

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**APROXIMACIONES A LA**  
**OBTENCIÓN DE CÁPSIDAS MÁS ESTABLES**  
**DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA**  
**Y**  
**ESTUDIO DE LA GENERACIÓN DE**  
**MUTACIONES COMPENSATORIAS**

Memoria presentada por  
**Eva Luna García**  
Para optar al grado de  
Doctor en Ciencias.

**Madrid, 2010**

Este trabajo ha sido realizado durante los años 2004 a 2008 en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM) bajo la dirección del Dr. Mauricio García Mateu.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director de tesis, el Prof. Mauricio García Mateu, el haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este trabajo en el laboratorio que dirige. En este tiempo bajo su guía, creo haber aprendido mucho acerca de lo que es la investigación para conocer cada día un poco más del apasionante mundo de la naturaleza. Agradezco también al Dr. Roberto Mateo y a Alicia Rodríguez Huete y Verónica Rincón su colaboración y ayuda experimental para la realización de este trabajo.

A mis primeros compañeros del grupo, cuando estábamos en los tiempos primigenios del laboratorio 214 (de menor tamaño que el actual), por ayudar a resolver mis dudas y especialmente a Roberto, mi guía y primer “compañero de virus”. Más tiempo he pasado con las chicas tras la mudanza al 118 y al actual 205: Mila, Rebeca, Rebeca Valladolid, Verónica y Alicia, y por supuesto Miguel Ángel, el actual chico 205. ¡Lo que nos hemos reído en nuestras conversaciones-cotilleos del día a día! y cuyo tono de voz se fue incrementando de forma paralela a como lo hacían los m<sup>2</sup> del laboratorio. Especialmente a Verónica, mi segunda compañera de virus, y a Alicia con lo bien que nos lo pasamos con las secuencias.

Agradezco en general a toda la gente del laboratorio 121, donde siempre encontraban un reactivo que no tenía (y ellos tampoco) pero que siempre conseguían pidiéndolo o rebuscando en sus arcones. En especial a Cristina Escarmís y Mercedes Dávila por responder siempre a mis dudas. En la misma línea agradezco a la gente del laboratorio 105: Miguel, Raúl, Miguel CISA, Yuri, Maite, Mónica, Ángela y Mary. Con mucho cariño a todos los que fueron mis compañeros de Cultivos: laboratorio VPPA, laboratorio 105 y laboratorio 121, por los buenísimos ratos que hemos pasado comentado la prensa rosa del mundo animal y en general siempre en el día a día en cultivos. Allí, fuera por lo que fuera, tenias un rato de risa (y de conversación de nuestros queridísimos virus, que había tiempo para todo) asegurado. También a los “cuidadores de cultivos” Alfonso, M<sup>a</sup> Ángeles y Anuncia por tenerlo todo tan bien colocado y ser tan majos.

A las chicas de cocinas, especialmente a Valentina y Eva. A las chicas de radiactividad, que me han ayudado en el manejo de los isótopos. A los chicos (y a Peña) de informática, por ayudarme en mis múltiples preguntas y dudas informáticas (tanto de PC como de mac). En general a toda la gente del C.B.M. que me ha resuelto alguna duda o me ha prestado algo que necesitaba en ese momento.

También a JJ, por irme a buscar cuando salía tarde y por ayudarme con los programas informáticos.

# ABREVIATURAS

<b>A<sub>λ</sub></b>	Absorbancia
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BHK</b>	Células de riñón de hámster ( <i>Baby Hamster Kidney</i> )
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>c.p.m.</b>	Cuentas por minuto
<b>CPV</b>	Parvovirus canino ( <i>Canine ParvoVirus</i> )
<b>cre</b>	Elemento de replicación que actúa en <i>cis</i> ( <i>Cis-acting Replicating Element</i> )
<b>Ct</b>	Carboxilo terminal
<b>dATP</b>	5'-trifosfato de 2'-desoxiadenosina
<b>dCTP</b>	5'-trifosfato de 2'-desoxicitidina
<b>dGTP</b>	5'-trifosfato de 2'-desoxiguanosina
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco-Modified Eagle Medium</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>dTTP</b>	5'-trifosfato de 2'-desoxitimidina
<b>e.c.p.</b>	Efecto citopático
<b>EDTA</b>	Ácido etilendinitrilotetraacético
<b>g</b>	Aceleración de la gravedad
<b>h</b>	Horas
<b>HAV</b>	Virus de la hepatitis A ( <i>Hepatitis A Virus</i> )
<b>HBV</b>	Virus de la hepatitis B ( <i>Hepatitis B Virus</i> )
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(hidroxiethyl)-1-piperazina etanolsulfónico
<b>HIV</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana ( <i>Human immunodeficiency virus</i> )
<b>h.p.t</b>	Horas post-transfección
<b>HRV</b>	Rinovirus humano ( <i>Human RhinoVirus</i> )
<b>IRES</b>	Sitio interno de entrada al ribosoma ( <i>Internal Ribosome Entry Site</i> )
<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria-Bertani
<b>m.d.i.</b>	Multiplicidad de infección
<b>min.</b>	Minutos
<b>MODIP</b>	Un programa de modelado de puentes disulfuro ( <i>MOdelling of Disulphide bonds in Proteins</i> )
<b>MVM</b>	Virus diminuto del ratón ( <i>minute virus of mice</i> )
<b>Nt</b>	Amino terminal
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase-Chain Reaction</i> )
<b>PDB</b>	Banco de datos de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> )
<b>PFU</b>	Unidad formadora de placa ( <i>Plaque-Forming Unit</i> )
<b>PhMV</b>	Virus del moteado de <i>Physalis</i> ( <i>Physalis Mottle Virus</i> )
<b>PIPES</b>	Ácido piperazina-N, N'-bis (2-etanosulfónico)
<b>p.n.</b>	Pares de nucleótidos
<b>PoliA</b>	Poliadenilato
<b>PoliC</b>	Policitidilato
<b>PV</b>	Virus de la poliomielitis ( <i>PolioVirus</i> )
<b>rATP</b>	5'-trifosfato de adenosina
<b>rct</b>	Variación de la capacidad reproductiva a temperatura supraóptima
<b>rCTP</b>	5'-trifosfato de citidina
<b>rGTP</b>	5'-trifosfato de guanosina
<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT-PCR</b>	Reacción de transcripción inversa seguida de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa ( <i>reverse-transcriptase PCR</i> )
<b>rUTP</b>	5'-trifosfato de uridina
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico
<b>SF</b>	Suero fetal bovino
<b>TMV</b>	Virus del mosaico del tabaco ( <i>Tobacco Mosaic Virus</i> )
<b>TYMV</b>	Virus del mosaico amarillo del nabo ( <i>Turnip Yellow Mosaic Virus</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VFA</b>	Virus de la fiebre aftosa

# ÍNDICE

	Página
<b>ABSTRACT / RESUMEN EN INGLÉS</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>12</b>
<b>1. 1. La fiebre aftosa</b>	<b>12</b>
1.1.1. Descripción de la enfermedad	12
1.1.2. Vacunas en uso contra la fiebre aftosa y problemas que presentan	12
<b>1.2. El virus de la fiebre aftosa</b>	<b>13</b>
1.2.1. Clasificación	13
1.2.2 Organización del genoma y proteínas víricas	14
1.2.3. Estructura de la cápsida	16
<b>1.3. Ensamblaje, estabilidad conformacional y desensamblaje del virus de la fiebre aftosa</b>	<b>18</b>
1.3.1 Ensamblaje	18
1.3.2. Sensibilidad a pH ácido y desencapsidación	19
1.3.3. Termoestabilidad	20
1.3.4. Bases moleculares del ensamblaje, estabilidad conformacional y desensamblaje de partículas víricas	21
<b>1.4. Aproximaciones para la obtención de variantes víricos que presenten una mayor termoestabilidad. Aplicación preliminar a VFA</b>	<b>24</b>
1.4.1 Desarrollo de nuevas vacunas contra la fiebre aftosa	24
1.4.2. Posibles limitaciones selectivas a la estabilidad de las cápsidas víricas	25
1.4.3. Selección y aislamiento de variantes termoestables a partir de poblaciones víricas	26
1.4.4. Diseño racional de variantes víricos termoestables mediante ingeniería de proteínas	27
<b>1.5. Mutaciones compensatorias en virus</b>	<b>29</b>
1.5.1. Cuasiespecies víricas	29
1.5.2. Mutaciones compensatorias en genomas víricos	30
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
3.1. Disoluciones y tampones	35
3.2. Células eucarióticas	35
3.2.1. Células BHK-21 y su cultivo	35
3.2.2. Descongelación de células BHK-21	36
3.2.3. Congelación y almacenamiento de células BHK-21	36
3.3. Virus e infecciones	36
3.3.1. VFA utilizados	36
3.3.2. Infecciones con VFA en medio líquido	38
3.3.3. Amplificación de poblaciones de VFA en cultivos celulares	38
3.3.4. Tratamiento térmico de poblaciones de VFA para la selección de mutantes termoestables	38
3.3.5. Titulación de VFA	39
3.4. Preparación de células <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ competentes	39
3.5. Plásmidos, mutagénesis dirigida y subclonaje	39
3.5.1. Plásmidos utilizados para la mutagénesis y el subclonaje en un clon infeccioso de VFA	39
3.5.2. Mutagénesis dirigida	40
3.5.2.1. Oligonucleótidos para mutagénesis dirigida	40
3.5.2.2. PCR mutagénica	42
3.5.2.3. Transformación de células <i>E.coli</i> XL1-Blue	42
3.5.3. Subclonaje molecular	42
3.6. Transcripción <i>in vitro</i> de ARN de VFA	42
3.7. Electroporación de células eucarióticas con ARN de VFA	43
3.8. Extracción de ARN de VFA y amplificación de fragmentos para secuenciación	43
3.9. Secuenciación de ADN	44
3.10. Purificación y marcaje radiactivo con <sup>35</sup> S de viriones de VFA	45
3.11. Electroforesis e inmunoelectrotransferencia de proteínas de la cápsida de VFA	46
3.12. Determinación de la resistencia de viriones de VFA a su inactivación térmica	46
3.12.1. Cinética de poblaciones con un título inicial de 1000 PFU/ml	46
3.12.2. Cinética de poblaciones con un título inicial elevado	47
3.12.3. Determinación de las constantes cinéticas de inactivación térmica	47

3.13. Determinación de la resistencia de viriones de VFA a su disociación térmica en subunidades pentaméricas	47
3.14. Ensayos de eficacia biológica de variantes de VFA	48
3.15. Análisis estructural de cápsidas víricas y modelado molecular	49
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>50</b>
4.1. Análisis de la presencia de variantes termoestables en diferentes poblaciones de VFA	50
4.1.1. Elección de poblaciones de VFA para intentar el aislamiento e identificación de variantes de mayor resistencia frente a la inactivación térmica	50
4.1.2. Determinación de las condiciones del ensayo de resistencia a la inactivación térmica	51
4.1.3. Análisis de la presencia de variantes termoestables en poblaciones naturales de VFA C-S8 (serotipo C)	53
4.1.4. Análisis de la presencia de variantes termoestables en poblaciones naturales de VFA de serotipos A y O	54
4.1.5. Análisis de la presencia de variantes termoestables en poblaciones de VFA CS-8 adaptadas a cultivos	55
4.1.6. Análisis de la presencia de variantes termoestables en poblaciones sometidas a selección mediante calentamiento y amplificación en pases seriados	57
4.2. Análisis de mutantes de VFA diseñados racionalmente para aumentar la termoestabilidad del virión	58
4.2.1. Elección de la estrategia de diseño racional	58
4.2.2. Intentos para incrementar la estabilidad térmica de VFA mediante la introducción de puentes disulfuro interpentaméricos	60
4.2.2.1. Diseño de virus modificados	60
4.2.2.2. Construcción y análisis de la infectividad de viriones modificados	63
4.2.2.3. Análisis de la presencia de puentes disulfuro en la cápsida de viriones modificados	63
4.2.2.4. Análisis de la resistencia de viriones modificados frente a la inactivación térmica de su infectividad	65
4.2.2.5. Análisis de la resistencia de viriones modificados frente a su disociación térmica	66

4.2.3. Análisis de la estabilidad térmica y otras propiedades de viriones de VFA modificados para el establecimiento de nuevas interacciones electrostáticas interpentaméricas	67
4.2.3.1. Análisis de inactivación térmica de viriones modificados por un método más sensible	67
4.2.3.2. Estudio de la relación entre inactivación de la infectividad y disociación de viriones de VFA por acción del calor	72
4.2.3.3. Análisis de disociación térmica de viriones modificados	73
4.2.3.4. Análisis de la estabilidad genética de viriones modificados	76
4.2.3.5. Análisis de la eficacia biológica de viriones modificados	76
4.3. Estudio sistemático de la respuesta genética de VFA como respuesta a la introducción de mutaciones deletéreas en las interfases interpentaméricas	78
4.3.1. Diseño experimental	78
4.3.2. Comparación de la frecuencia de reversión genotípica y de mutación como alternativas para restaurar la infectividad en los mutantes analizados	80
4.3.3. Análisis de la mutación compensatoria como un mecanismo general para restaurar el efecto deletéreo causado por la eliminación de grupos funcionales implicados en interacciones entre pentámeros en el virión de VFA	82
4.3.4. Análisis de mutaciones compensatorias en respuesta a mutaciones deletéreas que implican la sustitución de grupos funcionales en las interfases entre pentámeros	85
4.3.5. Localización espacial de las mutaciones compensatorias en la cápsida de VFA	86
4.3.6. Análisis de la conservación en VFA de los residuos localizados en las internas entre pentámeros de VFA C-S8c1, y de aquellos en los que ocurrieron mutaciones compensatorias	90
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>92</b>
5.1. Estabilidad de VFA	92
5.1.1. ¿Existen variantes termoestables en poblaciones de VFA?	92
5.1.2. ¿Es la estabilidad frente a la inactivación de la infectividad una característica sometida a selección negativa en VFA?	94
5.1.3. La estabilidad térmica de los viriones de VFA frente a su disociación en subunidades puede incrementarse sin efectos desfavorables sobre la función biológica y la infectividad	96

<b>5.1.4. Bases moleculares de la estabilidad frente a la disociación térmica de variantes de VFA diseñados racionalmente</b>	<b>97</b>
<b>5.1.5. Posible aplicación de virus termoestables en la mejora de vacunas contra la fiebre aftosa</b>	<b>100</b>
<b>5.2. Mutaciones compensatorias en la cápsida de VFA</b>	<b>102</b>
<b>5.2.1. La estrategia más frecuentemente empleada para revertir el efecto de mutaciones letales no es la reversión al fenotipo parental, sino la aparición de mutaciones secundarias compensatorias</b>	<b>102</b>
<b>5.2.2. Mutaciones acompañantes: sustituciones “terciarias”</b>	<b>103</b>
<b>5.2.3. Frecuencia, diversidad y distribución de las sustituciones secundarias</b>	<b>104</b>
<b>5.2.4. Aproximaciones a las bases estructurales de la compensación funcional en la cápsida</b>	<b>105</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>108</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>109</b>
<b>8. ANEXO</b>	<b>127</b>

## ABSTRACT / RESUMEN EN INGLÉS

Our laboratory is studying the molecular determinants of assembly, disassembly and stability of viral particles. As one model we are using foot-and-mouth-disease virus (FMDV), an economically important picornavirus for which much structural and functional information is available.

The first part of this Ph.D. study was aimed at the generation of thermostable, but infectious and genetically stable FMDV mutants, either by isolation from viral populations or through rational protein engineering approaches. Such variants, if they could be obtained and characterized, would help to provide insights into the molecular basis of virus stability and its relationship with biological fitness, and could also facilitate the development of improved, thermostable FMD vaccines.

In collaboration with Dr. Mateo from our laboratory, we have investigated the presence in a wide range of FMDV populations of virus variants with an increased resistance to thermal inactivation. The results with both uncloned and cloned populations, from three different serotypes, recovered from cytolytic or persistent infections, and/or subjected to either very few passages or extensive passaging in cell culture do not rule out the possibility that thermostable variants could be present in some specific FMDV populations. However, they clearly indicate that the presence of thermostable virus variants, even in small proportions, is not a general feature of FMDV quasispecies. This suggests that no substantial increase in the stability of FMDV against thermal inactivation may readily occur without a negative effect on viral function.

As an alternative approach to explore whether thermostable variants of FMDV can be obtained, Dr. Mateo in our laboratory started attempts at the rational engineering of FMD virions with further electrostatic interactions between the pentameric capsid subunits. Three mutants (D3069E/T2188A, A2065K y A2065H) were viable, and one of them (D3069E/T2188A) showed an increased stability against dissociation into subunits in preliminary experiments carried out at 4°C. We have continued and expanded these studies in collaboration with Dr. Mateo. First, an alternative engineering approach for thermostabilization was attempted, based on the rational introduction of disulfide bonds between pentameric subunits, in order to provide further promising variants for a full characterization. The advantage of this latter approach is that the disulfide bonds could stabilize the extracellular virion, but not the intracellular virion because they would be reduced inside the cell. Thus, any unfavourable intracellular effect that capsid stabilization could have on infectivity (e.g., by impairing uncoating) would be avoided. Unfortunately, none of the 8 disulfide FMDV mutants engineered showed the desirable characteristics of preserved infectivity plus increased thermostability.

We then carried out a characterization of the three viable mutants that resulted from the attempts at introducing new interpentamer electrostatic interactions. We found that the engineered mutants D3069E/T2188A y A2065H are normally infectious and genetically fairly stable, and they show a highly increased thermostability against dissociation into pentamers, both at low and moderate temperatures. We also found that, in FMDV, inactivation of infectivity occurs much faster than dissociation into subunits. This finding reconciles our findings that no mutants of increased resistance to inactivation appear to be present in FMDV populations, while infectious FMDV variants of increased resistance to dissociation into subunits can be engineered.

The above results indicate that virion thermostability against dissociation into subunits may not be selectively constrained by functional requirements for infectivity, and provide the first thermostable engineered FMDVs for the development of vaccines less critically dependent on a cold chain.

The second part of our study aimed at investigating in depth the genetic response of a highly variable virus like FMDV, when individual deleterious mutations are systematically introduced along a functionally defined region of its genome, the interface between pentameric subunits. An understanding of the dynamics of compensatory mutations at this capsid region could help the rational choice of further combinations of mutations that may increase virion thermostability without compromising viability.

