arnold y Cameron 2000) (apartado 4.20) y cantidades crecientes de 3D, 3D(M) o 3D(M-M296I), tal y como se describe en la sección 4.21 de

Materiales y Métodos. Los resultados (Figura 5.13) muestran que 3D(M-M296I) produce bandas de retardo similares a las producidas por 3D y 3D(M). Con una concentración de 3D(M) y 3D(M-M296I) 1800 nM se observó un retardo similar al producido por 3D, obteniéndose valores de  $33,2 \pm 4,9\%$  y  $32,5 \pm 7,1\%$ , respectivamente, en la proporción de moléculas de RNA retardadas. Otros experimentos (no mostrados) indicaron una unión a sym/subU indistinguible para 3D(M) y 3D (valores incluidos en el panel de la derecha en la Figura 5.13; resultados obtenidos por M. Sierra y R. Agudo). Estos datos sugieren que mediante el empleo del molde heteropolimérico sym/subU, 3D(M-M296I) forma complejos RNA/proteína que tienen estabilidad parecida a los complejos formados por la enzima “wild-type”.



**Figura 5.13.** Análisis de la unión al RNA sym/subU de 3D(M), 3D(M-M296I) y 3D. El decanucleótido RNA sym/subU (20 nM) fue hibridado, marcado con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5', (secuencia escrita arriba a la derecha), e incubado con cantidades crecientes de proteína (o BSA como control negativo) tal y como se describe en la sección 4.21 de Materiales y Métodos. Izquierda: Patrones de los geles de retardo obtenidos para las polimerasas 3D(M) y 3D(M-M296I). Derecha: Secuencia del sym/subU y debajo, porcentaje del complejo sym/sub-3D formado en función de la concentración de proteína (las tres versiones de 3D o BSA). El sym/sub libre y en complejo con 3D fue cuantificado como se detalla en la sección 4.21 de Materiales y Métodos.

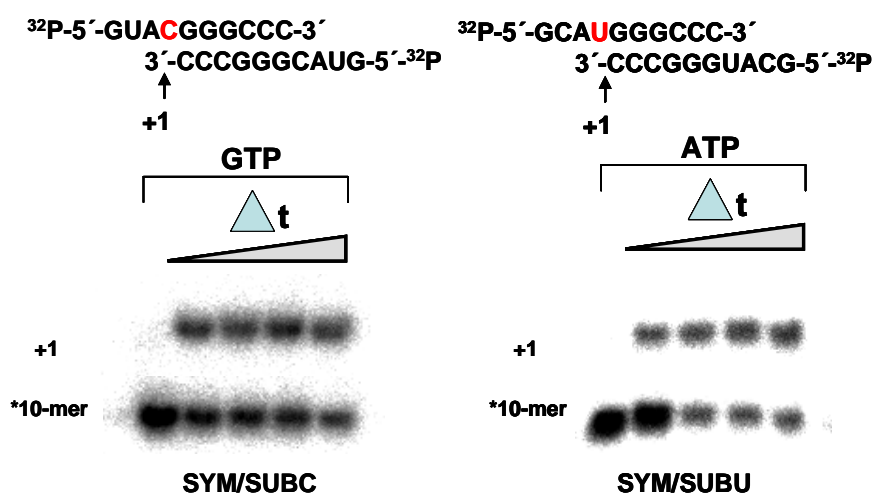
### 5.2.3.- Efecto de la sustitución M296I en la polimerasa del virus de la fiebre aftosa en la incorporación de ribavirina-5'-monofosfato

Con el fin de analizar el efecto de la mutación M296I sobre la capacidad de discriminación de RTP por parte de la polimerasa de VFA, se utilizaron las polimerasas 3D(M-M296I) y 3D(M) y se realizaron varios ensayos bioquímicos que se detallan a continuación.

#### 5.2.3.1.- Ensayos de extensión de moldes heteropoliméricos

Estudios *in vitro* con la polimerasa de PV mostraron que R se incorpora con la misma eficacia tanto con C como con U en el molde de RNA (Crotty y cols. 2000). Sin embargo, se ha descrito que cuando la R es incorporada por la polimerasa de VHC, R se comporta más como análogo de G que como análogo de A (Vo y cols. 2003), aunque otros trabajos con el mismo virus sugieren que se comporta por igual como G y como A (Maag y cols. 2001).

Para estudiar el comportamiento de RTP como sustrato de 3D de VFA, hemos utilizado de nuevo RNAs “sym/sub” que pueden actuar como molde e iniciador de la polimerización (Arnold y Cameron 2000) (sección 4.20 de Materiales y Métodos). Este sistema permite la cuantificación de la incorporación de un nucleótido en una posición definida (posición +1) (ver Materiales y Métodos, apartado 4.20 y Figura 4.4). Los sym/subC y sym/subU permiten interrogar la incorporación en la posición +1 de G (complementario a C) o A (complementario a U), respectivamente. De la misma forma, permiten comparar la incorporación de RMP frente a C (en lugar de GMP) o frente a U (en lugar de AMP) (bases clave del molde señaladas en rojo en la **Figura 5.14**). Los resultados indicaron una rápida incorporación de G en la posición +1 de sym/subC y de A en la posición +1 de sym/subU (**Figura 5.14**), lo que sugiere que estos moldes-iniciadores son adecuados para investigar el comportamiento de RTP como sustrato.

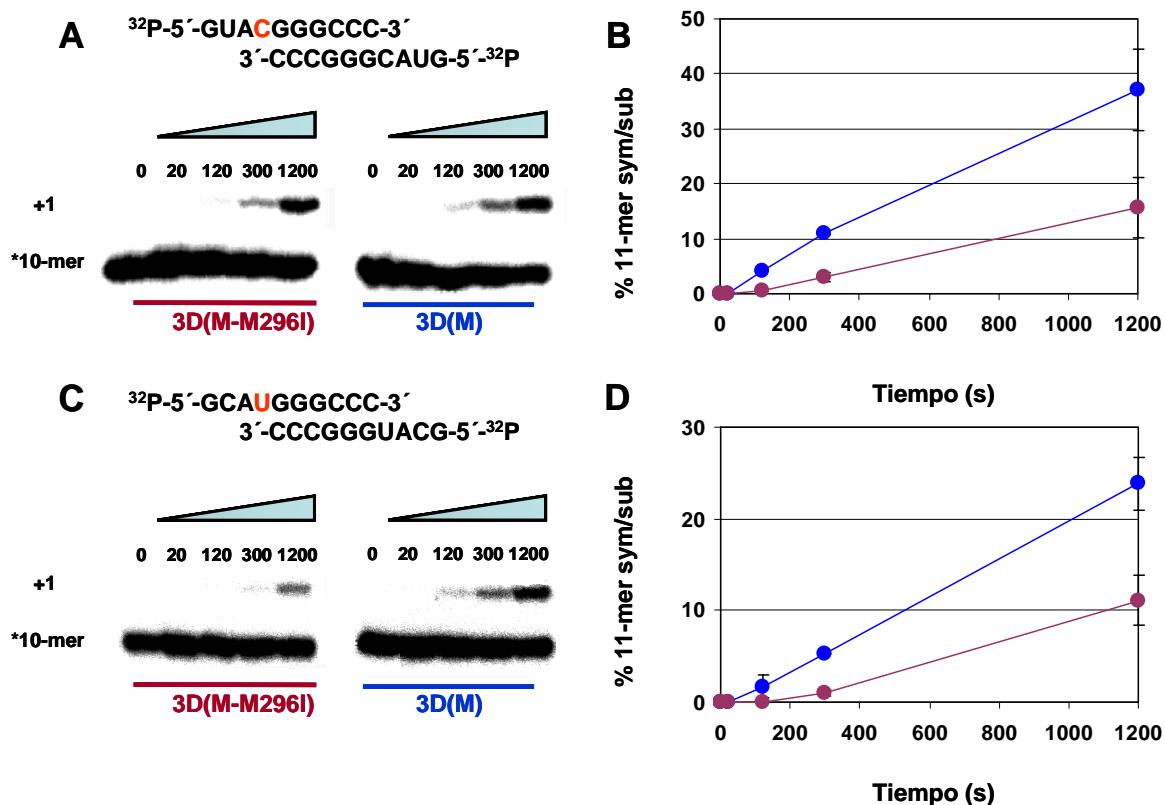


**Figura 5.14.** Incorporación en la posición +1 en sym/subC y sym/subU de GMP y AMP, respectivamente. Se indican las secuencias de los moldes heteropoliméricos empleados, sym/subC y sym/subU marcados con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5'. Se muestra mediante PAGE desnaturalizante la incorporación en +1 en los moldes sym/subC o sym/subU de 10 nucleótidos (\*10-mer), empleando GTP o ATP, respectivamente.  $\Delta t$  indica incrementos de tiempo (de 20 s a 20 min).

En primer lugar se evaluó la incorporación de RMP aisladamente, como sustrato de 3D de VFA, empleando sym/subC y sym/subU. Los resultados (Figura 5.15) muestran que la 3D de VFA es capaz de extender en un nucleótido tanto el molde sym/subC como el sym/subU, aunque se alcanza mayor incorporación de RMP cuando se emplea sym/subC. Esta preferencia de la incorporación de R en frente de C puede sugerir para esta enzima que el mutágeno se comporte más como análogo de G que como análogo de A. Estos datos confirman bioquímicamente que uno de los mecanismos de acción de R sobre el VFA puede ser su incorporación por la polimerasa al RNA como agente mutágeno durante la replicación viral (Airaksinen y cols. 2003).

Muy significativamente para explicar los datos virológicos (apartados 5.1.2-5.1.9) se observó una menor incorporación de RMP por parte de la polimerasa mutante 3D(M-M296I), en relación con la polimerasa “wild-type” 3D(M), tanto empleando sym/subC como sym/subU. Por tanto, la mutación M296I en la polimerasa de VFA produce un defecto en la incorporación de R, tanto cuando ésta actúa como G o como A.

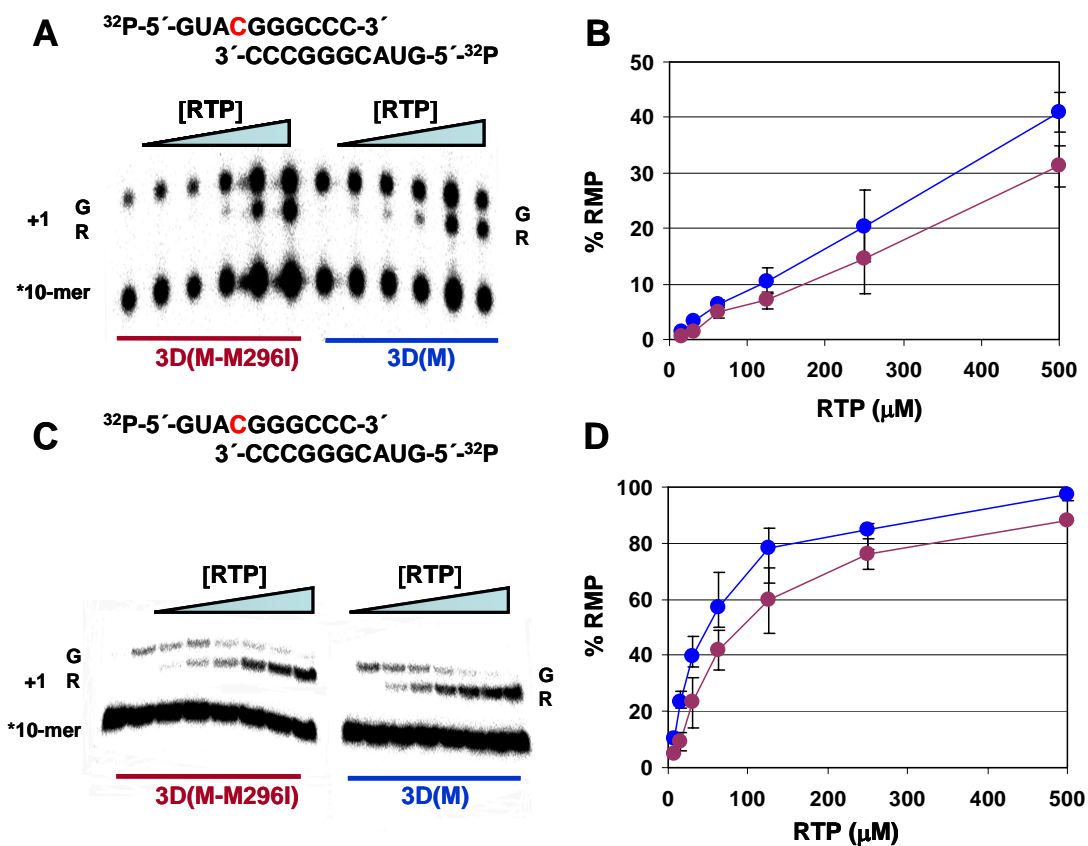




**Figura 5.15.** Incorporación de ribavirina monofosfato (RMP) por las polimerasas 3D(M) y mutante 3D(M-M296I) empleando sym/subC y sym/subU como molde-iniciador y RTP como sustrato. Se resalta en rojo la primera base (posición +1) que sirve como molde en el sym/sub correspondiente. **A:** Análisis electroforético por PAGE desnaturalizante de los sym/subC marcados con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5', tras la incorporación de la RMP catalizada por las polimerasas 3D(M) y 3D(M-M296I). Se preincubó la 3D (3 $\mu\text{M}$ ) con el RNA sym/subC (0,5  $\mu\text{M}$  híbrido) durante 10 minutos en presencia de  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (15 mM) y a continuación se añadió 50  $\mu\text{M}$  de RTP a la mezcla. Las reacciones se pararon con la adición de EDTA a una concentración final de 83 mM. **B.** Cinética (0, 20, 120, 300, 1200 s) de la incorporación de RMP en el sym/subC por 3D(M) (azul) y 3D(M-M296I) (granate). Se muestran las desviaciones estándar. **C** y **D** corresponde al mismo experimento y a los mismos símbolos que en A y B, respectivamente, a excepción de que se usó el sym/subU como molde iniciador de la reacción. Los procedimientos de extensión de moldes heteropoliméricos con RTP se detallan en la sección 4.22 de Materiales y Métodos.

Era interesante extender estos ensayos al estudio de la incorporación de RMP en presencia de los nucleótidos correctos GTP y ATP. Se evaluó la capacidad relativa de incorporación de RMP por las polimerasas 3D(M) y 3D(M-M296I) en presencia de

GTP empleando concentraciones variables de RTP y dos concentraciones distintas de sym/subC y GTP (Figura 5.16).



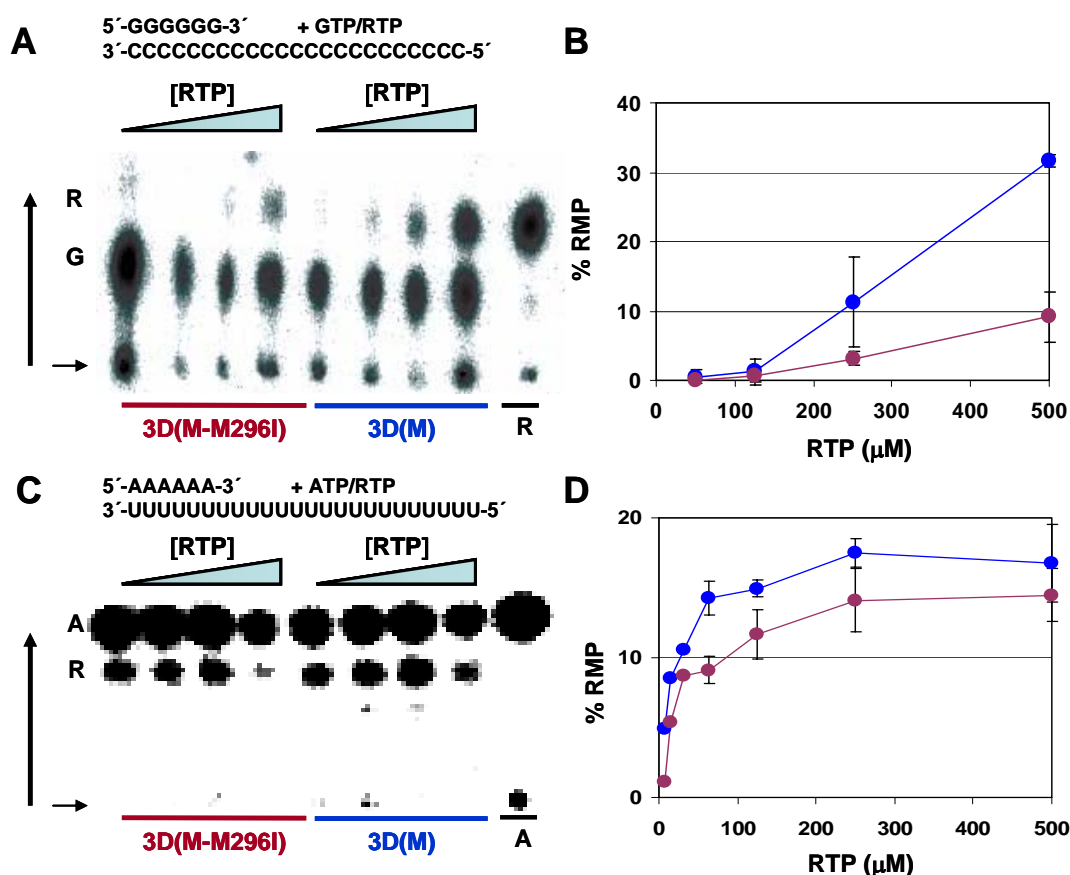
**Figura 5.16.** Incorporación relativa de RMP en competición con GMP por 3D(M) y 3D(M-M296I) empleando sym/subC. Se resalta en rojo la primera base (posición +1) que sirve como molde en el complejo molde-iniciador. **A:** Incorporación de GMP y RMP usando RNA sym/subC (2 nM), GTP (10 nM),  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (15 mM), y RTP (15; 31,2; 62,5; 125; 250 y 500  $\mu\text{M}$ ). Análisis electroforético por PAGE desnaturalizante de los sym/subC marcados con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5', tras la incorporación de la RMP y GMP por las polimerasas 3D(M) (azul) y 3D(M-M296I) (granate). G y R indica la migración de la posición +1 de cada nucleótido. **B:** Porcentaje de la incorporación de RMP con respecto a GMP en función de la concentración de RTP. Se dan las desviaciones estándar. **C y D** son el mismo experimento y los mismos símbolos que A y B a excepción de que las cantidades de RNA sym/sub, y GTP utilizado fueron 0,2 nM y 1nM, respectivamente, y que las concentraciones de RTP utilizadas fueron: 7,5; 15; 31,2; 62,5; 125; 250 y 500  $\mu\text{M}$ ). Nótese la diferencia de escala del eje de ordenadas entre B y D. Los procedimientos de extensión de ensayos heteropoliméricos están detallados en la sección 4.22 de Materiales y Métodos.

En las dos condiciones de reacción ensayadas, 3D(M-M296I) mantuvo disminuida la incorporación relativa de RMP empleando sym/subC. Por razones técnicas derivadas de la falta de discriminación entre la incorporación de RMP y AMP en la posición +1 del sym/subU, el ensayo en presencia de RTP y ATP no pudo realizarse.

#### 5.2.3.2.- Ensayos de extensión de moldes homopoliméricos

Para evaluar la capacidad relativa de incorporación de RMP de las polimerasas 3D(M) y 3D(M-M296I) en presencia de GTP y también de ATP se emplearon ensayos de extensión de moldes homopoliméricos.

Se cuantificó la incorporación relativa de RMP y GMP empleando poli(C)-oligo(dG)<sub>15</sub> como molde-iniciador, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] GTP y concentraciones crecientes de RTP como sustrato en presencia de Mg<sup>2+</sup>. La polimerasa 3D(M-M296I) mostró una menor capacidad para incorporar RMP en lugar de GMP, en comparación con el enzima “wild-type”, 3D(M), diferencia que se acrecentó a concentraciones superiores de RTP (**Figura 5.17A y B**). En reacciones de polimerización usando poli(U)-(A)<sub>6</sub> como molde-iniciador de la reacción en presencia de Mn<sup>2+</sup>, 3D(M-M296I) mostró solamente una ligera menor capacidad para incorporar RMP en lugar de AMP, en comparación con 3D(M) (**Figura 5.17C y D**). Este ensayo no pudo realizarse en presencia de Mg<sup>2+</sup>, dado que la polimerización empleando poli(U)-(A)<sub>6</sub> resultó ineficiente en presencia de Mg<sup>2+</sup> y no permitió el análisis de transferencia de marca por “vecino próximo” (sección 4.23.1 de Materiales y Métodos).



**Figura 5.17.** Incorporación de RMP relativa a GMP o AMP por 3D(M) y 3D(M-M296I) empleando moldes homopoliméricos con concentraciones variables de RTP. En los paneles A y C se muestra la resolución por cromatografía en capa fina de los RNA producto digeridos con una mezcla de RNasa A y T2. Las flechas verticales indican la dirección de la migración. Las flechas horizontales indican el punto de aplicación de la muestra. R, G y A indica la posición de RMP, GMP y AMP, respectivamente. La migración de R se identificó mediante la incorporación en +1 de RMP en el sym/subC, empleando  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  UTP, que se incorpora en la posición +2. En los paneles B y D se muestra la incorporación relativa de RMP en relación al nucleótido correcto, GMP o AMP por 3D(M) (azul) y 3D(M-M296I) (granate). **A y B:** Incorporación de GMP y RMP usando poli(C)-oligo(dG)<sub>15</sub> como molde-iniciador. La reacción se llevó a cabo en presencia de  $\text{MnCl}_2$  (10 mM),  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  GTP (1 nM) y concentraciones crecientes de RTP (50, 100, 250, 500  $\mu\text{M}$ ). Se representa la incorporación de RMP (% de RMP incorporado respecto a la suma de la incorporación de RMP y GMP) en función de concentración de RTP.

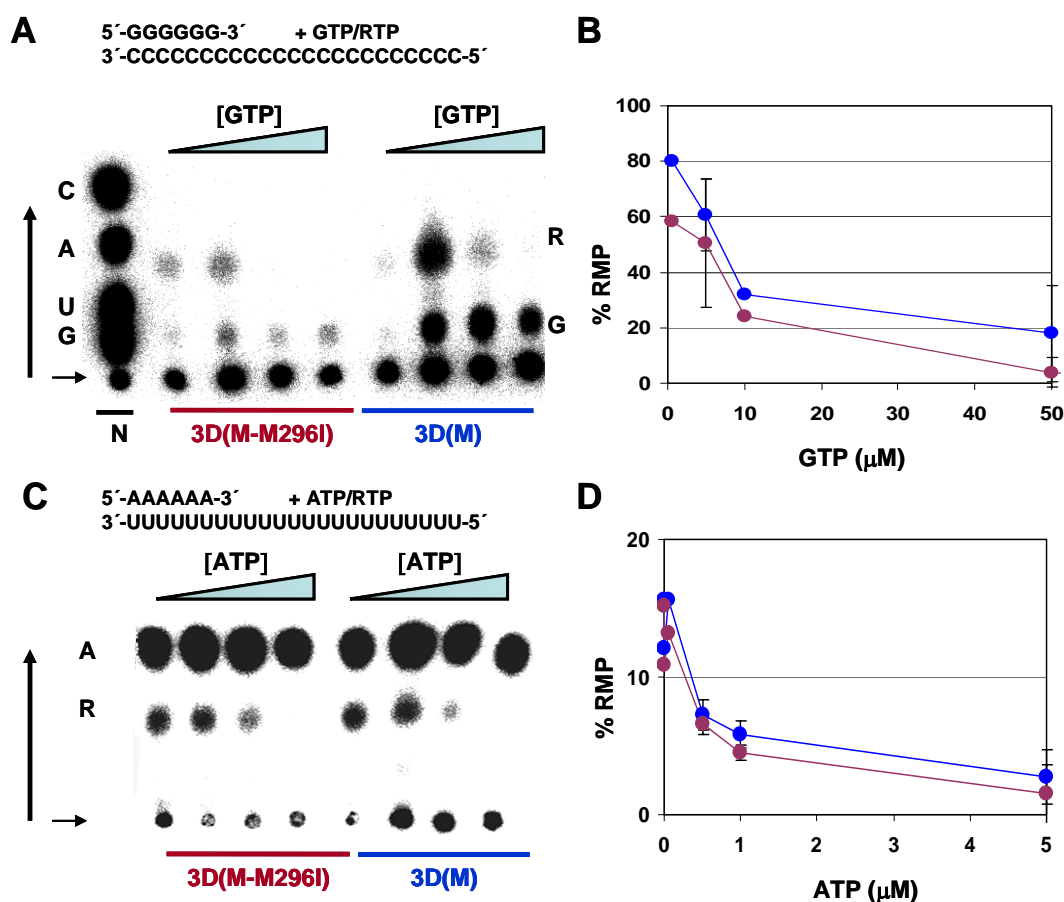
(Continúa en la página 108)

(Continuación de Figura 5.17)

**C y D:** Incorporación de AMP y RMP usando poli(U)-oligo(A)<sub>6</sub> como molde-iniciador. La reacción se llevó a cabo en presencia de Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (15 mM), [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP (1 nM) y concentraciones crecientes de RTP (7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250; 500  $\mu$ M). En C se muestran la resolución de los productos de síntesis obtenidos con las cuatro concentraciones más altas de RTP indicadas en D. Se representa la incorporación de RMP (% de RMP incorporada respecto a la suma de la incorporación de RMP y AMP) en función de concentración de RTP. Los valores son el promedio de al menos 3 determinaciones independientes; se dan las desviaciones estándar. Los procedimientos de extensión de ensayos homopoliméricos y el análisis de transferencia de marca por “vecino próximo” se detallan en la sección 4.23 de Materiales y Métodos.

---

Se midió la capacidad de incorporar RMP en presencia de Mn<sup>2+</sup> manteniendo la concentración de RTP constante. De esta manera, se pudo realizar el ensayo empleando los moldes poli(C)-oligo(dG)<sub>15</sub> o poli(U)-oligo(A)<sub>6</sub> bajo las mismas condiciones de reacción. Los resultados (**Figura 5.18**) muestran que RMP se incorpora preferentemente frente a C presente en el molde, en concordancia con los resultados obtenidos con moldes heteropoliméricos (apartado 5.2.3.1). De nuevo, hay un efecto mayor de discriminación de R por parte de la enzima “wild-type” cuando la R se incorpora frente a C que cuando se incorpora frente a U, aunque la diferencia entre 3D(M) y 3D(M-M296I) parece ser menos significativa. Si se compara la incorporación relativa de RMP en presencia de Mg<sup>2+</sup> (**Figura 5.17B**) con la de Mn<sup>2+</sup> (**Figura 5.18B**), tanto 3D(M) como 3D(M-M296I) incorporan más RMP en presencia de Mn<sup>2+</sup>, seguramente debido a una menor fidelidad de las enzimas en presencia de este catión (Arnold y cols. 2004; Castro y cols. 2005) (ver apartado 6.4).



**Figura 5.18.** Incorporación de RMP en relación a GMP o AMP por 3D(M) y 3D(M-M296I) empleando moldes homopoliméricos con RTP constante. En A y C se muestra la resolución por cromatografía en capa fina de los productos digeridos con una mezcla de RNasa A y T2. Las flechas verticales indican la dirección de la migración. Las flechas horizontales indican el punto de aplicación de la muestra. C, A, U, G, R indican la posición de la migración de CMP, AMP, UMP, GMP, y RMP, respectivamente. N indica la migración de los cuatro nucleótidos monofosfato, CMP, AMP, UMP y GMP, producto de una transcripción de pMT28 (descrito en 4.23) en presencia de ATP, CTP, UTP y [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]GTP (mezcla empleada aquí como control de migración de los nucleósidos monofosfato). En los paneles B y D se muestra la incorporación relativa de RMP en relación al nucleótido correcto, GMP o AMP por 3D(M) (azul) y 3D(M-M296I) (granate). **A y B:** Incorporación de GMP y RMP usando poli(C)-oligo(dG)<sub>15</sub> como molde-iniciador. La reacción se llevó a cabo en presencia de MnCl<sub>2</sub> (10 mM), RTP (400  $\mu\text{M}$ ) y concentraciones crecientes de [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] GTP (0,5; 5; 10 y 50  $\mu\text{M}$ ). Se representa la incorporación de RMP relativa (% de RMP incorporado respecto a la suma de la incorporación de RMP y GMP) en función de concentración de GTP.

(Continúa en la página 110)

(Continuación Figura 5.18)

**C y D:** Incorporación de AMP y RMP usando poli(U)-oligo(A)<sub>6</sub> como molde-iniciador. La reacción se llevó a cabo en presencia de de MnCl<sub>2</sub> (10 mM), RTP (400 μM) y concentraciones crecientes de [α-<sup>32</sup>P] ATP (0,05; 0,5; 1, y 5 μM). Se representa la incorporación de RMP relativa (% de RMP incorporada respecto a la suma de la incorporación de RMP y AMP) en función de concentración de ATP. Los valores son el promedio de al menos 3 determinaciones independientes; se dan las desviaciones estándar. Los procedimientos de extensión de ensayos homopoliméricos y el análisis de transferencia de marca al “vecino próximo” se detallan en la sección 4.23 de Materiales y Métodos.

Estos resultados confirman la incorporación de RMP tanto dirigida por citosina como por uracilo en el RNA molde por la polimerasa de VFA. Además, los resultados han mostrado que RMP tiene una preferencia a incorporarse en frente de C, lo cual sugiere una preferencia a comportarse más como análogo de G que de A. Una mayor incorporación de R enfrente de C es coherente con el tipo mayoritario de transiciones generadas tras el tratamiento con R en infecciones de VFA en cultivos celulares (ver [Tablas 5.3 y 5.6](#) y apartado 6.2 de Discusión). Los datos bioquímicos con polimerasas purificadas están de acuerdo con los datos virológicos y evolutivos en cuanto a la selección de una polimerasa con la sustitución M296I que disminuye la sensibilidad del VFA a la ribavirina (apartado 6.4 de Discusión).

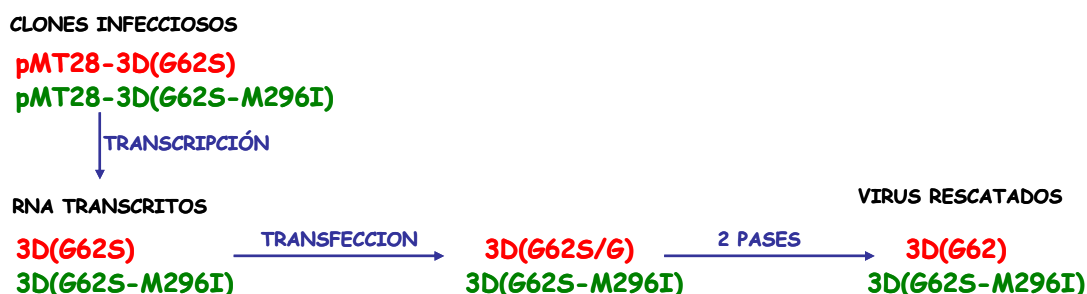
### **5.3.- Caracterización biológica y bioquímica de las variantes G62S y G62S-M296I de la polimerasa del virus de la fiebre aftosa**

Se ha descrito un variante de poliovirus (PV) con el cambio de aminoácido G64S dentro de la región de la polimerasa, seleccionado al replicar virus en presencia de cantidades crecientes de R (Pfeiffer y Kirkegaard 2003; Vignuzzi y cols. 2005). (Introducción, apartado 2.7.3). Mediante ensayos biológicos y bioquímicos se demostró que la mutación G64S en PV estaba implicada en resistencia a R debido una mayor fidelidad de copia por parte de este mutante en relación al virus “wild-type”. Dado que la mutación equivalente en la 3D de VFA (G62S) no se seleccionó en ninguna de las poblaciones de VFA que replicaron en presencia de R (5.1.1 y [Tabla 5.1](#)), era interesante estudiar la estabilidad de VFA con 3D (G62S) y su respuesta en presencia de

R, así como el comportamiento bioquímico de 3D de VFA con la sustitución G62S y con la doble sustitución G62S y M296I.

### 5.3.1.- Caracterización biológica de pMT28-3D(G62S) y pMT28-3D(G62S-M296I)

Para estudiar si variantes con la sustitución G62S o sustituciones G62S y M296I en la 3D de VFA manifestaban un fenotipo similar al observado para el mutante G64S en 3D de PV en cultivos celulares, se construyeron los clones infecciosos pMT28-3D(G62S) y pMT28-3D(G62S-M296I), tal como se especifica en el apartado 4.11.2 de Materiales y Métodos. La sustitución G62S se diseñó con una doble transversión, para minimizar una posible reversión a la secuencia “wild-type”. Los transcritos infecciosos de estos plásmidos se transfectaron en células BHK-21 y se realizaron 2 infecciones seriadas (pases), tal y como se especifica en la sección 4.13 de Materiales y Métodos. Se tituló el virus producido y se secuenció la región que codifica 3D de los genomas virales extraídos tanto del sobrenadante de la transfección como del pase 2 (**Figura 5.19**).