We used viral RNAs individually containing individual deleterious mutations of the 28 interfacial residues per protomer that proved critically needed for virus viability, and a few others created specifically for this purpose, to carry out a total of 96 transfections of susceptible cells, generally followed by passage(s) of the viral progeny in cell culture. The results revealed a very high frequency of fixation in the capsid of second-site, stereochemically diverse substitutions that compensated for the detrimental effect of primary substitutions at many different positions. Most second-site substitutions occurred at or near the capsid interpentamer interfaces, and involved residues that are spatially very close to the originally substituted residue. However, others occurred far from the primary substitution, and even from the interpentamer interfaces. The frequency and diversity of adequate second-site mutations was quite high, but a substantial part of the ability of the virus to accommodate many deleterious mutations at the capsid intersubunit interfaces appears to rely on the presence of a few defined capsid positions (second-site hotspots). These were revealed as privileged sites for the introduction of a sort of “general purpose” substitutions able to compensate for the deleterious effects of many different mutations at different positions in the capsid interfaces.

This remarkable capacity of the virus to respond to the introduction of deleterious mutations in the capsid with the frequent fixation of diverse second-site mutations has revealed second-site mutation as a strategy that may be widely used by FMDV to restore the infectivity lost by capsid mutations. The quasispecies structure of RNA virus populations would make such multiple combinations of compensatory mutations likely enough to actually occur with high frequency in the viral populations. This possibility may have profound implications for the variation and evolution of RNA viruses.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La fiebre aftosa

### 1.1.1. Descripción de la enfermedad

La fiebre aftosa es una enfermedad vírica que afecta a animales rumiantes ungulados, incluyendo vacas, cerdos y cabras (Pereira, 1981; Ferguson *et al.*, 2001; Sobrino *et al.*, 2001; Sobrino y Domingo, 2004; Mahy, 2005). La fiebre aftosa es una de las enfermedades animales económicamente más importantes a escala mundial. Entre las razones que justifican esta importancia pueden citarse las siguientes: i) disminución en la producción ganadera; ii) restricciones en el movimiento de ganado; iii) cierre de mercados; iv) gastos de vacunación y sacrificio de animales; v) restricciones que afectan al movimiento de personas y al turismo. Por poner un ejemplo, el último brote en Gran Bretaña en el año 2001 supuso unas pérdidas de más de 6 mil millones de libras esterlinas sólo en este país (Thompson *et al.*, 2002), y constituyó un amargo recordatorio para los países europeos de las devastadoras consecuencias que tiene esta enfermedad.

El agente causal es un picornavirus, el virus de la fiebre aftosa (VFA) (Sobrino y Domingo, 2004; Mahy, 2005). La enfermedad es extremadamente contagiosa, ya que este virus se transmite por contacto directo, transporte mecánico, aerosoles, etc., y puede ser transportado por el viento a grandes distancias (Ferguson *et al.*, 2001). El virus penetra por los epitelios de la boca, nariz, laringe o zonas de la piel desgarradas, donde produce vesículas o aftas primarias. Generalmente a los tres o cuatro días se produce viremia febril y el virus infecta epitelios alejados del punto de entrada, donde produce aftas secundarias. Tras la fase aguda de la enfermedad los animales se recuperan, pudiéndose establecer en rumiantes una infección persistente en la zona esófago-faríngea. Así, los animales se convierten en portadores asintomáticos, lo que dificulta aún más el control de la enfermedad (van Bekkum *et al.*, 1959; Gebauer *et al.*, 1988; Salt, 1993). Dichos animales portadores constituyen reservas de virus que pueden originar nuevos brotes de enfermedad aguda (Timoney *et al.*, 1988). Además, la enfermedad puede producir la muerte de animales jóvenes por miocarditis y causar abortos (Doel, 2003).

La fiebre aftosa es enzoótica en muchas regiones de África, Asia, América del Sur y Europa del Este. En los últimos años se han registrado brotes en países o regiones que se consideraban libres de la enfermedad como es el caso de Taiwan (Dunn y Donaldson, 1997), Grecia (Boletín OIE, 2000), Japón (Sakamoto y Yoshida, 2002), el Reino Unido (Ferguson *et al.*, 2001; Giles, 2001; Goodman, 2001; Pickrell y Enserick, 2001; Samuel y Knowles, 2001; Sobrino y Domingo, 2001) y regiones de Argentina y Uruguay (Correa Melo y López, 2002; Correa Melo *et al.*, 2002).

### 1.1.2. Vacunas en uso contra la fiebre aftosa y problemas que presentan

Las vacunas actualmente en uso contra la fiebre aftosa están basadas en viriones de VFA inactivados químicamente (Barteling, 2004). Los virus son producidos en grandes cantidades

mediante infección de células susceptibles en fermentadores. A continuación, los viriones se inactivan mediante tratamiento con un agente químico, como la etilenimina binaria.

La suspensión de virus se concentra mediante ultrafiltración, precipitación con polietilenglicol o adsorción con óxido de polietileno, y se mezcla con aceites minerales como adyuvantes para la inmunización de ganado porcino, ovino y bovino. Alternativamente, tras la concentración del virus, éste es adsorbido sobre un gel de hidróxido de aluminio (Brown, 1989; Doel, 2003; [http://www.oie.int/eng/normes/MANUAL/A\\_00024.htm](http://www.oie.int/eng/normes/MANUAL/A_00024.htm)). En un año relativamente reciente (año 2000), la venta de estas vacunas generó acerca de 84 millones de dólares, lo que representa casi un cuarto del gasto anual empleado habitualmente en el mantenimiento de la cabaña ganadera mundial (Gay *et al.*, 2003).

A pesar de su eficacia en términos generales, las vacunas actuales contra la fiebre aftosa presentan problemas importantes. Entre ellos: (i) Se requieren medidas especiales para prevenir el escape de virus durante la producción de la vacuna; (ii) La inactivación puede no resultar completa, con lo que la vacuna puede ser una fuente de infección (iii) Existen múltiples variantes antigénicas de VFA en circulación. La complicada dinámica de variación antigénica y aparición de resistentes en el campo hace necesario utilizar vacunas derivadas de virus de diferentes serotipos, que deben actualizarse en función de los virus circulantes en cada lugar y momento; (iv) La distinción entre animales vacunados y animales que han pasado la enfermedad es difícil; (v) El mantenimiento de la potencia inmunogénica de la vacuna es igualmente difícil y costoso. El virión de VFA es particularmente termolábil, y un calor moderado basta para inducir la disociación de la cápsida en subunidades, lo que conlleva una gran disminución de la inmunogenicidad (Brown y Crick, 1959; Ceglowski 1965; Meloen *et al.*, 1979). Por ello las vacunas requieren ser almacenadas a muy baja temperatura, y necesitan de una larga y costosa cadena de frío desde el punto de fabricación al punto de aplicación. Pero debido a consideraciones económicas, climatológicas y logísticas de muchos de los países donde la enfermedad es enzoótica, se producen frecuentemente rupturas de la cadena de frío. Además, el empleo de ciertos agentes inactivantes también se ha relacionado con una disminución en la inmunogenicidad. En concreto, la etilenimina binaria interacciona con el ARN y parece desestabilizar el virión (Doel y Baccharini, 1981).

## **1.2. El virus de la fiebre aftosa**

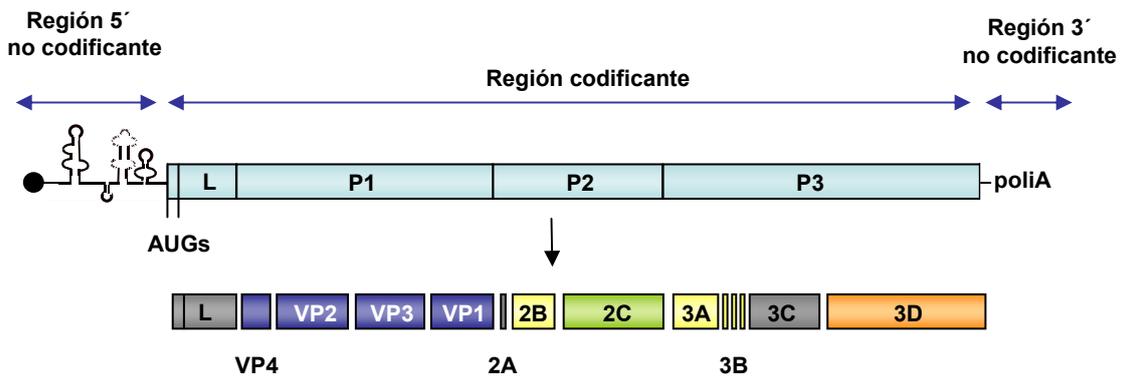
### **1.2.1. Clasificación**

VFA pertenece a la familia Picornaviridae. Como tal, posee un genoma ARN de cadena simple y polaridad positiva, carece de envuelta, y presenta una cápsida de simetría icosaédrica (revisiones en Domingo *et al.*, 1990; Belsham, 1993; Racaniello, 2001; Sobrino *et al.*, 2001; Mason *et al.*, 2003; Sobrino y Domingo, 2004; Mahy 2005). Los picornavirus se agrupan en cinco géneros mayores: enterovirus, rinovirus, cardiovirus, hepatovirus y aftovirus, e incluyen varias especies de gran importancia clínica y económica. VFA fue el primer virus de vertebrados aislado cuando en 1898 Loeffler y Frosch demostraron que la fiebre aftosa, considerada desde el siglo XVI como uno de los grandes azotes de la ganadería, era transmitida por un agente infeccioso filtrable. Desde entonces se han descrito siete serotipos distintos (A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2 y SAT3), más de 65 subtipos

(hasta que se abandonó la subtipación) y numerosísimos variantes antigénicos (Pereira, 1977; Mateu *et al.*, 1988; Knowles y Samuel, 2003). Esta diversidad antigénica es un reflejo de la estructura en cuasiespecies de las poblaciones de VFA (Domingo *et al.*, 2004), y constituye uno de los principales obstáculos para el control de la fiebre aftosa por vacunación (Barteling y Woortmeyer, 1987; Domingo *et al.*, 1990; Domingo y Holland, 1992; Doel, 2003; Thomson *et al.*, 2003).

### 1.2.2. Organización del genoma y proteínas víricas

El ARN genómico de VFA contiene algo más de 8000 nucleótidos. Se divide en una región central codificante, y dos regiones más cortas no codificantes situadas en los extremos de la molécula (revisión en Belsham y Martínez-Salas, 2004; **Figura 1**). El virus de referencia empleado en la presente tesis doctoral, C-S8c1, es un clon biológico obtenido a partir de un virus, C-S8, aislado de un cerdo enfermo en Santa Pau, Girona, en 1970 (Sobrino *et al.*, 1983). Pertenece al subtipo europeo C<sub>1</sub> dentro del serotipo C. El genoma de C-S8c1 contiene 8115 nucleótidos, sin contar los tramos homopoliméricos de polirribocitidilato (poliC) y poliadenilato (poliA), que son heterogéneos en longitud (Escarmís *et al.*, 1992, 1996; Toja *et al.*, 1999). La zona 5' no codificante comprende los primeros 1038 nucleótidos del genoma, la región codificante está comprendida entre los nucleótidos 1039 y 8023, y la zona 3' no codificante está situada entre los nucleótidos 8024 y 8115.



**Figura 1. Organización del genoma de VFA.** Se indican las dos regiones no codificantes y la región central codificante. En la parte inferior se indican los productos finales del procesamiento de la poliproteína: proteínas estructurales (azul), péptido 2A y proteínas con actividad proteolítica (gris), proteína 2C (verde), polimerasa 3D (naranja) y resto de proteínas no estructurales (amarillo). VPg se une covalentemente al extremo 5' de ARN (círculo negro en el extremo de la región 5' no codificante). Basado en Belsham (1993) y Racaniello (2001).

**Región 5'.** En esta zona reguladora se distinguen varias regiones: i) El fragmento S, en el extremo 5', es un segmento muy estructurado y conservado (Escarmís *et al.*, 1992; Belsham, 1993). ii) Un tramo de poli C de longitud variable (entre 100 y 300 nucleótidos). iii) Una serie de repeticiones con estructura terciaria de tipo pseudonudo (Escarmís *et al.*, 1995). iv) Un elemento *cre* (*Cis-acting Replication Element*) formado por un bucle que contiene la secuencia consenso AAACA, cuya alteración elimina la replicación sin afectar significativamente a la traducción (Mason *et al.*, 2002, 2003). v) Por último, precediendo a los AUGs iniciadores, un sitio IRES (sitio interno de entrada al ribosoma), de estructura secundaria definida y conservada, y cuyo primer bucle solapa con el elemento *cre*. El IRES permite la entrada del ribosoma para la iniciación de la síntesis de proteínas de

forma independiente del *cap* situado en el extremo 5' de los ARN mensajeros eucarióticos (Sonenberg y Pelletier, 1989; Jang *et al.*, 1990; Kuhn *et al.*, 1990; Belsham y Sonenberg, 1996; Ramos y Martínez-Salas, 1999; Martínez-Salas *et al.*, 2001)

**Región codificante.** Consiste en un único segmento de lectura abierta de que codifica una única poliproteína que es procesada proteolíticamente durante el ciclo de infección. La poliproteína está dividida en cuatro regiones, que desde el extremo N-terminal al C-terminal, se denominan: L, P1, P2 y P3 (**Figura 1**). La lectura del ARN puede comenzar en cada uno de los dos codones AUG funcionales, situados inmediatamente después del IRES.

La región L (leader) codifica las proteínas solapantes Lab o Lb, según comience la lectura en el primer o segundo AUG, respectivamente (Medina *et al.*, 1993). Lab y Lb catalizan su escisión de la poliproteína e inician la proteólisis del factor de iniciación de la traducción eucariota eIF-4F, lo que conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas de las células infectadas (Devaney *et al.*, 1988; Glaser y Skern, 2000).

La región P1 codifica para las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4 que forman la cápsida (ver el siguiente apartado).

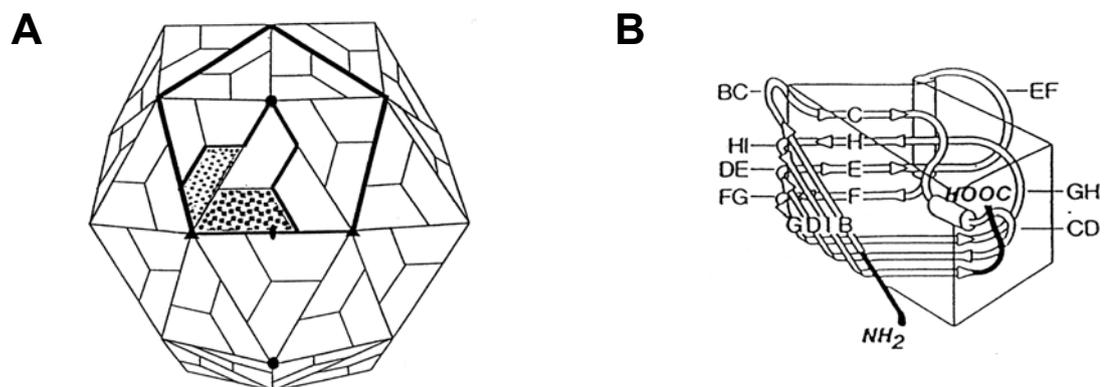
La región P2 codifica para las proteínas no estructurales 2A, 2B y 2C. El péptido 2A, de 16 aminoácidos, cataliza en *cis* la escisión de P1-2A de 2BC (Ryan *et al.*, 1991, 1999). 2B, 2C y su precursor 2BC están implicadas en replicación.

La región P3 codifica para las proteínas no estructurales 3A, 3B, 3C y 3D. La proteína homóloga a 3A en poliovirus está implicada en la síntesis de ARN vírico (Takeda *et al.*, 1986; Gromeier *et al.*, 1999). Se ha sugerido que 3A podría además actuar como un anclaje a membrana del complejo de replicación de picornavirus (Xiang *et al.*, 1998), y contribuir al efecto citopático y a la inhibición de la secreción de proteínas (Doedens y Kirkegaard, 1995). Esta proteína también se halla implicada en virulencia y rango de hospedador de diferentes picornavirus (Giraudou *et al.*, 1990; Beard y Mason, 2000; O'Donnell *et al.*, 2001; Núñez *et al.*, 2001). Sustituciones en la proteína 3A del virus de la hepatitis A permiten la adaptación de virus a cultivos celulares (Morace *et al.*, 1993; Graff *et al.*, 1994). El VFA codifica tres copias no idénticas en tándem de la proteína 3B (también denominada VPg), que es uridilada y se une covalentemente al extremo 5' del ARN genómico del virus, y que está implicada en la iniciación de la síntesis del ARN y probablemente también en encapsidación (Rowlands, 1999). Se han construido en el laboratorio VFA con una y dos copias funcionales de 3B, observándose en éstos una reducción en la síntesis de ARN y en la capacidad de replicar en ciertos tipos celulares (Falk *et al.*, 1992; Mason *et al.*, 2003). 3C es una proteasa que cataliza la mayoría de las escisiones proteolíticas de la poliproteína (Vakharia *et al.*, 1987; Clarke y Sangar, 1988); su secuencia sugiere que se trata de una serin-proteasa relacionada con la tripsina (Argos *et al.*, 1984; Bazan y Fletterick, 1988; Gorbalenya *et al.*, 1989). 3D es la ARN polimerasa dependiente de ARN (replicasa) encargada de la replicación del genoma de VFA. La estructura tridimensional de 3D de VFA (Ferrer-Orta *et al.*, 2004; Fry *et al.*, 2005) es similar a la de la proteína homóloga de poliovirus (Hansen *et al.*, 1997), como se esperaba de su similitud de secuencia (Martínez-Salas *et al.*, 1985). 3D de VFA contiene la triada catalítica DDD típica de las replicasas de virus ARN de polaridad positiva (Heringa y Argos 1994; Hansen *et al.*, 1997). Al igual que para otras ARN polimerasas, la secuencia y estructura tridimensional de 3D de VFA no muestran evidencia alguna de la presencia de un dominio con actividad exonucleasa 3'→5'.

**Región 3'.** La región 3' no codificante está implicada en la replicación viral (Gutiérrez *et al.*, 1994; Mirmomeni *et al.*, 1997; Duque y Palmenberg, 2001; Sáiz *et al.*, 2001). El extremo 3' está constituido por un tramo de poliadenilato (poliA), separado de la zona codificante de 3D por un segmento que se puede plegar en una estructura específica (Pilipenko *et al.*, 1992). El ARN de VFA actúa como ARN mensajero (revisiones en Belsham, 1993; Rowlands, 1999; Belsham y Martínez-Salas, 2004). El poliA interviene, a través de una serie de proteínas que se unen a él en la circularización del genoma necesaria para que tenga lugar la replicación (Barton *et al.*, 2001; Herold y Andino, 2001). Además, los residuos de adenilato terminales son el molde con el que se aparea el iniciador 3B-pUpU para comenzar la síntesis de la cadena negativa del genoma viral.

### 1.2.3. Estructura de la cápsida

La estructura tridimensional de VFA ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X (revisiones en Ferrer-Orta y Fita, 2004; Fry *et al.*, 2005). Las estructuras de VFA O<sub>1</sub>BFS (serotipo O; Achayra *et al.*, 1989; Fry *et al.*, 1999), del virus utilizado en este trabajo, C-S8c1 (serotipo C, Lea *et al.*, 1994) y de VFA A22 (serotipo A; Curry *et al.*, 1996) revelan una gran similitud conformacional. La cápsida icosaédrica mide unos 300 Å de diámetro y está formada por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4 (**Figura 2A**). VP1, VP2 y VP3 contienen algo más de 200 residuos aminoacídicos cada una, constituyen las unidades principales en la construcción de la cápsida, y comparten una estructura terciaria similar en forma de barril  $\beta$ , compuesto por ocho cadenas  $\beta$  antiparalelas (denominadas B, I, D, G, C, H, E, y F) conectadas entre sí por bucles de longitud variable (denominados con las dos letras correspondientes a las cadenas  $\beta$  que unen; **Figura 2B**). La proteína VP4, con unos 85 residuos, adopta una estructura extendida en la superficie interior de la cápsida. VP4 resulta del procesamiento proteolítico de VP0 (VP4+VP2) durante la maduración del virión, y se la puede considerar por tanto como una prolongación amino-terminal, no asociada covalentemente, de VP2.



**Figura 2. Representación esquemática de la estructura de la cápsida de picornavirus (A) y de las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 (B).** En el panel **A**, las líneas gruesas delimitan un pentámero y uno de los cinco protómeros que lo componen. Para este protómero se indica la posición de VP2 (puntos gruesos), VP3 (puntos finos) y VP1 (sin puntuar). La proteína VP4 es interna y no se indica. En el panel **B**, las cadenas  $\beta$  se representan como flechas, las hélices  $\alpha$  como cilindros, los bucles como cintas blancas y los segmentos N-terminal y C-terminal como cintas negras. La cara superior del trapecoide es la que se encuentra expuesta en la superficie del virión.

El protómero biológico (coeficiente de sedimentación 5S) está constituido, en el virión maduro, por una molécula de cada proteína de la cápsida. Cinco protómeros se asocian formando un pentámero (coeficiente de sedimentación 12S), y doce pentámeros se unen para formar la cápsida (**Figura 2A**). En cada eje de simetría quinaria se localiza un poro hidrofóbico. En la base de este poro se encuentran los extremos N-terminales de las cinco copias de VP4, que presentan un residuo de miristato unido covalentemente. La dimensión del poro es compatible con la penetración de agentes intercalantes que provocan la inactivación de la infectividad mediante la producción de lesiones en el ARN vírico (Brown y Stewart, 1960). Este poro también explica la rápida penetración de iones  $\text{Cs}^+$  y la mayor densidad que presenta el VFA en gradiente de  $\text{CsCl}$  ( $1.43\text{-}1.45 \text{ g/cm}^3$ ) en comparación con otros picornavirus (Acharya *et al.*, 1989; Racaniello, 2001). Los pentámeros se relacionan entre sí mediante su asociación alrededor de los ejes de simetría ternarios a los que rodean tres copias de VP2 y VP3 correspondientes a pentámeros distintos (**Figura 2A**). Los segmentos N-terminales de tres copias de VP2 se encuentran asociados entre sí formando un anillo  $\beta$  en cada eje ternario (Lea *et al.*, 1994).

Muchos de los bucles, incluyendo los de mayor longitud, y partes de las cadenas  $\beta$  sobresalen de la estructura del virión e interaccionan con anticuerpos (revisiones en Mateu, 1995; Mateu y Verdaguer, 2004). Las mayores diferencias estructurales y de secuencia existentes entre los distintos grupos de picornavirus se encuentran en estos bucles que conectan las cadenas  $\beta$  y son los que definen en gran medida el carácter antigénico de cada uno. En VFA destaca el bucle G-H de la proteína VP1 (aminoácidos 137-160; **Figura 2B**) que es muy largo y flexible, presenta estructura desordenada y esta completamente expuesto al solvente en la superficie exterior de la cápsida. Este bucle contiene el sitio antigénico principal A, que en el caso de virus de serotipo C está compuesto por múltiples epítomos continuos solapantes (Mateu *et al.*, 1988, 1989, 1990, 1995a, 1995b; Borrego *et al.*, 1995; Hewat *et al.*, 1997; Verdaguer *et al.*, 1998). En los serotipos A y C el bucle se encuentra cercano a un eje binario y el sitio antigénico implica residuos localizados en un único segmento de la proteína. Sin embargo en el serotipo O, debido a la presencia de un puente disulfuro en la base del bucle en condiciones nativas, este bucle tiene una conformación algo más rígida y se encuentra más cercano a un eje quinario (Parry *et al.*, 1990) y al extremo carboxilo-terminal de VP1 que forma parte del sitio antigénico. En condiciones reducidas su disposición es similar a la observada en el serotipo C (Logan *et al.*, 1993; Rowlands *et al.*, 1994). Por tanto la localización del bucle G-H determinaría la naturaleza continua o discontinua del sitio A. La visualización de complejos VFA-anticuerpos indica claramente que este bucle presenta una importante movilidad segmental (Hewat *et al.*, 1997; Verdaguer *et al.*, 1998).

Otros sitios antigénicos identificados en VFA C-S8c1 son el sitio C, formado por epítomos continuos localizados en el segmento C-terminal de VP1, y el sitio D, formado por múltiples epítomos discontinuos, y que implica residuos de VP1, VP2 y/o VP3 en una región de contacto entre las tres proteínas en cada protómero biológico (Lea *et al.*, 1994; Mateu *et al.*, 1994). La estructura antigénica de VFA de otros serotipos (O, A) presenta algunas diferencias importantes, pero es en general similar a la identificada para VFA de serotipo C (revisiones en Mateu, 1995; Mateu y Verdaguer, 2004).

La zona central del bucle G-H de VP1 presenta un triplete RGD (aminoácidos 141-143 en C-S8c1) muy conservado entre los distintos serotipos de VFA. La secuencia RGD es un motivo de

reconocimiento celular presente en proteínas que interactúan con receptores pertenecientes a la familia de las integrinas, localizados en la superficie de muchos tipos celulares (Pfaff, 1997). Diferentes estudios han demostrado que el motivo RGD de VFA, y en menor medida algunos aminoácidos adyacentes, están implicados en la interacción con receptores de tipo integrina, como la integrina  $\alpha_v\beta_3$  de la membrana celular (Fox *et al.*, 1989; Baxt y Becker 1990; Rieder *et al.*, 1993; Mason *et al.*, 1994; Berinstein *et al.*, 1995; McKenna *et al.*, 1995; Mateu *et al.*, 1996; Leippert *et al.*, 1997; Baranowski *et al.*, 1998; revisión en Baxt y Rieder, 2004). Algunas evidencias indican que las integrinas  $\alpha_v\beta_6$  y  $\alpha_v\beta_1$  también pueden actuar como receptores para VFA (Jackson *et al.*, 2000a, 2000b, 2002, 2003), y que VFA se puede unir a la integrina  $\alpha_v\beta_5$  como receptor, aunque de forma ineficiente.

En rinovirus humano (HRV), enterovirus (virus de la poliomielitis (PV)) y hepatovirus (virus de la hepatitis A (HAV)) se ha postulado que el sitio de la cápsida implicado en el reconocimiento por el receptor zona permanece invariable porque se encuentra situado en una depresión inaccesible para los anticuerpos ("hipótesis del cañón", Rossmann *et al.*, 1989, 1997). Sin embargo, en la cápsida de VFA no existe depresión alguna, es más el sitio de reconocimiento por el receptor celular y un sitio antigénico principal (sitio A) se encuentran en una protuberancia de la cápsida completamente expuestos al solvente, siendo los residuos críticos para el reconocimiento por el receptor celular y por los anticuerpos en gran parte los mismos (Mateu *et al.*, 1995a, 1995b, 1996; Verdaguer *et al.*, 1995, 1998). Más recientemente se ha encontrado igualmente un cierto solapamiento entre los residuos implicados en reconocimiento por receptores y por algunos anticuerpos en la cápsida de rinovirus (Smith *et al.*, 1996).

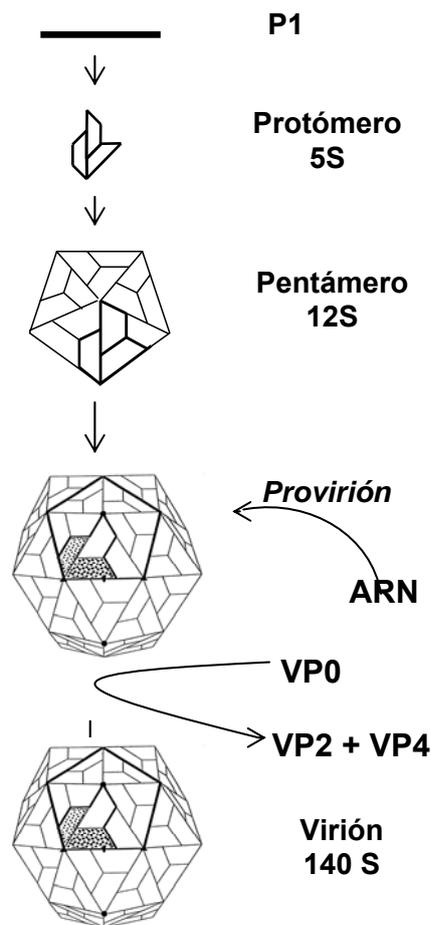
### **1.3. Ensamblaje, estabilidad conformacional y desensamblaje del virus de la fiebre aftosa**

#### **1.3.1. Ensamblaje**

El estudio del ensamblaje, estabilidad y desensamblaje de virus resulta de gran interés básico tanto en el campo de la virología, para una completa comprensión del ciclo vírico, como en el de la biología estructural, para el estudio del reconocimiento macromolecular en estructuras muy complejas, como son las cápsidas y los viriones. Además, presenta un considerable potencial aplicado en biotecnología, por ejemplo en el diseño y construcción de partículas víricas de mayor termoestabilidad para diversos usos. En el caso de VFA, la disponibilidad de viriones o cápsidas más estables frente a la disociación por calor podría permitir el desarrollo de vacunas mejoradas, menos dependientes de la cadena de frío y/o no infecciosas (ver apartado 1.4).

El mecanismo de ensamblaje de picornavirus ha sido más estudiado para HRV y PV, pero la evidencia disponible para VFA indica que el mismo mecanismo es aplicable también al ensamblaje de este último virus. El ensamblaje de picornavirus tiene lugar a través de varias etapas que se suceden de modo jerárquico (revisiones en Rueckert, 1996; Racaniello, 2001). Las proteínas de la cápsida VP0, VP3 y VP1 se traducen en forma de una sola poliproteína precursora (P1). Como para otras poliproteínas, el plegamiento de cada dominio en P1 ocurre probablemente de modo co-traduccional. La separación covalente de los tres dominios plegados mediante un posterior procesamiento

proteolítico mediado por la proteasa vírica 3C origina las proteínas VP0, VP3 y VP1, que permanecen unidas en forma de protómero. Los segmentos N- y C-terminales de cada proteína deben sufrir un reordenamiento conformacional en el protómero (Rossmann y Johnson, 1989). Tras el ensamblaje de protómeros en pentámeros, y de los pentámeros entre sí, ocurre la encapsidación del ARN (**Figura 3**). Este proceso i) desencadena un proceso autoproteolítico en el que la mayor parte de las moléculas de VP0 son fragmentadas para generar VP4 y VP2, lo cual es imprescindible para la infección; ii) provoca un ordenamiento de los extremos Nt de VP1 y Ct de VP4 situados cerca de los ejes ternarios que refuerza las interacciones entre las subunidades de la cápsida (Curry *et al.*, 1997); y iii) aumenta ligeramente la sensibilidad a pH del virión (Curry *et al.*, 1995).



**Figura 3. Ensamblaje de picornavirus.** Para una descripción de la ruta de ensamblaje, véase el texto

### 1.3.2. Sensibilidad a pH ácido y desencapsidación

VFA es un virus extremadamente sensible a la acidificación (Curry *et al.*, 1995; van Vlijmen *et al.*, 1998) ya que su cápsida se disocia completamente a pentámeros en condiciones sólo muy ligeramente ácidas (pH alrededor de 6,5). (Smyth y Martin, 2002; Mahy, 2005). La sensibilidad del virión de VFA a condiciones ácidas podría estar evolutivamente seleccionada para permitir la disociación de la cápsida y la liberación del ARN genómico durante las etapas iniciales de la

infección. Después del reconocimiento del virión de VFA por el receptor celular y la internalización de la partícula, que tiene lugar por endocitosis, el virión se disocia en pentámeros, liberando VP4 y su ARN (Vasquez *et al.*, 1979). Este proceso parece estar inducido por acidificación en los endosomas (Carrillo *et al.*, 1984; Baxt, 1987, Martín-Acebes *et al.*, 2010 y referencias citadas en este trabajo).

*In vitro* es posible inducir la disociación de viriones de VFA en pentámeros y la consecuente liberación del ARN mediante una ligera disminución en el pH, o mediante calentamiento moderado (Bachrach, 1968, 1977; Rueckert, 1996; Racaniello, 2001). Sin embargo, en contra de lo observado para otros picornavirus que utilizan esta misma estrategia para su desencapsidación (como PV y HRV), no se ha identificado aún ningún cambio en la conformación de la cápsida previo a la disociación en pentámeros.

Por otro lado en VFA la entrada de ARN durante la morfogénesis, aunque estabiliza la cápsida, también parece aumentar ligeramente la sensibilidad a pH y el virión completo parece ser algo más sensible a la acidificación que la cápsida vacía (Curry *et al.*, 1995). Es decir, el ARN en sí mismo también podría favorecer el proceso de desencapsidación. Esto no debe ser necesariamente así en otros virus. Por ejemplo, en el virus del mosaico amarillo del nabo (TYMV) el empaquetamiento del ARN, aunque globalmente desestabiliza al virión, por otro lado parece aumentar su estabilidad frente al pH (Virudachalam *et al.*, 1985).

El significado biológico de la sensibilidad a pH ácido en VFA puede extenderse a otros virus que también presentan sensibilidad a la acidificación. Esta es característica de algunos picornavirus (Mosser y Rueckert, 1993; White *et al.*, 1997; Carr *et al.*, 1997; Tsang *et al.*, 2000) y de algunos virus de otras familias. Por ejemplo, entre los parvovirus: el virus diminuto de ratón (MVM) es dependiente de acidificación para completar el ciclo infeccioso, aunque el pH debe bajar de 5,5 para que se detecten cambios, que además no implican la disociación de la cápsida (Ros *et al.*, 2002; Mani *et al.*, 2006; Farr *et al.*, 2006). Algo similar ocurre con el parvovirus canino (CPV), que por encima de pH 4 no sufre apenas cambios en su estructura (Nelson *et al.*, 2008). El virus adenoasociado tipo 8 (AAV8), a pesar de que a partir de pH 7,5 comienza a experimentar transiciones conformacionales, no se disocia hasta que el pH baja de 4 (Nam *et al.*, 2008).

En este contexto, es interesante destacar que VFA se cuenta entre los virus más fácilmente dissociables mediante una acidificación muy suave. La sensibilidad de VFA a pH puede variar ligeramente entre distintos aislados. Por ejemplo, en un estudio realizado con tres cepas del serotipo A (Curry *et al.*, 1995) se observaron diferencias de 0,5 unidades en las curvas de titulación de pH (véase también van Vlijmen *et al.*, 1998). También es importante mencionar que en las poblaciones de VFA se encuentran presentes con cierta abundancia, y son fáciles de seleccionar, variantes víricos totalmente viables que son capaces de infectar en condiciones en que la acidificación en los endosomas se encuentra inhibida (Martín-Acebes *et al.*, 2010), así como otros variantes que son más resistentes a la acidificación sin perder infectividad (Twomey *et al.*, 1995; F. Sobrino, comunicación personal). Por tanto, aunque se requiere la acidificación en los endosomas para que se produzca la disociación de la cápsida de VFA y la desencapsidación de su ARN, la extrema sensibilidad a pH ácido de VFA naturales no parece estar selectivamente restringida en un rango muy estrecho, sino que admite una notable variación sin que se produzca una alteración notable en la viabilidad.

### 1.3.3. Termoestabilidad

El virión de VFA presenta no sólo una extrema sensibilidad a la acidificación, sino también una notable sensibilidad a la temperatura, en cuanto que la aplicación de calor moderado, en condiciones fisiológicas, basta para producir la inactivación parcial o total de su infectividad, y su disociación en subunidades pentaméricas. A diferencia de la sensibilidad a pH, la termosensibilidad de VFA podría en un principio resultar sorprendente ya que, en regiones cálidas donde el virus es enzoótico, éste debería estar sujeto a una fuerte presión selectiva para mantener su integridad extracelular en presencia de temperaturas relativamente elevadas.

La termoestabilidad de los distintos géneros de picornavirus muestra claras diferencias, siendo aftovirus el más inestable de todos. En un estudio comparativo entre PV y HAV se comprobó que tanto a 4°C como a temperatura ambiente, HAV mantenía tanto su infectividad como su antigenicidad (y por tanto una parte al menos de la estructura nativa de su cápsida) inalteradas durante un tiempo mucho mayor que PV (Biziagos *et al.*, 1988). Sin embargo, a pesar su baja termoestabilidad, PV es aún bastante más termoestable que VFA. En otro estudio (Oliveira *et al.*, 1999) se analizó la resistencia a la presión y la temperatura de tres picornavirus cuyas estructuras 3D han mostrado una elevada similitud: VFA, PV y HRV. Los resultados mostraron que mientras que en PV y HRV a temperatura ambiente presiones superiores a 2,4 kbar no eran suficientes para provocar su inactivación, y su disociación solo se observaba a una presión de 2,4 kbar a 4°C, las partículas de VFA eran dramáticamente afectadas en estas condiciones. PV y HRV difieren poco en su estabilidad (menos de 10kcal/mol de partícula a 0°C), mientras que la diferencia de energía libre con VFA era superior a 200 kcal/mol de partícula.

A pesar de que la termolabilidad es una característica general entre serotipos y aislados de VFA, se han descrito algunas diferencias entre distintos variantes. En un estudio (Nettleton *et al.*, 1982) se analizó la resistencia a la temperatura de 49 cepas de VFA de distintos serotipos sometíéndolas a 54°C durante 1h. Virus de serotipos C, O y Asia resultaron ser los más termoresistentes, virus de serotipos SAT 1,2 y 3 los más termolábiles, y virus del serotipo A mostraron una termoestabilidad intermedia. Estos mismos resultados se obtuvieron cuando se analizó la resistencia al cloruro de guanidinio de cada uno de los serotipos. El grado de termoestabilidad también puede variar cuando se comparan distintas cepas de un mismo serotipo, como se puso de manifiesto en un estudio realizado con siete aislados diferentes de un mismo serotipo VFA (Doel y Baccarini, 1981). Esta heterogeneidad intratípica en el marcador rct (variación de la capacidad reproductiva a temperatura supraóptima) es corriente, dentro de unos límites, para la mayoría de virus analizados. Por ejemplo, en otros picornavirus como PV, donde parece ser que la termoestabilidad va asociada a la virulencia, siendo las cepas atenuadas más termolábiles (Christodoulou *et al.*, 1990); o coxsackievirus, en donde un estudio comparativo entre dos variantes mostró, entre otras cosas, que éstos diferían ampliamente en su resistencia a la temperatura, que era superior en la de menor tasa de crecimiento (Gobara *et al.*, 1977); lo mismo se observó en otras familias víricas, por ejemplo reovirus (Middleton *et al.*, 2002).