**Figura 5.19.** Esquema de la transfección de los RNA transcritos a partir de los clones infecciosos pMT28-3D(G62S) y pMT28-3D(G62S-M296I). La construcción de los plásmidos infecciosos y su transcripción se describen en los apartados 4.11.2 y 4.12, respectivamente. Los métodos de transfección en células BHK-21 se detallan en el apartado 4.13. Los virus rescatados se nombran en base a las sustituciones observadas de la secuencia consenso de la región que codifica 3D. (G62S indica virus con S en la posición 62 de 3D; G62S/G indica virus con una mezcla de G y S en la posición 62 de 3D; G62 indica virus con G en posición 62 de 3D).

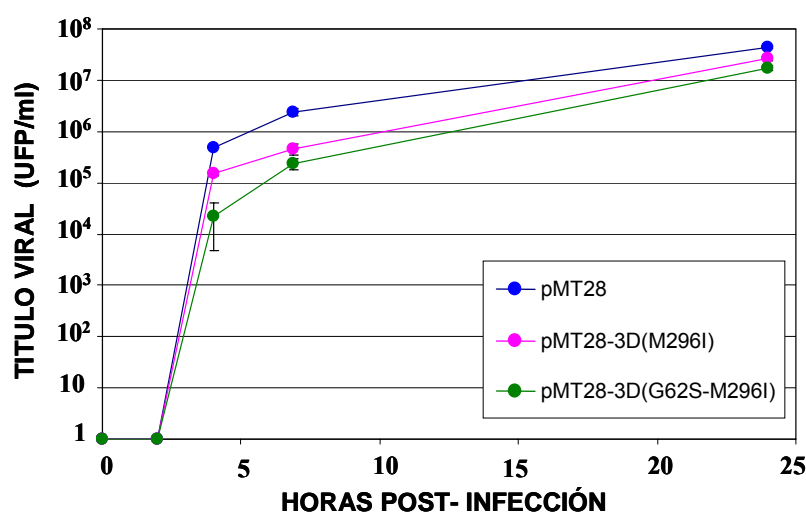
Tras la transfección con el transcrito de pMT28-3D(G62S), se rescató virus con la mutación G62S en la misma proporción que virus “wild-type” (G62). Al realizar dos infecciones seriadas, se observó efecto citopático total y una reversión completa de la



sustitución G62S a la secuencia “wild-type”. En el caso de la transfección con RNA de pMT28-3D(G62S-M296I), los virus rescatados durante las dos infecciones seriadas mostraron un leve retraso en el efecto citopático respecto al virus “wild-type”, y la secuencia de la región 3D reveló que tanto G62S como M296I se mantuvieron en la secuencia consenso, incluso tras las dos infecciones seriadas del sobrenadante de la transfección. Dado que el cambio de G a S en esta posición requiere dos transversiones (que son menos frecuentes que las transiciones durante la replicación de VFA, ver **Tablas 5.3** y **5.6**), la reversión al aminoácido “wild-type” sugiere que la mutación G62S supone una fuerte desventaja selectiva para la replicación de VFA, aunque esta sustitución parecer ser tolerada cuando se halla en presencia de M296I en el mismo RNA de VFA. Hasta el momento no hemos podido obtener un VFA estable cuya polimerasa incluya G62S como única sustitución.

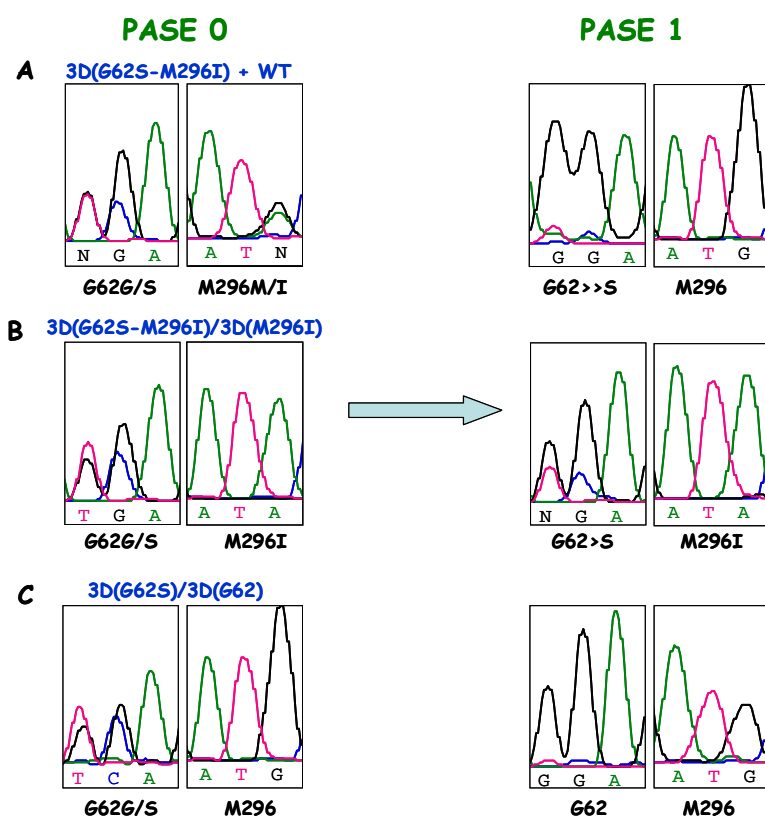
#### *5.3.1.1.-Efecto de la mutación G62S en la replicación viral*

Para estudiar el comportamiento biológico del virus pMT28-3D(G62S-M296I), se comparó la cinética de producción viral de pMT28-3D(G62S-M296I) con respecto a la de pMT28 y pMT28-3D(M296I). Para ello se infectaron en paralelo células BHK-21 con cada uno de los clones infecciosos a una m.d.i. de 0,5 UFPs/célula. Los resultados (**Figura 5.20**) muestran que pMT28-3D(G62S-M296I) tiene un retraso significativo en la replicación viral, acentuándose la diferencia a tiempos cortos post-infección, al igual que ya se había observado entre pMT28-3D(M296I) y pMT28 (apartado 5.1.4 y **Figura 5.5**). Estos datos muestran una desventaja en la capacidad de producir progenie de pMT28-3D(G62S-M296I) respecto a VFA “wild-type” y VFA que expresan 3D únicamente con la sustitución M296I. Este resultado es coherente con que la reversión de G62S observada al transfectar RNA de pMT28-3D(G62S) sea debida a un efecto deletéreo de la sustitución G62S en la replicación de VFA.



**Figura 5.20.** Producción viral en infecciones de pMT28, pMT28-3D(M296I) y pMT28-3D(G62S-M296I). Se infectaron  $2-4 \times 10^6$  células BHK-21 con pMT28, pMT28-3D(M296I) o pMT28-3D(G62S-M296I) a una m.d.i de 0,5 UFPs/célula y a distintos tiempos post-infección se recogieron alícuotas del medio de cultivo que se titularon mediante ensayo de plaqueo, como se describe en el apartado 4.4.3 de Materiales y Métodos. Las titulaciones se realizaron por triplicado y se muestran las desviaciones estándar.

Para confirmar que G62S tenía un efecto deletéreo en la replicación de VFA se realizaron experimentos de competición entre pMT28-3D(G62S-M296I) y pMT28 y entre pMT28-3D(G62S-M296I) y pMT28-3D(M296I), empleando siempre una proporción 1:1 inicial de los dos virus ensayados. Las coinfecciones se realizaron en células BHK-21 a una multiplicidad de infección (m.d.i.) de 0,1 UFPs por célula. Se analizó por secuenciación la región que codifica 3D de los genomas de los sobrenadantes de infección (pase 1) y de la mezcla inicial de los dos virus en competición (pase 0). En la competición entre pMT28-3D(G62S-M296I) y pMT28, este virus desplazó a pMT28-3D(G62S-M296I) resultando una dominancia del virus “wild-type” (95% del total) en el pase 1 (**Figura 5.21A**). Asimismo, pMT28-3D(G62S-M296I) fue desplazado por pMT28-3D(M296I), resultando una dominancia del virus portador únicamente de la mutación M296I en 3D (70% del total) (**Figura 5.21B**). Estos resultados indican el carácter deletéreo de la sustitución G62S en la polimerasa de VFA.



**Figura 5.21.** Efecto de la sustitución G62S en la replicación de VFA y VFA M296I. Se muestran los cromatogramas correspondientes a las secuencias consenso de las posiciones 62 (GGA codifica para G y UCA para S) y 296 (AUG codifica para M y AUA para I) de 3D. Los virus se nombran en base a las sustituciones observadas en 3D. Las mezclas se indican con los dos aminoácidos presentes separados por los símbolos >> o > (G62>>S, G más del 95%; G62>S, G más del 70%). **A:** Se realizaron coinfecciones a una m.d.i. de 0,1 UFPs/célula (pase 0) en células BHK-21 entre pMT28-3D(G62S-M296I) y pMT28 (G62-M296) (WT). **B:** Igual que A, a excepción de que las coinfecciones se realizaron entre pMT28-3D(G62S-M296I) y pMT28-3D(M296I). **C:** El sobrenadante de la transfección de pMT28-3D(G62S) (pase 0) fue sometido a una infección en células BHK-21. En todos los casos, el RNA del pase 0 y del sobrenadante de la infección (pase 1) fueron extraídos cuando se observó e.c.p. completo y la región que codifica 3D amplificada y secuenciada.

Aunque no conseguimos rescatar VFA G62S sin estar acompañado por la mutación M296I, se realizó una infección partiendo del sobrenadante resultante de la transfección del transcrito infeccioso de pMT28-3D(G62S) que contiene virus con la sustitución G62S en la misma proporción que G62 (**Figura 5.19**). Tras realizar un pase, la secuencia de la región 3D del virus resultante correspondió a un virus “wild-type” (**Figura 5.21C**), confirmando el carácter deletéreo de la sustitución G62S en 3D.

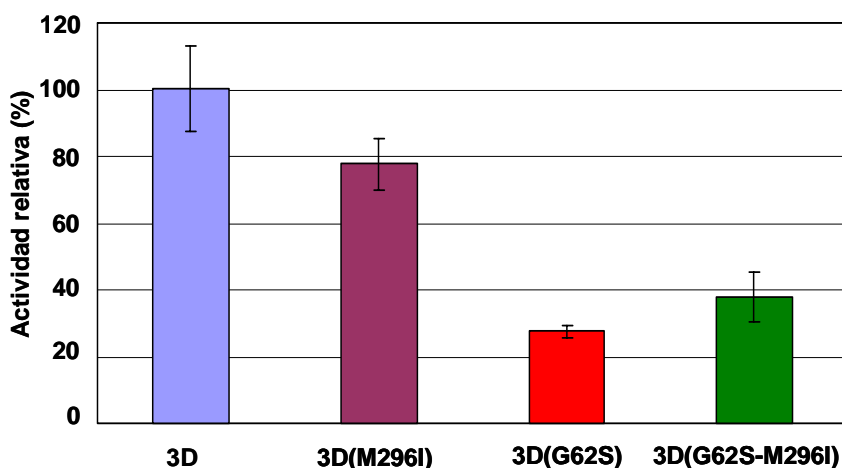
Con objeto de analizar el efecto de G62S durante la replicación de VFA en presencia de R, las coinfecciones descritas en el párrafo anterior se repitieron en presencia de R (400  $\mu$ M). Los resultados obtenidos de secuenciación de la región que codifica 3D de los virus progenie fueron idénticos a los obtenidos en ausencia de R (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren que la mutación G62S en la 3D supone una desventaja evolutiva para el VFA, tanto en ausencia como en presencia de R, aunque esta desventaja es menor en el contexto de secuencia de VFA M296I.

### **5.3.2.- Caracterización bioquímica de las polimerasas 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I) del virus de la fiebre aftosa**

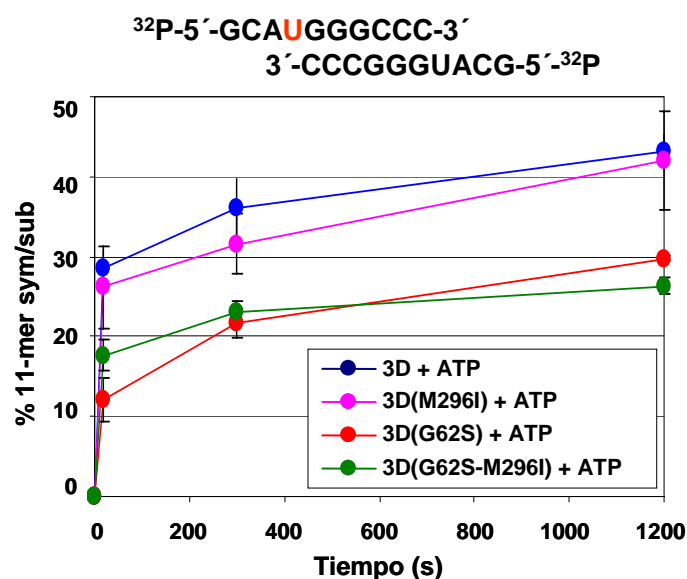
Si la sustitución G62S en la 3D es deletérea para la replicación del VFA, ello debe reflejarse en algún defecto la actividad del enzima. Para investigar esta posibilidad los cDNA de las polimerasas 3D(G62S), 3D(M296I) y 3D(G62S-M296I) se clonaron en el vector pET-28a, se expresaron en *E. coli* BL21 y se purificaron por cromatografía de afinidad, tal como se detalla en Materiales y Métodos (apartados 4.15, 4.16 y 4.17 y Figura 4.3). La pureza de las tres enzimas fue superior al 95%.

Se midió la actividad de elongación de RNA de las tres enzimas mediante ensayos de polimerización empleando poli(A) como molde y oligo-(dT)<sub>15</sub> como iniciador, tal y como se realizó en el apartado 5.2.1 y se detalla en la sección 4.18 de Materiales y Métodos. Se cuantificó la cantidad de 3D purificada y se calculó la actividad específica para cada enzima (**Figura 5.22**). Los resultados muestran que tanto 3D(G62S) como 3D(G62S-M296I) tienen menor actividad específica que 3D o 3D(M296I) (comparar con el apartado 5.2.1). Estos datos sugieren que la posición G62 desempeña un papel importante en la actividad de la 3D de VFA y son coherentes con la reversión de la mutación G62S en los virus que codifican la enzima mutante (apartado 5.3.1).



**Figura 5.22.** Ensayos de actividad de las RpRd de VFA 3D (“wild-type”) y los mutantes 3D(M296I), 3D(G62S), 3D(G62S-M296I). Se muestra la actividad específica relativa de las enzimas 3D “wild-type” (azul), 3D(M296I) (rosa), 3D(G62S) (rojo) y 3D(G62S-M296I) (verde), en ensayos de polimerización empleando como molde una molécula de poli(A) y como iniciador un oligo-(dT)<sub>15</sub>. La actividad específica se mide por el número de pmoles de UMP incorporados por minuto de reacción y µg de enzima, tal y como se describe en el apartado 4.18 de Materiales y Métodos. Se da el valor promedio y las desviaciones estándar de al menos 4 experimentos.

Para investigar si las diferencias de actividad manifestadas en el ensayo de síntesis de poli(U) se observaban también con un molde heteropolimérico, las enzimas se preincubaron durante 10 minutos con el molde sym/subU para permitir la formación del complejo binario y se evaluó la incorporación del nucleótido correcto (AMP) en la posición +1 a distintos tiempos del inicio de la reacción, tal y como se detalla en el apartado 4.22 de Materiales y Métodos (Figura 4.5A). De nuevo, las enzimas 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I) mostraron una menor actividad en relación a 3D y 3D(M296I), reflejada en una capacidad unas dos veces menor de extensión a la posición +1 sobre un molde sym/subU (**Figura 5.23**).

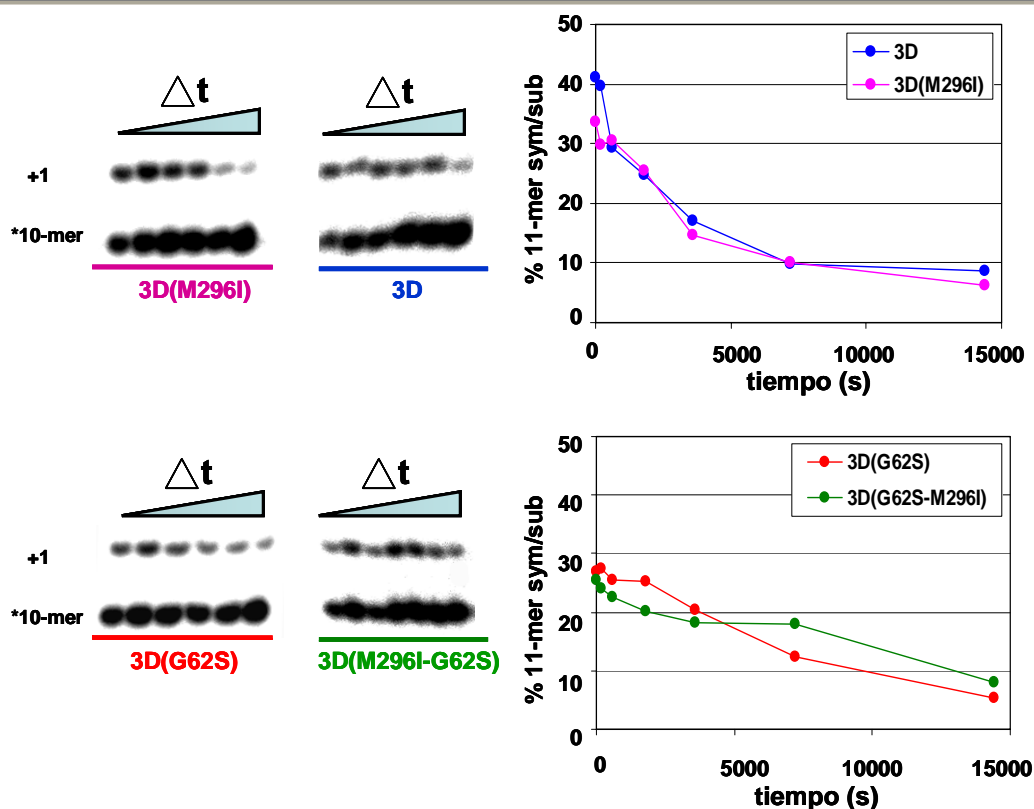


**Figura 5.23.** Incorporación de adenosina-5'-monofosfato (AMP) por las polimerasas 3D, 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I) empleando sym/subU como molde-iniciador. Se preincubó la 3D (3 $\mu$ M) con el RNA sym/subU (0,5  $\mu$ M híbrido) (secuencia escrita en la parte superior) durante 10 minutos en presencia de Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (15 mM) y a continuación se añadió ATP 50  $\mu$ M a la reacción. Las reacciones se pararon con la adición de EDTA a una concentración final de 83 mM a distintos tiempos tras el inicio de la reacción, tal y como se describe en la sección 4.22 de Materiales y Métodos. Se muestra la cinética (0, 20, 300, 1200 s) de la incorporación de AMP en el sym/subU por 3D (azul), 3D(M296I) (rosa), 3D(G62S) (rojo) y 3D(G62S-M296I) (verde). Se muestran los valores medios y desviaciones estándar de 3 experimentos independientes.

Ensayos bioquímicos con la 3D(G64S) de PV revelaron que este mutante mostraba una reducción en la actividad de polimerización con respecto al enzima “wild-type” de hasta 15 veces a consecuencia de una mayor tasa de inactivación enzimática por calor (Arnold y cols. 2005). Por ello, mediante ensayos de inactivación térmica se determinó si la reducción de actividad provocada por la mutación G62S en la polimerasa de VFA se podía asociar a una mayor sensibilidad a la temperatura de 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I) (sección 4.22 de Materiales y Métodos, Figura 4.5D). 3D, 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I) se incubaron a 37°C durante distintos tiempos y se midió la capacidad de incorporar AMP en la posición +1 del molde sym/subU durante 10 minutos de reacción (Figura 5.24).

La inactivación térmica a 37°C fue similar entre 3D y 3D(M296I) y entre 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I). Aunque la curva de inactivación a 37°C no es idéntica

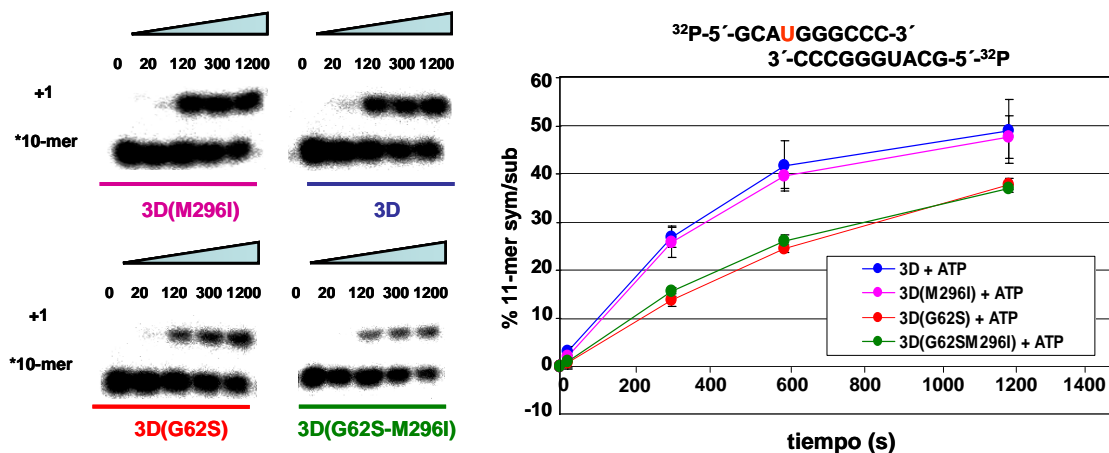
para las 3D que carecen de la sustitución G62S (panel de arriba a la derecha en la **Figura 5.24**) que para las enzimas con la sustitución G62S (panel de abajo a la derecha), no parece que la sustitución G62S confiera un carácter termosensible a la 3D de VFA, en cuanto a su actividad de polimerización con el sym/subU. Actualmente estamos investigando el posible significado de la diferencia de la cinética de pérdida de actividad, así como una posible mayor termosensibilidad de la 3D conferida por la sustitución G62S en ausencia y presencia de molde.



**Figura 5.24.** Inactivación enzimática de 3D, 3D(M296I), 3D(G62S), 3D(G62S-M296I) a 37°C. Izquierda: análisis electroforético por PAGE desnaturante del sym/subU marcado con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5', tras la incorporación de AMP por las polimerasas 3D (azul), 3D(M296I) (rosa), 3D(G62S) (rojo) y 3D(G62S-M296I) (verde). Tras la incubación de las 3D (3  $\mu\text{M}$ ) a 37°C en el tampón de reacción durante distintos periodos de tiempo, la reacción se inició mediante la adición de sym/subU (0,5  $\mu\text{M}$  híbrido) y ATP (50  $\mu\text{M}$ ) y se paró a los 10 minutos tras la adición de EDTA (83 mM). Derecha: Cinética de inactivación enzimática a los 0, 180, 600, 1800, 3600, 7200 y 14400 s. Se muestra la media de dos experimentos diferentes.

La menor actividad enzimática de 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I) observada en las **Figuras 5.22** y **5.23** podría ser debida a una menor afinidad por el molde-iniciador.

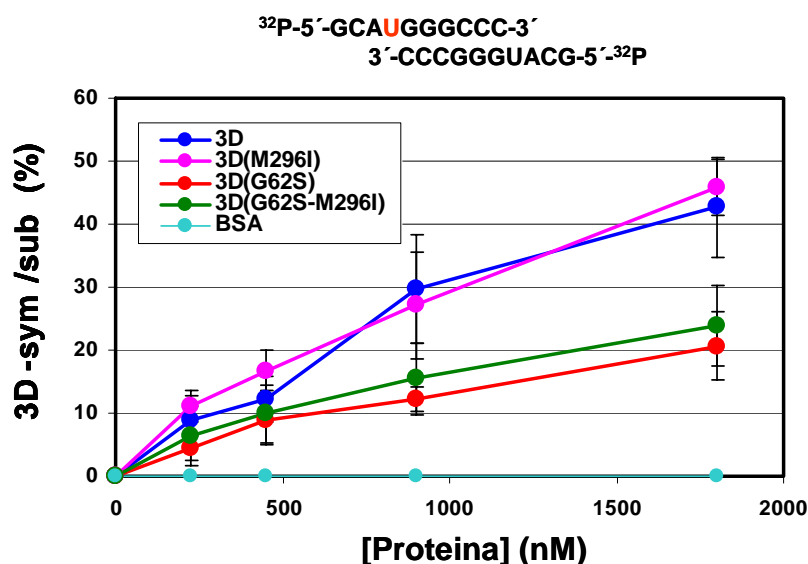
Con el fin de evaluar esta posibilidad, la reacción se inició por la adición de la enzima a una mezcla que contenía el molde-iniciador sym/subU y ATP (Figura 4.5C del apartado 4.22 de Materiales y Métodos). De esta forma, el paso limitante de la reacción es la formación del complejo entre 3D y sym/subU, ya que la incorporación del nucleótido se produce muy rápidamente (A.Arias, J.Arnold, C.Cameron, resultados sin publicar). El complejo activo se calculó midiendo la cinética de incorporación del primer nucleótido en el sym/subU. Como se muestra en la **Figura 5.25**, tanto 3D(G62S) como 3D(G62S-M296I) muestran una cinética de extensión de RNA más lenta que 3D y 3D(M296I). Este resultado sugiere que las enzimas que codifican para G62S tienen una menor afinidad por el RNA y, por tanto, muestran una cinética más lenta de extensión del RNA sym/sub (**Figura 5.23**). No obstante, la cinética de extensión en +1 no difiere muy significativamente (al menos a partir de los 200 s de reacción) de lo observado cuando las polimerasas fueron preincubadas con sym/subU durante 10 minutos (**Figura 5.23**), por lo que serán necesarios más estudios para identificar la etapa de la reacción de 3D que resulta influida negativamente por G62S.



**Figura 5.25.** Actividad de las polimerasas 3D(M), 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I) con el molde sym/subU sin preincubación enzima-molde. Izquierda: análisis electroforético por PAGE desnaturalizante del sym/subU marcado con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5', tras la incorporación de AMP por las polimerasas 3D (azul), 3D(M296I) (rosa), 3D(G62S) (rojo) y 3D(G62S-M296I) (verde). Las reacciones se iniciaron tras la adición de 3D (3  $\mu\text{M}$ ) a una mezcla que contenía ATP 50  $\mu\text{M}$  y el RNA sym/subU (0,5  $\mu\text{M}$  híbrido) (secuencia escrita arriba a la derecha) en presencia de  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (15 mM). Las reacciones se pararon con la adición de EDTA a una concentración final de 83 mM a distintos tiempos tras el inicio de la reacción, tal y como se describe en la sección 4.22 de Materiales y Métodos. Derecha: Cinética (0, 20, 300, 600, 1200 s) de formación de complejos entre sym/subU y las 3D. Se muestran las desviaciones estándar de al menos 3 experimentos



Se comparó la unión de las cuatro polimerasas al sym/subU, mediante ensayos de retardo en gel (sección 4.21 de Materiales y Métodos). Los resultados (**Figura 5.26**) indican que tanto 3D(G62S) como 3D(G62S-M296I) presentan una reducción en la formación de complejos RNA-proteína, en concordancia con una menor afinidad al sym/sub mostrada en la **Figura 5.25**.



**Figura 5.26.** Capacidad de unión de 3D, 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I) a un molde sym/subU. El decanucleótido sym/subU RNA (20 nM híbrido; secuencia escrita en la parte superior) fue hibridado, marcado con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5', e incubado con cantidades crecientes de proteína (o BSA como control negativo) tal y como se describe en la sección 4.21 de Materiales y Métodos. Se indica el porcentaje del complejo sym/sub-3D formado en función de la concentración de proteína (3D o BSA). El sym/sub libre y en complejo con 3D fue cuantificado como se detalla en la sección 4.21 de Materiales y Métodos.

Estos resultados con polimerasas mutantes proporcionan una interpretación al hecho de que aunque VFA y PV están muy cercanos evolutivamente, sus respuestas a una misma presión selectiva, en este caso replicación en presencia de R, pueden variar en cuanto a las alteraciones moleculares que resultan compatibles con la supervivencia del virus (Discusión, apartado 6.8).

## 6.- Discusión

### 6.1.- Mutagénesis letal: una nueva estrategia antiviral basada en el entendimiento de la dinámica de las cuasiespecies

Los virus que tienen RNA como material genético replican sus genomas con una tasa de error varios órdenes de magnitud superior a la observada normalmente en DNA celular y en muchos virus DNA. Este hecho, unido a que poseen un tiempo de generación muy corto y generalmente un elevado tamaño poblacional, conduce a una elevada diversidad genética intrapoblacional que acelera la capacidad de adaptación del virus a los cambios ambientales. Como consecuencia de las altas tasas de error, las poblaciones de virus RNA son distribuciones complejas de mutantes denominadas cuasiespecies (Introducción, apartado 2.1). Las cuasiespecies no engloban simplemente un término teórico sino que ofrecen una descripción real de cómo son las poblaciones virales y como los virus evolucionan en un hospedador y contribuyen a causar enfermedad. La rápida evolución de los virus RNA conlleva importantes consecuencias médicas, tanto para la prevención como para el tratamiento de las enfermedades que ocasionan. La estrategia antiviral más frecuente para el tratamiento de infecciones víricas consiste en inhibir directamente proteínas virales. Ello acarrea la frecuente emergencia de mutantes resistentes a los inhibidores antivirales (Sarafianos y cols. 2004), incluso empleando terapias de combinación (Pillay y Zambon 1998).

Existe, por tanto, una necesidad evidente de explorar nuevas estrategias para tratar infecciones asociadas a virus RNA que tengan en cuenta la dinámica de las cuasiespecies del patógeno diana. Una de las nuevas estrategias antivirales actualmente en estudio consiste en forzar la entrada del virus en catástrofe de error mediante mutagénesis incrementada, una estrategia denominada también mutagénesis letal. Se basa en aumentar artificialmente el número de errores que los virus cometen durante su replicación mediante el empleo de agentes mutagénicos capaces de incrementar la tasa de error de los virus más allá del umbral de error tolerable (revisiones en Eigen 2002; Anderson y cols. 2004; Domingo 2005) (Introducción, sección 2.2).

Las RNA polimerasas dependientes de RNA (RpRd) constituyen las proteínas en las que reside la capacidad replicativa de los virus RNA. La baja fidelidad de copia que presentan y la ausencia de una actividad correctora de errores son responsables, al

menos en parte, de la alta frecuencia de mutación durante la replicación de los genomas virales (Batschelet y cols. 1976; Drake y Holland 1999; Domingo 2007). En general, las interacciones entre las RdRp, el RNA y los nucleótidos sustratos (NTPs) en el centro activo del enzima son determinantes importantes de la fidelidad de copia. Estudios estructurales han definido los aminoácidos de la RdRp de VFA (3D) que interactúan con el molde-iniciador RNA (Ferrer-Orta y cols. 2004) y los que interactúan con nucleótidos estándar y con algunos análogos de nucleótido mutagénicos, la 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP) o ribavirina-5'-trifosfato (RTP) (Ferrer-Orta y cols. 2007). Estos estudios, juntamente con estudios bioquímicos como los que constituyen el núcleo de esta Tesis Doctoral, están abriendo posibilidades de aplicación de la mutagénesis letal.

En este sentido, en esta Tesis Doctoral se ha analizado el efecto de la ribavirina (R) durante infecciones citolíticas de VFA. Para profundizar en las bases moleculares de la entrada en catástrofe de error hemos seleccionado variantes de VFA con una sensibilidad reducida a R, asignable a la sustitución M296I en la polimerasa del virus. La purificación y caracterización de la polimerasa con M296I han permitido asociar la resistencia relativa a R del VFA a un defecto en la incorporación de ribavirina-5'-monofosfato (RMP) de la 3D mutante.

## **6.2.- 3D(M296I): una nueva polimerasa de picornavirus con menor sensibilidad a ribavirina**

Resultados previos en nuestro laboratorio demostraron que durante infecciones persistentes de VFA parte de la actividad antiviral de la R residía en su papel mutagénico (Airaksinen y cols. 2003). Para profundizar en las bases moleculares de la acción mutagénica de la ribavirina en infecciones citolíticas, se ha analizado el efecto de R sobre la complejidad del espectro de mutantes de poblaciones de VFA sometidas a un continuado tratamiento con el mutágeno (Resultados, sección 5.1.8 y 5.1.9.1). De la misma forma que ocurrió en infecciones persistentes, el espectro de mutantes de las poblaciones de VFA pasadas en presencia de R mostró una elevada frecuencia de mutación y entropía de Shannon, con un aumento significativo en la proporción de las transiciones C→U y G→A, en relación resto de mutaciones (Tablas 5.3 y 5.6 de Resultados). Por tanto, el presente estudio ha corroborado el carácter mutagénico de R para infecciones citolíticas producidas por VFA. Las transiciones C→U y G→A son las

esperadas como resultado de la incorporación incorrecta de RMP frente a C en el molde (síntesis de cadena negativa) y también como resultado del apareamiento incorrecto de R en frente de C en el molde (síntesis de cadena positiva) y la subsiguiente incorporación de U (Introducción, Figura 2.14). El tratamiento de células BHK-21 con R produjo un descenso mantenido en los niveles intracelulares de GTP de 5 fmol/célula a 1 fmol/célula, probablemente como resultado de la inhibición de la IMPDH, una enzima clave en la vía de biosíntesis del GTP (Lowe y cols. 1977; Sintchak y Nimmesgern 2000; Airaksinen y cols. 2003) (Introducción, apartado 2.7.2.1). Es posible que este descenso en los niveles de GTP origine una presión selectiva intracelular que tienda a forzar a la polimerasa viral a incorporar RMP con preferencia a GMP. A favor de esta hipótesis, los resultados obtenidos *in vitro* (apartado 5.2.3.1 y 5.2.3.2) mostraron una mejor incorporación de RMP en frente de C que en frente de U, tanto empleando moldes heteropoliméricos (Figura 5.15) como homopoliméricos (Figura 5.18). En conjunto, estos datos sugieren una preferencia de R a comportarse como análogo de G, o a incorporarse con mayor frecuencia cuando C está en el molde, durante la replicación de VFA.