VFA no sólo se encuentra entre los virus más inestables de la familia picornavirus, sino de los virus en general. Una baja o moderada termoestabilidad del virión no es un rasgo común a todos los virus, ni tampoco a los pequeños virus icosaédricos sin envuelta, como los picornavirus o los

parvovirus. Por ejemplo, los parvovirus como MVM (Hernando *et al.*, 2000) o CPV (Nelson *et al.*, 2008) mantienen su integridad estructural en presencia de diversas condiciones físicas y químicas desestabilizantes, incluyendo temperaturas muy elevadas. En estos estudios se ha observado que los viriones permanecen infecciosos, y que la disociación de la cápsida ocurre únicamente a temperaturas de unos 70°C.

#### **1.3.4. Bases moleculares del ensamblaje, estabilidad conformacional y desensamblaje de partículas víricas**

Los elementos moleculares y las bases estructurales, termodinámicas y cinéticas de los procesos de ensamblaje, cambio conformacional y desensamblaje de viriones se conocen, en general, de modo muy pobre e impreciso. Además del tamaño y la complejidad estructural de los virus, y del gran número de interacciones y residuos potencialmente implicados, hay que tener en cuenta otros aspectos limitantes.

Los procesos de asociación y disociación de virus y otros complejos de semejante tamaño frecuentemente implican la aparición de diversos intermediarios que pueden resultar muy difíciles de caracterizar. Estos procesos ocurren generalmente como reacciones irreversibles, y por tanto no son susceptibles de análisis termodinámico, mucho menos cuantitativo (Jonson, 1996; Casjens, 1997; Liljas, 1999; Zlotnick y Spray, 2003; Eijnsink *et al.*, 2004; Steven *et al.*, 2005). Los grandes complejos supramoleculares pueden presentar importantes diferencias estructurales y energéticas con respecto a dímeros y otros oligómeros de pequeño tamaño, muchísimo mejor estudiados cualitativa y cuantitativamente. A pesar de estas y otras limitaciones, se han realizado importantes avances en aspectos específicos de esta área de la virología estructural. A continuación se revisan brevemente algunos de los variados ejemplos existentes.

**Ensamblaje y estabilidad.** El ensamblaje suele ser un proceso jerárquico que transcurre a través de la formación de uno o más intermediarios estables (revisión en Casjens, 1997). El ensamblaje de estos intermediarios y la estabilidad conformacional de una cápsida vírica deben depender, en buena medida, del establecimiento y mantenimiento de un número indeterminado de interacciones no covalentes energéticamente relevantes entre las subunidades de la cápsida (Liljas, 1986; Rossmann y Johnson, 1989). Dichas interacciones pueden incluir contactos de van der Waals, enlaces por puentes de hidrógeno, enlaces mediante puente salino y otras interacciones electrostáticas de tipo carga-carga o carga-dipolo. Estas interacciones intersubunidad, junto al efecto hidrofóbico producido por la ocultación de grupos apolares al solvente durante la asociación, han de compensar con exceso la pérdida de entropía de las subunidades libres en solución y el aumento de entalpía debido a la eliminación de algunas de las interacciones de estas subunidades libres con el agua (Prevelige, 1998). Debido al gran tamaño de las partículas víricas y la complejidad de los procesos implicados, la mayoría de los análisis experimentales se han centrado en el papel de un número muy limitado de residuos de la cápsida de algunos virus modelo en el ensamblaje, desensamblaje o estabilidad de la partícula, generalmente mediante análisis mutacional. No obstante, en nuestro laboratorio se han realizado estudios sistemáticos del papel sobre la infectividad, ensamblaje y estabilidad frente a la disociación y/o la inactivación, de residuos situados en las

interfases entre subunidades de la cápsida en diferentes virus modelo (Mateo *et al.*, 2003; del Álamo *et al.*, 2003; Reguera *et al.*, 2004). Los resultados indican que en algunos casos (MVM) sólo un limitado número de residuos interfásicos, aquellos implicados en las interacciones presumiblemente más energéticas entre subunidades, tiene individualmente un papel crítico para el ensamblaje y/o la estabilidad de la cápsida. En cambio, en otros casos (VFA) la mayoría de los residuos interfásicos contribuyen de algún modo a estos procesos.

Además de las interacciones no covalentes entre subunidades de la cápsidas, otras interacciones pueden contribuir a la estabilidad conformacional del virión. Entre estas se incluyen la formación de enlaces covalentes, interacciones con pequeñas moléculas o iones (incluyendo aquellas capaces de neutralizar las cargas negativas de los fosfatos en el ácido nucleico vírico, e interacciones proteína-ácido nucleico viral.

La formación de puentes disulfuro entre subunidades de la cápsida juega claramente un papel en la estabilización de ciertos virus. En el virus de la hepatitis B (HBV) se ha descrito la participación en la estabilidad de la cápsida de cuatro residuos de cisteína muy conservados en la superficie de la cápsida que forman puentes disulfuro intermoleculares una vez ensamblada ésta (Zhou *et al.*, 1992). Otros virus como papovavirus, hepadnavirus y bacteriófagos de la familia de Q $\beta$  (Zhou *et al.*, 1992; Golmohammadi *et al.*, 1996; Ishizu *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002) también poseen puentes disulfuro en su cápsida. VFA C-S8c1 presenta puentes disulfuro entre subunidades de un mismo pentámero, que están situados cerca de los ejes quinarios de su cápsida y que podría estar contribuyendo a la estabilidad del virión en ciertas condiciones (Díez *et al.*, 1990).

Las interacciones proteína-ácido nucleico viral, o las establecidas con pequeñas moléculas o iones, incluyendo aquellas capaces de neutralizar las cargas negativas de los fosfatos en el ácido nucleico vírico, pueden asimismo contribuir a la estabilidad del virión (ver, por ejemplo, Virudachalam *et al.*, 1985; King y Chiu, 1997; Sastri *et al.*, 1999). En algunos picornavirus entre los que están VFA y PV, la cápsida vacía parece presentar una menor estabilidad que el virión completo (Rweyemamu, 1979; Doel y Baccarini, 1981; Curry *et al.* 1997). En estos virus la entrada de ARN parece provocar un ordenamiento conformacional de la zona del anillo  $\beta$ , que podría reforzar las interacciones dentro de un mismo protómero y entre distintos pentámeros (Curry *et al.*, 1997). Este mismo fenómeno se ha descrito en otros virus como el parvovirus MVM, en donde la mayor estabilidad térmica y mecánica del virión respecto de la cápsida vacía se debe a las interacciones que el ADN genómico establece con residuos de la pared interna de la cápsida (Reguera *et al.*, 2005; Carrasco *et al.* 2006, 2008). En el virus del moteado de *Physalis* (PhMV) la interacción proteína-ARN podría tener un papel en la estabilidad (Sastri *et al.*, 1999). En TYMV el empaquetamiento del ARN, aunque desestabiliza globalmente al virión, parece aumentar su estabilidad frente al pH (Virudachalam *et al.*, 1985). Algunos estudios han apuntado hacia la estabilización de diferentes picornavirus, como PV y HRV, por sales o cationes (Dorval *et al.*, 1989; Lentz *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1997), lisina y otras diaminas (Dorval *et al.*, 1990), o ácidos grasos de cadena corta (Ismail-Cassim *et al.*, 1990), entre otros compuestos. También se ha descrito la unión de cationes en parvovirus (Nelson *et al.*, 2008) y diversos virus de plantas (Lucas *et al.*, 2002).

**Cambios conformacionales.** Existe una evidencia creciente acerca de la existencia de cambios conformacionales en partículas de virus de diferentes familias y de su necesidad, por razones diversas, para el proceso de infección. Citaremos únicamente unos ejemplos de estos cambios conformacionales y de sus bases moleculares, para ilustrar la diversidad de estos procesos. En algunos virus, el procesamiento proteolítico de subunidades de la cápsida, una vez ensamblada, participa en la estabilización o la desestabilización de la conformación infecciosa del virión. En la cápsida de picornavirus la ruptura covalente de la proteína VP0 para dar las proteínas maduras VP4 y VP2 (revisiones en Rueckert, 1996; Racaniello, 2001) es necesaria para la infectividad del virión (Curry *et al.*, 1997). Esto mismo parece ocurrir en otros virus como nodavirus (Gallagher y Rueckert, 1988), o el virus de la cabaña (*flock house virus*). En este último se ha postulado que la maduración mediante procesamiento proteolítico, necesaria para su funcionalidad viral, favorece la formación de un estado metaestable que facilita una desencapsidación prácticamente irreversible de la partícula al encontrarse acoplada al desplegamiento de sus proteínas constituyentes (Oliveira *et al.*, 2000). Además, en PV la unión al receptor produce un cambio conformacional que resulta en la exposición del extremo N-terminal de VP1 y VP4, lo cual ayuda a la interacción con la membrana celular y a la internalización del virión (Chow *et al.*, 1997; Smyth y Martin, 2002). Se han propuesto mecanismos similares de internalización y desencapsidación para otros virus, por ejemplo nodavirus (Cheng *et al.*, 1994) o tetravirus (Munshi *et al.*, 1996).

**Desensamblaje.** El desensamblaje físico de la cápsida no es siempre un proceso necesario para la desencapsidación, por cuanto en algunos virus el material genético puede ser liberado mediante un cambio conformacional de la cápsida sin pérdida de integridad de la partícula. En otros casos, incluyendo VFA, la desencapsidación parece implicar un desensamblaje de la cápsida en subunidades. El proceso de desensamblaje es en general muy poco conocido. No obstante, para diversos virus se han identificado *in vivo* o *in vitro* algunos intermediarios de desensamblaje. Por ejemplo, los obtenidos mediante exposición a temperatura en picornavirus (Rueckert, 1996; Tsang *et al.*, 2000), el virus de la gripe (Carr *et al.*, 1997), reovirus (Middleton *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006) o parvovirus (Carreira *et al.*, 2004). O los detectados mediante mutaciones en la cápsida que afectan a la desencapsidación, por ejemplo en PV (Mosser y Rueckert, 1993), HRV (Wang *et al.*, 1998) o PhMV (Sastri *et al.*, 1999). En VFA (Ellard *et al.*, 1999) o el virus del mosaico del tabaco (TMV; Culver *et al.*, 1995) se ha observado la presencia en las interfases entre subunidades de la cápsida de residuos cargados positiva o negativamente que, dependiendo de las condiciones de pH o presencia/ausencia de cationes, pueden experimentar una interacción de carácter repulsivo que facilitaría la desencapsidación. En el caso particular de VFA, parece que la acidificación en el endosoma facilita la protonación de ciertas histidinas situadas en las interfases entre subunidades pentaméricas, y la repulsión generada entre ellas ayuda a la disociación de la cápsida, con la consiguiente liberación del ARN vírico en el citosol (Ellard *et al.*, 1999). Algo parecido se sospecha que podría ocurrir en TYMV donde, como en VFA, el pH de disociación de la cápsida coincide con el pKa de la histidina (Virudachalam *et al.*, 1985). *In vitro* es posible inducir la disociación del virión de VFA en subunidades y la subsiguiente liberación del ARN mediante una ligera disminución en el pH o un moderado calentamiento (Bachrach, 1968, 1977; Rueckert, 1996; Racaniello, 2001).

El conjunto de propiedades y procesos que permiten la formación de una partícula vírica estable y también la liberación productiva del material genético tiene una base molecular compleja y diversa. La energía de asociación entre las subunidades de una cápsida vírica puede resultar de un compromiso estructural delicado entre estabilidad extracelular y labilidad intracelular. Estos requerimientos conflictivos se han satisfecho en diversos virus mediante la evolución de cápsidas metaestables, capaces de realizar cambios conformacionales que modifican, en respuesta a estímulos adecuados, las interfases de reconocimiento y la energía de asociación entre subunidades (Rossmann *et al.*, 1997; Chow *et al.*, 1997).

## **1.4. Aproximaciones para la obtención de variantes víricos que presenten una mayor termoestabilidad. Aplicación preliminar a VFA**

### **1.4.1. Desarrollo de nuevas vacunas contra la fiebre aftosa**

Hace tiempo que se ha puesto de manifiesto la necesidad de disponer de vacunas contra la fiebre aftosa que sean más estables frente al calor y/o que no impliquen la manipulación de virus infeccioso (Doel, 1985; Terry *et al.*, 1983; Brown, 2004). En PV se ha conseguido una relativa estabilización mediante la adición de distintos compuestos o tratamientos externos (Ikegami *et al.*, 1964; Leal *et al.*, 1990; Milstien y Lemon, 1994; Melnick, 1996; Milstien *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997; Verheyden *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2009). No obstante, en el caso de las vacunas contra la fiebre aftosa no se han desarrollado agentes estabilizantes de suficiente eficacia. Es más deseable, en cualquier caso, el desarrollo de una vacuna basada en principios activos de suficiente termoestabilidad intrínseca, sin necesidad de aditivos.

En el pasado se han hecho importantes esfuerzos para desarrollar una vacuna de VFA basada en péptidos sintéticos, debido tanto a la elevada termoestabilidad de éstos, como a su ausencia de infectividad. Estos estudios ha servido para obtener una mejor conocimiento de VFA y de las interacciones de los virus con los anticuerpos (Rowlands, 2004; Mateu y Verdager, 2004). Pero como vacunas, los péptidos sintéticos presentan problemas importantes, incluyendo una pobre inmunogenicidad, una respuesta inconsistente y una elevada probabilidad de escape de los virus circulantes, a través de la mutación de un muy limitado numero de residuos de los epítotos representados en los péptidos inmunogénicos.

Por otra parte, se está explorando desde hace ya tiempo el uso de cápsidas vacías de VFA como potenciales vacunas administradas bien en forma de ADN (vacunas ADN), o bien en forma de cápsidas. Las cápsidas vacías presentarían la gran ventaja de evitar la manipulación de material infeccioso, asegurando al mismo tiempo la inmunización eficaz del animal por ser antigénicamente indistinguibles del virión (Curry *et al.*, 1995, 1997). Desafortunadamente, hasta el momento no ha sido posible producir a gran escala cápsidas recombinantes vacías de VFA. Pero incluso si este aspecto fuera resuelto, un problema adicional de estas vacunas sería probablemente que presentarían una estabilidad aún más reducida que las vacunas en uso, ya que la pérdida del ARN conlleva una disminución de estabilidad de la partícula vírica (Curry *et al.*, 1995).

En base a lo anteriormente expuesto, consideramos de gran interés biotecnológico el desarrollo de una vacuna contra la fiebre aftosa basada en viriones genéticamente modificados que posean una mayor termoestabilidad intrínseca frente a la disociación en subunidades, pero que conserven una infectividad normal (necesaria para el crecimiento de los virus durante la producción de la vacuna por el método actual). Una vacuna basada en estos variantes termoestables podría relajar los requerimientos de una cadena de frío, sin necesidad de modificar los métodos actuales, bien establecidos, para la producción y ensayo de vacunas. Alternativa o adicionalmente, la introducción en cápsidas vacías de los cambios de aminoácido responsables del incremento de estabilidad encontrados podría compensar la pérdida de estabilidad causada por la ausencia del ARN, facilitando de este modo el desarrollo de vacunas recombinantes contra la fiebre aftosa basadas en partículas víricas plenamente inmunogénicas, pero intrínsecamente no infecciosas.

#### **1.4.2. Posibles limitaciones selectivas a la estabilidad de las cápsidas víricas**

La obtención de viriones de VFA térmicamente más estables pero que conserven su infectividad podría resultar muy complicada si existiera una relación inversa entre estabilidad e infectividad. Este es un aspecto básico en virología que, a pesar de sus consecuencias prácticas, no ha sido apenas investigado.

Los viriones pequeños y sin envuelta como VFA parecen haber evolucionado hacia una exquisita optimización estructural, probablemente debido a las múltiples y a veces contradictorias presiones selectivas impuestas por las numerosas funciones que las partículas víricas deben desempeñar durante el ciclo viral (ver por ejemplo Mateu, 1995; Johnson, 1996; Rossmann *et al.*, 1997; Chow *et al.*, 1997; Mateo *et al.*, 2003; Carrasco *et al.*, 2006, 2008). En este sentido, numerosos estudios estructura-función de diferentes virus pequeños como VFA o MVM indican que es muy difícil introducir mutaciones en la cápsida sin provocar una reducción en la infectividad del virus (p.ej., Mateu 1995; Verdaguer *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996; Chow *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2000; Limn *et al.*, 2000; Mateo *et al.*, 2003; Reguera *et al.*, 2004, 2005; Carreira y Mateu, 2006). El escape del reconocimiento por el sistema inmune y la unión a la diana celular constituyen un ejemplo revelador de solapamiento estructural de funciones biológicas contrapuestas en la cápsida vírica (Verdaguer *et al.*, 1995; Mateu *et al.*, 1996; revisión en Mateu y Verdaguer, 2004).

De modo semejante, la estabilidad conformacional de VFA y otros virus podría estar sometida a presiones selectivas contradictorias. Es razonable postular que la cápsida de un virus debe ser lo suficientemente estable como para proteger eficazmente al genoma viral frente a los rigores del ambiente exterior durante el paso de hospedador a hospedador; y que, al mismo tiempo, la cápsida debe ser lo suficientemente inestable, o metaestable, como para permitir la desencapsidación en el interior celular (Rossmann *et al.*, 1997; Chow *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998). Por tanto, los virus podrían presentar un rango, o “ventana” de estabilidad más o menos restringido. Hasta la fecha existen pocos datos que revelen hasta qué punto pueden las partículas víricas aumentar su estabilidad conformacional sin ver comprometida su infectividad y/o eficacia biológica.

### 1.4.3. Selección y aislamiento de variantes termoestables a partir de poblaciones víricas

La estrategia más sencilla para tratar de obtener variantes víricas más estables puede ser su selección mediante calor a partir de una población viral genéticamente heterogénea. Estos mutantes, de obtenerse, aportarían asimismo información sobre la ventana de estabilidad admisible para el virus. Esta estrategia aplica más en especial a los virus ARN, cuya estructura poblacional en cuasiespecies ha sido demostrada ampliamente (ver apartado 1.5). Existen pocos ejemplos de la obtención a partir de poblaciones de mutantes que puedan presentar una mayor termoestabilidad, y en general su caracterización y la determinación de su eficacia biológica no han sido investigadas suficientemente.

Una cepa atenuada de PV, cuya temperatura de replicación óptima se encontraba alrededor de los 34°C, se sometió a sucesivos ciclos de amplificación, y se obtuvieron clones biológicos a 40°C que presentaban una mayor virulencia, marcador que se asoció con la termoestabilidad. Estos revertientes presentaban varias mutaciones, pero no quedó claro cuales de ellas eran las que conferían el fenotipo termoresistente (Christodoulou *et al.*, 1990). Más recientemente se consiguió aislar, mediante ciclos sucesivos de calentamiento más amplificación, un mutante de PV termoestable a 50° C durante 30min (Shiomi *et al.*, 2004). La adquisición de este fenotipo parece deberse a una única mutación en VP1 y es genéticamente estable. Sorprendentemente, este mutante resultó menos estable que el virus silvestre cuando se incubó a una temperatura menor (37°C) durante varios días, lo cual sugirió que los mecanismos responsables de la inactivación de PV a alta temperatura en un periodo corto de tiempo y a temperatura moderada durante un periodo más largo son distintos.

A partir de poblaciones de reovirus se aislaron variantes resistentes a la presencia de cierta concentración de etanol, y su secuenciación sugirió que este fenotipo se debía a mutaciones en una proteína de la cápsida. Poco después se encontró que estos mutantes también presentaban un fenotipo termoresistente cuando se calentaban 10min a 50°C. Uno de estos mutantes se sometió a un ensayo de inactivación térmica confirmándose su mayor termoestabilidad respecto de otras cepas clonales de reovirus. Finalmente se hizo un estudio específico para el aislamiento de reovirus de termoestabilidad incrementada a partir de dos poblaciones clonales, aislándose nueve clones termoresistentes cuya secuenciación reveló que la adquisición de este fenotipo se debía, en la mayoría de los casos, a mutaciones sencillas similares a las causantes de la resistencia a etanol (Middleton *et al.*, 2007).

En el caso de VFA, experimentos pioneros (Bachrach *et al.*, 1960; Pringle, 1964) pusieron de manifiesto que una población de virus de tipo A adaptada a cultivos mediante un número elevado de pases podía enriquecerse en variantes termoresistentes mediante calentamiento y posterior amplificación de los virus supervivientes en monocapas de células BHK susceptibles. Pero estos mutantes, que eran genéticamente inestables y/o presentaban una eficacia biológica reducida, nunca fueron caracterizados genotípicamente, y los estudios iniciales no se prosiguieron.

En nuestro laboratorio se ha intentado reproducir los resultados obtenidos por Bachrach y cols. con VFA a partir de una población derivada de un clon biológico de VFA, C-S8c1. Nuestro objetivo era en un principio aislar variantes clonales termoestables para identificar las mutaciones responsables de la estabilización térmica. De este modo podríamos tratar de entender qué

estrategias podrían utilizarse para la estabilización de cápsidas víricas en general. Además, mediante combinación de diferentes mutaciones estabilizantes identificadas en los variantes naturales y su introducción conjunta en clones moleculares, podrían en principio obtenerse viriones o cápsidas de VFA mucho más estables. En los experimentos iniciales, Roberto Mateo sometió a una población derivada de un clon biológico de VFA C-S8 (C-S8c1) a una serie de ciclos de calentamiento más amplificación, de forma muy similar a como lo describieron originalmente Bachrach y col. Sorprendentemente, en esos estudios preliminares nuestros no se consiguió ningún aumento significativo y consistente de la estabilidad de las poblaciones resultantes, y tampoco pudieron aislarse de ninguna de ellas clones biológicos de mayor termoestabilidad (Mateo, 2004; Mateo *et al.*, 2007). Como una primera parte de la presente tesis doctoral, hemos continuado y ampliado esos estudios.

#### **1.4.4. Diseño racional de variantes víricos termoestables mediante ingeniería de proteínas**

Otra estrategia posible para la obtención de variantes víricos termoestables es la utilización de técnicas de ingeniería de proteínas. Se han desarrollado dos aproximaciones complementarias para la estabilización de proteínas mediante modificación genética: el diseño racional y los métodos de evolución dirigida (ver, por ejemplo, Steipe, 1999; Dalboge y Borchert, 2000; Lehmann y Wyss, 2001; Arnold, 2001; Sánchez-Ruiz y Makhatadze, 2001; Wintrode *et al.*, 2001). El término "evolución dirigida" engloba un conjunto de técnicas experimentales que reproducen *in vitro* una parte de la diversidad potencial de una molécula y la evolución de sus propiedades en respuesta a una presión selectiva. La diversidad se genera mediante procesos de mutación y/o recombinación, inducidos o no en el laboratorio, y la optimización de las propiedades deseadas se realiza mediante selección positiva impuesta por el experimentador (Lehmann *et al.*, 2000). En el diseño racional se modifican residuos determinados de la proteína mediante mutagénesis dirigida, teniendo en consideración las relaciones estructura-función generales para las proteínas, y las particulares para la proteína considerada. En el caso concreto del incremento de estabilidad de las cápsidas víricas hay que tener en cuenta que el ensamblaje/desensamblaje son procesos generalmente irreversibles. Por tanto para aumentar la estabilidad frente a la disociación de la partícula se tratará específicamente de disminuir la constante cinética de disociación, de modo que aumente la vida media de la partícula vírica en las condiciones de ensayo o almacenamiento de la misma.

A pesar del interés básico y de las muchas aplicaciones posibles, apenas existen estudios en los que se haya diseñado racionalmente o mediante evolución dirigida un variante vírico que presente una estabilidad frente al calor sustancialmente mayor que la del virus natural. Sin embargo, pueden citarse algunos trabajos encaminados en esta dirección. En TMV, un virus con cápsida helicoidal formada por un sólo tipo de subunidad, se mutagenizó un residuo para introducir un nuevo puente salino intersubunidad, pero el mutante sencillo diseñado no resultó más estable. Sin embargo, una combinación de esta mutación con otra que podría incrementar las interacciones hidrofóbicas (Bendahmane *et al.*, 1997), y que por si sola impedía la formación de viriones infecciosos, resultó en una inhibición del desensamblaje superior al 80% (Lu *et al.*, 1998). La mutación de siete de los residuos de la cápsida del fago MS2 implicados en contactos entre las subunidades condujeron

todas a la correcta formación de cápsidas vacías, y tres de ellas confirieron un aumento de la estabilidad térmica de las mismas (Stonehouse y Stockley, 1993). Más recientemente, en este mismo virus, mediante la introducción de un puente disulfuro análogo al presente de forma natural en la cápsida del bacteriofago homólogo Q $\beta$ , se logró incrementar la termoestabilidad de su cápsida (Ashcroft *et al.*, 2005). En PV, mediante la mutación de un residuo de glutamato de VP2 se obtuvieron mutantes infectivos de termoestabilidad incrementada, aunque con un rendimiento disminuido debido a defectos en el ensamblaje (Reynolds *et al.*, 1992). La sustitución de un residuo del extremo N-terminal de la proteína VP1 en la cápsida del cocksackievirus A9 condujo a la formación de un mutante de estabilidad incrementada, pero que estaba negativamente afectado en su desencapsidación y en su capacidad infectiva (Airaksinen *et al.*, 2001).

En nuestro laboratorio nos planteamos el intentar estabilizar el virión de VFA frente a la disociación en subunidades mediante la introducción de nuevas interacciones entre los pentámeros que forman la cápsida. El conocimiento actual de la estructura tridimensional del VFA (Acharya *et al.*, 1989; Lea *et al.*, 1994; Curry *et al.*, 1996; Fry *et al.*, 1999) y la relativa simple organización de su cápsida sugerían que, hasta cierto punto, era factible intentar, al menos desde el punto de vista del diseño estructural, una termoestabilización racional del virión. Era preciso tener en cuenta, no obstante, que el incremento de estabilidad debía conseguirse sin dañar ninguna de las funciones biológicas necesarias para la infectividad. Este punto es crucial para permitir la amplificación de los virus termoestables que pudieran obtenerse, con el objetivo aplicado último de desarrollar una vacuna contra la fiebre aftosa de mayor termoestabilidad, pero que pudiera producirse mediante los procedimientos actualmente en uso.

Para ello, como parte de su proyecto de tesis doctoral, Roberto Mateo realizó en nuestro laboratorio un estudio exhaustivo de la importancia de cada residuo en los interfases entre pentámeros para la infectividad del virión de VFA (Mateo *et al.*, 2003, Mateo, 2004). En base a estos y otros resultados, se diseñaron y construyeron cinco clones infecciosos de VFA con mutaciones encaminadas a introducir nuevas interacciones electrostáticas entre pentámeros de la cápsida. Para ello se eligieron residuos de las interfases, o cercanos a ellas, que pudieran en principio aceptar las necesarias mutaciones sin comprometer la estabilidad del virus. Los resultados preliminares obtenidos permitieron identificar un virus mutante que presenta una mayor estabilidad frente a la disociación en subunidades pentaméricas, al menos a 4°C. Como una segunda parte de la presente tesis doctoral, hemos continuado y ampliado en gran medida esos estudios.

## **1.5. Mutaciones compensatorias en virus**

### **1.5.1. Cuasiespecies víricas**

Una característica fundamental de los virus ARN, incluyendo VFA, es la elevada heterogeneidad genética de sus poblaciones, una consecuencia del gran tamaño de sus poblaciones, su rápida replicación, y la ausencia de actividad correctora de errores durante la misma, que da lugar a una elevada frecuencia de mutación (revisiones en Holland *et al.*, 1982; Domingo y Holland, 1997;

Domingo *et al.*, 2001, 2004; Domingo, 2006). Las poblaciones de virus ARN constituyen distribuciones complejas de mutantes estrechamente relacionados entre sí, pero no idénticos, sometidos a un proceso continuo de variación genética, competición y selección (Domingo *et al.*, 1980, 1985, 1990, 1999, 2001; Domingo y Holland, 1988, 1997; Eigen *et al.*, 1988; Eigen y Biebricher, 1988). Esta estructura genética de las poblaciones de virus altamente variables ha recibido la denominación de *cuasiespecie vírica*. Hasta el momento todos los virus ARN examinados a nivel poblacional muestran un amplio y complejo espectro de mutantes y evolucionan como predice la dinámica de cuasiespecies (Domingo *et al.*, 1999, 2001, 2003, 2004; Domingo, 2006). Aunque la estructura en cuasiespecie es característica de los virus ARN, algunos virus ADN como el parvovirus MVM forman poblaciones cuya estructura genética podrían parecerse a las cuasiespecies de virus ARN (López-Bueno *et al.*, 2003, 2006).

La estructura en cuasiespecies de las poblaciones víricas presenta implicaciones biológicas de máxima importancia, ya que los variantes presentes en el espectro de mutantes, así como la frecuente y continua aparición de nuevos mutantes durante la replicación, confieren una extrema flexibilidad adaptativa, incluyendo la capacidad de escapar fácilmente a múltiples presiones selectivas que tienden a limitar su replicación (revisiones en Domingo y Holland, 1997; Domingo *et al.*, 1999, 2001, 2004; Domingo, 2006). Esto es especialmente frecuente cuando un cambio biológico depende de uno o unos pocos cambios de nucleótido o aminoácido. Existen abundantes ejemplos de cambios fenotípicos notables asociados a cambios genéticos mínimos, como la adquisición de resistencia a la acción de anticuerpos, células citotóxicas o inhibidores virales, o el cambio o expansión del rango de hospedador y del tropismo celular. Se citan a continuación unos pocos ejemplos concretos para el caso de VFA y otros picornavirus.

En VFA la adquisición de un fenotipo hipervirulento y nuevo tropismo en poblaciones pasadas en células persistentemente infectadas y parcialmente resistentes al virus, fue debida únicamente a dos sustituciones en la cápsida (Escarmís *et al.*, 1998). Este mismo fenotipo se adquirió cuando el virus fue pasado en infecciones citolíticas (Baranowski *et al.*, 1998). Solo tres sustituciones bastaron para que una población clonal de VFA adaptada a cultivos adquiriese rápidamente tropismo por un huésped natural (Núñez *et al.*, 2001). Una única sustitución en la cápsida de VFA provocó los cambios en la en el tropismo y antigenicidad del virus necesarios para la adaptación a las nuevas condiciones de crecimiento en cultivos en suspensión (Curry *et al.*, 1996). En otros picornavirus y en diferentes estudios se ha asociado una única sustitución a cambios fenotípicos radicales como son los casos de coxsackievirus (Virus coxsackie B3 (CVB3)) o el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) y la adquisición en ratón de los caracteres cardiovirulento (Tu *et al.*, 1995) y diabético (Bae y Yoon, 1993) respectivamente.

### **1.5.2. Mutaciones compensatorias en genomas víricos**

El enorme potencial de adaptación de la estructura poblacional en cuasiespecies de los virus ARN podría estar severamente limitado en el caso de que muchas de las mutaciones posibles conlleven una bajada significativa de la eficacia biológica del virus. Como se ha mencionado antes, la cápsida de los virus pequeños y sin envuelta como VFA parece haber sido extraordinariamente

optimizada por la evolución como respuesta a la necesidad de realizar múltiples funciones biológicas con una organización estructural muy sencilla (Mateu, 1995; Chiu *et al.*, 1997). Podría esperarse, por tanto, que a pesar de un elevado potencial para la variación genética en las cuasiespecies de VFA, la secuencia de la cápsida estuviera extremadamente conservada, lo que no es el caso. Esta aparente contradicción podría explicarse mediante la fijación frecuente de mutaciones compensatorias en su genoma.

En un genoma pueden fijarse mutaciones biológicamente desventajosas en el caso de que ocurran en otros *loci* mutaciones secundarias que sean capaces de restaurar la eficacia biológica perdida a causa de la mutación primaria, antes de que la presencia de ésta conduzca al genoma mutado a la extinción. Estas mutaciones compensatorias se han encontrado en múltiples ocasiones, muchas veces de forma fortuita, tanto en genomas celulares como en genomas víricos, y podrían ocurrir con elevada frecuencia en la naturaleza, como indican diferentes estudios teóricos (Kondrashov *et al.*, 2002; Kulathinal *et al.*, 2004) y experimentales (Jarvik y Botstein, 1975; Yamaguchi *et al.*, 1993; Pazhanisamy *et al.*, 1996; Deom y He, 1997; Ono *et al.*, 1997; Poteete *et al.*, 1997; Mateu y Fersht, 1999; Nijhuis *et al.*, 1999; Olivares *et al.*, 1999; 2004; Cimarelli *et al.*, 2000; Tachedjian *et al.*, 2000; Yuan y Shih, 2000; Pelemans *et al.*, 2001; Poon y Chao, 2005; Chanel-Vos y Kielian, 2006; Thompson *et al.*, 2006). En unos pocos casos, se ha podido comprender en cierta medida el mecanismo molecular por el que ocurre el efecto compensatorio en proteínas mediante estudios estructura-función detallados (Klig *et al.*, 1988; Das *et al.*, 1989; Blacklow y Knowles, 1990; Brown *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1994; Bouvier y Poteete, 1996; Nikolova *et al.*, 2000; Ebert y Beattie, 2004; Joerger *et al.*, 2004). Las razones moleculares de estos efectos de compensación son muy variadas, y van desde efectos inespecíficos aditivos sobre una única propiedad de la proteína (por ejemplo estabilidad), hasta efectos complejos, no aditivos y multifactoriales. A pesar de estos avances, para la gran mayoría de los efectos compensatorios detectados no existe una explicación mecanística clara.

En el caso de virus ARN, como es VFA, la estructura en cuasiespecies de sus poblaciones implica la existencia dentro de ellas no sólo de muchos mutantes sencillos, sino también de mutantes con múltiples mutaciones. Por tanto, su evolución mediante la fijación simultánea o secuencialmente rápida fijación de combinaciones de mutaciones, incluyendo mutaciones compensatorias, puede ser un hecho recurrente, muy frecuente e importante. De hecho, muchos casos documentados de mutaciones compensatorias implican proteínas de virus ARN (ver referencias indicadas anteriormente en este apartado). A continuación, y a modo de ejemplo, se describen brevemente algunos casos estudiados en virus ARN o ADN.

Un caso especialmente estudiado es el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), un retrovirus que posee una enorme capacidad de variación por la que fácilmente desarrolla resistencias a los fármacos, lo que supone el mayor inconveniente en la lucha contra esta grave enfermedad. Por esta causa debe utilizarse una terapia combinada atacando a la vez dianas diferentes que actúan en diferentes puntos del ciclo viral. Las más comunes son la proteasa, que procesa la poliproteína viral, y la retrotranscriptasa que cataliza la síntesis de ADN a partir del ARN viral. Generalmente la aparición de la resistencia conlleva inicialmente una disminución de la eficacia biológica del virus, que luego se

recupera mediante la fijación de mutaciones compensatorias que restauran la capacidad replicativa sin variar la resistencia al inhibidor. Este comportamiento ha sido descrito en numerosas ocasiones, tanto en el caso de inhibidores de la proteasa (Pazhanisamy *et al.*, 1996; Nijhuis *et al.*, 1999; Dam *et al.*, 2009), como en la transcriptasa inversa (Olivares *et al.*, 1999, 2004; Tachedjian *et al.* 2000; Pelemans *et al.*, 2001). En otro ejemplo, en un análisis mediante mutación sistemática a triptófano de los 16 residuos aromáticos del dominio p51 de la transcriptasa inversa de HIV se encontraron dos mutantes viables con una capacidad replicativa muy pobre, que sin embargo se recuperó debido a la aparición de una única mutación compensatoria diferente en cada uno de ellos (Olivares *et al.*, 2004). Las mutaciones compensatorias aparecen igualmente en otras proteínas del virus HIV como la nucleocápsida, en donde la adquisición de una sola mutación bastó para restaurar distintas funciones del virus (Cimarelli *et al.*, 2000); o la matriz, en donde mutaciones afectando a pasos diferentes del ciclo viral fueron revertidas en todos los casos mediante la aparición de mutaciones adicionales (Ono y Freed, 1997).

En el virus del bosque Semliki una mutación en un residuo altamente conservado que provocaba defectos en la infectividad, fue revertida por distintas mutaciones localizadas en grupos en zonas concretas de la proteína (Chanel-Vos y Kielian, 2006). En reovirus se demostró que distintas mutaciones compensatorias intragénicas eran capaces de revertir el fenotipo de un mutante de termoestabilidad incrementada defectivo en la entrada por presentar problemas en el desensamblaje (Agosto *et al.*, 2007). En virus vegetales también podemos citar varios casos, como el de TMV, en el que mutaciones deletéreas introducidas artificialmente en las proteínas con movimiento de la planta del tabaco fueron revertidas gracias a la aparición de dos sustituciones secundarias en el segmento distal de la misma proteína (Deom y He, 1997). En el virus del mosaico del pepino, distintas mutaciones que impedían la infección fueron revertidas por sus respectivas sustituciones secundarias (Thompson *et al.*, 2006).