La presión selectiva intracelular derivada de una mayor presencia de RTP relativa a GTP pudo originar la dominancia de VFA con la polimerasa con la sustitución M296I, ya que esta sustitución disminuye la capacidad de incorporación de RMP al RNA producto (Resultados, apartado 5.2.3). Si suponemos que el empleo de RTP como sustrato de 3D es detrimental para el virus debido a su carácter mutagénico, una polimerasa mutante con un defecto en la incorporación de R debe conferir una ventaja a VFA. El hecho de que M296I únicamente haya aparecido en las cuasiespecies de VFA que replicaron en presencia del R y en ninguna de las dos series paralelas que se realizaron en ausencia de R (Figura 5.1), apoya la idea de que esta mutación sea el resultado de una selección positiva en presencia de R. Además, M296I no ha aparecido en ningún espectro de mutantes de otras líneas evolutivas de VFA (pases a alta m.d.i. o passes placa a placa) donde la replicación tuvo lugar en presencia de FU o AZC o en ausencia de mutágeno (Escarmís y cols. 1996, 2002; Sierra y cols. 2000; Pariente y cols. 2001, 2003).

Las diferencias en la sensibilidad a R observadas entre las poblaciones MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5 con una historia paralela de passes en presencia de R (apartado 5.1.2) podría reflejar diferencias en la composición de los espectros de mutantes de ambas poblaciones (Tabla 5.1). En muchos sistemas se ha documentado

que el espectro de mutantes puede ejercer un efecto modulador reflejado en el comportamiento del virus [ejemplos revisados en (Domingo 2006; Domingo 2007)].

La sustitución M296I en la 3D confiere una ventaja selectiva al virus, tanto en el contexto de secuencia de C-S8c1 como de MARLS, en presencia de R pero no en su ausencia (apartado 5.1.5; Figuras 5.5 y 5.8). El valor de “fitness” de VFA que expresa 3D(M-M296I) en relación a VFA que expresa 3D(M) aumentó 7,6 veces en presencia de R, con respecto al valor en ausencia de R. El coste de “fitness” que implica la sustitución M296I fue relativamente moderado, de alrededor de 2 veces (Figura 5.7). No fue, por tanto, inesperado el hecho de no producirse reversión detectable de M296I tras pases de poblaciones de VFA expresando 3D M296I en ausencia de R (apartado 5.1.5 de Resultados). Resulta muy interesante que la presión selectiva ejercida por el FU durante la replicación de poblaciones de VFA que expresan 3D(M296I) sí haya favorecido la reversión de esta mutación (Resultados, 5.1.10), sugiriendo que la actividad de un agente mutagénico puede servir de indicador de mutaciones deletéreas en un espectro de mutantes.

### **6.3.- Análisis del mecanismo de resistencia a ribavirina en el virus de la fiebre aftosa**

El problema de generación de variantes virales resistentes a agentes antivirales está dificultando el control de un gran número de enfermedades importantes ocasionadas por virus RNA. Mutaciones como la M296I en 3D de VFA, que permiten la viabilidad del virus, proporcionan un modelo para estudiar la dinámica de generación de mutantes resistentes a agentes mutagénicos y su comportamiento evolutivo. Confirmada la acción mutagénica de R durante infecciones con VFA, habría dos posibles mecanismos para explicar el papel de M296I en resistencia a R. Un mecanismo sería la adquisición de una polimerasa con menor capacidad de incorporar RMP, permitiendo una correcta discriminación específica en contra de RTP como sustrato. Otro posible mecanismo sería que M296I confiriese una mayor fidelidad de copia general a la polimerasa, limitando la incorporación de cualquier nucleótido incorrecto. El VFA M296I mostró similar sensibilidad al tratamiento con FU y AZC que el VFA “wild-type” (apartado 5.1.9.2). Asimismo, en un ensayo de competición realizado en presencia de FU entre 3D y 3D(M-M296I) (Figura 5.12), el virus portador de M296I resultó tener 0,8 veces menos “fitness” que el virus “wild-type”. Estos resultados dan a

entender que la mutación M296I produce una ventaja selectiva solamente en presencia de R, y no de cualquier otro mutágeno, lo que sugiere que el mecanismo de resistencia en VFA es específico para R. Por otro lado, si la mutación M296I implicase un incremento en la fidelidad de copia de la polimerasa, una población generada por virus que expresa esta polimerasa debería caracterizarse por un espectro de mutantes menos diverso, tal y como se ha descrito para el mutante G64S de PV (Arnold y cols. 2005; Vignuzzi y cols. 2006). Al comparar los espectros de mutantes, el generado por VFA con 3D M296I resultó ser 1,6 veces más amplio que el generado por VFA con 3D “wild-type” (apartado 5.1.9.1). Estos resultados refuerzan la idea de que VFA con M296I en 3D no es un mutante con una mayor fidelidad de copia (que podría ser incluso inferior a la del virus “wild-type”) sino que apoyan que M296I confiere a la enzima una menor capacidad de emplear RTP como sustrato de modo específico. Los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral están de acuerdo con datos bioquímicos realizados por el Dr. Armando Arias de nuestro laboratorio en colaboración con los Drs C. Cameron y J. Arnold. (Penn State University, EE.UU) (resultados sin publicar). Estos ensayos fueron realizados a tiempos cortos de reacción (0,005 - 0,5 s) y permitieron determinar la capacidad de discriminación de nucleótidos incorrectos respecto a los correctos por parte de 3D y 3D(M296I) en base a las constantes de afinidad ( $K_D$ ) y a las velocidades de incorporación ( $k_{pol}$ ) de cada nucleótido. El mutante 3D(M296I) mostró una menor fidelidad de copia que la polimerasa 3D “wild-type” en la incorporación incorrecta de GTP en lugar de ATP. Su frecuencia de incorporación errónea fue 1,4 veces superior a la obtenida por la polimerasa 3D, al menos para la transición A-G. Sin embargo, la frecuencia de incorporación errónea de RMP respecto al nucleótido correcto fue 1,5 veces inferior para 3D(M296I).

Todos los datos apuntan a que la sustitución M296I en 3D de VFA contribuye a limitar el uso de RTP como sustrato, no como consecuencia de un aumento de fidelidad de la enzima sino como resultado de una discriminación específica sobre RTP. Obviamente, no podemos excluir que otros análogos de nucleótido no ensayados, en particular, análogos purínicos, pudieran resultar también discriminados por la 3D de M296I. Los datos actuales obtenidos con mutantes de PV y de VFA resistentes a R abren la interesante posibilidad de que las polimerasas de picornavirus tengan dominios estructurales (o al menos ciertos aminoácidos) implicados en fidelidad general de copia y otros que puedan modular la incorporación de análogos específicos sin afectar la fidelidad general. Serán necesarios estudios adicionales para confirmar esta propuesta y

para averiguar qué mecanismos subyacen a la selección de uno u otro tipo de polimerasas mutantes.

#### **6.4.- El comportamiento evolutivo del virus de la fiebre aftosa en respuesta al tratamiento con ribavirina y su concordancia con los datos bioquímicos**

Los ensayos de polimerización empleando 3D(M) y 3D(M-M296I) con moldes homopoliméricos y heteropoliméricos, tanto en presencia de  $Mg^{2+}$  como en presencia de  $Mn^{2+}$ , sugieren que al menos parte del comportamiento fenotípico del VFA con la sustitución M296I en la 3D se debe a una menor capacidad de incorporar R durante la síntesis de RNA (Resultados, apartado 5.2.3). Los ensayos de actividad (apartado 5.2.1) no mostraron diferencias detectables entre 3D y 3D(M-M296I), aunque la capacidad replicativa del virus mutante fue ligeramente inferior al virus “wild-type” en ausencia de R (Figuras 5.5 y 5.20). La diferencia entre el comportamiento de las enzimas y de los correspondientes virus durante infecciones en ausencia de R, aunque sean modestas, sugieren que los ensayos realizados *in vitro* con las polimerasas purificadas no reflejan todas las funciones de la polimerasa en el ciclo de infección.

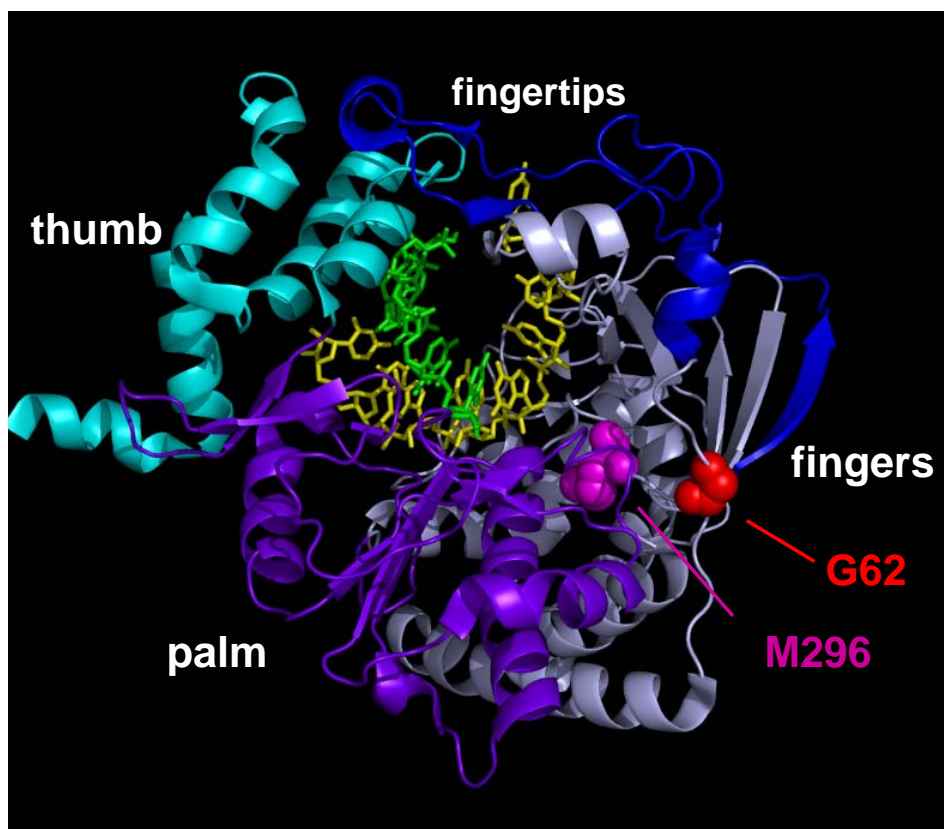
Era interesante analizar el comportamiento de RTP como sustrato bajo unas condiciones que pudieran asemejarse más a la situación fisiológica en la célula infectada. Con este fin, realizamos ensayos en los que RTP estuviese en competición con los nucleótidos correctos, bien con ATP o bien con GTP (Figuras 5.16-5.18). Tanto en este caso como cuando empleamos RTP como único sustrato, se observó siempre una preferencia de incorporación de RMP en lugar de GMP, más acentuada que en los ensayos de incorporación de RMP en lugar de AMP. La máxima diferencia entre 3D(M) y 3D(M-M296I) se observó en la incorporación de RMP relativa a GMP empleando moldes homopoliméricos (Figura 5.17AB). Problemas técnicos impidieron la medida de incorporación de RMP relativa a AMP empleando moldes heteropoliméricos. Sin embargo, sí fue posible una comparación entre ambas enzimas mediante una cinética de incorporación de RMP empleando sym/subC y sym/subU como molde-iniciadores (Figura 5.15). Resultados preliminares indican que la incorporación de R por la polimerasa de VFA no interrumpe la síntesis de RNA, lo que es esperable dado el carácter mutagénico y relativamente poco inhibitor de R sobre VFA. Sería interesante evaluar el comportamiento de la polimerasa 3D y 3D(M296I) respecto a incorporación

de AMP o GMP cuando R se encuentra en el molde; estos experimentos están contemplados en las actividades futuras de nuestro grupo.

### **6.5.- Localización estructural de la posición M296 en la polimerasa del virus de la fiebre aftosa. Implicaciones en resistencia a ribavirina**

El análisis estructural del complejo de la polimerasa de VFA (3D) en complejo con un RNA molde-iniciador y los sustratos naturales (ATP/UTP) o con RTP (Ferrer-Orta y cols. 2007) ha permitido proponer un posible efecto de la mutación M296I en la sensibilidad a R del VFA. Las estructuras han mostrado que la RTP ocupa el centro activo de la polimerasa en una posición correcta para favorecer la reacción de transferencia del grupo fosforilo y permitir la incorporación del nucleótido entrante. En presencia del análogo de nucleósido RTP, el residuo D245 (situado en el motivo A, ver apartado 2.6.1, Figuras 2.8 y 2.9) de la 3D cambia su conformación permitiendo posicionar al azúcar del RTP en el bolsillo de unión al nucleótido (Ferrer-Orta y cols. 2007). M296 se encuentra situada en el dominio “fingers” de la polimerasa (**Figura 6.1**), una zona alejada del bolsillo de unión a la ribosa. Concretamente, se encuentra en el bucle ( $\beta 9-\alpha 11$ ) (Introducción, Figura 2.8). El análisis estructural ha revelado que varios residuos de este bucle (S298-S304) establecen interacciones con el molde de RNA y con los nucleótidos entrantes (Ferrer-Orta y cols. 2004, 2007). M296 establece contactos directos con S298 y G299 (**Figura 6.2**), dos residuos conservados entre las polimerasas de picornavirus, que a su vez establecen puentes de hidrógeno con la base de la RTP. Por otro lado, la posición M296 contacta también con los residuos D245 (del motivo A) y N307 (del motivo B) que desempeñan un importante papel en el reconocimiento de nucleótido y en el correcto posicionamiento del azúcar de la ribosa en el bolsillo de unión a nucleótido en las RdRp (Gohara y cols. 2000, 2004; Ferrer-Orta y cols. 2007).

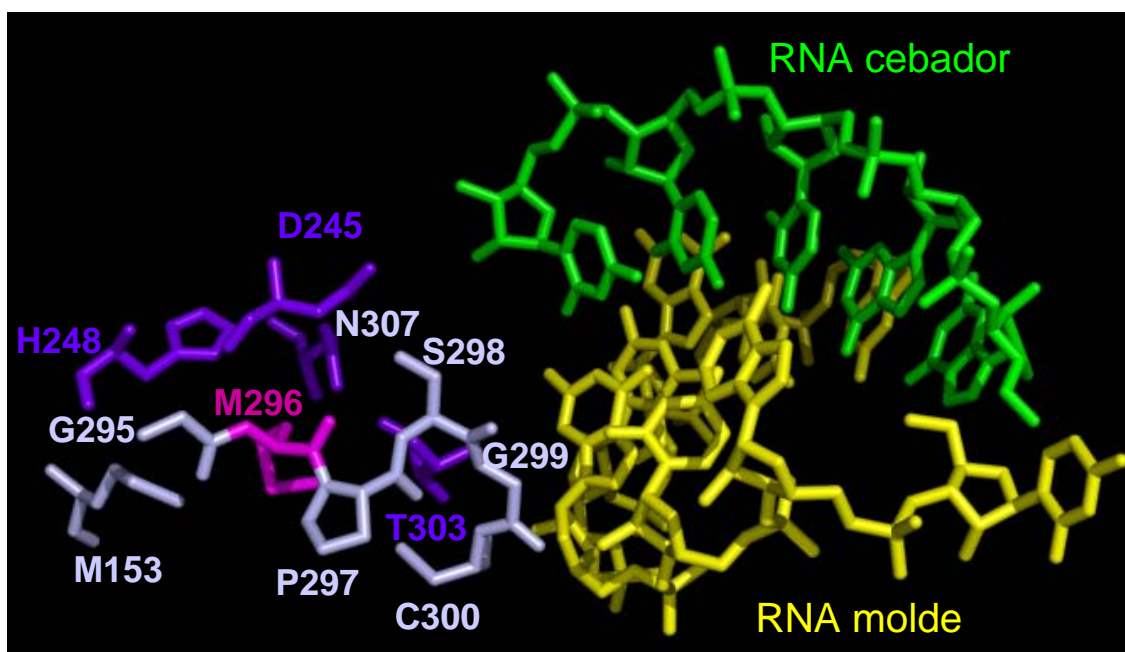




**Figura 6.1.** Localización estructural de los aminoácidos M296 y G62 en la polimerasa (3D) de VFA. Representación en forma de lazos de la estructura tridimensional de la RpRd de VFA (3D) en complejo con una molécula molde de RNA (en verde) y una molécula cebadora (en amarillo) (Ferrer-Orta y cols. 2004). En distintas tonalidades se representan los distintos dominios (“fingers”, “thumb”, “palm” y “fingertips”) de la polimerasa. El aminoácido M296 se localiza en el dominio “fingers”, concretamente en el bucle que conecta la lámina  $\beta 9$  con la hélice  $\alpha 11$  y se representa en forma de esferas fucsias. El aminoácido G62, representado en forma de esferas rojas, se encuentra en el bucle que conecta las hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ , también en el dominio “fingers” (Introducción, Figuras 2.8 y 2.9). La figura se ha realizado empleando el programa *pymol* (DeLano Scientific LLC). Las coordenadas cristalográficas empleadas han sido obtenidas de la base de datos de estructura de proteínas (PDB; <http://www.pdb.org>; código 1WNE).

La comparación estructural de todos los complejos de elongación resueltos para la 3D de VFA, revelan que el bucle  $\beta 9$ – $\alpha 11$  es bastante flexible. Esta flexibilidad parece ser requerida para la adaptación a las distintas formas y tamaños de las bases del molde y de los nucleótidos entrantes durante el proceso de elongación de RNA. La cadena lateral de M296 no proyecta a la cavidad de unión a RNA sino que forma parte de una cavidad con un fuerte carácter apolar, al que también contribuyen los residuos P244, P357, L378, P297, I306, y L310. Es posible que el cambio a I en la posición 296,

un aminoácido más hidrofóbico, pueda afectar a la conformación y flexibilidad del bucle  $\beta 9-\alpha 11$ , y alterar las interacciones con el NTP entrante o con la base aceptora del molde. Se han descrito mutaciones, tanto en DNA polimerasas como en la RT de HIV, bien cercanas o alejadas del centro activo de la polimerasa, que pueden tener efectos en la fidelidad del enzima como resultado de cambios dinámicos y/o estáticos en el tamaño y flexibilidad del centro activo (Harris y cols. 1998; Osheroff y cols. 1999; Kim y cols. 1999; Kim y cols. 2006).



**Figura 6.2.** Esquema de los aminoácidos que contactan directamente con M296. Se representa M296 en color fucsia y los aminoácidos vecinos en gris (si se encuentran en el dominio “fingers”) o en morado (si se encuentran en el dominio “palm”). Se muestra la localización del molde-iniciador de RNA como referencia. M296 no establece contactos directos con el RNA molde ni con el NTP entrante. Sin embargo, M296 se encuentra en contacto directo (a una distancia menor de  $3,5\text{\AA}$ ) con los aminoácidos D245 y N307, que juegan un papel fundamental en el reconocimiento del nucleótido ya que sus cadenas laterales establecen puentes de hidrógeno con el grupo  $2' \text{OH}$  de la ribosa (Ferrer-Orta y cols. 2006b, 2007). M296 también está próxima a los residuos C300 y T303, que contactan con la base del NTP y con los residuos conservados S298 y G299, que contactan con la base del NTP y RTP (Ferrer-Orta y cols. 2007). La figura se ha realizado empleando el programa *pymol* (DeLano Scientific LLC). Las coordenadas cristalográficas empleadas han sido obtenidas de la base de datos de estructura de proteínas (PDB; <http://www.pdb.org>; código 1WNE).

Los datos estructurales ofrecen una posible explicación a la participación de M296 en la polimerasa de VFA en el reconocimiento de RTP como sustrato. No obstante, serán necesarios estudios adicionales, incluyendo la co-cristalización del enzima 3D(M296I) en complejo con un molde RNA con GTP, ATP y RTP para proponer un mecanismo más preciso de la participación de M296I en la discriminación de RTP.

#### **6.6.- Mutantes de la polimerasa del virus de la fiebre aftosa en el proceso de entrada en catástrofe de error**

Con el objetivo de profundizar en las bases moleculares del proceso de entrada en catástrofe de error, resulta interesante el estudio de mutantes de la polimerasa de VFA producidos durante la replicación del virus en presencia de mutágenos. En el Anexo se recogen todas las mutaciones en 3D encontradas en el espectro de mutantes de las poblaciones de VFA tratadas con R, descritas en las secciones 5.1.8 y 5.1.9.1 de Resultados [poblaciones MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5, pMT28-Rp5, pMT28-3D(M296I)-Rp5]. Durante la replicación en presencia de mutágenos, las poblaciones virales pueden visualizarse como una “nube” de mutantes compuesta por variantes que surgen como consecuencia de la presión mutacional, incluyendo también mutaciones compensatorias que contribuyen a restablecer el “fitness” de la cuasiespecie en su conjunto. Asimismo, será posible la generación y coexistencia de mutantes con un efecto deletéreo (o incluso letal) que participen en la entrada del virus en catástrofe de error. Así, el análisis de la cuasiespecie procedente de una infección persistente de VFA en tratamiento con ribavirina reveló la presencia de un genoma inviable que contenía una polimerasa inactiva con las sustituciones G118D, V239M y G373D (Arias y cols. 2005). Actualmente estamos trabajando en la caracterización fenotípica, bioquímica y estructural de algunos de los mutantes de la polimerasa que puedan estar implicados en resistencia a análogos de nucleótidos y que puedan retrasar o facilitar el escape a la extinción de VFA durante la mutagénesis letal.

### **6.7.- Las polimerasas de picornavirus incluyen al menos dos sitios que afectan a la incorporación de ribavirina-5'-monofosfato**

El aislamiento de polimerasas con menor capacidad de incorporar RMP en RNA, con sustituciones alejadas entre sí [G64S en PV (Pfeiffer y Kirkegaard 2003; Arnold y cols. 2005) y M296I en VFA], sugiere que regiones distintas de la polimerasa de picornavirus pueden ejercer una influencia en el reconocimiento de análogos de nucleótido. Estudios cinéticos con la enzima G64S de PV sugirieron que esta sustitución podía inducir un cambio conformacional en la 3D previo a la transferencia del grupo fosforilo durante la incorporación del nucleótido (Arnold y cols. 2005). Aunque G64 y M296 se encuentran situadas en el dominio “fingers” de la 3D (**Figura 6.1**), G64 está alejada de los residuos involucrados en el reconocimiento del molde y unión a nucleótidos (Thompson y Peersen 2004; Ferrer-Orta y cols. 2004, 2006b). La resolución estructural de la enzima con G64S (Marcotte y cols. 2007) ha permitido sugerir que esta mutación lejana al bolsillo de unión a la ribosa es capaz de aumentar la fidelidad del enzima, no ya por grandes reorganizaciones estructurales, sino por cambios en la flexibilidad en el motivo A, que como se ha descrito en la Introducción (sección 2.6.1 y Figura 2.8), incluye residuos que unen iones o que interaccionan con la ribosa del nucleótido entrante.

La identificación en esta Tesis Doctoral de la mutación M296I durante el tratamiento antiviral con R sugiere que el aislamiento de mutantes de picornavirus con menor capacidad de incorporar R (y quizás otros análogos de nucleósidos) no es un fenómeno tan restringido como sugerían los resultados con PV, con el mismo mutante G64S aislado por dos grupos de modo independiente (Pfeiffer y Kirkegaard 2003; Arnold y cols. 2005). La identificación de sustituciones distintas localizadas en diversos sitios enzimáticos capaces de originar fenotipos asociados con resistencia a mutágenos, podría implicar una limitación en la aplicación de la mutagénesis letal como estrategia antiviral. También se han aislado variantes de RdRp asociados a una menor sensibilidad a R en pacientes infectados con VHC (Young y cols. 2003). Sin embargo, como se discute en el apartado 6.9, es posible que, al igual de lo que ocurre en el aislamiento de variantes de escape a inhibidores clásicos, la aparición de resistencias a R se haya favorecido al someter los virus a concentraciones subóptimas de R (Pfeiffer y Kirkegaard 2003; Sierra y cols. 2007) y su aislamiento no hubiera sido posible en presencia de concentraciones elevadas de R.

### **6.8.- Efecto de la mutación G62S en la polimerasa del virus de la fiebre aftosa**

La mutación responsable de la sustitución G64S en 3D de PV depende de una sola transición (Pfeiffer y Kirkegaard 2003; Arnold y cols. 2005). En cambio, debido a la diferencia de secuencia de nucleótidos entre PV y VFA, la sustitución G62S en VFA (equivalente a G64S en PV) depende de al menos una transición y una transversión. Dado que las transversiones son mucho menos frecuentes que las transiciones durante la replicación de VFA (apartado 5.1.8 y 5.1.9.1, Tablas 5.3 y 5.6) y de los virus en general (Domingo 2007) y que las dobles mutaciones en sitios definidos del genoma son improbables (el producto de la frecuencia de las dos mutaciones independientes), existe en el VFA una fuerte barrera genética en contra de la sustitución G62S, barrera que es fácilmente superable para PV. Además, los resultados de comportamiento de VFA que codifica 3D con S62 (apartado 5.3.1) y de actividad de polimerasas que incluyen S62 (apartado 5.3.2) sugieren que esta sustitución ocasiona una fuerte desventaja selectiva al VFA. Los análisis realizados hasta ahora sugieren que G62S afecta la unión de 3D al RNA, aunque la confirmación de este efecto requerirá experimentos adicionales. Resulta interesante también que la sustitución M296I en 3D parece rescatar la viabilidad del VFA con G62S (apartado 5.3.1.1), actuando de este modo como mutación compensatoria para mantener una función esencial para el virus. Esta observación se está analizando actualmente con mayor detalle en nuestro laboratorio.

La doble barrera genética y funcional sería suficiente para evitar la selección de VFA con G62S en 3D. Además, los datos disponibles hasta ahora sugieren que G62S no confiere resistencia detectable a R (apartado 5.3.1.1). El hecho de que la misma sustitución ejerza efectos fenotípicos y bioquímicos diferentes en distintos miembros de la misma familia *Picornaviridae*, pone de manifiesto la diversidad funcional entre miembros de una misma familia, incluso respecto a la posición equivalente en una proteína esencial y altamente conservada. Sería interesante investigar si el efecto deletéreo de G62S se manifiesta también en otro contexto de secuencia y si la acción deletérea puede ser atenuada en un ambiente replicativo distinto, como puede ser la presencia de un espectro de mutantes distinto.

### **6.9.- Perspectivas de la catástrofe de error como estrategia antiviral**

El mecanismo antiviral de la ribavirina y otros análogos base y de nucleósido mutagénicos (5-fluorouracilo, 5-azacitidina, 5-hidroxi-deoxicidina) ha sido documentado ampliamente para muchos sistemas virales (Holland y cols. 1990; Loeb y cols. 1999; Crotty y cols. 2000; Sierra y cols. 2000; Pariente y cols. 2001; Grande-Pérez y cols. 2002; Airaksinen y cols. 2003; revisiones en Anderson y cols. 2004 y Domingo 2005). En todos los casos, una acción mutagénica condujo a pérdidas en la producción viral y en algunos casos a la extinción del virus, frecuentemente asociada a incrementos en la frecuencia de mutación, sin variación de la secuencia consenso de la población. Estas propiedades distinguen a la extinción por mutagénesis letal de la extinción mediada únicamente por inhibición de la replicación viral. Cabe destacar que, aunque algunos análogos de nucleótido también ejerzan cierta acción inhibitoria de la replicación viral, la acción mutagénica es esencial para lograr la extinción del virus. Ello fue documentado por la incapacidad de combinaciones de inhibidores clásicos de extinguir VFA, a menos que la misma actividad inhibitoria se alcanzase con la presencia de un agente mutagénico (Pariente y cols. 2003). Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio mostraron que una baja capacidad replicativa (“fitness”) y bajas cargas virales (bajo tamaño poblacional) favorecen la extinción viral (Sierra y cols. 2000). Cuanto menor sea la oportunidad de un virus de replicar, menos será la probabilidad de sobrevivir ante una respuesta antiviral. De acuerdo con esta propuesta, la combinación de un agente mutagénico con uno o varios inhibidores resultó mas efectiva en la extinción viral, evitándose la selección de mutantes resistentes al inhibidor (Pariente y cols. 2003). Resultados similares se obtuvieron al extinguir HIV-1 de alto “fitness” mediante la combinación de un inhibidor y un análogo de nucleósido mutagénico pero no con el análogo mutagénico administrado solo (Tapia y cols. 2005). En este sentido, el uso de la ribavirina tendría un paralelismo al tratamiento combinado con un inhibidor y un mutágeno, con la diferencia de que ambas formas, el inhibidor por un lado (ribavirina monofosfato, como inhibidor de la IMPDH) y el mutágeno por otro (ribavirina trifosfato, como sustrato de la polimerasa), provienen de la misma pro-droga y ambos metabolitos son sintetizados por enzimas celulares. Actualmente estamos investigando si el tratamiento combinado de R con otros inhibidores o agentes mutagénicos puede favorecer la extinción por mutagénesis letal.

Resultados de nuestro laboratorio sugieren que la capacidad antiviral de un mutágeno podría incluir tanto un mecanismo directo resultado del aumento de mutaciones en los genomas virales como de otro indirecto, provocado por el efecto de algunos genomas portadores de mutaciones que ejercen una acción de interferencia sobre algunos genomas infecciosos (González-López y cols. 2004; Grande-Pérez y cols. 2005; Perales y cols. 2007). El mecanismo interferente observado denominado “defección letal” (Grande-Pérez y cols. 2005) podría ser consecuencia de que proteínas funcionalmente alteradas puedan actuar como dominantes negativas sobre proteínas normales. La cuasiespecie mutagenizada actuaría como un conjunto interferente sobre la población viable (Domingo y cols. 2005; Perales y cols. 2007). Algunos trabajos previos con infecciones con PV o Hantaan virus en presencia de R, mostraron un gran descenso de la infectividad seguido de un descenso en los niveles de RNA viral (Severson y cols. 2003; Crotty y cols. 2000, 2001). Durante la infección con VFA en presencia de R (apartado 5.1.7 y Figura 5.9) también se observó una disminución de la infectividad específica del RNA (**Tabla 6.1**), en consonancia con el modelo de defección letal. Este resultado sugiere que al menos parte del papel de la ribavirina consiste en aumentar la frecuencia de genomas que son defectivos en cuanto a infectividad pero que son competentes en replicación y que pueden interferir en la replicación de los genomas más competentes del mismo espectro de mutantes (Perales y cols. 2007).

**Tabla 6.1. Efecto de la ribavirina sobre la infectividad específica de VFA**

Parámetro observado	Concentración de ribavirina			
	0 µM	200 µM	400 µM	800 µM
Infectividad (UFPs/ml)	$3,4 \times 10^7$	$4,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$
RNA/célula	$5,8 \times 10^5$	$9,6 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$7,5 \times 10^3$
Infectividad específica (UFPs/RNA)	58,6	5,0	5,9	3,6

Datos obtenidos a partir de los valores de infectividad y RNA/célula resultado de una infección de pMT28 en ausencia de R o en presencia de las cantidades indicadas de R (Figura 5.9, apartado 5.1.7). Las infectividades específicas se expresan como valores relativos en unidades arbitrarias.

El aislamiento de variantes resistentes a agentes mutagénicos podría suponer una limitación en la aplicación de la mutagénesis letal como estrategia antiviral. Sin embargo, cabe resaltar que para la selección de variantes de VFA y PV resistentes a R, los virus tuvieron que someterse a una replicación en presencia de concentraciones crecientes del mutágeno, mientras que no hemos observado la sustitución M296I en poblaciones de VFA sometidas directamente a concentraciones elevadas de R (Airaksinen y cols. 2003 y resultados sin publicar). Una de las consecuencias del modelo de defeción letal sería que un posible mutante de resistencia al mutágeno coexista con mutantes defectivos interferentes, los cuales podrían evitar la dominancia del mutante de resistencia, permitiendo la extinción de la población viral. En el laboratorio estamos investigando el posible escape a la extinción del VFA debido a la presencia de la sustitución M296I en poblaciones sometidas a replicación con altas concentraciones de R.