A pesar de que las mutaciones compensatorias podrían ser más frecuentes en virus ARN, en virus ADN también se ha descrito su presencia en numerosas ocasiones. Por ejemplo, en el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1), en donde un mutante letal defectuoso en el ensamblaje, dio lugar a un elevado número de revertientes en una línea celular transformada gracias a la aparición de sustituciones secundarias en las proteínas de la cápsida (Warner *et al.*, 2000). En HBV una mutación relativamente frecuente que provoca una secreción de viriones inmaduros, fue compensada por otra mutación que también aparece frecuentemente en la naturaleza (Yuan y Shih, 2000). Este tipo de mutaciones también aparece en distintos bacteriofagos. Se han realizado estudios con la lisozima del fago T4 introduciendo mutaciones dañinas en la proteína que, en diversos casos, eran revertidas mediante la aparición de sustituciones secundarias (Bouvier y Poteete, 1996; Poteete *et al.*, 1997). Una de estas sustituciones que revertía una mutación desestabilizante de la enzima, introducida en el virus wt aumento su estabilidad (Wray *et al.*, 1999). En el fago P22 distintas mutaciones deletéreas se revertieron a costa de la adquisición de un fenotipo termosensible que a su vez desaparecía con la aparición sucesiva de nuevas mutaciones secundarias (Jarvik y Botstein, 1975).

Los estudios en los que se analiza sistemáticamente la aparición de mutaciones secundarias compensatorias en respuesta a la introducción controlada de mutaciones primarias deletéreas son muy escasos. No obstante se pueden citar algunos trabajos en esta línea. En un estudio de los patrones y correlaciones seguidos por las mutaciones aparecidas en la proteasa de HIV en respuesta

al tratamiento con inhibidores, se puso de manifiesto que el número de mutaciones compensatorias aumentaba proporcionalmente al número de inhibidores distintos que habían sido administrado durante el tratamiento, y que casi la mitad de los residuos de la proteína participaban en la aparición de la resistencia. Además la existencia de numerosos casos de covariación entre estas mutaciones, cuya frecuencia disminuía al aumentar el número de residuos implicados de dos a más, reflejaba la complejidad de los patrones mutacionales aparecidos (Wu *et al.*, 2003). En otro estudio, se introdujeron mutaciones al azar en 53 posiciones distintas de la lisozima del bacteriófago T4. En 8 de estos casos aparecieron sustituciones secundarias. De las 18 mutaciones compensatorias diferentes encontradas, la mayoría ejercían efectos globales compensando mutaciones en diferentes contextos primarios; no obstante seis de ellas fueron más específicas disminuyendo la función de otras lisozimas mutantes y/o la parental (Poteete *et al.*, 1997). En un análisis sistemático con el fago  $\phi$ x174 se introdujeron 21 mutaciones dañinas a lo largo de su genoma, y se encontró que la frecuencia de aparición de mutaciones compensatorias era del 70%; en el contexto del virus parental, estas ejercían en general un efecto deletéreo. Además aparecía una elevada densidad de mutaciones intragénicas que se situaban en su mayoría agrupadas alrededor de la mutación primaria, tanto en la secuencia como en la estructura tridimensional de la proteína. Con los datos obtenidos se estimó que el número de mutaciones intragénicas diferentes capaces de compensar a una mutación deletérea dada era nueve, y que, al menos en este organismo, alrededor de la mitad de las mutaciones compensatorias aparecidas estarían localizadas extragenicamente (Poon y Chao, 2005). A pesar de estos y otros estudios, en nuestro conocimiento no existe hasta el momento ningún estudio específicamente diseñado para el análisis de las mutaciones compensatorias que pueden aparecer en un virus en respuesta a la introducción sistemática de mutaciones deletéreas en una región funcionalmente bien definida de su genoma.

En el análisis estructura-función que realizamos en nuestro laboratorio con el objetivo final de generar VFA de estabilidad incrementada, R.Mateo encontró que la mutación individual a alanina (eliminación de la cadena lateral y de las interacciones de ésta con otros elementos) de la gran mayoría de los residuos situados en la interfase entre subunidades pentaméricas es deletérea para el virus. Por tanto, la región estructural y funcionalmente definida como de contacto entre subunidades en la cápsida de VFA es extremadamente intolerante a variación individual de los residuos que la componen. Sin embargo, en algunas ocasiones y con algunos mutantes se recuperaron títulos víricos, elevados, y la secuenciación parcial de algunas de estas poblaciones reveló la presencia de sustituciones secundarias en varios casos (Mateo *et al.*, 2003; Mateo, 2004). Estas y otras observaciones (Mateo y Mateu, 2007) sugerían la posibilidad de que pudieran producirse en las interfases entre protómeros y en su entorno estructural, si no mutaciones individuales capaces de aumentar la termoestabilidad del virus sin disminuir su infectividad, sí combinaciones de mutaciones individualmente deletéreas quizá, pero mutuamente compensatorias que pudieran de modo combinado conseguir ese resultado. Además, las observaciones realizadas sugerían la posibilidad de que durante la evolución de VFA existiera una dinámica compleja de mutaciones compensatorias en las funcionalmente críticas interfases entre subunidades en la cápsida de este virus. Por todo ello, en la tercera parte de la presente tesis doctoral hemos realizado un análisis sistemático de la respuesta genética de VFA, a la introducción de mutaciones deletéreas en las interfases entre subunidades pentaméricas de la cápsida.

## 2. OBJETIVOS

Nuestro laboratorio está interesado en entender los mecanismos y determinantes moleculares del ensamblaje, desensamblaje y estabilidad de las partículas víricas. Dentro de este objetivo general, el trabajo de investigación que se describe en esta memoria se centra en el virus VFA como modelo, y continúa y expande el trabajo anterior realizado por el Dr. Roberto Mateo en nuestro laboratorio. Los objetivos específicos de la presente tesis de doctorado han sido:

**1. Investigar la presencia de mutantes naturales termoestables en diferentes poblaciones de VFA.** En un estudio previo el Dr. Mateo no encontró variantes termoestables en poblaciones de VFA derivadas de un clon biológico. En colaboración con él, nos planteamos realizar un estudio en profundidad para investigar la presencia de variantes termoestables en diversas poblaciones naturales no clonales de VFA de diferentes serotipos, y en algunas poblaciones de laboratorio. Los resultados podrían ayudar a responder si existen restricciones evolutivas al incremento de estabilidad de una cápsida vírica como la de VFA. Además, en el caso que se obtuvieran mutantes termoestables, podrían identificarse sustituciones de aminoácidos que contribuyan a incrementar la estabilidad del virión sin comprometer su infectividad. Esto ayudaría a la construcción de variantes de VFA de aplicación en vacunas termoestables.

**2. Obtener y caracterizar variantes de VFA de mayor termoestabilidad, infecciosos y genéticamente estables, mediante la introducción racional de nuevas interacciones entre las subunidades que forman la cápsida.** En otro estudio previo el Dr. Mateo había diseñado y caracterizado parcialmente VFA variantes con mutaciones encaminadas a introducir nuevas interacciones electrostáticas entre pentámeros de la cápsida, con el objetivo de incrementar la estabilidad del virión. Tres de estos mutantes (D3069E/T2188A, A2065K y A2065H) resultaron viables, y el mutante D3069E/T2188A mostró una estabilidad frente a la disociación en subunidades superior al virus parental (en experimentos realizados a 4°C). En base a estos resultados iniciales nos planteamos, en colaboración con el Dr. Mateo: i) continuar la caracterización de los mutantes D3069E/T2188A, A2065K y A2065H. Y ii) diseñar racionalmente y caracterizar nuevos variantes de VFA con mutaciones encaminadas a introducir puentes disulfuro entre pentámeros, igualmente con el objetivo de incrementar la estabilidad del virión. La ventaja de esta última aproximación, de tener éxito, sería que los puentes disulfuro podrían estabilizar el virión en el entorno extracelular, pero no en el interior de la célula, donde serían reducidos. De este modo se podría evitar cualquier efecto desfavorable que la estabilización de la cápsida pudiera tener sobre la desencapsidación, y por tanto sobre la infectividad.

**3. Estudiar la dinámica de aparición de mutaciones compensatorias en VFA en respuesta a la introducción de mutaciones deletéreas en las interfases entre subunidades pentaméricas de la cápsida.** En otro estudio previo de nuestro laboratorio, el Dr. Mateo descubrió que la interfase entre pentámeros en la cápsida de VFA es extremadamente intolerante a variación individual de los residuos que la componen. Sin embargo, algunas observaciones preliminares sugerían la posibilidad de que pudieran producirse mutaciones compensatorias que restauraran la viabilidad del virus. Nos planteamos por tanto, como tercer objetivo de esta tesis doctoral, y con la ayuda de Alicia Rodríguez-Huete, realizar un análisis sistemático de la respuesta genética de VFA a la introducción de mutaciones deletéreas en una región estructural y funcionalmente definida, la interfase entre subunidades pentaméricas de la cápsida. Una comprensión de la dinámica de mutaciones compensatorias en esta región podría ayudar a la elección racional de combinaciones de mutaciones en la cápsida de VFA que aumenten la estabilidad sin reducir la viabilidad, y contribuir además a un mejor entendimiento de la evolución de VFA y de virus ARN en general.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Disoluciones y tampones

- Solución de tripsina-EDTA: 0,5 mg/ml tripsina (DIFCO); 0,016% etilendiaminotetraacetato sódico (EDTA, Merck); 0,0015 % rojo fenol (Merck), 1,12 mM glucosa (Merck) disueltos en tampón fosfato salino (PBS).
- Tampón PBS: 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck), 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck), 137 mM NaCl (Merck); 2,7 mM KCl (Merck), pH= 6,8.
- Solución de X-gal: 2% 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal, Roche) en dimetilformamida (Merck).
- Solución de IPTG: 1 M isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG, Apollo Scientific) en agua destilada. Esterilizada por filtración (filtros Millex, Millipore).
- Tampón de electroporación: 21 mM HEPES pH= 7,05 (Sigma), 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6 mM glucosa (Merck).
- Tampón TE: 10 mM Tris-HCl pH=8,0 (Sigma), 1 mM EDTA.
- Mezcla Met /Cys: 20  $\mu\text{M}$  metionina (Sigma), 8  $\mu\text{M}$  cisteína (Sigma), 0,1 % mercaptoetanol (Sigma), 2 mM ditiotretitol (Promega), 8,7 mM  $\text{KAcO}_3$  (Merck).
- Solución de  $\text{CaCl}_2$ : 10 mM PIPES pH= 7,0 (Sigma), 60 mM  $\text{CaCl}_2$  (Merck), 15% glicerol (Merck).
- Tampón TBE: 90 mM Tris-borato sódico pH=8,0, 2 mM EDTA.
- Tampón TAE: 40 mM Tris-acetato sódico pH=8,0, 1 mM EDTA.
- Tampón TNE: 50 mM Tris-HCl pH=7,5, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl.
- Tampón electrodo 10X: 1,92M glicina (Sigma), 0,25M Trizma base (Sigma). Para su uso se diluye 10 veces y se añade 1 g/l de SDS (Sigma).
- Tampón de transferencia: Tampón de electrodo 1X, 20% metanol (Merck).

### 3.2. Células eucarióticas

#### 3.2.1. Células BHK-21 y su cultivo

Se ha empleado para todos los ensayos la línea celular BHK-21c2. Estas células son fibroblastos de riñón de hámster (Stocker y McPherson, 1964) y fueron clonadas por dilución límite (de la Torre *et al.*, 1988). Las células se cultivaron hasta confluencia en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco), suplementado con aminoácidos no esenciales (Sigma; L-alanina a una concentración final de 0,44 mM, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-ácido glutámico y L-prolina, cada uno a una concentración final de 0,4 mM), gentamicina (Sigma) a una concentración final de 50 mg/ml, parahidroxibenzoato de butilo (Sigma) a una concentración del 0,00002%, y suero fetal bovino (SF, Gibco) a una concentración final del 5% en una atmósfera con 7% de  $\text{CO}_2$ , 98% de humedad y a 37 °C, tal y como se ha descrito previamente (Domingo *et al.*, 1980). Típicamente, las células se cultivaron en placas Petri o botellas de plástico (Nunc o Falcon), se despegaron por tratamiento con solución de tripsina-EDTA calentada a 37 °C durante 2-3 min a temperatura ambiente y se sembraron en nuevas placas o botellas a la densidad celular deseada.

### 3.2.2. Descongelación de células BHK-21

Para su cultivo, se descongelaron en un baño a 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 1.000 r.p.m. (180 g) durante 5 min a temperatura ambiente en una centrífuga de mesa *Rotina 46R* (Hettich). Se eliminó completamente el sobrenadante y se disgregó el pellet de células mediante suave agitación del tubo. Se añadieron 2,5 ml de DMEM suplementado con SF al 10% para resuspender las células, y la suspensión se añadió a 13 ml de DMEM+10% SF. Tras breve agitación se añadieron los 15 ml resultantes a placas Petri de 100 mm de diámetro (P100, Nunc) y se incubaron en las condiciones ya descritas. Habitualmente las células alcanzaron la confluencia en algo menos de 48 h.

### 3.2.3. Congelación y almacenamiento de células BHK-21

Para su almacenamiento, se utilizaron suspensiones con una densidad de  $10^6$  células/ml, que se añadieron a una mezcla de 90% SF y 10% dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma) en criotubos (Nunc). Los tubos se introdujeron en un tambor de congelación relleno con isopropanol, se enfriaron lentamente a -70°C a razón de 1°C/ min, y se mantuvieron en el tambor durante 2-24h. Las células congeladas se almacenaron en nitrógeno líquido.

## 3.3. Virus e infecciones

### 3.3.1. VFA utilizados

Como virus de referencia se utilizó VFA C-S8c1, un clon biológico procedente del aislado natural C-S8 (C<sub>1</sub> Santa Pau Sp/70), originalmente obtenido mediante tres aislamientos sucesivos de placa en células BHK-21 (Sobrino *et al.*, 1983). El virus parental y todos los mutantes utilizados se obtuvieron mediante transcripción *in vitro* del plásmido recombinante infeccioso pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 o mutantes derivados del mismo. Este plásmido quimérico, derivado de los serotipos O y C, codifica las proteínas estructurales, y por tanto la cápsida, de C-S8c1. El resto de la secuencia corresponde al aislado O1K. La secuencia de las proteínas de la cápsida de C-S8c1, y la numeración de los residuos aminoacídicos utilizada en este trabajo, se indican en la **Figura 4**.

**VP4**

1 50  
GAGQSSPATGSQNQSGNTGSI INNYMQQYQNSMDTNLGDNAISGGSNEG  
1 50

51 85  
STDTTSTHTTNTQNNDFWFSKLASSAFSGLFGALLA  
51 85

**VP2**

1 50  
DKKTEETLLEDRIILTRNGHTTSTTQSSVGVTFGYATAEDSTSGPNTSG  
1 50

51 100  
LETRVHQAERFFKMALFDWVPSQNFQGHMHKVVLPHEPKGVYGLVKSAY  
51 100

101 150  
MRNGWDVEVTAVGNQFNGGCLLVALVPEMGDISDREKYQLTLYPHQFINP  
101 150

151 200  
RTNMTAHITVPYVGVNRYDQYKQHRPWTLVVMVAPLTTNTAGAQQIKVY  
151 200

201 218  
ANIAPTNVHVAGELPSKE  
201 218

**VP3**

1 50  
GIFPVACSDGYGNMVTTPDKTADPAYGKVYNPPRTALPGRFTNYLDVAEA  
1 50

51 100  
CPTFLMFENVVYVSTRTDGQRLAKFDVSLAAKHSNTYLAGLAQYYTQY  
51 101

101 150  
TGTINLHFMTGPTDAKARYMVAYVPPGMDAPDNPEEAHCIIHAEWDTGL  
102 151

151 200  
NSKFTFSIPYISAADYAYTASHEAETTCVQGWVCVYQITHGKADADALVV  
152 201

201 219  
SASAGKDFELRLPVDARQQ  
202 220

**VP1**

1 50  
TTTTGESADPVTTTVENYGGGETQVQRRHHTDVAFVLDLRFVKVTVSDNQHT  
1 50

51 100  
LDVMQAHKDNIVGALLRAATYYFSDLEIAVTHTGKLTWVPNGAPVSALNN  
51 100

101 150  
TTNPTAYHKGPVTRLALPYTAPHRVLATAYTGTTTTYASARGDLAHLTTT  
101 154

151 200  
HARHLPTSFNFGAVKAETITELLVRMKRAELYCPRPILPIQPTGDRHKQP  
155 204

201 209  
LVAPAKQLL  
205 213

**Figura 4. Secuencia de aminoácidos de la cápsida de C-S8c1.** La secuencia de las proteínas de la cápsida del virus utilizado en este trabajo coincide con la indicada en Escarmís *et al.*, (1999). La numeración encima y debajo de la secuencia corresponde a la utilizada por Escarmís y cols. (1999) y por Lea y cols. (1994), respectivamente. En el presente trabajo se utiliza la numeración empleada por Lea y cols., en la que las posiciones 59 de VP3 y 138, 139, 140 y 144 de VP1 no corresponden a ningún aminoácido. Esto es debido a que C-S8c1 presenta deleciones con respecto al virus O1BFS, que estos y otros autores utilizan como referencia para la numeración de residuos en las proteínas de la cápsida de VFA. De modo general para nombrar los residuos se usan cuatro dígitos, indicando el primero de ellos la proteína de la cápsida a la que pertenece (1: VP1, 2: VP2; 3: VP3; 4: VP4), y los otros tres la posición del aminoácido de acuerdo con la numeración normalizada para la cápsida de VFA del archivo PDB C-S8c1 1FMD (Lea *et al.*, 1994).

### **3.3.2. Infecciones con VFA en medio líquido**

Los virus obtenidos en diferentes experimentos de electroporación con ARN viral infeccioso fueron en algunos casos amplificados mediante infección de monocapas de células BHK-21c2. Habitualmente se infectaron monocapas confluentes al 90% con inóculos de virus a la máxima multiplicidad de infección (m.d.i.) posible. El volumen de inóculo fue de 100, 200 y 600  $\mu$ l para placas Petri de 35, 60 y 100 mm de diámetro (P35, P60 y P100, Falcon) respectivamente. Los virus se adsorbieron durante 1 h a 37°C en las condiciones descritas anteriormente. Tras lavar las monocapas con DMEM, se añadieron 1, 4 y 10 ml de DMEM+2% SF para placas P35, P60 y P100 respectivamente. Se recogieron los sobrenadantes de infección cuando se observó un efecto citopático (e.c.p.) completo. Los sobrenadantes se centrifugaron a 4 °C en centrifuga de mesa *Rotina 46R* (Hettich) a 2.500 r.p.m. (1.130 g) durante 10 min, o en microfuga *Mikro 22R* (Hettich) a 2.500 r.p.m. (760 g) durante 10 min. Se hicieron alícuotas, que se congelaron y almacenaron a -70 °C.

### **3.3.3. Amplificación de poblaciones de VFA en cultivos celulares**

Para la amplificación de poblaciones de VFA se realizaron pases seriados de virus no mutados o mutantes en monocapas de células BHK-21c2 como se ha descrito anteriormente (Mateo, 2004). Cuando fue necesario, las poblaciones originales se amplificaron en un mínimo número de pases sobre monocapas de células BHK infectadas a la máxima m.d.i. posible

Para facilitar la aparición e imposición de mutaciones compensatorias en poblaciones de VFA se utilizaron mutantes de VFA C-S8c1, obtenidos mediante mutagénesis dirigida, que presentaban una infectividad comprometida. A partir de los sobrenadantes de estas transfecciones, en las que se había observado escaso o nulo c.p.e., se realizaron entre uno y cuatro pases seriados para dar la oportunidad al virus de escapar a la letalidad fijando otras mutaciones adicionales en su genoma.

### **3.3.4. Tratamiento térmico de poblaciones de VFA para la selección de mutantes termoestables**

Para la selección de mutantes termoestables a partir de poblaciones de VFA se siguió un protocolo similar al descrito por Bachrach *et al.* (1960) y Mateo (2004). Se utilizaron diferentes poblaciones de VFA, que se detallan en el capítulo de Resultados. Se tomó 1 ml de la población amplificada resultante y se incubó durante 1 h a una temperatura elevada (normalmente 55°C o 59°C) con el fin de inactivar preferencialmente aquellos variantes en la población que no presentaran una estabilidad relativamente alta. A temperaturas más elevadas (61 a 77 ° C) la infectividad se redujo a niveles demasiado bajos o indetectables, y a temperaturas inferiores la reducción de infectividad fue insuficiente para permitir un enriquecimiento significativo de variantes termoestables. En algunos casos se realizaron pases seriados alternados con etapas de selección por calor. En cada paso una alícuota de 200  $\mu$ l de la población resultante de este tratamiento se empleó como inóculo para infectar, del modo descrito antes, una monocapa de células BHK-21c2 sembrada en una placa P60. El sobrenadante se recogió alrededor de las 40 h post-infección y 1 ml del mismo se utilizó para repetir el proceso de calentamiento y amplificación varias veces más.

### 3.3.5. Titulación de VFA

Los títulos virales fueron determinados en ensayos de plaqueo. Los métodos de plaqueo de VFA sobre monocapas de células BHK-21 en medio con agar semisólido han sido descritos anteriormente (Domingo *et al.*, 1980; Sobrino *et al.*, 1983). Brevemente, se infectaron monocapas de células BHK-21c2 cultivadas en placas Petri (P60) y cercanas a confluencia, con diluciones crecientes de suspensiones de virus en DMEM, que siempre se mantuvieron en hielo. Tras 1 h de adsorción a 37°C en una atmósfera con 7% de CO<sub>2</sub> y 98% de humedad, las monocapas se lavaron dos veces con DMEM y se añadió agar semisólido a una concentración final de 0,5% en medio DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales, gentamicina y parahidroxibenzoato de butilo (como se ha indicado antes), y con SF al 2% y dietilaminoetil-dextrano al 1% (concentraciones finales). Las monocapas se incubaron durante 24 h en las mismas condiciones utilizadas para la adsorción, se fijaron con una solución acuosa de formaldehído al 2%, y se tiñeron con una solución acuosa de formaldehído al 2% y cristal violeta al 2%. El título se determinó mediante contaje de las placas de lisis.

### 3.4. Preparación de células *E.coli* DH5 $\alpha$ competentes

Para la preparación de células de *E.coli* DH5 $\alpha$  competentes se utilizaron células procedentes de un glicerolado mantenido a -70 °C, mediante incubación en 10 ml de medio LB a 37°C durante la noche en un baño agitador C76 (New Brunswick Scientific) a 250 r.p.m. Se inocularon 4,5 ml de este cultivo en 450 ml de medio LB, y el nuevo cultivo se incubó de igual forma hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0,4. Se mantuvieron las células en hielo durante 5 minutos y a continuación se centrifugaron a 3.000 r.p.m. (1.600 g) durante 8 minutos a 4°C en una centrifuga de mesa. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 90 ml de solución de CaCl<sub>2</sub>. Se centrifugó de nuevo a 2.500 r.p.m. (1.100 g) durante 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante, para volver a resuspender el sedimento en 90 ml de solución de CaCl<sub>2</sub>. Tras mantener las células durante 30 minutos en hielo, se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones y finalmente se resuspendió el sedimento en 18 ml de solución CaCl<sub>2</sub>. La suspensión resultante se distribuyó en alícuotas que se congelaron rápidamente en una mezcla de etanol y nieve carbónica y se almacenaron a -70 °C. Las células competentes así preparadas mantuvieron una buena eficiencia de transformación durante al menos varios meses.

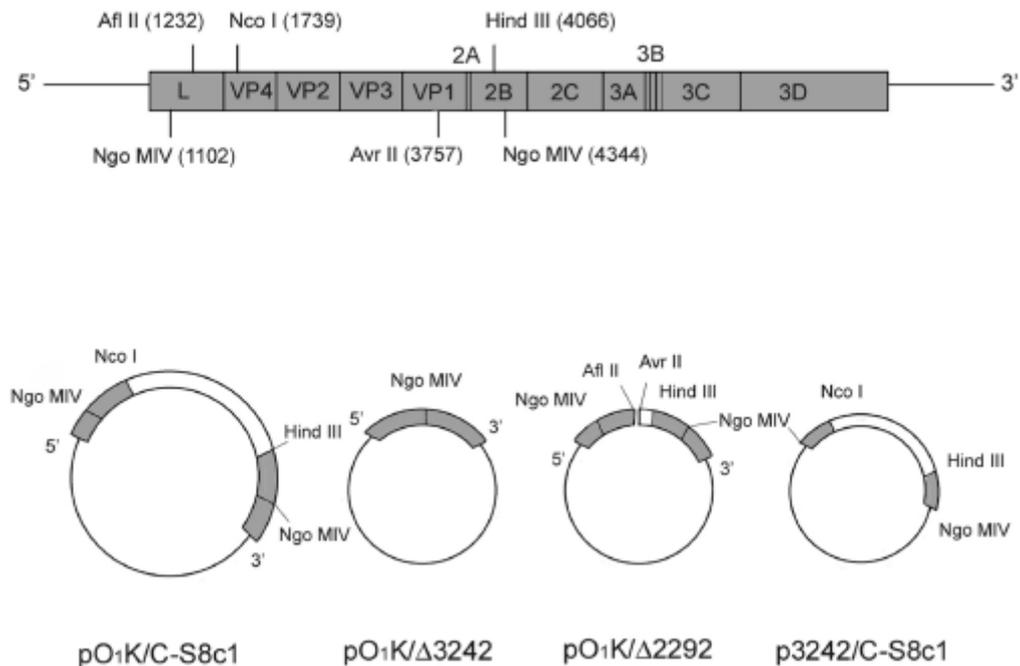
### 3.5. Plásmidos, mutagénesis dirigida y subclonaje.

#### 3.5.1. Plásmidos utilizados para la mutagénesis y el subclonaje en un clon infeccioso de VFA

Los plásmidos empleados fueron pO<sub>1</sub>K/C-S8c1, pO<sub>1</sub>K/ $\Delta$ 2292 y p3242/C-S8c1. La construcción de estos plásmidos se ha descrito previamente (Baranowski *et al.*, 1998). El plásmido infeccioso quimérico pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 (**Figura 5**) se construyó a partir de un clon de ADNc infeccioso derivado del aislado O<sub>1</sub> Kaufbeuren (O<sub>1</sub>K) por el Dr. E. Beck y colaboradores (Zibert *et al.*, 1990). pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 contiene el ADNc correspondiente a un genoma quimérico de VFA cuyas proteínas estructurales (y por tanto toda la cápsida) son las de C-S8c1, y el resto de las proteínas no estructurales pertenecen a

O<sub>1</sub>K. El plásmido pO<sub>1</sub>K/Δ2292 (Mateo, 2004) corresponde al vector pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 al que le falta un segmento de 2292 p.n. flanqueado por sitios de restricción *Afl* II y *Avr* II.

Dicho segmento incluye parte de la secuencia de la proteína L junto con toda la secuencia que codifica para las proteínas estructurales (P1), a excepción del último segmento de VP1 a partir de la posición 3757, lugar de corte de *Avr* II (**Figura 5**). Finalmente, el plásmido p3242/C-S8c1 (**Figura 5**) contiene la secuencia de 3242 p.n. entre los sitios *Ngo* MIV mencionada anteriormente, subclonada en un vector derivado del plásmido comercial pGEM-5Zf (+) (Baranowski *et al.*, 1998).



**Figura 5. Diagramas de los plásmidos pO<sub>1</sub>K/C-S8c1, pO<sub>1</sub>K/Δ3242, p3242/C-S8c1 y pO<sub>1</sub>K/Δ2292.** En la parte superior se representa un esquema del genoma de VFA O<sub>1</sub>K. En los diagramas de los plásmidos, los rectángulos en gris o en blanco representan segmentos correspondientes al genoma de VFA O<sub>1</sub>K o C-S8c1, respectivamente. El vector linealizado pO<sub>1</sub>K/Δ2292 se construyó a partir de pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 mediante la digestión con *Afl* II y *Avr* II (ver texto). Los rectángulos están delimitados por los lugares de corte de las nucleasas de restricción indicadas. La numeración empleada para los lugares de restricción de *Ngo* MIV y *Afl* II en el genoma de O<sub>1</sub>K se refiere a la empleada por Zibert y cols. (1990). El resto de la numeración empleada se refiere a la utilizada por Escarmís y cols. (1999) y está referida a C-S8c1. El vector pO<sub>1</sub>K/Δ3242 pertenece a la serie pero no se utilizó en este trabajo.

### 3.5.2. Mutagénesis dirigida

#### 3.5.2.1. Oligonucleótidos para mutagénesis dirigida

Los oligodesoxinucleótidos (Life Technologies) se recibieron liofilizados, libres de sales y otros solutos. Tras centrifugar los tubos a 12.000 r.p.m. (14.800 g) durante 30 segundos a temperatura ambiente en una microfuga, los oligonucleótidos se disolvieron en tampón TE pH=8,0 a una concentración final de aproximadamente 200 nmol/ml a partir de los datos suministrados por la casa comercial. La concentración real se determinó mediante dilución 1/200 en agua y medida de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro UV-1603 (Shimadzu), utilizando para el cálculo el coeficiente de extinción específico suministrado por la casa comercial. Las soluciones preparadas se almacenaron a -20 °C. Las parejas de oligonucleótidos mutagénicos utilizados se indican en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Oligonucleótidos mutagénicos empleados en este trabajo.**

Oligonucleótido <sup>a</sup>	Secuencia
T2053W F T2053W R	CTGGTCTAGAGTGGCGCGTTCATC GATGAACGCGCCACTCTAGACCAG
Q2057W F Q2057W R	CGCGCGTTCATTGGGCAGAGAGG CCTCTCTGCCCAATGAACGCGCG
K2198W F K2198W R	CCCAACAGATCTGGGTGTATGCCAAC GTTGGCATAACCCAGATCTGTTGGG
K2096W F K2096W R	GGGTCTCGTCTGGTCATACGCGTAC GTACGCGTATGACCAGACGAGACCC
K2088W F K2088W R	CCCACGAACCATGGGGTGTTCACGG CCGTAAACACCCCATGTTTCGTGGG
Y2200W F Y2200W R	CAGATCAAAGTGTGGGCCAACATAGCC GGCTATGTTGGCCACACTTTGATCTG
I3189W F I3189W R	GTGTGTACCAATGGACTCACGGCAAG CTTGCCGTGAGTCCATTGGTACACAC
M3122W F M3122W R	GAAAGCTCGGTAAGTGGGTGGCGTAC GTACGCCACCCAGTACCGAGCTTTC
M3122G F M3122G R	GAAAGCTCGGTATGGGGTGGCGTAC GTACGCCACCCCATACCGAGCTTTC
T2022G-2CN F T2022G-2CN R	CGTAACGGGCACGGGACCTCGACAACC GGTTGTGCGAGGTCCCCTGCCCGTTACG
T3190F-2CN F T3190F-2CN R	GTGTACCAAATCTTTCACGGCAAGGCAG CTGCCTTGCCGTGAAAGATTTGGTACAC
E2213A-2CN F E2213A-2CN R	GCACGTGGCGGGTGCCTCCCCTCCAAGG TTCCGGAGGGGAGGGCACCCGCCACGTGC
D3069A-2CN F D3069A-2CN R	CTCAACACGAATTGCGGGCAAAGGCTAC GTAGCCTTTGCCCGCAATTCGTGTTGAG
E3146A-2CN F E3146A-2CN R	CTGCATACACGCAGCCTGGGACACTGGTC GACCAGTGTCCCAGGCTGCGTGTATGCAG
T2023C F T2023C R	GTAACGGGCACACGTGCTCGACAACCC GGTTGTGCGAGCACGTGTGCCCGTTAC
A3145C F A3145C R	CACTGCATACACTGCGAATGGGACACTGG CCAGTGTCCCATTGCGAGTGTATGCAGTG
T2007C/ T2008C F T2007C/ T2008C R	GATAAGAAAACGGAGGAATGCTGCCTCCTTGAAGACCGCATT GAATGCGGTCTTCAAGGAGGCAGCATTCTCCGTTTTCTTATC
K2003C/ E2006C F K2003C/ E2006C R	CCCTTCTCGCTGATAAGTGCACGGAGTGCACCACTCTCCTTG CAAGGAGAGTGGTGCACCTCCGTGCACTTATCAGCGAGAAGGG
T2007C/ D2012C F T2007C/ D2012C R	GAAAACGGAGGAATGCACTCTCCTTGAATGCCGATTCTC GAGAATGCGGCATTCAAGGAGAGTGCATTCTCCGTTTTTC
T2053C/ Q2057C F T2053C/ Q2057C R	CAATACATCTGGTCTAGAGTGCCGCGTTCATTGCGCAGAGAGG CCTCTCTGCGCAATGAACGCGGCACTCTAGACCAGATGTATTG

<sup>a</sup> La denominación de cada oligonucleótido incluye la abreviatura del aminoácido original a mutagenizar, su posición en la cápsida según el código utilizado por Lea *et al.*, (1994) (ver texto), el aminoácido introducido y la orientación del oligonucleótido sobre el molde (F, directa-*forward* o R, inversa-*reverse*).

### 3.5.2.2. PCR mutagénica

La mutagénesis dirigida de los residuos de la cápsida de VFA se llevó a cabo sobre el plásmido p3242/C-S8c1 mediante la técnica de PCR inversa utilizando un termociclador *PTC-150 MiniCycler* (MJ Research), parejas de oligonucleótidos mutagénicos y el kit *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). Se siguieron las instrucciones del fabricante, realizando una primera incubación de 30 s a 95 °C seguida de 14 ciclos compuestos por incubaciones de 30 s a 95 °C, 1 min a 55 °C y 14 min a 68 °C, y de una incubación final a 4 °C.

### 3.5.2.3. Transformación de células *E.coli* XL1-Blue

Los plásmidos p3242/C-S8c1 mutantes se utilizaron para transformar células *E.coli* XL1-Blue supercompetentes (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante, con ligeras modificaciones. Se empleó para el crecimiento de las células transformadas medio LB, en lugar de medio NZY<sup>+</sup>. La eficiencia del proceso de mutagénesis se determinó siguiendo las instrucciones del fabricante y resultó cercana al 90%. Las bacterias transformadas se sembraron sobre placas Petri con medio LB sólido conteniendo ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. El ADN plasmídico procedente de colonias aisladas, tras amplificación en medio líquido, fue extraído y purificado mediante el kit *Wizard SV Miniprep* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se estimó utilizando un pequeño volumen de muestra (1,5 µl) en un espectrofotómetro Nanodrop. La presencia de la mutación introducida y la ausencia de otras mutaciones se determinaron mediante secuenciación automática.

### 3.5.3. Subclonaje molecular

A continuación se procedió a introducir las mutaciones en el plásmido infeccioso mediante subclonaje en el plásmido defectivo pO<sub>1</sub>K/Δ2292. El segmento que portaba la mutación en el plásmido p3242/C-S8c1 se obtuvo mediante la digestión con *Afl* II y *Avr* II y se ligó con el vector de destino, pO<sub>1</sub>K/Δ2292, previamente digerido con las mismas enzimas para obtener un plásmido pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 que portaba la mutación deseada. Los plásmidos p3242/C-S8c1 mutantes se utilizaron para transformar células *E.coli* DH5α competentes. Para la transformación de células de *E.coli* competentes, aislamiento de colonias bacterianas y cultivos de bacterias se siguieron esencialmente los procedimientos descritos en Sambrook y Russell, (2001). El ADN plasmídico procedente de colonias individuales, tras amplificación en medio líquido, fue extraído y purificado mediante el kit *Wizard SV Miniprep* (Promega), y se cuantificó como se ha indicado en el apartado anterior. Una vez subclonado el segmento mutagenizado de 3242 p.n. en pO<sub>1</sub>K/C-S8c1, se confirmó la presencia de cada mutación sobre el plásmido pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 mutante obtenido. En ningún caso se encontraron mutaciones acompañantes.

## 3.6. Transcripción *in vitro* de ARN de VFA

Los plásmidos pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 mutantes y el control no mutado fueron linearizados mediante incubación con *Hpa*I, urificados y disueltos en agua estéril libre de nucleasas. Para la transcripción

del ARN infeccioso de VFA a partir de pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 linearizados se empleó el kit *Riboprobe in vitro Transcription System* (Promega). La mezcla de transcripción (40 µl) contenía 40 mM Hepes, pH=7,7, 6 mM acetato magnésico, 2 mM espermidina, 10 mM ditioneitol, 0,1 mg/ml BSA (New England Biolabs), 1 unidad/µl de RNAsina, 2,5 mM de cada ribonucleósido trifosfato (rATP, rUTP, rGTP, rCTP), 25 ng/µl de ADN linearizado y 0,5 unidades/µl de ARN polimerasa de SP6, y se incubó durante 2 h a 37°C. La concentración de ARN obtenida se estimó y ajustó mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. En general las concentraciones obtenidas fueron muy similares en todos los casos, y el ajuste necesario mínimo.