En conjunto, el empleo de agentes mutagénicos se presenta como una nueva y prometedora estrategia antiviral documentada con varios sistemas virales tanto en cultivos celulares como *in vivo* (Loeb y cols. 1999; Sierra y cols. 2000; Crotty y cols. 2001; Eigen 2002; Grande-Pérez y cols. 2002; Ruiz-Jarabo y cols. 2003; Harris y cols. 2005; revisado en Anderson y cols. 2004 y Domingo 2006). No obstante, su aplicación práctica requerirá encontrar agentes mutagénicos adecuados, no tóxicos y específicos para las replicasas virales. A pesar de que R está aprobada para terapia de diversas infecciones (notablemente VHC y algunos virus respiratorios y hemorrágicos), el tratamiento ocasiona a menudo efectos secundarios negativos y muestra eficacia limitada (aproximadamente, el 50% de pacientes de VHC tratados con R en combinación con interferon- $\alpha$  muestran una respuesta mantenida) (Feld y Hoofnagle 2005). Una alternativa en estudio, es el diseño de análogos de R de nueva generación (mediante pequeñas variaciones en su estructura) que muestren un mejor perfil farmacocinético que permita alcanzar concentraciones más altas de drogas en el sitio de infección, evitando efectos secundarios (Hong y Cameron 2002). De hecho, las concentraciones de R alcanzadas en pacientes se encuentran aproximadamente entre 0,2 y el 10% de las concentraciones que han resultado efectivas para la extinción de VFA de células en cultivo (Airaksinen y cols. 2003). Por otro lado, el empleo de la mutagénesis letal como estrategia antiviral no estaría restringido al uso de análogos de nucleósido. El descubrimiento de residuos lejanos al bolsillo de unión a ribosa, como



G64S o M296I, que puedan modular la fidelidad de un enzima, permite contemplar el diseño de nuevas drogas que se unan a la superficie de las replicasas virales y que alteren la fidelidad de la enzima, reduciendo los problemas de toxicidad celular. Inhibidores que se unen a la superficie de enzimas y que afectan a su actividad catalítica por interacciones indirectas han mostrado efectividad en algunas RNA polimerasas, como en el caso *E. coli* (Artsimovitch y cols. 2003). Será importante investigar posibles alteraciones de la fidelidad de las polimerasas víricas por ligandos alejados del centro activo.

Los datos presentados en esta Tesis Doctoral muestran que los picornavirus, que constituyen sistemas versátiles para los que se conocen distintos agentes mutagénicos e inhibidores de la replicación viral, pueden constituir sistemas modelo adecuados para estudiar la extinción vírica por mutagénesis incrementada. Además, el conocimiento de mutantes de polimerasas resistentes a análogos de nucleótidos ofrece una herramienta para entender las bases moleculares de la fidelidad de copia, uno de los aspectos esenciales en la dinámica poblacional de virus.

## 7.- Conclusiones

1. La ribavirina es mutagénica para el virus de la fiebre aftosa (VFA) durante infecciones citolíticas en células BHK-21. La ribavirina ejerce un efecto dependiente de dosis tanto en la síntesis de RNA viral como en la producción de virus infeccioso.
2. Se han seleccionado variantes del VFA con sensibilidad disminuida a ribavirina mediante replicación del virus en presencia de cantidades crecientes de ribavirina.
3. La menor sensibilidad a ribavirina de los variantes del VFA seleccionados se ha asociado a la sustitución M296I en la 3D (polimerasa) del VFA. M296I en 3D del VFA confiere una ventaja selectiva al virus durante su replicación en presencia de ribavirina, pero no en ausencia de ribavirina.
4. La replicación del VFA en presencia de ribavirina provocó un aumento en la complejidad del espectro de mutantes. El aumento de complejidad fue menor durante la replicación de VFA que incluye M296I en su 3D.
5. La mutación M296I en la 3D de VFA revierte al replicar el virus en presencia de 5-fluorouracilo.
6. La 3D del VFA es capaz de incorporar ribavirina-5'-monofosfato tanto como análogo de G o análogo de A. Existe una mayor incorporación de ribavirina-5'-monofosfato cuando se incorpora frente a citosina en el molde que cuando se incorpora frente a uracilo en el molde.
7. La mutación M296I en la polimerasa de de VFA provoca un defecto en la incorporación de ribavirina-5'-monofosfato, detectado en ensayos de polimerización con 3D purificada, empleando moldes homopoliméricos y heteropoliméricos, tanto con ribavirina-5'-trifosfato (RTP) como único sustrato o con RTP junto con los nucleótidos estándar, GTP o ATP.
8. La mutación G62S en 3D de VFA disminuye la actividad de la enzima y es deletérea para la replicación del virus.

## 8.- Bibliografía

- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., D., and Brown, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**(6209), 709-716.
- Agol, V. I. (2006). Molecular mechanisms of poliovirus variation and evolution. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**, 211-59.
- Ahmed, R., Hahn, C. S., Somasundaram, T., Villarete, L., Matloubian, M., and Strauss, J. H. (1991). Molecular basis of organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *J Virol* **65**(8), 4242-7.
- Airaksinen, A., Pariente, N., Menendez-Arias, L., and Domingo, E. (2003). Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* **311**(2), 339-49.
- Albà, M. (2001). Replicative DNA polymerases. *Genome Biol* **2**(1), REVIEWS3002.
- Amaraa, R., Mareckova, H., Urbanek, P., and Fucikova, T. (2003). Immunological predictors of different responses to combination therapy with interferon alpha and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* **38**(3), 254-9.
- Anderson, J. P., Daifuku, R., and Loeb, L. A. (2004). Viral Error Catastrophe by Mutagenic Nucleosides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 183-205.
- Andrei, G., and De Clercq, E. (1993). Molecular approaches for the treatment of hemorrhagic fever virus infections. *Antiviral Res* **22**(1), 45-75.
- Argos, P., Kamer, G., Nicklin, M. J., and Wimmer, E. (1984). Similarity in gene organization and homology between proteins of animal picornaviruses and a plant comovirus suggest common ancestry of these virus families. *Nucleic Acids Res* **12**(18), 7251-67.
- Arias, A., Agudo, R., Ferrer-Orta, C., Perez-Luque, R., Airaksinen, A., Brocchi, E., Domingo, E., Verdaguer, N., and Escarmis, C. (2005). Mutant viral polymerase in the transition of virus to error catastrophe identifies a critical site for RNA binding. *J. Mol. Biol.* **353**(5), 1021-32.
- Arias, A., Lázaro, E., Escarmis, C., and Domingo, E. (2001). Molecular intermediates of fitness gain of an RNA virus: characterization of a mutant spectrum by biological and molecular cloning. *J. Gen. Virol.* **82**(Pt 5), 1049-60.
- Arnold, J. J., and Cameron, C. E. (2000). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)). Assembly of stable, elongation-competent complexes by using a symmetrical primer-template substrate (sym/sub). *J Biol Chem* **275**(8), 5329-36.
- Arnold, J. J., Gohara, D. W., and Cameron, C. E. (2004). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): pre-steady-state kinetic analysis of ribonucleotide incorporation in the presence of Mn<sup>2+</sup>. *Biochemistry* **43**(18), 5138-48.
- Arnold, J. J., Vignuzzi, M., Stone, J. K., Andino, R., and Cameron, C. E. (2005). Remote site control of an active site fidelity checkpoint in a viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **280**(27), 25706-16.
- Artsimovitch, I., Chu, C., Lynch, A. S., and Landick, R. (2003). A new class of bacterial RNA polymerase inhibitor affects nucleotide addition. *Science* **302**(5645), 650-4.
- Asahina, Y., Izumi, N., Enomoto, N., Uchihara, M., Kurosaki, M., Onuki, Y., Nishimura, Y., Ueda, K., Tsuchiya, K., Nakanishi, H., Kitamura, T., and Miyake, S. (2005). Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **43**(4), 623-9.

- Bae, Y. S., and Yoon, J. W. (1993). Determination of diabetogenicity attributable to a single amino acid, Ala776, on the polyprotein of encephalomyocarditis virus. *Diabetes* **42**(3), 435-43.
- Balzarini, J., Karlsson, A., Wang, L., Bohman, C., Horska, K., Votruba, I., Fridland, A., Van Aerschot, A., Herdewijn, P., and De Clercq, E. (1993). Eicar (5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide). A novel potent inhibitor of inosinate dehydrogenase activity and guanylate biosynthesis. *J Biol Chem* **268**(33), 24591-8.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., and Domingo, E. (2001). Evolution of cell recognition by viruses. *Science* **292**(5519), 1102-5.
- Baranowski, E., Ruíz-Jarabo, C. M., Pariente, N., Verdaguer, N., and Domingo, E. (2003). Evolution of cell recognition by viruses: a source of biological novelty with medical implications. *Adv. Virus Res.* **62**, 19-111.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Sevilla, N., Andreu, D., Beck, E., and Domingo, E. (2000a). Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol* **74**(4), 1641-7.
- Baranowski, E., Ruíz-Jarabo, C. M., Sevilla, N., Andreu, D., Beck, E., and Domingo, E. (2000b). Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J. Virol.* **74**(4), 1641-7.
- Baranowski, E., Sevilla, N., Verdaguer, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Beck, E., and Domingo, E. (1998). Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **72**(8), 6362-72.
- Bartzatt, R., and Anderson, G. A. (1989). Ribavirin inhibits proliferation of bovine respiratory syncytial virus in vitro. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **12**(3), 57-62.
- Batschelet, E., Domingo, E., and Weissmann, C. (1976). The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene* **1**(1), 27-32.
- Baxt, B., and Rieder, E. (2004). Molecular aspects of foot-and-mouth disease virus virulence and host range: Role of host cell receptors and viral factors. In "Foot-and-Mouth Disease. Current Perspectives" (F. Sobrino, and E. Domingo, Eds.), pp. 145-172. Horizon Bioscience, Wymondham.
- Beard, C. W., and Mason, P. W. (2000). Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **74**(2), 987-91.
- Beard, W. A., and Wilson, S. H. (2003). Structural insights into the origins of DNA polymerase fidelity. *Structure* **11**(5), 489-96.
- Belsham, G. J. (1993). Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **60**(3), 241-260.
- Belsham, G. J., McInerney, G. M., and Ross-Smith, N. (2000). Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J Virol* **74**(1), 272-80.
- Belsham, G. J., and Sonenberg, N. (1996). RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiol Rev* **60**(3), 499-511.
- Benarroch, D., Egloff, M. P., Mulard, L., Guerreiro, C., Romette, J. L., and Canard, B. (2004). A structural basis for the inhibition of the NS5 dengue virus mRNA 2'-O-methyltransferase domain by ribavirin 5'-triphosphate. *J Biol Chem* **279**(34), 35638-43.

- Berger, E. A., Murphy, P. M., and Farber, J. M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**, 657-700.
- Berinstein, A., Roivainen, M., Hovi, T., Mason, P. W., and Baxt, B. (1995). Antibodies to the vitronectin receptor (integrin alpha V beta 3) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J Virol* **69**(4), 2664-6.
- Bernad, A., Blanco, L., Lazaro, J. M., Martin, G., and Salas, M. (1989). A conserved 3'-5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* **59**(1), 219-28.
- Biebricher, C. K., and Eigen, M. (2006). What is a quasispecies? *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* **299**, 1-31.
- Bienz, K., Egger, D., Troxler, M., and Pasamontes, L. (1990). Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol* **64**(3), 1156-63.
- Björndal, A., Deng, H., Jansson, M., Fiore, J. R., Colognesi, C., Karlsson, A., Albert, J., Scarlatti, G., Littman, D. R., and Fenyo, E. M. (1997). Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* **71**(10), 7478-87.
- Borrego, B., Novella, I. S., Giralt, E., Andreu, D., and Domingo, E. (1993). Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. *J. Virol.* **67**(10), 6071-6079.
- Borrow, P., Evans, C. F., and Oldstone, M. B. (1995). Virus-induced immunosuppression: immune system-mediated destruction of virus-infected dendritic cells results in generalized immune suppression. *J. Virol.* **69**(2), 1059-70.
- Bougie, I., and Bisailon, M. (2004). The broad spectrum antiviral nucleoside ribavirin as a substrate for a viral RNA capping enzyme. *J Biol Chem* **279**(21), 22124-30.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F. A. (1999a). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(23), 13034-9.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F. A. (1999b). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23), 13034-9.
- Bruenn, J. A. (2003). A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **31**(7), 1821-9.
- Butcher, S. J., Grimes, J. M., Makeyev, E. V., Bamford, D. H., and Stuart, D. I. (2001). A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* **410**(6825), 235-40.
- Cao, W., Henry, M. D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J. H., Ravkov, E. V., Nichol, S. T., Compans, R. W., Campbell, K. P., and Oldstone, M. B. (1998). Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**(5396), 2079-81.
- Carrillo, C., Tulman, E. R., Delhon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G. F., and Rock, D. L. (2005). Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **79**(10), 6487-504.
- Cassidy, L. F., and Patterson, J. L. (1989). Mechanism of La Crosse virus inhibition by ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother* **33**(11), 2009-11.

- Castro, C., Arnold, J. J., and Cameron, C. E. (2005). Incorporation fidelity of the viral RNA-dependent RNA polymerase: a kinetic, thermodynamic and structural perspective. *Virus Res.* **107**(2), 141-9.
- Clarke, D. K., Duarte, E. A., Moya, A., Elena, S. F., Domingo, E., and Holland, J. (1993). Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. *J. Virol.* **67**(1), 222-228.
- Cline, J., Braman, J. C., and Hogrefe, H. H. (1996). PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **24**(18), 3546-3551.
- Coffin, J. M. (1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**(5197), 483-489.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E. (1997). "Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Contreras, A. M., Hiasa, Y., He, W., Terella, A., Schmidt, E. V., and Chung, R. T. (2002). Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J Virol* **76**(17), 8505-17.
- Cooper, A. C., Banasiak, N. C., and Allen, P. J. (2003). Management and prevention strategies for respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in infants and young children: a review of evidence-based practice interventions. *Pediatr Nurs* **29**(6), 452-6.
- Cramp, M. E., Rossol, S., Chokshi, S., Carucci, P., Williams, R., and Naoumov, N. V. (2000). Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **118**(2), 346-55.
- Crance, J. M., Gratier, D., Guimet, J., and Jouan, A. (1997). Inhibition of sandfly fever Sicilian virus (Phlebovirus) replication in vitro by antiviral compounds. *Res Virol* **148**(5), 353-65.
- Crance, J. M., Scaramozzino, N., Jouan, A., and Garin, D. (2003). Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res* **58**(1), 73-9.
- Crotty, S., Cameron, C. E., and Andino, R. (2001). RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**(12), 6895-900.
- Crotty, S., Maag, D., Arnold, J. J., Zhong, W., Lau, J. Y. N., Hong, Z., Andino, R., and Cameron, C. E. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleotide, ribavirin, is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine* **6**, 1375-1379.
- Cummings, K. J., Lee, S. M., West, E. S., Cid-Ruzafa, J., Fein, S. G., Aoki, Y., Sulkowski, M. S., and Goodman, S. N. (2001). Interferon and ribavirin vs interferon alone in the re-treatment of chronic hepatitis C previously nonresponsive to interferon: A meta-analysis of randomized trials. *Jama* **285**(2), 193-9.
- Chang, J., Nie, X., Gudima, S., and Taylor, J. (2006). Action of inhibitors on accumulation of processed hepatitis delta virus RNAs. *J Virol* **80**(7), 3205-14.
- Chao, L. (1990). Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* **348**(6300), 454-455.
- Charpentier, N., Dávila, M., Domingo, E., and Escarmís, C. (1996). Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. *Virology* **223**(1), 10-18.
- Chevaliez, S., Brillet, R., Lazaro, E., Hezode, C., and Pawlotsky, J. M. (2007). Analysis of Ribavirin Mutagenicity in Human Hepatitis C Virus Infection. *J Virol.*

- Choi, S. S., Rasshofer, R., and Roggendorf, M. (1989). Inhibition of hepatitis delta virus RNA replication in primary woodchuck hepatocytes. *Antiviral Res* **12**(4), 213-22.
- Davis, G. L., Esteban-Mur, R., Rustgi, V., Hoefs, J., Gordon, S. C., Trepo, C., Shiffman, M. L., Zeuzem, S., Craxi, A., Ling, M. H., and Albrecht, J. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* **339**(21), 1493-9.
- Day, C. W., Smee, D. F., Julander, J. G., Yamshchikov, V. F., Sidwell, R. W., and Morrey, J. D. (2005). Error-prone replication of West Nile virus caused by ribavirin. *Antiviral Res.* **67**(1), 38-45.
- De Benedetti, A., and Graff, J. R. (2004). eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* **23**(18), 3189-99.
- de Felipe, P., Hughes, L. E., Ryan, M. D., and Brown, J. D. (2003). Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J Biol Chem* **278**(13), 11441-8.
- de Felipe, P., and Ryan, M. D. (2004). Targeting of proteins derived from self-processing polyproteins containing multiple signal sequences. *Traffic* **5**(8), 616-26.
- De Jong, J. J., De Ronde, A., Keulen, W., Tersmette, M., and Goudsmit, J. (1992). Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* **66**(11), 6777-80.
- de la Iglesia, F., and Elena, S. F. (2007). Fitness Declines in Tobacco Etch Virus upon Serial Bottleneck Transfers. *J Virol* **81**(10), 4941-7.
- de la Torre, J. C., Alarcon, B., Martinez-Salas, E., Carrasco, L., and Domingo, E. (1987). Ribavirin cures cells of a persistent infection with foot-and-mouth disease virus in vitro. *J Virol* **61**(1), 233-5.
- de la Torre, J. C., and Holland, J. J. (1990). RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *J. Virol.* **64**(12), 6278-81.
- de la Torre, J. C., Martínez-Salas, E., Diez, J., Villaverde, A., Gebauer, F., Rocha, E., Dávila, M., and Domingo, E. (1988). Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.* **62**(6), 2050-2058.
- de la Torre, J. C., Wimmer, E., and Holland, J. J. (1990). Very high frequency of reversion to guanidine resistance in clonal pools of guanidine-dependent type 1 poliovirus. *J. Virol.* **64**(2), 664-71.
- de Los Santos, T., de Avila Botton, S., Weiblen, R., and Grubman, M. J. (2006). The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J Virol* **80**(4), 1906-14.
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D., and Argos, P. (1990). An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng* **3**(6), 461-7.
- Devaney, M. A., Vakharia, V. N., Lloyd, R. E., Ehrenfeld, E., and 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**(11), 4407-9.
- Di Bisceglie, A. M., Thompson, J., Smith-Wilkaitis, N., Brunt, E. M., and Bacon, B. R. (2001). Combination of interferon and ribavirin in chronic hepatitis C: re-treatment of nonresponders to interferon. *Hepatology* **33**(3), 704-7.

- Dixit, N. M., Layden-Almer, J. E., Layden, T. J., and Perelson, A. S. (2004). Modelling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. *Nature* **432**(7019), 922-4.
- Doedens, J. R., Giddings, T. H., Jr., and Kirkegaard, K. (1997). Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J Virol* **71**(12), 9054-64.
- Doedens, J. R., and Kirkegaard, K. (1995). Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *Embo J* **14**(5), 894-907.
- Domingo, E., Ed. (2006). Quasispecies: Concepts and Implications for Virology. Current Topics in Microbiology and Immunology. . Vol. 299.
- Domingo, E. (2007). Virus Evolution (D. M. Knipe, and P. M. Howley and cols., Eds.),. Fields Virology. Lippincott Williams and Wilkins, a wolters kluwer business. Philadelphia, U.S.A. **1**(12), 389-421.
- Domingo, E., Biebricher, C., Eigen, M., and Holland, J. J. (2001). Quasispecies and RNA Virus Evolution: Principles and Consequences. Landes Bioscience, Austin.
- Domingo, E., Davila, M., and Ortin, J. (1980). Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* **11**(3-4), 333-46.
- Domingo, E., editor (2005). Virus entry into error catastrophe as a new antiviral strategy. *Virus Res.* **107**, 115-228.
- Domingo, E., and Gomez, J. (2007). Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res*, in press.
- Domingo, E., Gonzalez-Lopez, C., Pariente, N., Airaksinen, A., and Escarmis, C. (2005). Population dynamics of RNA viruses: the essential contribution of mutant spectra. *Arch. Virol. Suppl.*(19), 59-71.
- Domingo, E., and Holland, J. J. (1994). Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In "Evolutionary Biology of Viruses" (S. S. Morse, Ed.), pp. 161-184. Raven Press, New York.
- Domingo, E., and Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 151-178.
- Domingo, E., Holland, J. J., and Ahlquist, P. (1988). "RNA Genetics." I, II, III CRC Press, Boca Raton.
- Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortín, J., López-Galindez, C., Pérez-Breña, P., Villanueva, N., Nájera, R., VandePol, S., Steinhauer, D., DePolo, N., and Holland, J. J. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene* **40**(1), 1-8.
- Domingo, E., Menéndez-Arias, L., Quiñones-Mateu, M. E., Holguín, A., Gutiérrez-Rivas, M., Martínez, M. A., Quer, J., Novella, I. S., and Holland, J. J. (1997). Viral quasispecies and the problem of vaccine-escape and drug-resistant mutants. *Prog. Drug. Res.* **48**, 99-128.
- Domingo, E., Ruíz-Jarabo, C. M., Arias, A., Molina-Paris, C., Briones, C., Baranowski, E., and Escarmís, C. (2003). Detection and biological implications of genetic memory in viral quasispecies. In "Cardiomyopathies and Heart Failure: Biomolecular, Infectious and Immune Mechanisms" (A. Matsumori, Ed.), pp. 259-276. Kluwer Academic Publishers, London, UK.
- Domingo, E., Sabo, D., Taniguchi, T., and Weissmann, C. (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* **13**(4), 735-744.
- Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**(16), 7160-7164.



- Drake, J. W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**(9), 4171-5.
- Drake, J. W., and Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13910-13913.
- Duarte, E., Clarke, D., Moya, A., Domingo, E., and Holland, J. (1992). Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**(13), 6015-6019.
- Duarte, E. A., Novella, I. S., Ledesma, S., Clarke, D. K., Moya, A., Elena, S. F., Domingo, E., and Holland, J. J. (1994a). Subclonal components of consensus fitness in an RNA virus clone. *J. Virol.* **68**(7), 4295-4301.
- Duarte, E. A., Novella, I. S., Weaver, S. C., Domingo, E., Wain-Hobson, S., Clarke, D. K., Moya, A., Elena, S. F., de la Torre, J. C., and Holland, J. J. (1994b). RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. *Infect. Agents Dis.* **3**(4), 201-214.
- Dulbecco, R., and Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**(3), 396-7.
- Echols, H., and Goodman, M. F. (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem* **60**, 477-511.
- Edell, D., Bruce, E., Hale, K., Edell, D., and Khoshoo, V. (1998). Reduced long-term respiratory morbidity after treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis with ribavirin in previously healthy infants: a preliminary report. *Pediatr Pulmonol* **25**(3), 154-8.
- Eigen, M. (1971). Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**, 465-523.
- Eigen, M. (1993). Viral quasispecies. *Sci. Am.* **269**(1), 42-9.
- Eigen, M. (1996). On the nature of virus quasispecies. *Trends. Microbiol.* **4**(6), 216-218.
- Eigen, M. (2002). Error catastrophe and antiviral strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(21), 13374-6.
- Eigen, M., and Biebricher, C. K. (1988). Sequence space and quasispecies distribution. In "RNA Genetics" (E. Domingo, P. Ahlquist, and J. J. Holland, Eds.), Vol. 3, pp. 211-245. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Eigen, M., McCaskill, J., and Schuster, P. (1988). Molecular quasi-species. *J. Phys. Chem.* **92**, 6881-6891.
- Eigen, M., and Schuster, P. (1979). "The hypercycle. A principle of natural self-organization." Springer, Berlin.
- Escarmís, C., Carrillo, E. C., Ferrer, M., Arriaza, J. F., Lopez, N., Tami, C., Verdaguer, N., Domingo, E., and Franze-Fernández, M. T. (1998). Rapid selection in modified BHK-21 cells of a foot-and-mouth disease virus variant showing alterations in cell tropism. *J. Virol* **72**(12), 10171-10179.
- Escarmis, C., Davila, M., Charpentier, N., Bracho, A., Moya, A., and Domingo, E. (1996). Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J Mol Biol* **264**(2), 255-67.
- Escarmís, C., Dávila, M., and Domingo, E. (1999). Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet. *J. Mol. Biol.* **285**, 495-505.
- Escarmis, C., Dopazo, J., Davila, M., Palma, E. L., and Domingo, E. (1995). Large deletions in the 5'-untranslated region of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virus Res* **35**(2), 155-67.

- Escarmís, C., Gómez-Mariano, G., Dávila, M., Lázaro, E., and Domingo, E. (2002). Resistance to extinction of low fitness virus subjected to plaque-to- plaque transfers: diversification by mutation clustering. *J. Mol. Biol.* **315**(4), 647-61.
- Escarmis, C., Lazaro, E., and Manrubia, S. C. (2006). Population bottlenecks in quasispecies dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**, 141-70.
- Escarmis, C., Toja, M., Medina, M., and Domingo, E. (1992). Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res* **26**(2), 113-25.
- Falk, M. M., Sobrino, F., and Beck, E. (1992). VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **66**(4), 2251-60.
- Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J. C., Strazzera, A., Chien, D. Y., Munoz, S. J., Balestrieri, A., Purcell, R. H., and Alter, H. J. (2000). The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* **288**(5464), 339-44.
- Feld, J. J., and Hoofnagle, J. H. (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **436**(7053), 967-72.
- Fernandez-Larsson, R., O'Connell, K., Koumans, E., and Patterson, J. L. (1989). Molecular analysis of the inhibitory effect of phosphorylated ribavirin on the vesicular stomatitis virus in vitro polymerase reaction. *Antimicrob Agents Chemother* **33**(10), 1668-73.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., and Verdaguer, N. (2006a). The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J* **25**(4), 880-8.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Escarmis, C., and Verdaguer, N. (2006b). A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**(1), 27-34.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., and Verdaguer, N. (2004). Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J. Biol. Chem.* **279**(45), 47212-21.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., and Verdaguer, N. (2007). Sequential structures provide insights into the fidelity of RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Figlerowicz, M., Alejska, M., Kurzynska-Kokorniak, A., and Figlerowicz, M. (2003). Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Medicinal Res. Reviews* **23**(4), 488-518.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., and Skalka, A. M. (2004). "Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses." second edition ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Fouchier, R. A., Brouwer, M., Broersen, S. M., and Schuitemaker, H. (1995). Simple determination of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing V3 genotype by PCR. *J Clin Microbiol* **33**(4), 906-11.
- Frank, K. B., McKernan, P. A., Smith, R. A., and Smee, D. F. (1987). Visna virus as an in vitro model for human immunodeficiency virus and inhibition by ribavirin, phosphonoformate, and 2',3'-dideoxynucleosides. *Antimicrob Agents Chemother* **31**(9), 1369-74.
- Freistadt, M. S., Meades, G. D., and Cameron, C. E. (2004). Lethal mutagens: broad-spectrum antivirals with limited potential for development of resistance? *Drug Resist Updat.* **7**(1), 19-24.

- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., and Ellenberger, T. (2006). "DNA repair and mutagenesis." American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Fry, E. E., Lea, S. M., Jackson, T., Newman, J. W., Ellard, F. M., Blakemore, W. E., Abu-Ghazaleh, R., Samuel, A., King, A. M., and Stuart, D. I. (1999). The structure and function of a foot-and-mouth disease virus- oligosaccharide receptor complex. *EMBO J.* **18**(3), 543-54.
- Fry, E. E., Stuart, D. I., and Rowlands, D. J. (2005). The structure of foot-and-mouth disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **288**, 71-101.
- Furtado, M. R., Callaway, D. S., Phair, J. P., Kunstman, K. J., Stanton, J. L., Macken, C. A., Perelson, A. S., and Wolinsky, S. M. (1999). Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* **340**(21), 1614-22.
- Gallois-Montbrun, S., Chen, Y., Dutartre, H., Sophys, M., Morera, S., Guerreiro, C., Schneider, B., Mulard, L., Janin, J., Veron, M., Deville-Bonne, D., and Canard, B. (2003). Structural analysis of the activation of ribavirin analogs by NDP kinase: comparison with other ribavirin targets. *Mol Pharmacol* **63**(3), 538-46.
- Garcia-Arriaza, J., Domingo, E., and Escarmis, C. (2005). A segmented form of foot-and-mouth disease virus interferes with standard virus: a link between interference and competitive fitness. *Virology* **335**(2), 155-64.
- Garcia-Arriaza, J., Manrubia, S. C., Toja, M., Domingo, E., and Escarmis, C. (2004). Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J Virol* **78**(21), 11678-85.
- Garcia, S., Crance, J. M., Billecocq, A., Peinnequin, A., Jouan, A., Bouloy, M., and Garin, D. (2001). Quantitative real-time PCR detection of Rift Valley fever virus and its application to evaluation of antiviral compounds. *J Clin Microbiol* **39**(12), 4456-61.
- Ge, L., Zhang, J., Zhou, X., and Li, H. (2007). Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl china virus. *J Virol* **81**(11), 5902-7.
- Gebauer, F., de la Torre, J. C., Gomes, I., Mateu, M. G., Barahona, H., Tiraboschi, B., Bergmann, I., de Mello, P. A., and Domingo, E. (1988). Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.* **62**(6), 2041-2049.
- Giraud, A. T., Beck, E., Strebel, K., de Mello, P. A., La Torre, J. L., Scodeller, E. A., and Bergmann, I. E. (1990). Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology* **177**(2), 780-3.
- Glaser, W., and Skern, T. (2000). Extremely efficient cleavage of eIF4G by picornaviral proteinases L and 2A in vitro. *FEBS Lett* **480**(2-3), 151-5.
- Gohara, D. W., Arnold, J. J., and Cameron, C. E. (2004). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): kinetic, thermodynamic, and structural analysis of ribonucleotide selection. *Biochemistry* **43**(18), 5149-58.
- Gohara, D. W., Crotty, S., Arnold, J. J., Yoder, J. D., Andino, R., and Cameron, C. E. (2000). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D<sup>pol</sup>). Structural, biochemical, and biological analysis of conserved structural motifs A and B. *J. Biol. Chem.* **275**(33), 25523-32.
- Gonzalez-Lopez, C., Arias, A., Pariente, N., Gomez-Mariano, G., and Domingo, E. (2004). Preextinction viral RNA can interfere with infectivity. *J Virol* **78**(7), 3319-24.

- Gorbalenya, A. E., Pringle, F. M., Zeddari, J. L., Luke, B. T., Cameron, C. E., Kalmakoff, J., Hanzlik, T. N., Gordon, K. H., and Ward, V. K. (2002). The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral RNA-dependent RNA polymerases of an ancient lineage. *J Mol Biol* **324**(1), 47-62.
- Goswami, B. B., Borek, E., Sharma, O. K., Fujitaki, J., and Smith, R. A. (1979). The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**(3), 830-6.
- Grande-Perez, A., Gomez-Mariano, G., Lowenstein, P. R., and Domingo, E. (2005). Mutagenesis-induced, large fitness variations with an invariant arenavirus consensus genomic nucleotide sequence. *J Virol* **79**(16), 10451-9.
- Grande-Pérez, A., Sierra, S., Castro, M. G., Domingo, E., and Lowenstein, P. R. (2002). Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(20), 12938-43.
- Gromeier, M., Wimmer, E., and Gorbalenya, A. E. (1999). Genetics, pathogenesis and evolution of picornaviruses. In "Origin and Evolution of Viruses" (E. Domingo, R. G. Webster, and J. J. Holland, Eds.), pp. 287-343. Academic Press, San Diego.
- Guarne, A., Tormo, J., Kirchweger, R., Pfistermueller, D., Fita, I., and Skern, T. (1998). Structure of the foot-and-mouth disease virus leader protease: a papain-like fold adapted for self-processing and eIF4G recognition. *Embo J* **17**(24), 7469-79.
- Hall, C. B., McBride, J. T., Walsh, E. E., Bell, D. M., Gala, C. L., Hildreth, S., Ten Eyck, L. G., and Hall, W. J. (1983). Aerosolized ribavirin treatment of infants with respiratory syncytial viral infection. A randomized double-blind study. *N Engl J Med* **308**(24), 1443-7.
- Hansen, J., Long, A. M., and Schultz, S. (1997a). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **15**, 1109-1122.
- Hansen, J. L., Long, A. M., and Schultz, S. C. (1997b). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **5**(8), 1109-22.
- Harris, D., Kaushik, N., Pandey, P. K., Yadav, P. N., and Pandey, V. N. (1998). Functional analysis of amino acid residues constituting the dNTP binding pocket of HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **273**(50), 33624-34.
- Harris, K. S., Brabant, W., Styrchak, S., Gall, A., and Daifuku, R. (2005). KP-1212/1461, a nucleoside designed for the treatment of HIV by viral mutagenesis. *Antiviral Res.* **67**(1), 1-9.
- Herold, J., and Andino, R. (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* **7**(3), 581-91.
- Herrera, M., Garcia-Arriaza, J., Pariente, N., Escarmis, C., and Domingo, E. (2007). Molecular basis for a lack of correlation between viral fitness and cell killing capacity. *PLoS Pathog* **3**(4), e53.
- Herrmann, E., Lee, J. H., Marinos, G., Modi, M., and Zeuzem, S. (2003). Effect of ribavirin on hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon. *Hepatology* **37**(6), 1351-8.
- Ho, D. D. (1995). Time to hit HIV, early and hard. *N. Engl. J. Med.* **333**(7), 450-1.
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**(6510), 123-6.
- Hofmann, W. P., Polta, A., Herrmann, E., Mihm, U., Kronenberger, B., Sonntag, T., Lohmann, V., Schonberger, B., Zeuzem, S., and Sarrazin, C. (2007). Mutagenic

- effect of ribavirin on hepatitis C nonstructural 5B quasispecies in vitro and during antiviral therapy. *Gastroenterology* **132**(3), 921-30.
- Holland, J. J., de la Torre, J. C., Clarke, D. K., and Duarte, E. (1991). Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J. Virol.* **65**(6), 2960-2967.
- Holland, J. J., Domingo, E., de la Torre, J. C., and Steinhauer, D. A. (1990). Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J. Virol.* **64**, 3960-3962.
- Holland, J. J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., and VandePol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**(4540), 1577-1585.
- Hong, Z., and Cameron, C. E. (2002). Pleiotropic mechanisms of ribavirin antiviral activities. *Prog Drug Res* **59**, 41-69.
- Hsu, E. C., Sarangi, F., Iorio, C., Sidhu, M. S., Udem, S. A., Dillehay, D. L., Xu, W., Rota, P. A., Bellini, W. J., and Richardson, C. D. (1998). A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J. Virol.* **72**(4), 2905-16.
- Huggins, J. W. (1989). Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev Infect Dis* **11 Suppl 4**, S750-61.
- Hultgren, C., Milich, D. R., Weiland, O., and Sallberg, M. (1998). The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* **79** ( Pt 10), 2381-91.
- Isnard, M., Granier, M., Frutos, R., Reynaud, B., and Peterschmitt, M. (1998). Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *J. Gen. Virol.* **79**, 3091-9.
- Jackson, T., Ellard, F. M., Ghazaleh, R. A., Brookes, S. M., Blakemore, W. E., Corteyn, A. H., Stuart, D. I., Newman, J. W., and King, A. M. (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **70**(8), 5282-7.
- Jäger, J., and Pata, J. D. (1999). Getting a grip: polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol* **9**(1), 21-8.
- Jang, S. J., Wang, L. F., Radkowski, M., Rakela, J., and Laskus, T. (1999). Differences between hepatitis C virus 5' untranslated region quasispecies in serum and liver. *J Gen Virol* **80** ( Pt 3), 711-6.
- Jordan, I., Briese, T., Averett, D. R., and Lipkin, W. I. (1999). Inhibition of Borna disease virus replication by ribavirin. *J Virol* **73**(9), 7903-6.
- Jordan, I., Briese, T., Fischer, N., Lau, J. Y., and Lipkin, W. I. (2000). Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J Infect Dis* **182**(4), 1214-7.
- Joyce, C. M., and Steitz, T. A. (1995). Polymerase structures and function: variations on a theme? *J Bacteriol* **177**(22), 6321-9.
- Kai, K., and Furuta, T. (1984). Isolation of paralysis-inducing murine leukemia viruses from Friend virus passaged in rats. *J Virol* **50**(3), 970-3.
- Kamal, S. M., Fehr, J., Roesler, B., Peters, T., and Rasenack, J. W. (2002). Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **123**(4), 1070-83.

- Kamal, S. M., Ismail, A., Graham, C. S., He, Q., Rasenack, J. W., Peters, T., Tawil, A. A., Fehr, J. J., Khalifa Kel, S., Madwar, M. M., and Koziel, M. J. (2004). Pegylated interferon alpha therapy in acute hepatitis C: relation to hepatitis C virus-specific T cell response kinetics. *Hepatology* **39**(6), 1721-31.
- Kanda, T., Yokosuka, O., Imazeki, F., Tanaka, M., Shino, Y., Shimada, H., Tomonaga, T., Nomura, F., Nagao, K., Ochiai, T., and Saisho, H. (2004). Inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells: ribavirin induces mutagenesis in HCV RNA. *J. Viral. Hepat.* **11**(6), 479-87.
- Kentsis, A., Topisirovic, I., Culjkovic, B., Shao, L., and Borden, K. L. (2004). Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(52), 18105-10.
- Kettenberger, H., Armache, K. J., and Cramer, P. (2004). Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS. *Mol Cell* **16**(6), 955-65.
- Kim, B., Ayran, J. C., Sagar, S. G., Adman, E. T., Fuller, S. M., Tran, N. H., and Horrigan, J. (1999). New human immunodeficiency virus, type 1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) mutants with increased fidelity of DNA synthesis. Accuracy, template binding, and processivity. *J Biol Chem* **274**(39), 27666-73.
- Kim, T. W., Brieba, L. G., Ellenberger, T., and Kool, E. T. (2006). Functional evidence for a small and rigid active site in a high fidelity DNA polymerase: probing T7 DNA polymerase with variably sized base pairs. *J Biol Chem* **281**(4), 2289-95.
- Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A., and Steitz, T. A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**(5065), 1783-90.
- Kuhn, R., Luz, N., and Beck, E. (1990). Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **64**(10), 4625-31.
- Kunkel, T. A., and Alexander, P. S. (1986). The base substitution fidelity of eucaryotic DNA polymerases. Mismatching frequencies, site preferences, insertion preferences, and base substitution by dislocation. *J Biol Chem* **261**(1), 160-6.
- Kunz, S., Sevilla, N., McGavern, D. B., Campbell, K. P., and Oldstone, M. B. (2001). Molecular analysis of the interaction of LCMV with its cellular receptor [alpha]-dystroglycan. *J Cell Biol* **155**(2), 301-10.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- Lanford, R. E., Chavez, D., Guerra, B., Lau, J. Y., Hong, Z., Brasky, K. M., and Beames, B. (2001). Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes. *J Virol* **75**(17), 8074-81.
- Larder, B. A. (1994). Interactions between drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Gen Virol* **75** ( Pt 5), 951-7.
- Lázaro, E., Escarmís, C., Domingo, E., and Manrubia, S. C. (2002). Modeling viral genome fitness evolution associated with serial bottleneck events: evidence of stationary states of fitness. *J Virol* **76**(17), 8675-81.
- Lazaro, E., Escarmis, C., Perez-Mercader, J., Manrubia, S. C., and Domingo, E. (2003). Resistance of virus to extinction on bottleneck passages: Study of a decaying and fluctuating pattern of fitness loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**(19), 10830-10835.

- Lea, S., Hernandez, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J., and et al. (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**(2), 123-39.
- Lee, C. H., Gilbertson, D. L., Novella, I. S., Huerta, R., Domingo, E., and Holland, J. J. (1997). Negative effects of chemical mutagenesis on the adaptive behavior of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **71**(5), 3636-3640.
- Lemon, S. M. (1997a). Targeting the Achilles' heel of hepatitis C virus. *Hepatology* **25**(4), 1035-7.
- Lemon, S. M. (1997b). Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clin Chem* **43**(8 Pt 2), 1494-9.
- Loeb, L. A., Essigmann, J. M., Kazazi, F., Zhang, J., Rose, K. D., and Mullins, J. I. (1999). Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1492-1497.
- Loeb, L. A., and Mullins, J. I. (2000). Lethal mutagenesis of HIV by mutagenic ribonucleoside analogs. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **13**, 1-3.
- Loeffler, F., and Frosch, P. (1898). Berichte der kommission zur erforschung der maul- und klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, part I, **23**, 371-391.
- López-Bueno, A., Villarreal, L. P., and Almendral, J. M. (2006). Parvovirus variation for disease: A difference with RNA viruses? In "Current Topics in Microbiol. and Immunol." Vol. 299, pp. 349-370.
- Love, R. A., Maegley, K. A., Yu, X., Ferre, R. A., Lingardo, L. K., Diehl, W., Parge, H. E., Dragovich, P. S., and Fuhrman, S. A. (2004). The crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from human rhinovirus: a dual function target for common cold antiviral therapy. *Structure* **12**(8), 1533-44.
- Lowe, J. K., Brox, L., and Henderson, J. F. (1977). Consequences of inhibition of guanine nucleotide synthesis by mycophenolic acid and virazole. *Cancer Res* **37**(3), 736-43.
- Lyle, J. M., Bullitt, E., Bienz, K., and Kirkegaard, K. (2002a). Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **296**(5576), 2218-22.
- Lyle, J. M., Clewell, A., Richmond, K., Richards, O. C., Hope, D. A., Schultz, S. C., and Kirkegaard, K. (2002b). Similar structural basis for membrane localization and protein priming by an RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **277**(18), 16324-31.
- Maag, D., Castro, C., Hong, Z., and Cameron, C. E. (2001). Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J. Biol. Chem.* **276**(49), 46094-8.
- Maciejewski, M. W., Shin, R., Pan, B., Marintchev, A., Denninger, A., Mullen, M. A., Chen, K., Gryk, M. R., and Mullen, G. P. (2001). Solution structure of a viral DNA repair polymerase. *Nat Struct Biol* **8**(11), 936-41.
- Mangia, A., Santoro, R., Minerva, N., Ricci, G. L., Carretta, V., Persico, M., Vinelli, F., Scotto, G., Bacca, D., Annese, M., Romano, M., Zechini, F., Sogari, F., Spirito, F., and Andriulli, A. (2005). Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* **352**(25), 2609-17.
- Marcotte, L. L., Wass, A. B., Gohara, D. W., Pathak, H. B., Arnold, J. J., Filman, D. J., Cameron, C. E., and Hogle, J. M. (2007). Crystal structure of poliovirus 3CD protein: virally encoded protease and precursor to the RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **81**(7), 3583-96.

- Marroqui, L., Estepa, A., and Perez, L. (2007). Assessment of the inhibitory effect of ribavirin on the rainbow trout rhabdovirus VHSV by real-time reverse-transcription PCR. *Vet Microbiol* **122**(1-2), 52-60.
- Martinez-Salas, E., and Fernandez-Miragall, O. (2004). Picornavirus IRES: structure function relationship. *Curr Pharm Des* **10**(30), 3757-67.
- Martinez-Salas, E., Lopez de Quinto, S., Ramos, R., and Fernandez-Miragall, O. (2002). IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* **84**(8), 755-63.
- Martínez-Salas, E., Ramos, R., Lafuente, E., and López de Quinto, S. (2001). Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J. Gen. Virol.* **82**(Pt 5), 973-84.
- Martínez, M. A., Carrillo, C., González-Candelas, F., Moya, A., Domingo, E., and Sobrino, F. (1991). Fitness alteration of foot-and-mouth disease virus mutants: measurement of adaptability of viral quasispecies. *J. Virol.* **65**(7), 3954-3957.
- Mason, P. W., Bezborodova, S. V., and Henry, T. M. (2002). Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **76**(19), 9686-94.
- Mason, P. W., Grubman, M. J., and Baxt, B. (2003). Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res.* **91**(1), 9-32.
- Masuda, M., Remington, M. P., Hoffman, P. M., and Ruscetti, S. K. (1992). Molecular characterization of a neuropathogenic and nonerythroleukemogenic variant of Friend murine leukemia virus PVC-211. *J Virol* **66**(5), 2798-806.
- Masuda, M., Hanson, C. A., Alvord, W. G., Hoffman, P. M., and Ruscetti, S. K. (1996a). Effects of subtle changes in the SU protein of ecotropic murine leukemia virus on its brain capillary endothelial cell tropism and interference properties. *Virology* **215**(2), 142-51.
- Masuda, M., Hanson, C. A., Hoffman, P. M., and Ruscetti, S. K. (1996b). Analysis of the unique hamster cell tropism of ecotropic murine leukemia virus PVC-211. *J Virol* **70**(12), 8534-9.
- Mateu, M. G. (1995). Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res* **38**(1), 1-24.
- Mateu, M. G., Da Silva, J. L., Rocha, E., De Brum, D. L., Alonso, A., Enjuanes, L., Domingo, E., and Barahona, H. (1988). Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology* **167**(1), 113-24.
- Mateu, M. G., Martinez, M. A., Capucci, L., Andreu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E., and Domingo, E. (1990). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J Gen Virol* **71** ( Pt 3), 629-37.
- Matloubian, M., Kolhekar, S. R., Somasundaram, T., and Ahmed, R. (1993). Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **67**(12), 7340-9.
- McCormick, J. B., Getchell, J. P., Mitchell, S. W., and Hicks, D. R. (1984). Ribavirin suppresses replication of lymphadenopathy-associated virus in cultures of human adult T lymphocytes. *Lancet* **2**(8416), 1367-9.
- McCormick, J. B., King, I. J., Webb, P. A., Scribner, C. L., Craven, R. B., Johnson, K. M., Elliott, L. H., and Belmont-Williams, R. (1986). Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N. Engl. J. Med.* **314**(1), 20-6.
- McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Schiff, E. R., Shiffman, M. L., Lee, W. M., Rustgi, V. K., Goodman, Z. D., Ling, M. H., Cort, S., and Albrecht, J. K. (1998).



- Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* **339**(21), 1485-92.
- Medina, R. A., Mirowsky-Garcia, K., Hutt, J., and Hjelle, B. (2007). Ribavirin, human convalescent plasma and anti-beta3 integrin antibody inhibit infection by Sin Nombre virus in the deer mouse model. *J Gen Virol* **88**(Pt 2), 493-505.
- Mikkelsen, J. G., and Pedersen, F. S. (2000). Genetic reassortment and patch repair by recombination in retroviruses. *J Biomed Sci* **7**(2), 77-99.
- Miller, V., and Larder, B. A. (2001). Mutational patterns in the HIV genome and cross-resistance following nucleoside and nucleotide analogue drug exposure. *Antivir. Ther.* **6 Suppl 3**, 25-44.
- Mirmomeni, M. H., Hughes, P. J., and Stanway, G. (1997). An RNA tertiary structure in the 3' untranslated region of enteroviruses is necessary for efficient replication. *J Virol* **71**(3), 2363-70.
- Moffat, K., Knox, C., Howell, G., Clark, S. J., Yang, H., Belsham, G. J., Ryan, M., and Wileman, T. (2007). Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth disease virus 2BC protein is reproduced by coexpression of 2B with 2C, and the site of inhibition is determined by the subcellular location of 2C. *J Virol* **81**(3), 1129-39.
- Morgenstern, B., Michaelis, M., Baer, P. C., Doerr, H. W., and Cinatl, J., Jr. (2005). Ribavirin and interferon-beta synergistically inhibit SARS-associated coronavirus replication in animal and human cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **326**(4), 905-8.
- Morse, S. S., Ed. (1994). *The Evolutionary Biology of Viruses*. New York: Raven Press.
- Muller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mut. Res.* **1**, 2-9.
- Muller, W. E., Maidhof, A., Taschner, H., and Zahn, R. K. (1977). Virazole (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide; a cytostatic agent. *Biochem Pharmacol* **26**(11), 1071-5.
- Murphy, F. A. (1994). New, emerging, and reemerging infectious diseases. *Adv. Virus Res.* **43**, 1-52.
- Murphy, F. A., and Nathanson, N. (1994). The emergence of new virus diseases: an overview. *Seminars in Virology* **5**, 87-102.
- Murphy, M. E., Kariwa, H., Mizutani, T., Tanabe, H., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Takashima, I. (2001). Characterization of in vitro and in vivo antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *J Vet Med Sci* **63**(6), 637-45.
- Murray, K. E., and Barton, D. J. (2003). Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **77**(8), 4739-50.
- Myers, T. W., and Gelfand, D. H. (1991). Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **30**(31), 7661-6.
- Nájera, I., Holguín, A., Quiñones-Mateu, M. E., Muñoz-Fernández, M. A., Nájera, R., López-Galíndez, C., and Domingo, E. (1995). Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J. Virol.* **69**(1), 23-31.
- Nayak, A., Goodfellow, I. G., and Belsham, G. J. (2005). Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J Virol* **79**(12), 7698-706.

- Nayak, A., Goodfellow, I. G., Woolaway, K. E., Birtley, J., Curry, S., and Belsham, G. J. (2006). Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol* **80**(19), 9865-75.
- Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J., and Perelson, A. S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**(5386), 103-7.
- Ng, K. K., Cherney, M. M., Vazquez, A. L., Machin, A., Alonso, J. M., Parra, F., and James, M. N. (2002). Crystal structures of active and inactive conformations of a caliciviral RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **277**(2), 1381-7.
- Ng, K. K., Pendas-Franco, N., Rojo, J., Boga, J. A., Machin, A., Alonso, J. M., and Parra, F. (2004). Crystal structure of norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft. *J Biol Chem* **279**(16), 16638-45.
- Nichol, S. T., Spiropoulou, C. F., Morzunov, S., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Feldmann, H., Sanchez, A., Childs, J., Zaki, S., and Peters, C. J. (1993). Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* **262**(5135), 914-7.
- Ning, Q., Brown, D., Parodo, J., Catral, M., Gorczynski, R., Cole, E., Fung, L., Ding, J. W., Liu, M. F., Rotstein, O., Phillips, M. J., and Levy, G. (1998). Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* **160**(7), 3487-93.
- Novella, I. S., Duarte, E. A., Elena, S. F., Moya, A., Domingo, E., and Holland, J. J. (1995). Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(13), 5841-5844.
- Núñez, J. I., Baranowski, E., Molina, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Sanchez, C., Domingo, E., and Sobrino, F. (2001). A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J Virol* **75**(8), 3977-83.
- O'Donnell, V. K., Pacheco, J. M., Henry, T. M., and Mason, P. W. (2001). Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* **287**(1), 151-62.
- O'Reilly, E. K., and Kao, C. C. (1998). Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* **252**(2), 287-303.
- Osheroff, W. P., Beard, W. A., Wilson, S. H., and Kunkel, T. A. (1999). Base substitution specificity of DNA polymerase beta depends on interactions in the DNA minor groove. *J Biol Chem* **274**(30), 20749-52.
- Page, T., and Connor, J. D. (1990). The metabolism of ribavirin in erythrocytes and nucleated cells. *Int J Biochem* **22**(4), 379-83.
- Pariante, N., Airaksinen, A., and Domingo, E. (2003). Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **77**(12), 7131-8.
- Pariante, N., Sierra, S., Lowenstein, P. R., and Domingo, E. (2001). Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *J. Virol.* **75**(20), 9723-30.
- Parker, W. B. (2005). Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res.* **107**(2), 165-71.

- Paul, A. V., Peters, J., Mugavero, J., Yin, J., van Boom, J. H., and Wimmer, E. (2003). Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. *J Virol* **77**(2), 891-904.
- Paul, A. V., Rieder, E., Kim, D. W., van Boom, J. H., and Wimmer, E. (2000). Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* **74**(22), 10359-70.
- Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D., and Wimmer, E. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* **393**(6682), 280-4.
- Pawlotsky, J. M. (2000). Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology* **32**(5), 889-96.
- Pawlotsky, J. M., Germanidis, G., Neumann, A. U., Pellerin, M., Frainais, P. O., and Dhumeaux, D. (1998). Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* **72**(4), 2795-805.
- Peavy, D. L., Powers, C. N., and Knight, V. (1981). Inhibition of murine plaque-forming cell responses in vivo by ribavirin. *J Immunol* **126**(3), 861-4.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**(6180), 320-325.
- Perales, C., Mateo, R., Mateu, M. G., and Domingo, E. (2007). Insights into RNA virus mutant spectrum and lethal mutagenesis events: replicative interference and complementation by multiple point mutants. *J Mol Biol* **369**(4), 985-1000.
- Pereira, H. G. (1977). Subtyping foot-and-mouth disease virus. *Devel. In Biol. Standard* **35**, 167-174.
- Pereira, H. G. (1981). Foot-and-mouth disease virus. In "Virus Diseases of Food animals" (R. P. G. Gibbs, Ed.), Vol. 2, pp. 333-363. Academic Press, New York.
- Pfeiffer, J. K., and Kirkegaard, K. (2003). A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**(12), 7289-94.
- Pfeiffer, J. K., and Kirkegaard, K. (2005a). Increased fidelity reduces poliovirus fitness under selective pressure in mice. *PLoS Pathogens* **1**, 102-110.
- Pfeiffer, J. K., and Kirkegaard, K. (2005b). Ribavirin resistance in hepatitis C virus replicon-containing cell lines conferred by changes in the cell line or mutations in the replicon RNA. *J. Virol.* **79**(4), 2346-55.
- Pfister, T., and Wimmer, E. (1999). Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* **274**(11), 6992-7001.
- Piccone, M. E., Zellner, M., Kumosinski, T. F., Mason, P. W., and Grubman, M. J. (1995). Identification of the active-site residues of the L proteinase of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **69**(8), 4950-6.
- Pillay, D., and Zambon, M. (1998). Antiviral drug resistance. *Bmj* **317**(7159), 660-2.
- Pincus, S. E., Diamond, D. C., Emini, E. A., and Wimmer, E. (1986). Guanidine-selected mutants of poliovirus: mapping of point mutations to polypeptide 2C. *J Virol* **57**(2), 638-46.
- Pincus, S. E., Rohl, H., and Wimmer, E. (1987). Guanidine-dependent mutants of poliovirus: identification of three classes with different growth requirements. *Virology* **157**(1), 83-8.

- Pincus, S. E., and Wimmer, E. (1986). Production of guanidine-resistant and -dependent poliovirus mutants from cloned cDNA: mutations in polypeptide 2C are directly responsible for altered guanidine sensitivity. *J Virol* **60**(2), 793-6.
- Pleij, C. W., Rietveld, K., and Bosch, L. (1985). A new principle of RNA folding based on pseudoknotting. *Nucleic Acids Res* **13**(5), 1717-31.
- Pringle, C. R. (1970). Genetic characteristics of conditional lethal mutants of vesicular stomatitis virus induced by 5-fluorouracil, 5-azacytidine, and ethyl methane sulfonate. *J. Virol.* **5**(5), 559-567.
- Quinones-Mateu, M. E., and Arts, E. J. (2006). Virus fitness: concept, quantification, and application to HIV population dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**, 83-140.
- Quiñones-Mateu, M. E., and Arts, E. (2006). Virus fitness: concept, quantification, and application to HIV population dynamics. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* **299**, 83-140.
- Racaniello, V. R. (2001). *Picornaviridae: The viruses and their replication*. In "Fields Virology" (D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus, Eds.), pp. 685-722. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Rankin, J. T., Jr., Eppes, S. B., Antczak, J. B., and Joklik, W. K. (1989). Studies on the mechanism of the antiviral activity of ribavirin against reovirus. *Virology* **168**(1), 147-58.
- Rezende, L. F., and Prasad, V. R. (2004). Nucleoside-analog resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase and their influence on polymerase fidelity and viral mutation rates. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(9), 1716-34.
- Richman, D. D. (1994). Resistance, drug failure, and disease progression. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **10**(8), 901-5.
- Roberts, P. J., and Belsham, G. J. (1995). Identification of critical amino acids within the foot-and-mouth disease virus leader protein, a cysteine protease. *Virology* **213**(1), 140-6.
- Rodriguez, M., McCormick, J. B., and Weissenbacher, M. C. (1986). Antiviral effect of ribavirin on Junin virus replication in vitro. *Rev Argent Microbiol* **18**(2), 69-74.
- Rodriguez, P. L., and Carrasco, L. (1993). Poliovirus protein 2C has ATPase and GTPase activities. *J Biol Chem* **268**(11), 8105-10.
- Rodriguez, P. L., and Carrasco, L. (1995). Poliovirus protein 2C contains two regions involved in RNA binding activity. *J Biol Chem* **270**(17), 10105-12.
- Rowlands, D. J., Ed. (2003). Foot-and-mouth disease. *Virus Res.* **91**, 1-161.
- Rowlands, D. J. (1999). "Foot-and-mouth disease viruses (Picornaviridae)." *Encyclopedia of Virology* (A. a. E. Granoff, R.G., Ed.) Academic Press, London.
- Ruiz-Jarabo, C. M., Arias, A., Baranowski, E., Escarmís, C., and Domingo, E. (2000). Memory in viral quasispecies. *J. Virol.* **74**, 3543-3547.
- Ruiz-Jarabo, C. M., Arias, A., Molina-Paris, C., Briones, C., Baranowski, E., Escarmis, C., and Domingo, E. (2002). Duration and fitness dependence of quasispecies memory. *J Mol Biol* **315**(3), 285-96.
- Ruiz-Jarabo, C. M., Ly, C., Domingo, E., and de la Torre, J. C. (2003). Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology* **308**(1), 37-47.
- Ryan, M. D., and Flint, M. (1997). Virus-encoded proteinases of the picornavirus supergroup. *J Gen Virol* **78** ( Pt 4), 699-723.

- Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A., and Mason, P. W. (1997). Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J. Virol.* **71**(7), 5115-5123.
- Saiz, M., Gomez, S., Martinez-Salas, E., and Sobrino, F. (2001). Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol* **82**(Pt 1), 93-101.
- Salt, J. S. (1993). The carrier state in foot and mouth disease--an immunological review. *Br Vet J* **149**(3), 207-223.
- Salt, J. (2004). Persistence of foot-and-mouth disease virus. In "Foot-and-mouth disease: current perspectives" (Sobrino, F. and Domingo, E., Eds), pp. 103-145. Horizon Bioscience, Wymondham, England.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Sarafianos, S. G., Hughes, S. H., and Arnold, E. (2004). Designing anti-AIDS drugs targeting the major mechanism of HIV-1 RT resistance to nucleoside analog drugs. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(9), 1706-15.
- Sarnow, P. (2003). Viral internal ribosome entry site elements: novel ribosome-RNA complexes and roles in viral pathogenesis. *J Virol* **77**(5), 2801-6.
- Saunders, K., and King, A. M. (1982). Guanidine-resistant mutants of aphthovirus induce the synthesis of an altered nonstructural polypeptide, P34. *J. Virol.* **42**(2), 389-94.
- Saunders, K., King, A. M., McCahon, D., Newman, J. W., Slade, W. R., and Forss, S. (1985). Recombination and oligonucleotide analysis of guanidine-resistant foot-and-mouth disease virus mutants. *J. Virol.* **56**(3), 921-9.
- Scheidel, L. M., Durbin, R. K., and Stollar, V. (1987). Sindbis virus mutants resistant to mycophenolic acid and ribavirin. *Virology* **158**(1), 1-7.
- Scheidel, L. M., and Stollar, V. (1991). Mutations that confer resistance to mycophenolic acid and ribavirin on Sindbis virus map to the nonstructural protein nsP1. *Virology* **181**(2), 490-9.
- Schinkel, J., de Jong, M. D., Bruning, B., van Hoek, B., Spaan, W. J., and Kroes, A. C. (2003). The potentiating effect of ribavirin on interferon in the treatment of hepatitis C: lack of evidence for ribavirin-induced viral mutagenesis. *Antivir Ther* **8**(6), 535-40.
- Schuitemaker, H., Koot, M., Kootstra, N. A., Dercksen, M. W., de Goede, R. E., van Steenwijk, R. P., Lange, J. M., Schattenkerk, J. K., Miedema, F., and Tersmette, M. (1992). Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* **66**(3), 1354-60.
- Schuster, P., and Stadler, P. F. (1999). Nature and evolution of early replicons. In "Origin and Evolution of Viruses" (E. Domingo, R. G. Webster, and J. J. Holland, Eds.), pp. 1-24. Academic Press, San Diego.
- Semler, B. L., and Wimmer, E., Eds. (2002). Molecular Biology of Picornaviruses. Washington, D.C.: ASM Press.
- Serrano, P., Pulido, M. R., Saiz, M., and Martinez-Salas, E. (2006). The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *J Gen Virol* **87**(Pt 10), 3013-22.

- Severson, W. E., Schmaljohn, C. S., Javadian, A., and Jonsson, C. B. (2003). Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J. Virol.* **77**(1), 481-8.
- Sevilla, N., Kunz, S., Holz, A., Lewicki, H., Homann, D., Yamada, H., Campbell, K. P., de La Torre, J. C., and Oldstone, M. B. (2000). Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192**(9), 1249-60.
- Shigeta, S., Mori, S., Watanabe, J., Soeda, S., Takahashi, K., and Yamase, T. (1997). Synergistic anti-influenza virus A (H1N1) activities of PM-523 (polyoxometalate) and ribavirin in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* **41**(7), 1423-7.
- Showalter, A. K., Byeon, I. J., Su, M. I., and Tsai, M. D. (2001). Solution structure of a viral DNA polymerase X and evidence for a mutagenic function. *Nat Struct Biol* **8**(11), 942-6.
- Sierra, M., Airaksinen, A., Gonzalez-Lopez, C., Agudo, R., Arias, A., and Domingo, E. (2007). Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J Virol* **81**(4), 2012-24.
- Sierra, S., Davila, M., Lowenstein, P. R., and Domingo, E. (2000). Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis: influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *J Virol* **74**(18), 8316-23.
- Simmons, A., Whitehead, R. P., Kolokoltsov, A. A., and Davey, R. A. (2006). Use of recombinant lentivirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein G for efficient generation of human anti-cancer chimeric T cells by transduction of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Virol J* **3**, 8.
- Sintchak, M. D., and Nimmesgern, E. (2000). The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology* **47**(2-3), 163-84.
- Smee, D. F., Bray, M., and Huggins, J. W. (2001). Antiviral activity and mode of action studies of ribavirin and mycophenolic acid against orthopoxviruses in vitro. *Antivir Chem Chemother* **12**(6), 327-35.
- Smee, D. F., Morris, J. L., Barnard, D. L., and Van Aerschot, A. (1992). Selective inhibition of arthropod-borne and arenaviruses in vitro by 3'-fluoro-3'-deoxyadenosine. *Antiviral Res* **18**(2), 151-62.
- Smolinski, M. S., Hamburg, M. A., and Lederberg, J., Eds. (2003). Microbial Threats to Health. Emergence, Detection and Response. Washington DC: The National Academies Press.
- Sobrinho, F., Davila, M., Ortin, J., and Domingo, E. (1983). Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**(2), 310-8.
- Sobrinho, F., and Domingo, E., Eds. (2004). Foot-and-Mouth Disease: Current Perspectives. Horizon Bioscience. Wymondham, England.
- Sobrinho, F., Sáiz, M., Jiménez-Clavero, M. A., Núñez, J. I., Rosas, M. F., Baranowski, E., and Ley, V. (2001). Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.* **32**, 1-30.
- Steinhauer, D. A., Domingo, E., and Holland, J. J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* **122**(2), 281-288.
- Steitz, T. A. (1998). A mechanism for all polymerases. *Nature* **391**(6664), 231-2.
- Steitz, T. A. (1999). DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem* **274**(25), 17395-8.

- Stoker, M., and Macpherson, I. (1964). Syrian Hamster Fibroblast Cell Line Bhk21 and Its Derivatives. *Nature* **203**, 1355-7.
- Streeter, D. G., Witkowski, J. T., Khare, G. P., Sidwell, R. W., Bauer, R. J., Robins, R. K., and Simon, L. N. (1973). Mechanism of action of 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**(4), 1174-8.
- Stuyver, L. J., Lostia, S., Patterson, S. E., Clark, J. L., Watanabe, K. A., Otto, M. J., and Pankiewicz, K. W. (2002). Inhibitors of the IMPDH enzyme as potential anti-bovine viral diarrhoea virus agents. *Antivir Chem Chemother* **13**(6), 345-52.
- Sun, Y., Chung, D. H., Chu, Y. K., Jonsson, C. B., and Parker, W. B. (2007). Activity of ribavirin against Hantaan virus correlates with production of ribavirin-5'-triphosphate, not with inhibition of IMP dehydrogenase. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(1), 84-8.
- Sutmoller, P., Barteling, S. S., Olascoaga, R. C., and Sumption, K. J. (2003). Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* **91**(1), 101-44.
- Swetina, J., and Schuster, P. (1982). Self-replication with errors. A model for polynucleotide replication. *Biophys. Chem.* **16**(4), 329-345.
- Tahirov, T. H., Temiakov, D., Anikin, M., Patlan, V., McAllister, W. T., Vassilyev, D. G., and Yokoyama, S. (2002). Structure of a T7 RNA polymerase elongation complex at 2.9 Å resolution. *Nature* **420**(6911), 43-50.
- Takeda, N., Kuhn, R. J., Yang, C. F., Takegami, T., and Wimmer, E. (1986). Initiation of poliovirus plus-strand RNA synthesis in a membrane complex of infected HeLa cells. *J. Virol.* **60**(1), 43-53.
- Takhampunya, R., Ubol, S., Houng, H. S., Cameron, C. E., and Padmanabhan, R. (2006). Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin. *J Gen Virol* **87**(Pt 7), 1947-52.
- Tam, R. C., Pai, B., Bard, J., Lim, C., Averett, D. R., Phan, U. T., and Milovanovic, T. (1999). Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J Hepatol* **30**(3), 376-82.
- Tapia, N., Fernandez, G., Parera, M., Gomez-Mariano, G., Clotet, B., Quinones-Mateu, M., Domingo, E., and Martinez, M. A. (2005). Combination of a mutagenic agent with a reverse transcriptase inhibitor results in systematic inhibition of HIV-1 infection. *Virology* **338**(1), 1-8.
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., and Yanagi, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**(6798), 893-7.
- Thompson, A. A., and Peersen, O. B. (2004a). Structural basis for proteolysis-dependent activation of the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *EMBO J.* **23**(17), 3462-71.
- Thompson, A. A., and Peersen, O. B. (2004b). Structural basis for proteolysis-dependent activation of the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Embo J* **23**(17), 3462-71.
- Tiley, L., King, A. M., and Belsham, G. J. (2003). The foot-and-mouth disease virus cis-acting replication element (cre) can be complemented in trans within infected cells. *J Virol* **77**(3), 2243-6.
- Timoney, J. F., Gillespie, J.H., Scott, F. W., and Barlough, J. E. (1988). Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. *Cornell University Press, Ithaca*, 647-667.
- Toja, M. (1997). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.
- Toja, M., Escarmis, C., and Domingo, E. (1999). Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications

- for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res.* **64**(2), 161-71.
- Toltzis, P., O'Connell, K., and Patterson, J. L. (1988). Effect of phosphorylated ribavirin on vesicular stomatitis virus transcription. *Antimicrob Agents Chemother* **32**(4), 492-7.
- Traut, T. W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* **140**(1), 1-22.
- Tu, Z., Chapman, N. M., Hufnagel, G., Tracy, S., Romero, J. R., Barry, W. H., Zhao, L., Currey, K., and Shapiro, B. (1995). The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region. *J. Virol.* **69**(8), 4607-18.
- Tumpey, T. M., Maines, T. R., Van Hoeven, N., Glaser, L., Solorzano, A., Pappas, C., Cox, N. J., Swayne, D. E., Palese, P., Katz, J. M., and Garcia-Sastre, A. (2007). A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science* **315**(5812), 655-9.
- van Bekkum, J. G., Frenke, H. S., Frederiks, H. H. J., and Frenkel, S. (1959). Observations on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeneesk.* **84**, 1159-1164.
- van Kuppeveld, F. J., Melchers, W. J., Kirkegaard, K., and Doedens, J. R. (1997). Structure-function analysis of coxsackie B3 virus protein 2B. *Virology* **227**(1), 111-8.
- van Regenmortel, M. H., and Mahy, B. W. (2004). Emerging issues in virus taxonomy. *Emerg Infect Dis* **10**(1), 8-13.
- van Tiel, F. H., Harmsen, M., Kraaijeveld, C. A., and Snippe, H. (1986). Inhibition of Semliki Forest virus multiplication by ribavirin: a potential method for the monitoring of antiviral agents in serum. *J Virol Methods* **14**(2), 119-25.
- Vignuzzi, M., Stone, J. K., and Andino, R. (2005). Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Res.* **107**(2), 173-81.
- Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E., and Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**, 344-348.
- Vo, N. V., Young, K. C., and Lai, M. M. C. (2003). Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. *Biochemistry* **42**(35), 10462-71.
- Volckaert, G., and Fiers, W. (1977). Micro thin-layer techniques for rapid sequence analysis of 32P-labeled RNA: double digestion and pancreatic ribonuclease analyses. *Anal. Biochem.* **83**(1), 228-39.
- Volkenstein, M. V. (1994). "Physical approaches to biological evolution." Springer-Verlag, Berlin.
- Wang, W. K., Dudek, T., Zhao, Y. J., Brumblay, H. G., Essex, M., and Lee, T. H. (1998). CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10), 5740-5.
- Watts, D. M., Ussery, M. A., Nash, D., and Peters, C. J. (1989). Inhibition of Crimean-Congo hemorrhagic fever viral infectivity yields in vitro by ribavirin. *Am J Trop Med Hyg* **41**(5), 581-5.
- Weaver, S. C. (1998). Recurrent emergence of Venezuelan equine encephalomyelitis. In "Emerging Infections" (W. M. Sheld, and J. Hughes, Eds.), Vol. I, pp. 27-42. ASM Press, Washington DC.



- Webster, R. G. (1999). Antigenic variation in influenza viruses. In "Origin and Evolution of Viruses" (E. Domingo, R. G. Webster, and J. J. Holland, Eds.), pp. 377-390. Academic Press, San Diego.
- Webster, R. G., Laver, W. G., Air, G. M., and Schild, G. C. (1982). Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature* **296**(5853), 115-21.
- Willis, R. C., Carson, D. A., and Seegmiller, J. E. (1978). Adenosine kinase initiates the major route of ribavirin activation in a cultured human cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(7), 3042-4.
- Willis, S. H., Kazmierczak, K. M., Carter, R. H., and Rothman-Denes, L. B. (2002). N4 RNA polymerase II, a heterodimeric RNA polymerase with homology to the single-subunit family of RNA polymerases. *J Bacteriol* **184**(18), 4952-61.
- Wimmer, E., Hellen, C. U., and Cao, X. (1993). Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 353-436.
- Witwer, C., Rauscher, S., Hofacker, I. L., and Stadler, P. F. (2001). Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic Acids Res* **29**(24), 5079-89.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Diver, W. P., Graham, M., Bateman, C., Baker, D. J., and Smith, S. S. (1988). RglB facilitated cloning of highly methylated eukaryotic DNA: the human L1 transposon, plant DNA, and DNA methylated in vitro with human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **16**(10), 4465-82.
- Woychik, N. A., and Hampsey, M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* **108**(4), 453-63.
- Wray, S. K., Gilbert, B. E., and Knight, V. (1985a). Effect of ribavirin triphosphate on primer generation and elongation during influenza virus transcription in vitro. *Antiviral Res* **5**(1), 39-48.
- Wray, S. K., Gilbert, B. E., Noall, M. W., and Knight, V. (1985b). Mode of action of ribavirin: effect of nucleotide pool alterations on influenza virus ribonucleoprotein synthesis. *Antiviral Res* **5**(1), 29-37.
- Wray, S. K., Smith, R. H., Gilbert, B. E., and Knight, V. (1986). Effects of selenazofurin and ribavirin and their 5'-triphosphates on replicative functions of influenza A and B viruses. *Antimicrob Agents Chemother* **29**(1), 67-72.
- Wyde, P. R., Chetty, S. N., Jewell, A. M., Boivin, G., and Piedra, P. A. (2003). Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res* **60**(1), 51-9.
- Wyde, P. R., Moore-Poveda, D. K., De Clercq, E., Neyts, J., Matsuda, A., Minakawa, N., Guzman, E., and Gilbert, B. E. (2000). Use of cotton rats to evaluate the efficacy of antivirals in treatment of measles virus infections. *Antimicrob Agents Chemother* **44**(5), 1146-52.
- Xiang, W., Cuconati, A., Hope, D., Kirkegaard, K., and Wimmer, E. (1998). Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J Virol* **72**(8), 6732-41.
- Xiang, W., Cuconati, A., Paul, A. V., Cao, X., and Wimmer, E. (1995a). Molecular dissection of the multifunctional poliovirus RNA-binding protein 3AB. *Rna* **1**(9), 892-904.
- Xiang, W., Harris, K. S., Alexander, L., and Wimmer, E. (1995b). Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J Virol* **69**(6), 3658-67.

- Xu, X., Liu, Y., Weiss, S., Arnold, E., Sarafianos, S. G., and Ding, J. (2003). Molecular model of SARS coronavirus polymerase: implications for biochemical functions and drug design. *Nucleic Acids Res* **31**(24), 7117-30.
- Yin, J., Paul, A. V., Wimmer, E., and Rieder, E. (2003). Functional dissection of a poliovirus cis-acting replication element [PV-cre(2C)]: analysis of single- and dual-cre viral genomes and proteins that bind specifically to PV-cre RNA. *J Virol* **77**(9), 5152-66.
- Young, K. C., Lindsay, K. L., Lee, K. J., Liu, W. C., He, J. W., Milstein, S. L., and Lai, M. M. (2003). Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology* **38**(4), 869-878.
- Yuste, E., López-Galíndez, C., and Domingo, E. (2000). Unusual distribution of mutations associated with serial bottleneck passages of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **74**(20), 9546-52.
- Yuste, E., Sánchez-Palomino, S., Casado, C., Domingo, E., and López-Galíndez, C. (1999). Drastic fitness loss in human immunodeficiency virus type 1 upon serial bottleneck events. *J. Virol.* **73**(4), 2745-2751.
- Zhang, Y. J., Hatzioannou, T., Zang, T., Braaten, D., Luban, J., Goff, S. P., and Bieniasz, P. D. (2002). Envelope-dependent, cyclophilin-independent effects of glycosaminoglycans on human immunodeficiency virus type 1 attachment and infection. *J Virol* **76**(12), 6332-43.
- Zhou, S., Liu, R., Baroudy, B. M., Malcolm, B. A., and Reyes, G. R. (2003). The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* **310**(2), 333-42.
- Zimmerman, T. P., and Deeprose, R. D. (1978). Metabolism of 5-amino-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide and related five-membered heterocycles to 5'-triphosphates in human blood and L5178Y cells. *Biochem Pharmacol* **27**(5), 709-16.

**Anexo I. Mutaciones encontradas en la región 3D del genoma del virus de la fiebre aftosa (VFA) en el espectro de mutantes de poblaciones del virus pasadas en presencia de ribavirina**

Poblaciones de VFA <sup>a</sup>							
MARLS-RAp30-5 y MARLS-RBp30-5				pMT28-Rp5			
Cambio de aa <sup>b</sup>	Cambio de nt <sup>c</sup>	Dominio y motivo estructural <sup>d</sup>	Interacciones <sup>e</sup>	Cambio de aa <sup>b</sup>	Cambio de nt <sup>c</sup>	Dominio y motivo estructural <sup>d</sup>	Interacciones <sup>e</sup>
V143I	G7036A	$\alpha 5$		S40F	C6728U	$\beta 2-\alpha 2$	
A145T	G7042A	$\alpha 5$		A68V	C6812U	$\alpha 3$	
A145I	G7042A C7043T	$\alpha 5$		A72T	G6823A	$\alpha 3$	
K148E	A7051G	$\alpha 5$		A92V	C6884U	$\alpha 3-\alpha 4$	
K148N	A7051C	$\alpha 5$		P117S	C6958U	$\alpha 4-\beta 3$	atp
M150I	G7059A	$\alpha 5$		V239M	G7624A	$\beta 6 (A)$	
E154K	G7069A	$\alpha 5-\beta 6$		E151K	G7060A	$\alpha 5$	
R168L	G7112T	$\beta 6$	ATP, VPg	L163P	U7097C	$\beta 5 (F)$	ATP
P169S	C7114T	$\beta 6$	atp, vpg	P169S	C7114U	$\beta 6$	atp, vpg
M170I	G7119A	$\alpha 6$		R193K	G7187A	$\alpha 7$	RNA
E171D	G7122T	$\alpha 6$		N235S	A7313G	$\beta 8 (A)$	
N206S	A7226G	$\alpha 7$		A252V	C7364U	$\alpha 9$	
A231T	G7300A	$\alpha 8-\beta 8$		V260M	G7387A	$\alpha 9$	
P269S	C7414T	$\alpha 10$		E264K	G7399A	$\alpha 9-\alpha 10$	
I274V	A7429G	$\alpha 10$		E293K	G7468A	$\beta 9$	
E282K	G7453A	$\beta 9$		M296V	A7495G	$\beta 9-\alpha 11$	
A284V	C7460T	$\beta 9$		G418E	G7862A		
T291I	C7481T	$\beta 9$		P436S	C7915U	$\alpha 15$	
M296I	G7497A	$\beta 9-\alpha 11$					
I313T	T7547C	$\alpha 11 (B)$					
D349N	G7654A	$\beta 11-\alpha 12$					
F350S	T7658C	$\alpha 12 (D)$					
L353I	C7666A	$\alpha 12 (D)$					
K358R	A7682G	$\alpha 12 (D)$					
L376P	T7736C	$\beta 12-\beta 13$					
V383I	G7756A	$\beta 14 (E)$					

(Continúa en página 164)

## (Continuación de Anexo)

Poblaciones de VFA <sup>a</sup>							
pMT28-3D(M296I)Rp5							
Cambio de aa <sup>b</sup>	Cambio de nt <sup>c</sup>	Dominio y motivo estructural <sup>d</sup>	Interacciones <sup>e</sup>	Cambio de aa <sup>b</sup>	Cambio de nt <sup>c</sup>	Dominio y motivo estructural <sup>d</sup>	Interacciones <sup>e</sup>
K18E	A6661G	- β1	rna	C217Y	A7259G	α7-α8	VPg
P32S	C6763U	α1-β2		A231T	G7300A	α8-β8	
E33D	G6708A	β2		A243I	C7337U	β8-α9 (A)	RTP,VPg
E69K	G6814A	α3		F257V	U7378	α9	
D70N	G6817A	α3		F267S	U7408C	α9-α10	
A92T	G6883A	α3-α4		K276Q	A7435C	α10	
A101T	G6910A	α4		E282K	G7453A	β9	
I102T	U6914C	α4		E282G	A7455G	β9	
I102G	U6914G	α4		I29IV	A7477G	β9	
P113S	C6946U	α4-β3		S298L	U7051C	β9-α11	RNA,ATP,RTP,VPg
D114N	G6949A	α4-β3	rna,atp,rtv,Vpg	V315M	G7552A	α11 (B)	
T115A	A6952G	α4-β3	RNA,ATP,RTP,VPg	D339Y	G7624U	β10 (C)	D catalítico
L131P	U6977C	β3		S344G	A7639G	β11	
V139I	G7024A	β4		D347G	A7649G	β11-α12	
P141L	C7031U	α5		K370R	A7715G	β12-β13	
K148R	A7052G	α5		M403T	U7817C	β15	
L149F	C7054U	α5		T407I	C7892U	α13	VPg
E151K	G7060A	α5		F414S	U7849C	β16	
E151G	A7061G	α5		T419I	C7865U	β16-α14	
P169S	C7114U	β6 (F)	atp,vpg	D437G	A7919G	α15	
M170V	A7117G	α6 (F)		E438G	A7922G	α15	
R179S	C7144G	α6-β7 (F)	ATP,RTP,VPg	F446L	U7956U	α15-α16	
P185S	C7162U	β7-α7		I451V	A7963G	α15-α16	
R193M	G7187U	α7	RNA	R456S	A7977U	α16	
M194V	A7189G	α7	rna				

<sup>a</sup> El origen de las poblaciones se detallan en las secciones 5.1.8 y 5.1.9.1 de Resultados. Los resultados del análisis del espectro de mutantes de las poblaciones indicadas (heterogeneidad genética y tipos de mutaciones encontradas) se describen en las Tablas 5.5 y 5.6 de la sección de Resultados.

<sup>b</sup> Se ha usado el código de aminoácidos de una única letra, descrito en Abreviaturas.

<sup>c</sup> La numeración de residuos que se ha utilizado es la descrita en Escarmís y cols. (1999).

<sup>d</sup> Localización de la mutación en la estructura tridimensional de la polimerasa de VFA (Ferrer-Orta y cols. 2004). Entre paréntesis se especifica el motivo estructural (Figuras 2.8 y 2.9 del apartado 2.6.1).

<sup>e</sup> Se indican los residuos críticos en la unión a ATP, RTP, VPg o RNA según Ferrer-Orta y cols. 2004, 2006a y 2007). En minúsculas se indican aquellos residuos que interacciona con residuos críticos en la unión a ATP, RTP, VPg o RNA. D catalítico implica que la mutación D339Y ocurre en uno de los tres aspárticos catalíticos de la polimerasa de VFA.

## Foot-and-Mouth Disease Virus Mutant with Decreased Sensitivity to Ribavirin: Implications for Error Catastrophe<sup>∇</sup>

Macarena Sierra, Antero Airaksinen,<sup>†</sup> Claudia González-López,<sup>¶</sup> Rubén Agudo, Armando Arias, and Esteban Domingo<sup>\*</sup>

*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain*

Received 27 July 2006/Accepted 23 November 2006

**The nucleoside analogue ribavirin (R) is mutagenic for foot-and-mouth disease virus (FMDV). Passage of FMDV in the presence of increasing concentrations of R resulted in the selection of FMDV with the amino acid substitution M296I in the viral polymerase (3D). Measurements of progeny production and viral fitness with chimeric viruses in the presence and absence of R documented that the 3D substitution M296I conferred on FMDV a selective replicative advantage in the presence of R but not in the absence of R. In polymerization assays, a purified mutant polymerase with I296 showed a decreased capacity to use ribavirin triphosphate as a substrate in the place of GTP and ATP, compared with the wild-type enzyme. The results suggest that M296I has been selected because it attenuates the mutagenic activity of R with FMDV. Replacement M296I is located within a highly conserved stretch in picornaviral polymerases which includes residues that interact with the template-primer complex and probably also with the incoming nucleotide, according to the three-dimensional structure of FMDV 3D. Given that a 3D substitution, distant from M296I, was associated with resistance to R in poliovirus, the results indicate that picornaviral polymerases include different domains that can alter the interaction of the enzyme with mutagenic nucleoside analogues. Implications for lethal mutagenesis are discussed.**

RNA viruses do not replicate as informationally defined genomes but as complex and dynamic mutant spectra termed viral quasispecies (11, 24, 25, 29, 30). Several relevant biological properties of RNA viruses as infectious agents depend on aspects of their mutant spectra: (i) the association of disease outcome with the complexity (quantitated by average mutation frequencies and genetic distances) of the mutant spectra (33, 34, 59–61, 63, 64, 75), (ii) complementation among components of a mutant spectrum that can mediate virus spread and pathogenesis (53, 76), and (iii) suppression of specific variants by the surrounding mutant spectrum (23, 41, 42, 47), which can attenuate the disease potential of a virus (14, 73; for general reviews on implications of quasispecies, see references 24, 25, 27, and 38).

An application of quasispecies dynamics has been the development of a new antiviral strategy termed virus entry into error catastrophe or lethal mutagenesis (2, 10, 28, 29, 51, 71). Firmly rooted in the theoretical studies (reviewed in references 10 and 28), the concept of virus extinction through error catastrophe has been amply supported by experimental studies with RNA viruses (reviewed in references 2 and 27). Stated in general terms, for any replication system there is a maximum error rate

above which the genetic information carried by the system can no longer be maintained (2, 27, 28). Several recent observations have strengthened error catastrophe as a feasible new antiviral strategy. (i) The mutagenic nucleoside analogue ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) (R), an antiviral agent licensed for clinical practice (58, 69), is mutagenic for a number of RNA viruses (16, 18, 19, 21, 50, 67), including foot-and-mouth disease virus (FMDV) (1, 56). Recent evidence suggests that R can act as a mutagen for hepatitis C virus in the course of treatment of chronically infected patients (9). Therefore, in some viral infections, R may exert its antiviral effect, in part, via its mutagenic activity (44, 45, 58). (ii) The mutagenic base analogue 5-fluorouracil prevented the establishment of a persistent infection of mice with lymphocytic choriomeningitis virus (65). This experiment constitutes a proof of the principle of the feasibility of an error catastrophe-based antiviral approach *in vivo*. (iii) Mutagenesis—not merely inhibition of viral replication—drives viruses to extinction (55).

The mutagenic activity of R with poliovirus is exerted after its intracellular conversion to the triphosphate form (RTP), which is incorporated by the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), termed 3D, and acts as a mutagenic purine analogue (17–19). By growing poliovirus in the presence of R, a poliovirus mutant with the replacement G64S in 3D was selected (62, 76). This mutant (3D G64S) shows a decreased capacity to use RTP as a substrate and an increased template copying fidelity, as measured by genetic and biochemical methods (8, 12, 62, 75). Poliovirus mutant 3D G64S has been instrumental on several grounds. (i) RdRps are the major viral gene products responsible of the error-prone replication and quasispecies dynamics of RNA viruses. Therefore, fidelity mutants are essential for studying the molecular basis of template-copying fidelity, designing fidelity-lowering drugs, and explor-

<sup>\*</sup> Corresponding author. Mailing address: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain. Phone: 34 91 4978485. Fax: 34 91 4974799. E-mail: edomingo@cbm.uam.es.

<sup>†</sup> Present address: National Product Control Agency for Welfare and Health, Chemicals Unit, PL 210, FI-00531 Helsinki, Finland.

<sup>¶</sup> Present address: Cell Biology Unit, MRC-Laboratory for Molecular Cell Biology, and Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, Gower Street, London WC1E 6BT, United Kingdom.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 6 December 2006.

ing the influence of mutation rates on virus behavior. (ii) Poliovirus mutant 3D G64S has documented that enhanced fidelity need not entail a decreased replication rate, that a broad mutant spectrum is essential for virus adaptation to a complex environment (in this case represented by susceptible mice [61, 75]), and that an individual mutant unable to reach a target organ can do so when complemented by a population displaying a broad mutant spectrum (61, 76). These are essential features of quasispecies behavior which have now become amenable to direct experimental analysis *in vivo*. (iii) The poliovirus mutant 3D G64S has revealed that viruses with increased resistance to nucleoside analogues can be isolated and, therefore, that such mutants could contribute to failures of lethal mutagenesis as an antiviral strategy.

The fact that two groups working independently selected the same R-resistant poliovirus mutant, 3D G64S (62, 76), suggests that picornaviral polymerases may have very limited possibilities for circumventing the selective disadvantage associated with the mutagenic activity of R. Because of the new avenues for understanding RNA genetics that have been opened by the R-resistant poliovirus mutant, and since R acts also as a mutagenic agent for FMDV (1, 56), we designed experiments to select FMDV mutants with decreased sensitivity to R. Here we describe the isolation of a new class of picornavirus mutants displaying decreased sensitivity to R. The FMDV mutant harbors the M296I substitution in 3D and was selected in the course of passage of FMDV in BHK-21 cells in the presence of increasing concentrations of R. We document that the M296I replacement confers on FMDV a selective advantage during replication in the presence of R and that the purified mutant 3D has an impaired capacity, relative to that of the wild-type enzyme, to incorporate RTP in the place of GTP opposite to a C and in the place of ATP opposite to a U in the template. In the three-dimensional structure of FMDV 3D, M296 is located far from position G62 (the amino acid equivalent of G64 in poliovirus 3D) but lies within a conserved amino acid stretch that establishes contacts with the template-primer RNA and probably also with the incoming nucleotide substrate (35–37). The implications of the isolation of the FMDV mutant 3D M296I for selection of extinction escape mutants and a possible failure of an error catastrophe-based antiviral approach are discussed.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cells, viruses, and infections.** The origin of BHK-21 cells and procedures for cell growth and infection of cell monolayers with FMDV in liquid medium and in semisolid agar medium for plaque assays have previously been described (26, 70). FMDV C-S8c1 is a plaque-purified derivative of natural isolate C<sub>1</sub> Santa-Pau Spain 70 (70), a representative of European serotype C FMDV. FMDV MARLS is a monoclonal antibody escape mutant selected from the C-S8c1 population passaged 213 times in BHK-21 cells (13). The fitness of MARLS relative to that of C-S8c1 has been estimated at 25 from previous data (39, 57).

**Treatment with ribavirin.** A solution of R in phosphate-buffered saline was prepared at a concentration of 200 mM, sterilized by filtration, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Prior to use, the stock solution was diluted in Dulbecco's modification of Eagle's medium to reach the desired concentrations. Cell monolayers were incubated for 7 h with R prior to infection. Infected cells in the absence of R and mock-infected cells were maintained in parallel; no evidence of contamination of cells with virus was observed at any time. FMDV MARLS was passaged serially in the presence and absence of increasing concentrations (200  $\mu\text{M}$  to 800  $\mu\text{M}$ ) of R (Fig. 1); virus rescued from infectious transcripts of pMT28 and pMT28-3D(M296I) (described below) were passaged serially five times in the absence or in the presence of ribavirin (800  $\mu\text{M}$ ). For each passage,  $4 \times 10^6$  BHK-21 cells

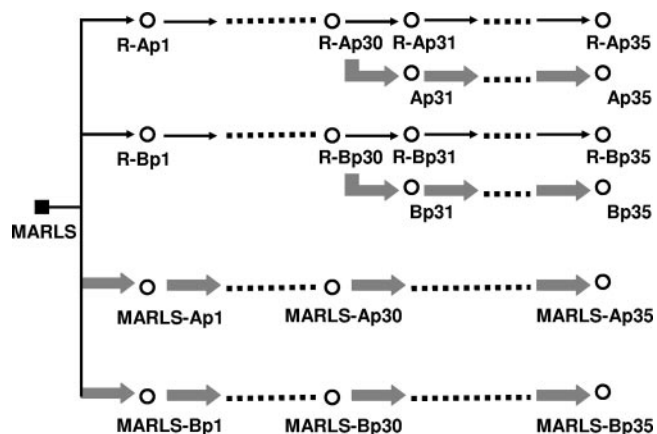


FIG. 1. Scheme of passages of FMDV MARLS in the presence or absence of R. The initial biological clone MARLS (filled square) was subjected to four parallel passage series; empty circles indicate the uncloned progeny FMDV populations. Thin arrows indicate passages in the presence of R (with duplicate lineages R-A and R-B; passages 1 to 5 were with 200  $\mu\text{M}$  R, passages 6 to 25 were with 400  $\mu\text{M}$  R, and passages 25 to 35 were with 800  $\mu\text{M}$  R). Large arrows indicate passages in the absence of R (duplicate lineages MARLS-A and MARLS-B); “p” followed by a number refers to passage number. The origin of FMDV MARLS and conditions for the infection of BHK-21 cell monolayers in the presence or absence of R are described in Materials and Methods.

were infected with  $1 \times 10^6$  to  $4 \times 10^6$  PFU of virus from the previous passage until cytopathology was complete (about 30 h in the presence of R and 16 h in the absence of R).

**Extraction of RNA, cDNA synthesis, PCR amplification, and nucleotide sequencing.** RNA was extracted from the supernatants of infected cells by treatment with Trizol (Invitrogen) as previously described (68). Reverse transcription (RT) was carried out using avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega), and PCR amplification was performed using AmpliTaq polymerase (Perkin-Elmer) as specified by the manufacturer. RT-PCR amplifications intended for the cloning of individual cDNA molecules were carried out using *Pfu* DNA polymerase (Promega) because of its high copying fidelity (15), using primers and procedures that have been described previously (1, 39, 55, 57, 68); experimental details will be provided upon request. Nucleotide sequencing was carried out using the Big Dye Terminator cycle sequencing kit (ABI Prism; Perkin-Elmer) and an automated ABI 373 sequencer; all sequences were determined at least in duplicate from independent sequencing reaction mixtures. The nucleotide sequences of the genomes of FMDV C-S8c1 and MARLS are available in GenBank, with accession numbers AJ133357 and AF274010, respectively.

**Quantification of viral RNA.** FMDV RNA was quantified by real-time RT-PCR amplification using the Light Cycler instrument (Roche) and the RNA Master SYBR green I kit (Roche) according to the instructions of the manufacturer. Quantification was relative to a standard curve obtained with known amounts of FMDV C-S8c1 RNA. This procedure has been described previously (40, 41).

**Molecular cloning, expression, and purification of FMDV 3D.** Molecular cloning of the FMDV genomic region encoding the viral polymerase (3D) in plasmid pET-28a, IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) induction of *Escherichia coli*, cell lysis, and enzyme purification by affinity chromatography through Nitrilotriacetic acid were carried out as previously described (37). The expression vector pET-28a including the wild-type FMDV 3D (with the 3D sequence of our standard FMDV C-S8c1) is termed pET-28a3D, and it has been described previously (3, 37). To clone and express 3D of MARLS and 3D of MARLS with the M296I replacement, cDNA from the corresponding FMDV genomes was amplified with EHF polymerase (Roche) and primers A2SaC1 ([CAGAGCTCG ACCCTGAACCGCACCACGA in the sense orientation; the 5' nucleotide is at position 6581; FMDV residue numbering is as described in reference 31) and C-not-pol (CCAATTGTGATGTTTGCGCGCCGCTGCGTCGCCGACACG GCGTTC in the antisense orientation; the 5' nucleotide is at FMDV C-S8c1 genomic position 8043). The product was digested with HindIII (genomic position 6667) and NotI (position 8020) (the restriction site generated with the

nucleotides is in boldface in primer C-not-pol) and ligated to plasmid pET-28a3D, which had been previously digested with the same enzymes and treated with shrimp alkaline phosphatase (66). The expression plasmid encoding 3D of FMDV MARLS is termed pET-28a3D(M). 3D of MARLS differs from 3D of C-S8c1 in having H instead of Q at position 232. The presence of H or Q at position 232 of 3D did not have any detectable effect either in the progeny production capacity of FMDV or in standard enzymological activities with purified 3D [polymerization with poly(A)-oligo(dT)<sub>15</sub>, VPg uridylylation, and RNA binding measured by gel mobility shift assay (3, 35, 37)]. The plasmid encoding 3D with the M296I substitution in the context of 3D of the MARLS (with Q232H) plasmid is termed pET-28a3D(M-M296I). The sequence of the 3D-coding region was confirmed for all constructs. The expressed 3D proteins are termed 3D(M) and 3D(M-M296I). The 3Ds were purified as previously described (37).

**Preparation of FMDVs with mutations in 3D.** Plasmid pMT28 encodes an infectious transcript of FMDV C-S8c1 (40). Chimeric plasmids encoding mutant 3Ds of the FMDV C-S8c1 genome were constructed by replacing part of the 3D-coding region of pMT28 with the corresponding 3D-coding region of the mutant of interest. Specifically, to construct pMT28-3D(M) (an infectious clone expressing 3D of MARLS in the context of the C-S8c1 genome), pMT28 was amplified with primer CR3DIL (GCGACAAAGGTTTGTCTTGG; the 5' nucleotide is at position 7718) and T7 (described in reference 3), and viral RNA encoding MARLS polymerase was subjected to RT-PCR amplification with avian myeloblastosis virus reverse transcriptase and *Pfu* DNA polymerase, using primers A2SacI and Av2New (TG TGAAGTGTCTTTGAGGAAAG; the 5' nucleotide is at position 7783). The two amplicons were shuffled and digested with ClaI (position 7004) and NdeI [the site of the restriction enzyme was engineered at the 3' side of the viral poly(A) (40)]. The digest was ligated to pMT28 DNA previously digested with the same enzymes. To construct pMT28-3D(M-M296I), RNA encoding M296I was subjected to the same procedure, except that the shuffled DNA product was digested with SalI (position 7150) and NdeI and the digestion product was ligated to pMT28 DNA that had been digested previously with SalI and NdeI. To construct pMT28-3D(M296I), the codon encoding Met 296 of the FMDV 3D polymerase was changed to Ile in wild-type pMT28. We replaced codon 296, ATG, with an alternative Ile codon, ATA, by site-directed mutagenesis during PCR amplification using the primer pair A2SacI and MKRES (GGAACAGCCAGATGGTAT; the 5' nucleotide is at position 7512; the underlined residue corresponds to the mutation site) and primer Forward ResA (GAAGGCGGGATACCATCTGGCTGTTCCG; the 5' nucleotide is at position 7486) with the T7 primer. The amplicons were shuffled, digested with NdeI and ClaI, and ligated to pMT28 DNA that had previously been digested with ClaI and NdeI.

Ligation, transformation of *E. coli* DH5 $\alpha$ , and colony screening with PCR amplification, nucleotide sequencing, and preparation of infectious RNA transcripts were carried out as previously described (3, 66). RNA concentrations of infectious transcripts were estimated by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining, with known amounts of *E. coli* rRNA as the standard. About 1  $\mu$ g of FMDV RNA transcript were transfected into BHK-21 cells using lipofectin (Gibco), and cells were cultured until cytopathology was complete. Then the virus obtained was passaged twice in BHK-21 cells, and aliquots for further studies were prepared and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The entire 3D-coding regions of the resulting clonal populations were sequenced to confirm that their nucleotide sequences were identical to those of the corresponding parental plasmids.

**Characterization of mutant spectra.** The complexity of mutant spectra was determined by quantifying the mutation frequency, expressed as the number of different mutations divided by the total number of nucleotides sequenced, and by the normalized Shannon entropy, which is a measure of the proportion of identical sequences in a distribution (1, 55, 68). For populations Ap35 and Bp35 (Fig. 1), the residues of 3D that were analyzed spanned residues 7150 to 8020 and 7004 to 8020, respectively. For pMT28 and pMT28-3D(M296I) populations, the entire 3D- and VP1-coding regions were sequenced.

**Fitness assays.** Relative fitness was measured by growth competition experiments in the presence or absence of R, as previously described (4, 49). The proportion of the two competing genomes at different passages was determined by real-time RT-PCR, employing primers specifically designed to discriminate the two RNAs. The discriminatory forward primers were MKWT (GGAACAGCCAGATGGCAT) for pMT28-3D(M) and MKRES for pMT28-3D(M-M296I) (the 5' nucleotide is at position 7512 for both primers); the G7497A mutation (underlined nucleotide) is present only in the R-resistant genomes and corresponds to the M296I replacement in 3D. The reverse primer was 3DR4 (ACTCGCATGTGCGAGTTTT; the 5' nucleotide is at position 7141) in both cases. The hybridization temperature for real time RT-PCR assays was  $68^{\circ}\text{C}$  for wild-type and  $72^{\circ}\text{C}$  for mutant RNA. Under these conditions, amplification of the two

competing RNAs was accurately discriminated (4). To determine the relative fitness value, the logarithm of the ratio of the two competing RNAs was plotted against passage number to obtain the fitness vector; the antilogarithm of the vector slope is the fitness of the virus tested, relative to that of the reference virus (49).

**3D polymerization assays.** Polymerization assays were carried out using poly(rC) or poly(rU) (300 residues on average; Amersham Pharmacia) as templates and oligo(dG)<sub>15</sub> (Life Technologies) or oligo(rA)<sub>6</sub> (Dharmacon Research), respectively, as primers. The assay was performed with MOPS (morpholinepropanesulfonic acid; 30 mM, pH 7.0; Sigma), NaCl (33 mM), and Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (15 mM) or MnCl<sub>2</sub> (10 mM) with poly(rC) or poly(rU) (40 ng/ $\mu$ l), oligo(dG)<sub>15</sub> or oligo(rA)<sub>6</sub> (2.4  $\mu$ M), [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP or [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP (20 mCi/mmol, 0.01 mCi/ml; Amersham), RTP (Moravek Biochemicals, Inc.), and 3D (3  $\mu$ M) (in Tris-HCl [250 mM, pH 7.5], NaCl [250 mM], EDTA [1 mM], glycerol [10%, vol/vol]). A 22.5- $\mu$ l mixture of all components except 3D was prewarmed for 2 min at  $37^{\circ}\text{C}$ , and the reaction was started by adding 2.5  $\mu$ l of 3D; the reaction was carried out for 10 or 30 min [for assays with poly(rC) or poly(rU), respectively] at  $37^{\circ}\text{C}$  and stopped by the addition of 5  $\mu$ l of 500 mM EDTA. Deviations from the basic protocol and specific concentrations of substrate and templates-primers are indicated in the corresponding figure legend. Reaction products were subjected to nucleotide analysis. To this aim, the reaction products were separated from unincorporated nucleotides using G25 Sephadex chromatography (Mini Quick Spin Oligo columns; Roche), equilibrated with Tris-HCl (10 mM, pH 8.0), EDTA (1 mM); the RNA was precipitated with ethanol, dissolved in water, and digested with a mixture of RNase A (500 ng/ $\mu$ l) (Boehringer Mannheim) and RNase T<sub>2</sub> (0.1 U/ $\mu$ l) (Sigma) for 15 min at  $37^{\circ}\text{C}$  in NH<sub>4</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (50 mM, pH 5.0). Mononucleotides were separated by polyethyleneimine-cellulose thin-layer chromatography, using as the solvent 0.5% formic acid for the products with poly(rC) as the template or 0.75% formic acid for the products with poly(rU) as the template and Li-formate (0.15 M) adjusted to pH 3.0 with formic acid (77). The membranes were air dried and the reaction products analyzed and quantitated using a phosphorimager (model BAS-1500; Fuji).

3D polymerization assays with heteropolymeric templates were used to study the incorporation of nucleotides at a defined position. To this aim, symmetrical- and substrate-RNA (sym/sub-RNA) oligonucleotides (Dharmacon Research) (5) were purified, end labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP and polynucleotide kinase (NEB), and annealed using standard protocols (5, 66). 3D (3  $\mu$ M) and sym/sub-C (5'-GUACGGCCCC-3') or sym/sub-U (5'-GCAUGGGCCCC-3') were incubated in MOPS (30 mM, pH 7.0), NaCl (33 mM), and Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (15 mM) for 10 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and then mixed with nucleoside triphosphate substrates (different ratios of RTP and GTP) to initiate the reaction (final volume, 25  $\mu$ l). Deviations from this basic protocol and specific concentrations of substrate and templates-primers are indicated in the figure legends. After 5 min, or at fixed times after the addition of the substrate, the reaction was stopped by the addition of EDTA to a final concentration of 83 mM. Reaction products were resolved by electrophoresis on a denaturing 23% polyacrylamide and 7 M urea gel in Tris base (90 mM), boric acid (90 mM), EDTA (2 mM) (pH 8.0). Proteins in gels were visualized and quantitated with a phosphorimager (model BAS-1500; Fuji).

**Other assays with 3D.** Poly(rU) synthesis using poly(A)-oligo(dT)<sub>15</sub> as the template-primer, VPg uridylylation, and RNA binding assays were carried out as previously described (3).

## RESULTS

**Selection of an FMDV mutant with decreased sensitivity to ribavirin.** R can eliminate FMDV from persistently infected BHK-21 cells (22), and its activity is, at least in part, exerted by lethal mutagenesis (1). To test whether FMDV with decreased sensitivity to R could be selected, FMDV MARLS (13) was passaged cytolytically in the presence of increasing concentrations of R. MARLS was chosen due to its high fitness (39) to favor a broad mutant spectrum on which selection could act. The passage protocol was designed to generate two parallel lineages of virus replicating in the presence of R and two ensuing bifurcations to continue replication in both the presence and absence of R; a control passage series was also used (Fig. 1). To test whether passage in the presence of increasing concentrations of R resulted in FMDV populations with de-

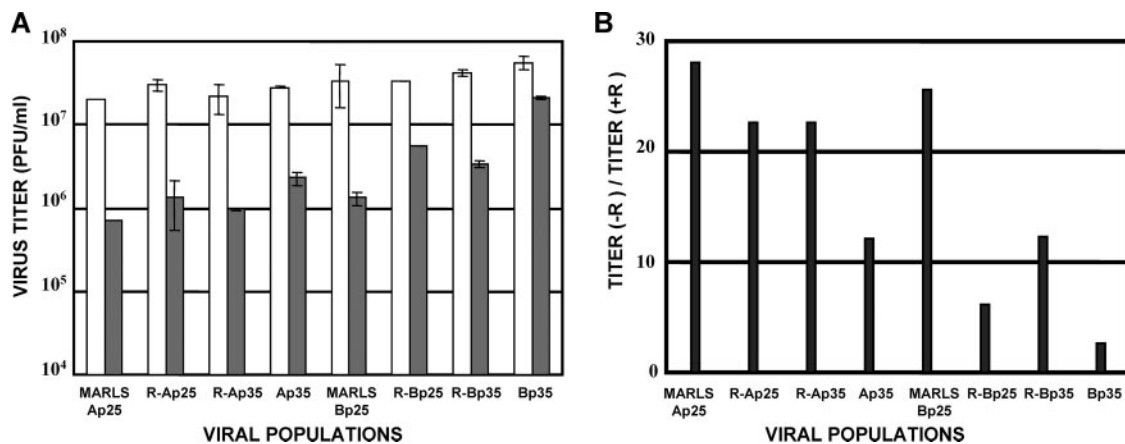


FIG. 2. FMDV titer produced in the presence or absence of R. (A) BHK-21 cell monolayers were infected at an MOI of 0.05 PFU/cell with the viral populations indicated in the abscissa (the passage history of the viruses is described in the legend to Fig. 1) either in the absence (empty bars) or presence (filled bars) of R (800  $\mu$ M). Virus was titrated when cytopathology was complete (16 to 30 h postinfection). Titrations were carried out in triplicate, and standard deviations are given. Procedures are described in Materials and Methods. (B) Ratios of titers of progeny virus produced in the absence to those produced in the presence of R, calculated from the results shown in panel A. Note the differences in the ratios between parallel passage series A and B (compare with Fig. 1). Procedures are described in Materials and Methods.

creased sensitivities to R, the capacity of several viral populations to produce progeny in the presence and absence of R was tested. The ratios of titers produced in the absence relative to the titers produced in the presence of R were 25 to 28 for the lineages passaged in the absence of R and 2 to 22 for those passaged in the presence of R, including in the latter the populations that underwent 30 serial passages in infected cells with R and then five additional passages without R (Fig. 2). The lower average ratios for the R-B series than for the parallel R-A series (Fig. 2B) were confirmed in an independent virus production experiment with the same viral populations. Thus, the results suggest an increase in the capacity to produce progeny in the presence of R for those FMDV populations that had been passaged in the presence of R compared with those passaged in its absence.

**A new mutation in 3D associated with ribavirin resistance.**

To study whether serial passage of FMDV MARLS in the presence of increasing concentrations of R resulted in any alteration of the viral RdRp (3D), RNA from the MARLS-Ap25, MARLS-Ap30, MARLS-Ap35, R-Ap25, R-Ap30, R-Ap35, Ap35, MARLS-Bp25, MARLS-Bp30, MARLS-Bp35 R-Bp25, R-Bp30, R-Bp35, and Bp35 populations (the relationships among these viral populations are depicted in Fig. 1) was subjected to RT-PCR amplification, and the consensus nucleotide sequences for the 3D-coding regions were determined and compared with the sequence of parental MARLS 3D. Several points of heterogeneity (mixtures of two nucleotides at the same genomic position) were observed among the populations analyzed (data not shown), and some of the mutations could contribute to the differences between R-A and R-B populations with regard to the capacity to produce progeny in the presence of R; this possibility could also apply to the differences between Ap35, Bp35, and those populations passaged always in the presence of R. This point was not further investigated (see Discussion). However, the G7497A mutation was the only one found to be established in each of the viral populations subjected to multiple passages in the presence of

R and was absent in each of the populations passaged in the absence of R. The G7497A mutation leads to the amino acid substitution M296I in 3D, suggesting that this replacement was selected in the course of viral replication in the presence of R.

**FMDV 3D with the M296I replacement confers decreased sensitivity to ribavirin.**

The increased capacity of FMDV to produce progeny in the presence of R could be associated with replacement M296I in 3D but also (i) with other genetic modifications of the virus that could interfere with the intracellular activation of R or could decrease the effective concentration of active R derivatives in the replication complex or (ii) with other indirect mechanisms that could compensate for the effect of R. To investigate the possible implication of the 3D substitution M296I in the decreased sensibility to R, plasmids pMT28-3D(M) and pMT28-3D(M-M296I) were constructed and their infectious transcripts were used to transfect BHK-21 cells to rescue FMDV encoding either 3D(M) or 3D(M-M296I) in the same genetic background. The two viruses were compared with regard to progeny production in the absence and presence of R. The results show a modest but significant increase in the progeny production of the virus with 3D(M-M296I) in the presence of R compared with that of the virus encoding 3D(M) in an infection at a low multiplicity of infection (MOI) (Fig. 3A and B). To confirm that pMT28-3D(M-M296I) had a selective replicative advantage over pMT28-3D(M) in the presence of R, the relative fitness of the two viruses was calculated by direct growth competition in BHK-21 cells, in the presence and absence of R. The results (Fig. 4) show a fitness of pMT28-3D(M-M296I) relative to that of pMT28-3D(M) of 3.8 in the presence of 800  $\mu$ M R but of 0.5 in the absence of R. These values indicate a clear replicative advantage of FMDV harboring 3D M296I only in the presence of R, in agreement with the results of progeny production in the presence and absence of R by the two viruses independently (Fig. 2).

Amino acid 232 of 3D is H in FMDV MARLS but Q in FMDV C-S8c1. To investigate whether 3D replacement M296I



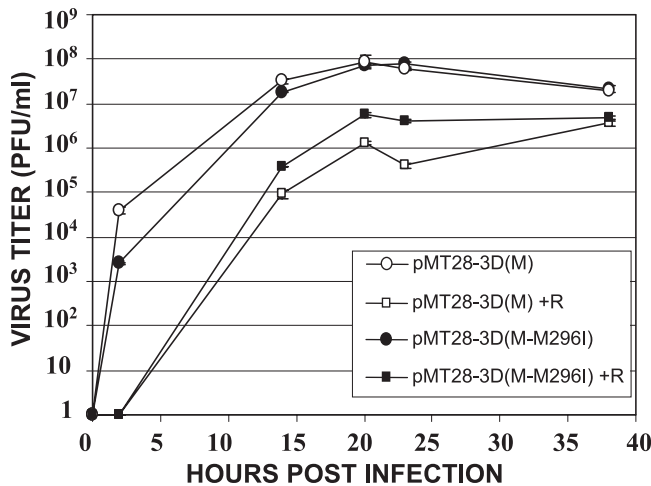


FIG. 3. Infectivity of progeny virus in infections of BHK-21 cells with FMDV encoding either wild-type 3D or 3D with the M296I mutation. Shown are the kinetics of progeny production after infection of BHK-21 cells (MOI of 0.05 PFU/cell) with pMT28-3D(M) or pMT28-3D(M-M296I) in the absence or presence of 800  $\mu$ M R (+R). Procedures are described in Materials and Methods.

conferred a selective advantage in the presence of R and also in the sequence context of C-S8c1 3D (in the absence of 3D replacement Q232H), viruses pMT28 and pMT28-3D(M296I) were rescued from infectious transcripts as described in Materials and Methods. Again, 3D replacement M296I conferred on FMDV C-S8c1 a selective advantage in the presence of R, as evidenced by the results of an infection carried out at a high MOI (2 PFU/cell). The infectious titer produced by the virus rescued from pMT28-3D(M296I) in the presence and absence of R was  $(1.5 \pm 0.4) \times 10^6$  PFU/ml and  $(2.2 \pm 0.4) \times 10^7$  PFU/ml. The corresponding values for virus rescued from pMT28-3D were  $(5.6 \pm 1.1) \times 10^5$  PFU/ml and  $(2.7 \pm 0.4) \times 10^7$  PFU/ml. Thus, the ratio of the level of production of infectious progeny in the presence of R to that in the absence

of R was threefold higher for the virus expressing mutant 3D than for the virus expressing standard 3D.

**Biased mutation types in mutant spectra of ribavirin-treated FMDV.** Previous analyses of clonal populations of FMDV passed in BHK-21 cells in the absence of mutagens indicated a mutation frequency among components of the mutant spectrum (calculated relative to the consensus sequence of the corresponding populations) of  $0.7 \times 10^{-4}$  up to  $5.9 \times 10^{-4}$  substitutions per nucleotide (1, 57, 68), with a modest dominance of the C→A, C→U, and U→C mutations (Table 1). When persistently infected BHK-21 cells were treated with R, mutation frequencies among components of the mutant spectra in the resident FMDV reached from  $5.7 \times 10^{-4}$  up to  $2.1 \times 10^{-3}$  substitutions per nucleotide (1). The mutation types were highly biased in favor of C→U and G→A (32 out of 40 mutations [1]). To investigate whether a similar mutation type bias was observed in FMDV passaged cytolytically in the presence of R, molecular clones representing the 3D-coding region of the Ap35 and Bp35 populations were sequenced and the mutation types analyzed. The mutation frequency for the two populations was  $1.7 \times 10^{-3}$  substitutions per nucleotide, in agreement with previous determinations from persistent R-treated FMDV infections (1). Again, the results (Table 1) show a dominance of C→U and G→A transitions (96 out of 117 mutations), a statistically significant bias relative to the transitions shown by populations passaged in the absence of R ( $0.005 > P > 0.001$ ;  $\chi^2$  test). The results indicate that the process of the cytolytic replication of FMDV in the presence of R results in the systematic selection of virus harboring the M296I substitution in 3D, accompanied by an increase in mutant spectrum complexity and the dominance of the C→U and G→A transitions.

**Similar mutant spectrum complexities of viruses expressing 3D and 3D(M296I).** To investigate whether the 3D M296I replacement could alter the complexity of the mutant spectrum of the FMDV quasispecies, virus expressing either standard 3D or 3D(M296I) was rescued from infectious transcripts of

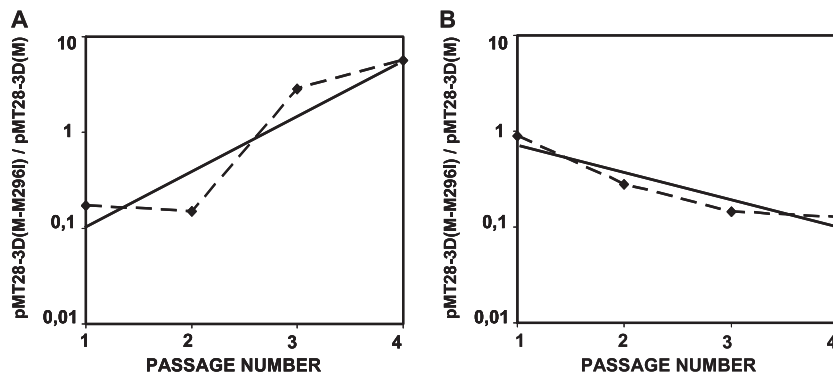


FIG. 4. Relative levels of fitness of FMDVs including either wild-type 3D or 3D(M296I) in the presence or absence of R. (A) BHK-21 cells were infected with a mixture of the clone with wild-type 3D [clone pMT28-3D(M)] and the clone with the M296I mutation in 3D [pMT28-3D(M-M296I)] at a MOI of 0.1 PFU/cell in the presence of 800  $\mu$ M R. The progeny of the first infection was used to infect cells under the same conditions, and the process was repeated a total of four times. (B) Experiments were the same as those whose results are shown in panel A, except that the infections were carried out in the absence of R. The ratio of pMT28-3D(M) to pMT28-3D(M-M296I) was determined for each population by real time RT-PCR using discriminatory primers and control RNAs as detailed in Materials and Methods. Straight lines were fitted to the experimental points; the equations obtained were  $y = 0.0283 \times e^{1.3395x}$  and  $R^2 = 0.8488$  (in the presence of R) and  $y = 1.3305 \times e^{-0.6524x}$  and  $R^2 = 0.8916$  (in the absence of R). The antilogarithm of the vector slope gives the relative levels of fitness of the two competing viruses (49). A second, independent fitness determination gave similar results. Procedures are detailed in Materials and Methods.

TABLE 1. Types of mutations in mutant spectra of FMDV populations passaged in the presence or absence of R

Mutation type	Presence of R					Absence of R				
	Persistent C-S8c1 <sup>a</sup>	Ap35 <sup>b</sup>	Bp35 <sup>c</sup>	pMT28 p5 <sup>d</sup>	pMT28-3D (M296I)p5 <sup>e</sup>	Persistent C-S8c1 <sup>a</sup>	Cytolytic C-S8c1 <sup>f</sup>	Cytolytic C-S8c1 <sup>g</sup>	pMT28 p5 <sup>h</sup>	pMT28-3D (M296I)p5 <sup>i</sup>
A→C	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
A→G	2	1	5	8	0	1	1	0	6	12
A→U	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
C→A	0	1	1	0	0	4	6	0	0	1
C→U	21	20	38	12	4	3	3	3	2	2
G→A	11	10	28	2	6	2	1	0	1	4
G→C	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
G→U	1	0	4	0	0	1	1	0	0	0
U→C	4	3	4	1	3	1	3	0	9	6
U→G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2

<sup>a</sup> Data are from reference 1.

<sup>b</sup> Ap35 is the population described in Results and the legend to Fig. 1. Mutations are based on the analysis of 23 clones (20,010 nucleotides) of genomic residues 7150 to 8020 (3D-coding region).

<sup>c</sup> Bp35 is the population described in Results and the legend to Fig. 1. Mutations are based in the analysis of 47 clones (47,752 nucleotides) of genomic residues 7004 to 8020 (3D-coding region).

<sup>d</sup> Virus expressed from plasmid pMT28 (standard C-S8c1 sequence) passaged five times in BHK-21 cells in the presence of ribavirin (800  $\mu$ M) as described in Materials and Methods. Mutations are based on the sequencing of 32 clones (19,840 nucleotides) of genomic residues 3210 to 3830 (VP1-coding region).

<sup>e</sup> Virus expressed from plasmid pMT28-3D(M296I) (with 3D substitution M296I in the sequence context of C-S8c1) passaged five times in BHK-21 cells in the presence of 800  $\mu$ M R as described in Materials and Methods. Mutations are based on the sequencing of 20 clones (12,200 nucleotides) of genomic residues 3210 to 3830 (VP1-coding region).

<sup>f</sup> Data are from reference 57.

<sup>g</sup> Data are from reference 58.

<sup>h</sup> Virus expressed from plasmid pMT28 (standard C-S8c1 sequence) passaged five times in BHK-21 as described in Materials and Methods. Mutations are based on the sequencing of 29 clones (40,600 nucleotides) of genomic residues 6620 to 8020 (3D-coding region) and 29 clones (17,980 nucleotides) of genomic residues 3210 to 3830 (VP1-coding region).

<sup>i</sup> Virus expressed from plasmid pMT28-3D(M296I) (with 3D substitution M296I in the sequence context of C-S8c1) passaged five times in BHK-21 cells as described in Materials and Methods. Mutations are based on the sequencing of 29 clones (40,600 nucleotides) of genomic residues 6620 to 8020 (3D-coding region) and 29 clones (17,980 nucleotides) of genomic residues 3210 to 3830 (VP1-coding region).

pMT28 or pMT28-3D(M296I), respectively, and passaged five times in BHK-21 cells as described in Materials and Methods. The mutation frequencies of the mutant spectra generated by the viruses expressing the mutant and standard 3Ds were  $4.6 \times 10^{-4}$  and  $3 \times 10^{-4}$  substitutions per nucleotide, respectively. The Shannon entropies of the mutant spectra of the pMT28-3D(M296I) and pMT28 populations were 0.56 and 0.45, respectively. Thus, the results for the complexity of the mutant spectrum do not provide evidence that the M296I replacement enhanced the template copying of FMDV 3D. In parallel passages of the same viruses in the presence of 800  $\mu$ M R, the mutation frequencies in the mutagenized mutant spectra at passage 5 were  $11.5 \times 10^{-4}$  and  $12.1 \times 10^{-4}$  substitutions per nucleotide for the mutant and standard FMDVs, respectively. The Shannon entropies of the mutant spectra generated by the viruses expressing 3D(M296I) and standard 3D in the presence of R were 0.65 and 0.75, respectively. A comparison of mutation frequencies attained in the presence and absence of R indicates that, while the presence of R resulted in a 2.5-fold increase in mutation frequency for the mutant FMDV, the increase for the standard virus was 4-fold. The distribution of mutation types observed (Table 1) does not differ significantly from those recorded for other FMDV populations passaged either in the presence or in the absence of R.

**Mutant polymerase 3D M296I is deficient in the incorporation of ribavirin triphosphate.** The bias toward C→U and G→A (rather than U→C and A→G) transitions in the mutant spectra of FMDV populations passaged in the presence of R suggests a preference for ribavirin monophosphate (RMP) to be incorporated in the place of GMP rather than in the place of AMP during FMDV RNA replication. This preference

could be influenced by the decrease in intracellular GTP levels due to the inhibition of IMP dehydrogenase by RMP (1, 58, 69) or by an intrinsic substrate incorporation bias by the viral polymerase. To test whether 3D(M-M296I) differed from 3D(M) with regard to the capacity to use RTP as a substrate, the two enzymes were expressed in *E. coli*, purified, and tested in several polymerization assays, as detailed in Materials and Methods. The two enzymes were >95% pure as judged by polyacrylamide gel electrophoresis analysis and Coomassie brilliant blue staining and were equally active in our standard poly(rU) synthesis assay (3, 37) [the specific activities for 3D(M) and 3D(M-M296I) were  $172.91 \pm 22.71$  pmol  $\mu$ g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> and  $177.3 \pm 29.12$  pmol  $\mu$ g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, respectively, with an average of 10 determinations for each enzyme]. They were also equally active in the VPg uridylylation assay (35) [ $0.429 \pm 0.082$  pmol  $\mu$ g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> and  $0.476 \pm 0.104$  pmol  $\mu$ g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> for 3D(M) and 3D(M-M296I), respectively], and both enzymes bound RNA with the same efficiency as determined by an RNA binding assay (3) [ $33.2 \pm 4.9\%$  and  $32.5 \pm 7.1\%$  of RNA molecules were retarded, respectively, using 1800 nM 3D(M) and 3D(M-M296I)]. We evaluated the relative capacities of 3D(M) and 3D(M-M296I) to incorporate ribavirin in the presence of a low concentration of either GTP or ATP. Using poly(rC)-oligo(dG)<sub>15</sub> as the template-primer and [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP and increasing concentrations of RTP as substrates, 3D(M-M296I) showed a significantly decreased capacity to incorporate RTP in the place of GTP, compared with 3D(M), mainly at a high RTP concentration (Fig. 5A and B). In contrast, in polymerization reactions with poly(rU)-poly(rA)<sub>6</sub> as the template-primer carried out in the presence of Mn<sup>2+</sup>, 3D(M-M296I) showed only a modest decreased capacity to incorpo-

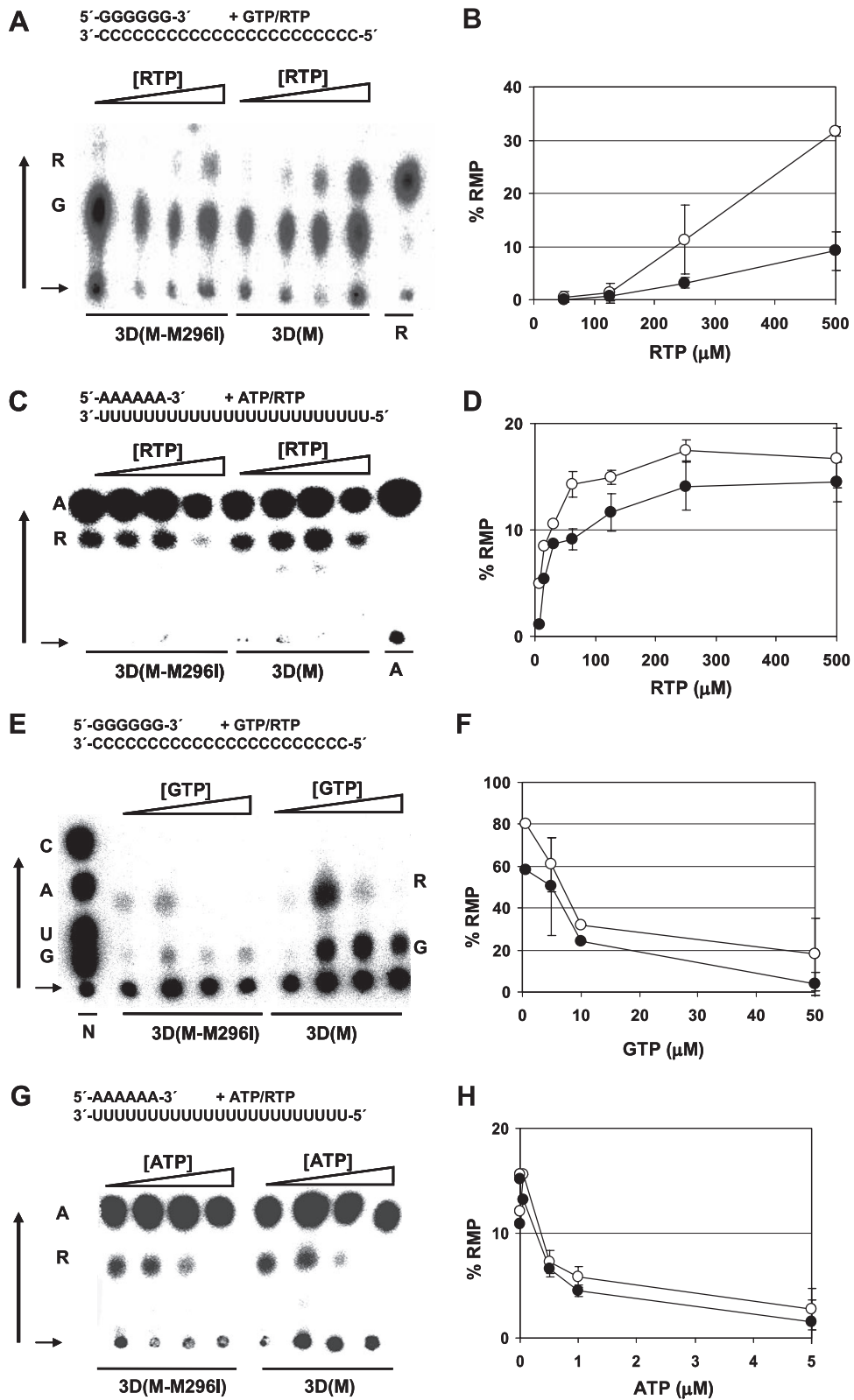


FIG. 5. Incorporation of RMP relative to that of GMP or AMP by purified FMDV 3D(M) or FMDV 3D(M-M296I) using homopolymeric templates-primers. (A) Incorporation of RMP and GMP using poly(rC)-oligo(dG)<sub>15</sub> as the template-primer. The reaction was performed in Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (15 mM), [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP (1 nM), and increasing concentrations of RTP (50, 100, 250, and 500  $\mu\text{M}$ ). Results of thin-layer chromatography of RNase-digested products are shown; the black vertical arrow shows the direction of the migration, and the horizontal arrow indicates the sample application point. The positions of ribavirin monophosphate (R) and GMP (G) are indicated. Ribavirin monophosphate control migration is the product of RMP incorporation at position +1 (from the primer 3' end) into sym/sub-RNA 5'-GUACGGGCC-3', with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP incorporated

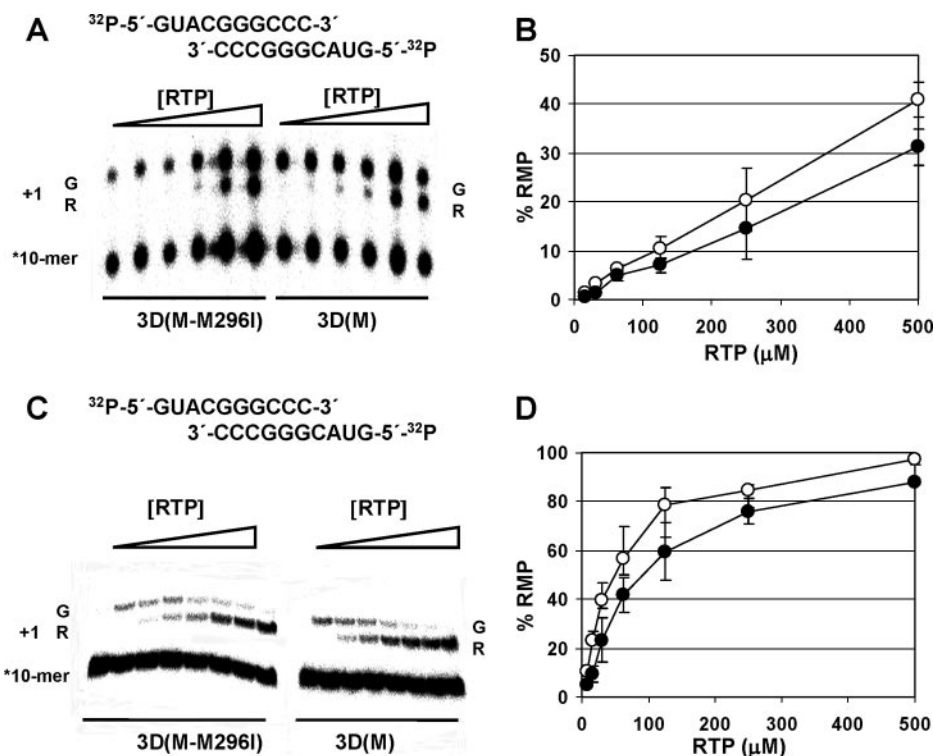


FIG. 6. Relative levels of incorporation of RMP and GMP using a heteropolymeric template-primer. (A) Incorporation of GMP and RMP using the sym/sub-RNA 5'-GUACGGGCC-3' (2 nM),  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (15 mM), GTP (10 nM), and RTP (15, 31.25, 62.5, 125, 250, and 500  $\mu\text{M}$ ). Results of denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of the  $^{32}\text{P}$ -labeled products from 3D(M) and 3D(M-M296I) polymerase-catalyzed GMP and RMP incorporation are shown. The +1 incorporation position of G and R is indicated. (B) Incorporation of RMP as a function of RTP concentration [ $\circ$ , 3D(M);  $\bullet$ , 3D(M-M296I)]. Averages of results from three experiments performed like that shown in panel A are shown. (C) Incorporation of GMP and RMP using sym/sub-RNA (0.2 nM),  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (15 mM), GTP (1 nM), and RTP (7.5, 15, 31.25, 62.5, 125, 250, and 500  $\mu\text{M}$ ). The results of denaturing PAGE of the  $^{32}\text{P}$ -labeled products from 3D(M) and 3D(M-M296I) polymerase-catalyzed GMP and RMP incorporation are shown. (D) Incorporation of RMP as a function of RTP concentration [ $\circ$ , 3D(M);  $\bullet$ , 3D(M-M296I)]. Averages of results of three experiments performed like that shown in panel C (note the different scales in the ordinates between panels B and D) are shown. Standard deviations of densitometry values are given. Procedures are detailed in Materials and Methods.

rate RMP in the place of AMP, compared with 3D(M) (Fig. 5C and D). A similar difference was quantitated in experiments with poly(rC)-oligo(dG)<sub>15</sub> or poly(rU)-poly(rA)<sub>6</sub>, with increasing concentrations of GTP or ATP, respectively, and with a constant concentration of RTP (Fig. 5E to H). In this assay,

under identical Mn ion and template concentrations, RMP is preferentially incorporated in place of GMP (over AMP).

To investigate whether the decreased capacity to incorporate RTP relative to GTP was maintained with a heteropolymeric template, the incorporation of RTP versus GTP was

at position +2. RNase digestion and nucleotide (nearest-neighbor) analysis were performed as detailed in Materials and Methods. (B) Incorporation of RMP as a function of RTP concentration [ $\circ$ , 3D(M);  $\bullet$ , 3D(M-M296I)]. Shown are averages of results from four experiments performed like that whose results are shown in panel A. (C) Incorporation of RMP and AMP using poly(rU)-poly(rA)<sub>6</sub> as the template-primer,  $\text{MnCl}_2$  (10 mM), [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP (1 nM), and increasing concentrations of RTP (62.5, 125, 250, and 500  $\mu\text{M}$ ). The results of thin-layer chromatography of RNase-digested products are shown. The positions of ribavirin monophosphate (R) and AMP (A) are indicated; other symbols are as described for panel A. (D) Incorporation of RMP as a function of RTP concentration [ $\circ$ , 3D(M);  $\bullet$ , 3D(M-M296I)]. Averages of results from three experiments performed like that whose results are shown in panel C (note the different scales in the ordinates between panels B and D). (E) Incorporation of RMP and GMP using poly(rC)-oligo(dG)<sub>15</sub> as the template-primer,  $\text{MnCl}_2$  (10 mM), RTP (400  $\mu\text{M}$ ), and increasing concentrations of [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]GTP (0.5, 5, 10, and 50  $\mu\text{M}$ ). The results of thin-layer chromatography of RNase-digested products are shown. The positions of ribavirin monophosphate (R) and GMP (G) are indicated. The N lane shows the position of nucleoside monophosphates. Other symbols are as described for panel A. (F) Incorporation of RMP as a function of GTP concentration [ $\circ$ , 3D(M);  $\bullet$ , 3D(M-M296I)]. Shown are averages of results of three experiments performed like that whose results are shown in panel E. (G) Incorporation of RMP and AMP using poly(rU)-poly(rA)<sub>6</sub> as the template-primer,  $\text{MnCl}_2$  (10 mM), RTP (400  $\mu\text{M}$ ), and increasing concentrations of [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (0.05, 0.5, 1, and 5  $\mu\text{M}$ ). Results of thin-layer chromatography of RNase-digested products are shown. The positions of ribavirin monophosphate (R) and AMP (A) are indicated. Other symbols are as described for panel A. (H) Incorporation of RMP as a function of ATP concentration [ $\circ$ , 3D(M);  $\bullet$ , 3D(M-M296I)]. Shown are averages of results from three experiments performed like that whose results are shown in panel G (note the different scales in the ordinates between panels F and H). Standard deviations of densitometry values are given. Procedures are detailed in Materials and Methods.

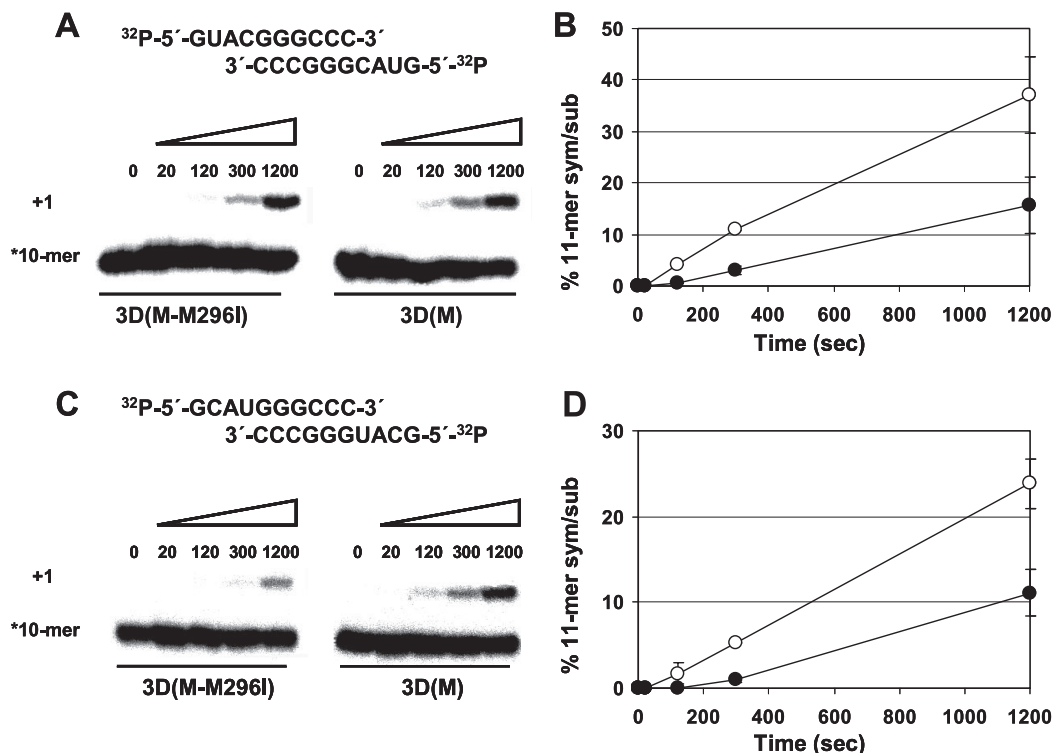


FIG. 7. Incorporation of RMP into sym/sub-C and sym/sub-U by wild-type 3D(M) and mutant 3D(M-M296I). (A) Denaturing PAGE of the  $^{32}\text{P}$ -labeled products of the polymerase-catalyzed RMP incorporation into sym/sub-C. 3D (3  $\mu\text{M}$ ) was mixed with sym/sub-C RNA (0.5  $\mu\text{M}$  duplex) for 10 min for annealing, and then RTP (50  $\mu\text{M}$ ) was added to the reaction mixture. Reactions were stopped at the indicated times by the addition of EDTA. (B) Kinetics (0, 20, 120, 300, and 1,200 s) of RMP incorporation into sym/sub-C by 3D(M) ( $\circ$ ) and 3D(M-M296I) ( $\bullet$ ). Shown are averages of results from three experiments performed like that whose results are shown in panel A. Standard deviations of densitometry values are given. (C and D) Experiments were performed and symbols are the same as those described for panels A and B, respectively, except that sym/sub-U was used as the template-primer. Procedures are detailed in Materials and Methods.

tested with a sym/sub-RNA template-primer at a defined (+1) template position (Fig. 6A to D). Under two different reaction conditions, 3D(M-M296I) showed a significantly lower capacity than wild-type 3D(M) to incorporate RMP in the place of GMP, in agreement with results using homopolymeric templates-primers. To examine how efficiently FMDV polymerase incorporates RMP when mimicking GTP or ATP, we measured the incorporation of RMP into sym/sub-C and sym/sub-U in the absence of standard nucleotides. The results (Fig. 7) show again that RMP was more efficiently incorporated with C as a template than with U. With the two templates, mutant 3D(M-M296I) incorporated RMP less efficiently than wild-type 3D(M), in agreement with the results of a competitive incorporation of RMP relative to GMP and AMP. Thus, the enzymological measurements agree with the virological studies and support the conclusion that FMDV polymerase with decreased sensitivity to R was selected upon passage of the virus in the presence of R.

## DISCUSSION

**New picornaviral RdRp with decreased sensitivity to ribavirin.** Previous results indicated that R is mutagenic for FMDV (1). Here we have reported that serial infections in the presence of increasing concentrations of R resulted in the selection of FMDV with a decreased sensitivity to R. The mutant spec-

tra of FMDV populations passaged in the presence of R showed elevated mutation frequencies, which reflected a continued mutagenic action of R, with a highly significant increase in the proportion of the transitions C $\rightarrow$ U and G $\rightarrow$ A relative to other mutation types (Table 1). This suggests a preference for RTP to be incorporated in place of GTP rather than in place of ATP by FMDV 3D or that UTP is incorporated more frequently than CTP when R is present in template RNA (1). Since R treatment of BHK-21 cells results in sustained intracellular levels of about 5 fmol/cell, while GTP levels are decreased to about 1 fmol/cell (1), an environmental pressure to misincorporate RTP instead of GTP is likely to be a selective force acting on FMDV while it replicates in the presence of R. This selective force may have contributed to the establishment of FMDV with substitution M296I in 3D. That this replacement was the result of selection by the presence of R is indicated by its dominance only in the FMDV MARLS quasispecies that replicated in the presence of R and not in the two MARLS quasispecies passaged in parallel in the absence of R (Fig. 1). M296I was not found in several mutant spectra of other FMDV lineages (large population passages or plaque-to-plaque transfers) in which replication occurred either in the absence of mutagens or in the presence of 5-fluorouracil or 5-azacytidine (31, 32, 55, 57, 68). Furthermore, substitution M296I in 3D conferred a selective advantage on FMDV—in the sequence context of either C-S8c1 or MARLS—in the

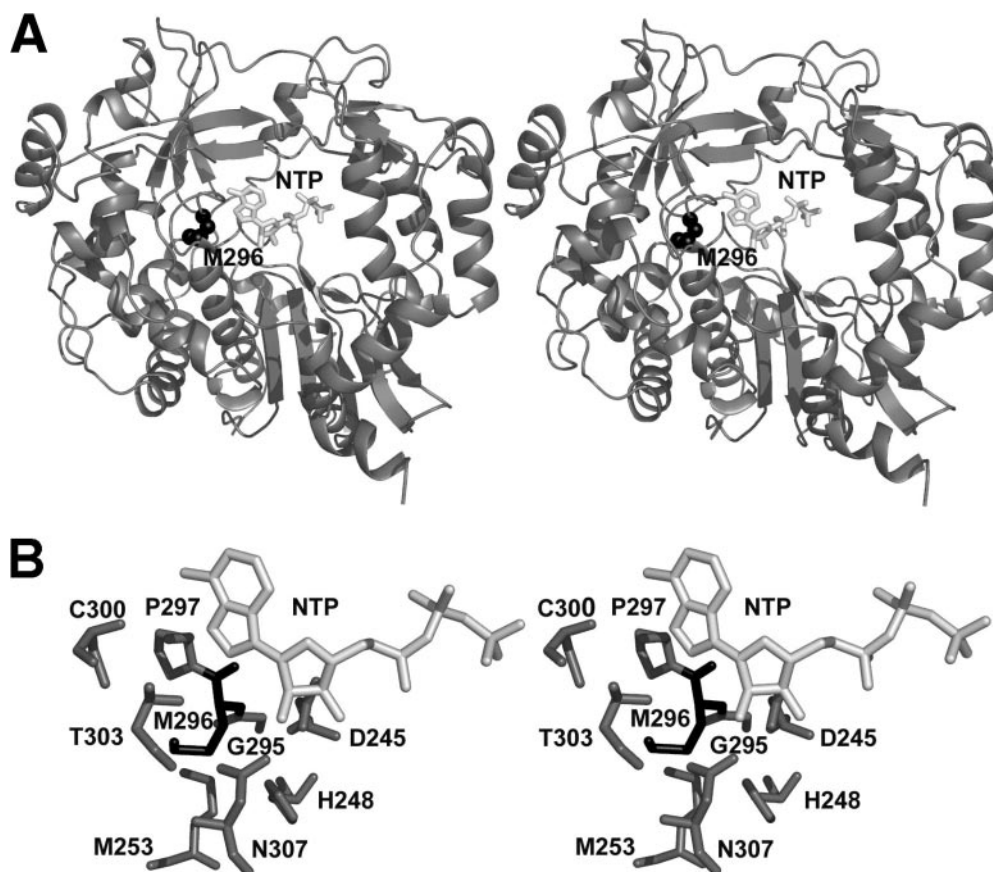


FIG. 8. Stereoviews of the location of M296 in the polymerase (3D) of FMDV. (A) Ribbon diagram of the structure of FMDV 3D that shows the location of M296 (the representation of CPK is in black) and an incoming nucleoside triphosphate (NTP) (white sticks). The structure corresponds to a complex with a template-primer; the incoming nucleotide is modeled as previously reported (35, 37). M296 is located in a loop connecting strand  $\beta$ 9 and the  $\alpha$ 11 helix (37). The sequence of this loop is highly conserved in picornaviral polymerases. (B) Diagram showing the amino acids that are in direct contact with M296. The modeled NTP is also shown as a reference. M296 does not have direct interactions with the template-primer RNA or with the incoming NTP. However, this residue is in close contact (distance, lower than 3.5 Å) with amino acids D245 and N307, both of which play an important role in the positioning of the incoming nucleotide substrate by direct hydrogen bonding of their side chains to the ribose 2' hydroxyl group (35, 37). M296 is also close to residues S298, C300, and T303, which might contact the NTP base (37). Diagrams are courtesy of N. Verdaguier (IBM-CSIC, Barcelona, Spain).

presence of R but not in its absence (Fig. 3). The differences in levels of sensitivity to R observed for the viral populations Ap35 and Bp35 (Fig. 1) despite similar high mutation frequencies could be due to differences in the mutant spectrum compositions of the two populations or to mutation frequencies approaching a plateau level compatible with continuing viral replication.

The fitness value of FMDV expressing 3D(M-M296I) relative to FMDV expressing 3D(M) was increased 7.6-fold in the presence of R, with respect to the value in the absence of R. The fitness cost of 3D replacement M296I was moderated (about twofold) (Fig. 4) and permitted the dominance of FMDV with 3D replacement M296I after five passages in the absence of R (populations Ap35 and Bp35 in Fig. 1).

The evolutionary behavior of FMDV in response to R is in agreement with biochemical data. Polymerization assays with 3D(M) and 3D(M-M296I) using homopolymeric and heteropolymeric templates-primers in the presence of  $Mg^{2+}$  or  $Mn^{2+}$  (3, 5, 37) suggest that at least part of the phenotypic behavior of FMDV associated with 3D substitution M296I is due to a

decreased capacity to incorporate RTP during RNA synthesis (Fig. 5 and 6). In polymerization assays with poly(rC)-poly(dG)<sub>15</sub> in the presence of  $Mn^{2+}$ , we observed the maximum capacity to incorporate RMP, in agreement with previously documented decreases in the copying fidelity of RdRps in the presence of  $Mn^{2+}$  (6, 7, 12). In the presence of  $Mg^{2+}$ , there was no polymerization activity with poly(rU)-poly(rA)<sub>6</sub>, and therefore we have not been able to compare the effects of a divalent ion in this system. In the incorporation assays used, either with RTP in competition with GTP or ATP, which resembles the physiological situation (Fig. 5 and 6), or with RTP alone (Fig. 7), RMP was incorporated in the place of GMP more preferentially than in the place of AMP. The maximum difference between 3D(M) and 3D(M-M296I) was seen in their relative capacities to use RTP instead of GTP as a substrate with homopolymeric templates (Fig. 5); technical problems impeded measurements of incorporation of RMP in the place of AMP using a heteropolymeric template. However, a difference between the two enzymes was also seen in the kinetics of incorporation of RMP with sym/sub-C and sym/

sub-U as templates-primers (Fig. 7). Additional studies are necessary to investigate the behavior of FMDV 3D when R is present in template RNA. Determinations of kinetic parameters are required to try to define the step in nucleotide incorporation affected by replacement M296I and to further evaluate whether the decreased incorporation of RMP by 3D(M-M296I) reflects a general alteration in the copying fidelity (decreased misincorporation of a standard nucleotide) by this enzyme. Also, phenotypic assays are in progress to evaluate whether 3D replacement M296I alters the adaptability of FMDV quasispecies in the face of other selective constraints.

An effect of M296I in nucleotide incorporation is not surprising in view of the location of M296I within an amino acid stretch (3D residues 295 to 299) which is highly conserved among picornaviral 3Ds and other RdRps (37). This conserved stretch includes S298, which interacts with template-primer RNA and is predicted to interact with the incoming nucleotide (37). Moreover, 3D residues 300 to 307 (which are part of helix  $\alpha$ 11) include amino acids which either establish contacts with RNA or, again, are predicted to interact with the incoming nucleotide substrate (37) (Fig. 8). Therefore, M296I may exert some influence on the discrimination of standard nucleotides or nucleotide analogues, and structural and enzymological studies to explore this possibility are in progress.

**At least two domains of picornavirus 3D can affect RMP incorporation, with implications for error catastrophe as an antiviral strategy.** Viral extinction through error catastrophe or lethal mutagenesis has been supported by many experimental results and by theoretical studies when the latter are based on realistic assumptions such as the coexistence of genomes with different fitness levels in the mutant spectrum (10, 11, 17, 18, 28, 29, 43, 54, 71; see reviews in references 2 and 27). The transition toward viral extinction occurs with a decrease of specific infectivity, an increase in the complexity of the mutant spectrum, and an invariant consensus sequence of the viral genome (18, 19, 42, 46, 55, 56, 68), a set of properties that distinguish extinction associated with error catastrophe from extinction due solely to the inhibition of viral replication. Furthermore, direct experimental evidence indicates that mutagenesis is required to produce viral extinction (55, 57). Recent developments include evidence of the mutagenic activity of ribavirin in the course of a successful treatment of patients chronically infected with hepatitis C virus (9, 78) and the initiation of a clinical trial with AIDS patients involving the administration of a nucleoside analogue (48).

A poliovirus mutant with replacement G64S in 3D showing decreased sensitivity to R was isolated, and its RdRp has been characterized (8, 62). The mutant enzyme showed an increased template-copying fidelity, produced poliovirus populations with a less complex mutant spectrum than the wild-type enzyme, and rendered the viral quasispecies less adaptable to a complex environment (61, 76). Enzyme catalysis studies suggest that replacement G64S may induce a conformational change in 3D that precedes the phosphoryl transfer during nucleotide incorporation (8). Unlike replacement M296I in FMDV 3D, replacement G64S in poliovirus 3D lies far from residues involved directly in template recognition and nucleotide binding (8, 36, 37, 74). It has been suggested that G64, located in the finger domain of poliovirus 3D, is hydrogen bonded to residues which in turn are hydrogen bonded to 3D

motif A, which includes residues that bind metal ions or interact with the ribose moiety of the incoming nucleotide. The perturbation of motif A as a result of G64S may alter the equilibrium position of the triphosphate and the fidelity properties of the enzyme (8).

Two groups independently isolated the same G64S 3D poliovirus mutation, affecting a residue that does not interact directly with the incoming nucleotide (62, 75). The isolation of the M296I mutation in FMDV 3D, however, suggests that the occurrence of picornavirus mutants with a decreased capacity to incorporate RTP (and perhaps other nucleotide analogues) may not be as restricted as suggested by the results with poliovirus. Substitutions at different enzyme domains may lead to related mutagen-resistant phenotypes, which could contribute to failures in the event of an application of lethal mutagenesis as an antiviral strategy. RdRp mutations that confer a decreased sensitivity of hepatitis C virus to R *in vivo* have been reported (78). One possibility is that, when the intensity of the mutagenic activity is sufficient, no extinction escape mutants will be selected (55, 57, 72). Noticeably, the isolation of FMDV with decreased sensitivity to R was achieved by passaging the virus in the presence of increasing concentrations of R (Fig. 1). Genomes encoding 3D replacement M296I were not detected in the mutant spectra of FMDV treated directly with high R concentrations on the way to extinction (1). In this view, the situation would have a parallel in the isolation of inhibitor escape viral variants, which is favored by suboptimal inhibitory concentrations (52). Weighing against selection of extinction escape mutants in lethal mutagenesis is the interfering effect of mutagenized mutant spectra (20, 41, 47). More work is needed to clarify the tolerance of viral polymerases to accept replacements that enhance viral resistance to mutagenic agents and to evaluate to what extent such replacements can affect the efficacy of lethal mutagenesis. Interestingly, mutagen-resistant polymerase mutants may offer a tool for understanding the molecular basis of template-copying fidelity and to design new fidelity-lowering drugs to become components of formulations for lethal mutagenesis (2, 27, 48, 51).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to C. Escarmís for the supply of infectious FMDV clones and valuable advice, to N. Verdaguier for information on the structures of 3D and 3D complexes and for the preparation of Fig. 8, to M. Dávila for expert technical assistance, and to J. C. de la Torre for supplying ribavirin.

This work was supported by grant BFU-2005-00863 from MCyT, by grant 08.2/0015/2001 from CAM, and by the Fundación R. Arecos. M.S. was supported by a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia, A. Airaksinen by a Marie Curie Fellowship of the European Community program Quality of Life and Management of Living Resources under contract QLK2-CT-1999-51462, C.G.-L. by a postdoctoral fellowship from CAM, R.A. by a predoctoral fellowship from CAM, and A. Arias by a postdoctoral contract under Proyecto Intramural de Frontera (CSIC, 2005).

#### REFERENCES

1. Airaksinen, A., N. Pariente, L. Menendez-Arias, and E. Domingo. 2003. Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* **311**:339–349.
2. Anderson, J. P., R. Daifuku, and L. A. Loeb. 2004. Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:183–205.
3. Arias, A., R. Agudo, C. Ferrer-Orta, R. Perez-Luque, A. Airaksinen, E. Brocchi, E. Domingo, N. Verdaguier, and C. Escarmís. 2005. Mutant viral polymerase in the transition of virus to error catastrophe identifies a critical site for RNA binding. *J. Mol. Biol.* **353**:1021–1032.

4. Arias, A., C. M. Ruiz-Jarabo, C. Escarmis, and E. Domingo. 2004. Fitness increase of memory genomes in a viral quasispecies. *J. Mol. Biol.* **339**:405–412.
5. Arnold, J. J., and C. E. Cameron. 2000. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D<sup>pol</sup>). Assembly of stable, elongation-competent complexes by using a symmetrical primer-template substrate (sym/sub). *J. Biol. Chem.* **275**:5329–5336.
6. Arnold, J. J., S. K. Ghosh, and C. E. Cameron. 1999. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D<sup>pol</sup>). Divalent cation modulation of primer, template, and nucleotide selection. *J. Biol. Chem.* **274**:37060–37069.
7. Arnold, J. J., D. W. Gohara, and C. E. Cameron. 2004. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D<sup>pol</sup>): pre-steady-state kinetic analysis of ribonucleotide incorporation in the presence of Mn<sup>2+</sup>. *Biochemistry* **43**: 5138–5148.
8. Arnold, J. J., M. Vignuzzi, J. K. Stone, R. Andino, and C. E. Cameron. 2005. Remote site control of an active site fidelity checkpoint in a viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **280**:25706–25716.
9. Asahina, Y., N. Izumi, N. Enomoto, M. Uchihara, M. Kurosaki, Y. Onuki, Y. Nishimura, K. Ueda, K. Tsuchiya, H. Nakanishi, T. Kitamura, and S. Miyake. 2005. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **43**:623–629.
10. Biebricher, C. K., and M. Eigen. 2005. The error threshold. *Virus Res.* **107**:117–127.
11. Biebricher, C. K., and M. Eigen. 2006. What is a quasispecies? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**:1–31.
12. Castro, C., J. J. Arnold, and C. E. Cameron. 2005. Incorporation fidelity of the viral RNA-dependent RNA polymerase: a kinetic, thermodynamic and structural perspective. *Virus Res.* **107**:141–149.
13. Charpentier, N., M. Dávila, E. Domingo, and C. Escarmis. 1996. Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. *Virology* **223**: 10–18.
14. Chumakov, K. M., L. B. Powers, K. E. Noonan, I. B. Roninson, and I. S. Levenbook. 1991. Correlation between amount of virus with altered nucleotide sequence and the monkey test for acceptability of oral poliovirus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:199–203.
15. Cline, J., J. C. Braman, and H. H. Hogrefe. 1996. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **24**:3546–3551.
16. Contreras, A. M., Y. Hiasa, W. He, A. Terella, E. V. Schmidt, and R. T. Chung. 2002. Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J. Virol.* **76**: 8505–8517.
17. Crotty, S., C. Cameron, and R. Andino. 2002. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J. Mol. Med.* **80**:86–95.
18. Crotty, S., C. E. Cameron, and R. Andino. 2001. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:6895–6900.
19. Crotty, S., D. Maag, J. J. Arnold, W. Zhong, J. Y. N. Lau, Z. Hong, R. Andino, and C. E. Cameron. 2000. The broad-spectrum antiviral ribonucleotide, ribavirin, is an RNA virus mutagen. *Nat. Med.* **6**:1375–1379.
20. Crowder, S., and K. Kirkegaard. 2005. Trans-dominant inhibition of RNA viral replication can slow growth of drug-resistant viruses. *Nat. Genet.* **37**: 701–709.
21. Day, C. W., D. F. Smee, J. G. Julander, V. F. Yamshchikov, R. W. Sidwell, and J. D. Morrey. 2005. Error-prone replication of West Nile virus caused by ribavirin. *Antivir. Res.* **67**:38–45.
22. de la Torre, J. C., B. Alarcón, E. Martínez-Salas, L. Carrasco, and E. Domingo. 1987. Ribavirin cures cells of a persistent infection with foot-and-mouth disease virus in vitro. *J. Virol.* **61**:233–235.
23. de la Torre, J. C., and J. J. Holland. 1990. RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *J. Virol.* **64**:6278–6281.
24. Domingo, E. (ed.). 2006. Current topics in microbiology and immunology, vol. 299. Quasispecies: concepts and implications for virology. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
25. Domingo, E., C. Biebricher, M. Eigen, and J. J. Holland. 2001. Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences. Landes Bioscience, Austin, TX.
26. Domingo, E., M. Dávila, and J. Ortín. 1980. Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* **11**:333–346.
27. Domingo, E. (ed.). 2005. Virus entry into error catastrophe as a new antiviral strategy. *Virus Res.* **107**:115–228.
28. Eigen, M. 2002. Error catastrophe and antiviral strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:13374–13376.
29. Eigen, M., and C. K. Biebricher. 1988. Sequence space and quasispecies distribution, p. 211–245. *In* E. Domingo, P. Ahlquist, and J. J. Holland (ed.), RNA genetics, vol. 3. CRC Press, Boca Raton, FL.
30. Eigen, M., and P. Schuster. 1979. The hypercycle. A principle of natural self-organization. Springer, Berlin, Germany.
31. Escarmis, C., M. Dávila, N. Charpentier, A. Bracho, A. Moya, and E. Domingo. 1996. Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J. Mol. Biol.* **264**:255–267.
32. Escarmis, C., G. Gómez-Mariano, M. Dávila, E. Lázaro, and E. Domingo. 2002. Resistance to extinction of low fitness virus subjected to plaque-to-plaque transfers: diversification by mutation clustering. *J. Mol. Biol.* **315**: 647–661.
33. Farci, P., A. Shimoda, A. Coiana, G. Diaz, G. Peddis, J. C. Melpolder, A. Strazzer, D. Y. Chien, S. J. Munoz, A. Balestrieri, R. H. Purcell, and H. J. Alter. 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* **288**:339–344.
34. Farci, P., R. Strazzer, H. J. Alter, S. Farci, D. Degioannis, A. Coiana, G. Peddis, F. Usai, G. Serra, L. Chessa, G. Diaz, A. Balestrieri, and R. H. Purcell. 2002. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:3081–3086.
35. Ferrer-Orta, C., A. Arias, R. Agudo, R. Perez-Luque, C. Escarmis, E. Domingo, and N. Verdaguier. 2006. The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J.* **25**:880–888.
36. Ferrer-Orta, C., A. Arias, C. Escarmis, and N. Verdaguier. 2006. A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**:27–34.
37. Ferrer-Orta, C., A. Arias, R. Perez-Luque, C. Escarmis, E. Domingo, and N. Verdaguier. 2004. Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J. Biol. Chem.* **279**:47212–47221.
38. Figlerowicz, M., M. Alejska, A. Kurzynska-Kokorniak, and M. Figlerowicz. 2003. Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med. Res. Rev.* **23**:488–518.
39. García-Arriaza, J., E. Domingo, and C. Escarmis. 2005. A segmented form of foot-and-mouth disease virus interferes with standard virus: a link between interference and competitive fitness. *Virology* **335**:155–164.
40. García-Arriaza, J., S. C. Manrubia, M. Toja, E. Domingo, and C. Escarmis. 2004. Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J. Virol.* **78**:11678–11685.
41. González-López, C., A. Arias, N. Pariente, G. Gómez-Mariano, and E. Domingo. 2004. Preextinction viral RNA can interfere with infectivity. *J. Virol.* **78**:3319–3324.
42. González-López, C., G. Gómez-Mariano, C. Escarmis, and E. Domingo. 2005. Invariant aphthovirus consensus nucleotide sequence in the transition to error catastrophe. *Infect. Genet. Evol.* **5**:366–374.
43. Graci, J. D., and C. E. Cameron. 2004. Challenges for the development of ribonucleoside analogues as inducers of error catastrophe. *Antivir. Chem. Chemother.* **15**:1–13.
44. Graci, J. D., and C. E. Cameron. 2006. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev. Med. Virol.* **16**:37–48.
45. Graci, J. D., and C. E. Cameron. 2002. Quasispecies, error catastrophe, and the antiviral activity of ribavirin. *Virology* **298**:175–180.
46. Grande-Pérez, A., G. Gómez-Mariano, P. R. Lowenstein, and E. Domingo. 2005. Mutagenesis-induced, large fitness variations with an invariant arenavirus consensus genomic nucleotide sequence. *J. Virol.* **79**:10451–10459.
47. Grande-Pérez, A., E. Lázaro, P. Lowenstein, E. Domingo, and S. C. Manrubia. 2005. Suppression of viral infectivity through lethal defection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:4448–4452.
48. Harris, K. S., W. Brabant, S. Styrchak, A. Gall, and R. Daifuku. 2005. KP-1212/1461, a nucleoside designed for the treatment of HIV by viral mutagenesis. *Antivir. Res.* **67**:1–9.
49. Holland, J. J., J. C. de la Torre, D. K. Clarke, and E. Duarte. 1991. Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J. Virol.* **65**:2960–2967.
50. Lanford, R. E., D. Chavez, B. Guerra, J. Y. Lau, Z. Hong, K. M. Brasky, and B. Beames. 2001. Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes. *J. Virol.* **75**:8074–8081.
51. Loeb, L. A., J. M. Essigmann, F. Kazazi, J. Zhang, K. D. Rose, and J. I. Mullins. 1999. Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:1492–1497.
52. Menéndez-Arias, L. 2002. Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**:381–388.
53. Moreno, I. M., J. M. Malpica, E. Rodríguez-Cerezo, and F. García-Arenal. 1997. A mutation in tomato aspermy cucumovirus that abolishes cell-to-cell movement is maintained to high levels in the viral RNA population by complementation. *J. Virol.* **71**:9157–9162.
54. Nowak, M., and P. Schuster. 1989. Error thresholds of replication in finite population mutation frequencies and the onset of Muller's ratchet. *J. Theor. Biol.* **137**:375–395.
55. Pariente, N., A. Airaksinen, and E. Domingo. 2003. Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **77**:7131–7138.
56. Pariente, N., S. Sierra, and A. Airaksinen. 2005. Action of mutagenic agents and antiviral inhibitors on foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* **107**:183–193.
57. Pariente, N., S. Sierra, P. R. Lowenstein, and E. Domingo. 2001. Efficient



- virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *J. Virol.* **75**:9723–9730.
58. **Parker, W. B.** 2005. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res.* **107**:165–171.
  59. **Pawlotsky, J. M.** 2006. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**:261–284.
  60. **Pawlotsky, J. M.** 2000. Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology* **32**:889–896.
  61. **Pfeiffer, J. K., and K. Kirkegaard.** 2005. Increased fidelity reduces poliovirus fitness under selective pressure in mice. *PLoS Pathog.* **1**:102–110.
  62. **Pfeiffer, J. K., and K. Kirkegaard.** 2003. A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:7289–7294.
  63. **Quer, J., J. I. Esteban, J. Cos, S. Sauleda, L. Ocana, M. Martell, T. Otero, M. Cubero, E. Palou, P. Murillo, R. Esteban, and J. Guardia.** 2005. Effect of bottlenecks on evolution of the nonstructural protein 3 gene of hepatitis C virus during sexually transmitted acute resolving infection. *J. Virol.* **79**:15131–15141.
  64. **Rowe, C. L., S. C. Baker, M. J. Nathan, and J. O. Fleming.** 1997. Evolution of mouse hepatitis virus: detection and characterization of spike deletion variants during persistent infection. *J. Virol.* **71**:2959–2969.
  65. **Ruiz-Jarabo, C. M., C. Ly, E. Domingo, and J. C. de la Torre.** 2003. Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology* **308**:37–47.
  66. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  67. **Severson, W. E., C. S. Schmaljohn, A. Javadian, and C. B. Jonsson.** 2003. Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J. Virol.* **77**:481–488.
  68. **Sierra, S., M. Dávila, P. R. Lowenstein, and E. Domingo.** 2000. Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis. Influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *J. Virol.* **74**:8316–8323.
  69. **Snell, N. J.** 2001. Ribavirin—current status of a broad spectrum antiviral agent. *Expert Opin. Pharmacother.* **2**:1317–1324.
  70. **Sobrinho, F., M. Dávila, J. Ortín, and E. Domingo.** 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**:310–318.
  71. **Swetina, J., and P. Schuster.** 1982. Self-replication with errors. A model for polynucleotide replication. *Biophys. Chem.* **16**:329–345.
  72. **Tapia, N., G. Fernandez, M. Parera, G. Gomez-Mariano, B. Clotet, M. Quinones-Mateu, E. Domingo, and M. A. Martínez.** 2005. Combination of a mutagenic agent with a reverse transcriptase inhibitor results in systematic inhibition of HIV-1 infection. *Virology* **338**:1–8.
  73. **Teng, M. N., M. B. Oldstone, and J. C. de la Torre.** 1996. Suppression of lymphocytic choriomeningitis virus-induced growth hormone deficiency syndrome by disease-negative virus variants. *Virology* **223**:113–119.
  74. **Thompson, A. A., and O. B. Peersen.** 2004. Structural basis for proteolysis-dependent activation of the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *EMBO J.* **23**:3462–3471.
  75. **Vignuzzi, M., J. K. Stone, and R. Andino.** 2005. Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Res.* **107**:173–181.
  76. **Vignuzzi, M., J. K. Stone, J. J. Arnold, C. E. Cameron, and R. Andino.** 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**:344–348.
  77. **Volckaert, G., and W. Fiers.** 1977. Micro thin-layer techniques for rapid sequence analysis of 32P-labeled RNA: double digestion and pancreatic ribonuclease analyses. *Anal. Biochem.* **83**:228–239.
  78. **Young, K. C., K. L. Lindsay, K. J. Lee, W. C. Liu, J. W. He, S. L. Milstein, and M. M. Lai.** 2003. Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology* **38**:869–878.