### **3.7. Electroporación de células eucarióticas con ARN de VFA**

Se utilizaron para cada experimento 2-4x10<sup>6</sup> células BHK-21c2 procedentes de placas P100 a una confluencia del 70-80%. Las células se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de electroporación. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (Bio-Rad; electrodos separados 0,4 cm), y se añadieron 3 µg de ARN de VFA parental o mutante. Para la transfección se utilizó un electroporador *Gene Pulser* (Bio-Rad), empleando dos pulsos consecutivos de 2 s cada uno a 280 V, 250 µF y 400 Ω. A continuación la suspensión de células se transfirió a una botella B75 (Nunc) que contenía 4 ml de medio DMEM+10% SF, y se incubó a 37 °C durante 4 h en una atmósfera con 7% de CO<sub>2</sub> y 98% de humedad. A las 4 h post-transfección se retiró el medio y se añadieron 2 ml de DMEM+2% SF. Los virus del sobrenadante de infección fueron recogidos a las 45 h, 55 h y 90 h post-transfección. En todos los casos las suspensiones de virus se clarificaron mediante centrifugación a 2.500 r.p.m. (630 g) durante 10 min en frío en una microfuga, para eliminar los posibles restos celulares, y se dividieron en alícuotas, que se almacenaron a -70 °C. Para los experimentos se utilizó el ARN recién transcrito sin congelar, o congelado. En cada experimento individual se utilizó como control positivo células electroporadas con una misma cantidad de ARN parental (obtenido a partir de la transcripción del vector pO1K/C-S8c1 original), y como control negativo células electroporadas en ausencia de ARN. Para el ARN control (no mutante) se observó e.c.p. generalizado de manera reproducible a las 40 h post-electroporación y títulos similares para la progenie obtenida.

### **3.8. Extracción de ARN de VFA y amplificación de fragmentos para secuenciación**

Para su secuenciación, el ARN genómico de VFA fue extraído de viriones procedentes de sobrenadantes de infección de monocapas celulares. Se empleó un volumen de sobrenadante de 150 µl a los que se añadieron 400 µl de Trizol (Invitrogen), y la mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de cloroformo (Merck), y la mezcla se agitó abundantemente y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Tras una centrifugación a 12.000 r.p.m. (14.800 g) durante 5 min a temperatura ambiente en microfuga se tomó la fase acuosa y se añadió sobre 1 µl del reactivo *see-DNA* (Amersham Biosciences). A continuación se añadieron sobre la mezcla 250 µl de isopropanol (Merck) y se precipitó el ácido nucleico durante 1 h a -70 °C. Finalmente, el ARN se resuspendió en 20 µl de agua estéril libre de nucleasas y se almacenó a -70 °C para su posterior uso.

El ARN viral extraído de sobrenadantes de infección se utilizó en reacciones de transcripción inversa, empleando la retrotranscriptasa AMV-RT del virus de la mieloblastosis aviar (Roche), acopladas a reacciones de amplificación mediante PCR del ADNc obtenido, utilizando las ADN polimerasas de *Thermophylus aquaticus* (Taq, Perkin Elmer) o Expand high fidelity (EHF, Roche). Se siguieron las instrucciones de los fabricantes. Típicamente, la mezcla de reacción (50  $\mu$ l) contenía 1-4  $\mu$ l de solución de ARN vírico obtenida como se ha descrito en el apartado anterior, 100 ng de cada oligonucleótido iniciador, 5  $\mu$ l de tampón de reacción 10X para Taq polimerasa, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM de cada desoxinucleósido trifosfato (dNTP: dATP, dTTP, dGTP y dCTP; Gibco BRL), 0,25  $\mu$ l (10 unidades) de RNasina (Promega), 0,25  $\mu$ l (6,25 unidades) de AMV-RT, 0,25  $\mu$ l de Taq ADN polimerasa (1,25 unidades). En el caso de utilizar la enzima EHF la reacción se hizo de la misma manera excepto en que de la ADN polimerasa se añadieron 0,87 unidades, la concentración de cada dNTP fue de 0,2mM y se añadieron 12 unidades de RNasina. En el caso de usar la Taq polimerasa la incubación se realizó durante 30 min a 42 °C, seguida de 2 min a 94 °C, 30 ciclos compuestos por incubaciones de: 20s a 94 °C, 20s a la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos (65 °C) y 2min (1min por cada 1.000 p.n. de producto amplificado) a 72 °C, para terminar con 3min de elongación final a 72°C. En el caso de usar la EHF polimerasa la incubación se realizó durante 60 min a 42 °C, seguida de 2 min a 95 °C, 30 ciclos compuestos por incubaciones de: 30s a 95 °C, 1min a 65 °C y 3,30 min a 68 °C, para terminar con 10 min a 72°C. Los productos de RT-PCR obtenidos fueron purificados para eliminar el exceso de oligonucleótidos y nucleótidos mediante el kit *Montage PCR* (Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se cuantificó como se ha descrito en la sección 5.2 y/o mediante electroforesis en geles de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio, y se envió para su secuenciación.

### 3.9. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cabo en i) el Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid/ Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid. Se empleó el kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Abi Prism, Perkin Elmer) y los secuenciadores ABI377, ABI PRISM 3700 y ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems). ii) en la empresa Macrogen (Corea del Sur). El análisis de las secuencias se llevó a cabo con el paquete informático *DNA Star 4.0* (Lasergene).

Tanto para las mutaciones introducidas sobre el plásmido p3242/C-S8c1, como para los segmentos mutagenizados de 3242 p.n. subclonados en el plásmido infeccioso pO<sub>1</sub>K/C-S8c1, se confirmó la presencia de cada una de las mutaciones en los respectivos plásmidos utilizando el oligonucleótido apropiado en cada caso, como se indica en la **Tabla 2**.

En los casos indicados en Resultados, se secuenciaron parcial o totalmente las cápsidas de poblaciones de virus progenie. Para ello se extrajo el ARN genómico de los virus, se amplificó mediante una RT-PCR la región de interés como se ha descrito en el apartado anterior, y se secuenció la misma con el oligonucleótido apropiado. Para su amplificación la región de la cápsida se dividió en dos partes, para cada una de las cuales se empleó una pareja de oligonucleótidos iniciadores distinta. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación y posterior determinación de secuencias de la cápsida de VFA se indican en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación y secuenciación de segmentos genómicos de VFA.**

Objeto	Región genómica <sup>a</sup>	Oligonucleótido			
		Nombre	Secuencia (5'→3')	Posición <sup>b</sup>	Orientación <sup>c</sup>
Amplificac. cápsida	Proteasa L	LR2bis	GGACGGGAACACGCTGTCT	1471	s
		<sup>a</sup> VP3	3D1bis	GCCGGCCAAGTAGGT	2826
	<sup>a</sup> VP3	3R1EcoR1 new	CACGAACTGACGGGCAAAGGCTACTGG	2744	s
		2C	2CD1bis	CTCTTCTGAGGCGATCCAAGC	4458
Secuenciación cápsida	Proteasa L	4D1new	TTGTTCTGGGTGTTGGTTGTGTG	1835	a
		<sup>a</sup> VP3	2R2new	GATGGGCGACATCAGTGACAGGG	2280
	<sup>a</sup> VP3	JH2	GGGTTGATGAACTGGTGGGG	2345	a
		3R3	AGGCTGCCCACTTGCATACACGCAG	2960	s
		G1	GTTTCAGCCTCGTGGGACGC	3077	a
		2C	1R1L	ACACCGTGTGTTGGCTACGGCG	3572

<sup>a</sup> Región del genoma donde hibrida el oligonucleótido (ver Figura 1).

<sup>b</sup> Orientación del oligonucleótido iniciador: s ("sentido"), misma polaridad que el ARN genómico; a ("antisentido"), polaridad inversa.

<sup>c</sup> Posición en el genoma del VFA del nucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido. La numeración es la seguida por Escarmís *et al.*, (1999)

### 3.10. Purificación y marcaje radiactivo con <sup>35</sup>S de viriones de VFA

Se infectaron con VFA aproximadamente 1,2x10<sup>8</sup> células BHK-21c2 crecidas en cuatro botellas B175 (Nunc), a una multiplicidad de infección (m.d.i.) de 3. A las 2 h post-infección se retiró el medio DMEM y se añadió medio DMEM deficiente en Met y Cys suplementado con 5% SF. Se incubó 1h más y se añadieron 1,87 mCi de la mezcla radiactiva de L-(<sup>35</sup>S) Met/Cys (Redivue Pro-mix, Amersham Biosciences). Se recogieron los sobrenadantes y las células cuando se observó e.c.p. completo, y se almacenaron a -70 °C para la posterior purificación de viriones.

Los viriones se purificaron como sigue: Los extractos derivados de las infecciones se centrifugaron a 2.500rpm (1.130 g) durante 10 min. a 4°C en centrifuga de mesa *Rotina 46R* (Hettich). Se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 9.000rpm (3.850g) durante 20 min. a 4°C en un rotor SS34 usando una centrifuga RC5 (Sorvall). El sobrenadante se sometió a ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa al 20% en tampón TNE (50 mM Tris HCl pH 7,5; 5mM EDTA; 0,1 M NaCl) a 25.000rpm (81.300 g) durante 2,5h a 4°C en ultracentrifuga (Beckman) en un rotor AH-627. El sedimento se resuspendió extensivamente en TNE y se centrifugó a 12.000rpm (14.800g), 10min, y 4°C en microfuga (Hettich). El sobrenadante resultante se sometió a ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa del 7,5% al 30% en TNE a 37.000rpm (180.000g) durante 1h. a 4°C en ultracentrifuga (Beckman) en un rotor SW40 como se ha descrito (Díez *et al.*, 1990). El gradiente se fraccionó en alícuotas de 0,5 ml y la radiactividad contenida en cada una se determinó utilizando diluciones 1/28 en líquido de centelleo OptiPhase "Hisafe" 2 (Wallac) y un contador de centelleo

líquido 1219 Rackbeta (Wallac). Las fracciones que contenían viriones (coeficiente de sedimentación 140 S), se mezclaron y se dializaron extensivamente frente a PBS. Se estimó la concentración y pureza de la preparación mediante espectrofotometría UV entre 260 y 360 nm de una dilución 1/5 en PBS de la preparación del virus purificado. Una unidad de densidad óptica a 260nm corresponde aproximadamente a una concentración de 0,13 mg/ml de VFA purificado. El grado de pureza se estimó mediante determinación de la relación A260/A280, que para el VFA puro es aproximadamente de 1. Se determinó asimismo la actividad específica de la preparación, en cuentas por minuto (c.p.m.) por  $\mu\text{g}$  de virus.

### **3.11. Electroforesis e inmunoelectrotransferencia de proteínas de la cápsida de VFA**

Se siguió, con algunas modificaciones, el protocolo empleado por Díez *et al.* (1990). Primeramente se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 11%, urea 8 M y dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) a partir de virus purificado como se ha descrito en el apartado anterior pero no radiactivo. Se utilizaron tanto condiciones reductoras como no reductoras (presencia o ausencia de 2-mercaptoetanol, respectivamente). A continuación las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Trans Blot Transfer Medium, BioRad) a 225 mA durante 2 h a 4°C en una cubeta mini-PROTEAN Trans-Blot cell (BioRad). Una vez realizada la transferencia se bloqueó la membrana con PBS-BSA al 3% mediante una incubación de 2h a o/n con agitación. A continuación se incubó la membrana durante 2 horas con anticuerpos monoclonales (Mabs) que reconocen la proteína VP3 (6C2 ó 6C3) o la proteína VP2 (6F2 ó 4A3) de VFA (Mateu *et al.*, 1990), diluidos 1/500-1/200, (dependiendo del anticuerpo), en PBS-BSA 1%. Se realizaron dos lavados de 15 min con PBS-Tween 20 (Sigma) 0,05%. Posteriormente se incubó 1 hora con un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa (Biorad) diluido 1/5.000 en PBS-Tween 0,2%. Se realizaron dos lavados de 30 min con PBS-Tween 20 0,05%. Finalmente se reveló con 4-cloro-1-naftol (Sigma) al 0.05% diluido en metanol (Merck) al 20% y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,015% en PBS.

### **3.12. Determinación de la resistencia de viriones de VFA a su inactivación térmica**

En estos ensayos se determinó la cinética de reducción de la infectividad de viriones de VFA mediante la acción del calor, a temperatura constante. Se utilizaron sobrenadantes procedentes de la transfección con ARN viral, o de infecciones. Se realizaron dos tipos de cinéticas:

#### **3.12.1. Cinética de poblaciones con un título inicial de 1000 PFU/ml**

Los sobrenadantes de infección se diluyeron en medio DMEM+2% SF hasta un título aproximado de 1.000 unidades formadoras de placa (PFU) por ml. Se transfirieron a tubos eppendorff

de 1,5 ml alícuotas de 200 µl de dicha dilución de virus, y los tubos se sometieron a calentamiento a temperatura constante (42 °C si no se indica lo contrario) durante distintos intervalos de tiempo. Tras el calentamiento, cada tubo se transfirió inmediatamente a un recipiente con hielo. Posteriormente se añadieron otros 100µl de medio de dilución y las suspensiones de virus remanentes se plaquearon por duplicado en placas P60 (100 µl en cada una) para determinar el título de virus remanentes tras cada uno de los tiempos de incubación.

### **3.12.2. Cinética de poblaciones con un título inicial elevado**

Se partió directamente de los sobrenadantes de infección sin diluir conteniendo una población viral inicial de título elevado (en general cercano a  $10^8$  PFU/ ml). Se sometió un volumen de 1 ml a calentamiento a temperatura constante (42°C si no se indica lo contrario), se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, y se determinó mediante dilución posterior y plaqueo el título de virus remanentes tras cada uno de los tiempos de incubación (Bachrach, 1960).

En ambos tipos de ensayos, además del virus estudiado, siempre se ensayó en paralelo el virus C-S8c1, como control positivo y para normalizar los resultados obtenidos en distintos experimentos.

### **3.12.3. Determinación de las constantes cinéticas de inactivación térmica**

Los datos experimentales obtenidos en los ensayos descritos en 3.12.1. o 3.12.2. se ajustaron a curvas de decaimiento exponencial de primer orden mediante el programa Kaleidagraph (Abelbeck Software), como se ha descrito previamente (Mateo *et al.*, 2003; Mateo, 2004), utilizando la ecuación:

$$C=C_0 e^{-kt} + A$$

donde C es el título viral a tiempo t y  $C_0$  el título viral cuando  $t=0$ ; k es la constante cinética de disociación; y A es el título viral a tiempo infinito. Cuando se indica en el texto, este último parámetro se fijó a cero ( $A=0$ ) dado que, a tiempo infinito, la reacción irreversible de disociación de los viriones en cápsidas acabaría por inactivar el virus completamente.

## **3.13. Determinación de la resistencia de viriones de VFA a su disociación térmica en subunidades pentaméricas**

Se realizaron cinéticas de disociación térmica de viriones en pentámeros mediante la determinación directa de la cantidad de viriones remanentes a diferentes tiempos de incubación a temperatura constante, como se ha descrito previamente (Mateo *et al.*, 2003; Mateo, 2004). Se tomaron alícuotas de 50µl de virus marcado radiactivamente con  $^{35}\text{S}$  y purificado (ver apartado 3.10), y se incubaron durante diferentes intervalos de tiempo a una misma temperatura (4 °C, 42 °C, ó 50 °C, dependiendo del experimento). Inmediatamente tras la incubación cada alícuota se transfirió a un

recipiente con hielo. Las diferentes alícuotas se sometieron a centrifugación en gradientes de sacarosa del 7,5% al 45% en tampón TNE. Los gradientes se centrifugaron a 4° C en un rotor SW40 (Beckman) a 18.000 r.p.m. (41.500 g) durante 18 h, y se fraccionaron en alícuotas de 0,5 ml. Para cada tiempo se obtuvo el perfil de radiactividad en función del coeficiente de sedimentación, determinando la radiactividad de cada una de las fracciones como se ha descrito en el apartado 3.10. A partir de este perfil, se calculó el porcentaje de viriones remanentes a cada tiempo de incubación como la relación entre la radiactividad asociada al pico de viriones (coeficiente de sedimentación 140S) a ese tiempo y la correspondiente al tiempo cero. Los valores obtenidos se representaron en función del tiempo de inactivación.

### **3.14. Ensayos de eficacia biológica de variantes de VFA**

Para los virus, se ha definido la eficacia biológica como la capacidad para producir progenie infecciosa en un determinado ambiente (Holland *et al.*, 1991; Domingo y Holland, 1997; Domingo *et al.*, 2003). Esta definición experimental permite establecer valores de eficacias biológicas relativas en un contexto definido mediante experimentos de competición empleando mezclas de virus que se distinguen fenotípica o genotípicamente. Con el objeto de determinar la eficacia biológica relativa de distintas variantes de VFA con respecto a un virus de referencia (generalmente el virus parental, C-S8c1), se realizaron ensayos de competición entre el variante y el virus de referencia como se ha descrito previamente (Domingo y Holland, 1997; Domingo *et al.*, 1999). Para ello, se determinó el título de suspensiones de cada uno de los virus, y en función del título se realizó una mezcla a partes iguales de ambos virus. Se utilizaron  $6 \cdot 10^5$  PFU de cada uno de ellos en un volumen total de 800  $\mu$ l en medio DMEM. Se tomaron 400  $\mu$ l de esa mezcla para infectar dos monocapas de células BHK crecidas en sendas botellas B25 (Nunc) hasta confluencia ( $3 \cdot 10^6$  células) con 200  $\mu$ l cada una, a una m.d.i. de 0,1. Los 400  $\mu$ l restantes se congelaron a -20°C (pase 0) para la posterior extracción del ARN viral y su secuenciación. Después de 1h de adsorción del inoculo a 37°C, este se retiró y se añadieron 2,4ml de DMEM fresco suplementado con 2% SF. Una vez alcanzado un e.c.p. completo se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 2.500 r.p.m, 10min, y 4°C en una centrifuga de mesa *Rotina 46R (Hettich)* para eliminar las células. Del sobrenadante clarificado se realizó una dilución 1/10 tomando 80  $\mu$ l a los que se añadieron 720  $\mu$ l de DMEM. De estos 800  $\mu$ l de nuevo se tomaron 400  $\mu$ l para infectar otras dos botellas B25 con 200  $\mu$ l cada una, y los otros 400  $\mu$ l se congelaron a -20° C (pase 1). De esta forma se realizaron varios pases seriados (de 4 a 8 dependiendo del ensayo), siempre por duplicado. Una vez extraído el ARN viral de las poblaciones obtenidas en cada uno de los pases, éste se sometió a transcripción reversa y amplificación mediante una PCR-reversa (como previamente se ha explicado en el apartado 9) y se secuenció el ADN resultante.

El cromatograma resultante de la secuenciación permitió estimar el grado de dominancia de cada uno de los dos virus competidores en el pase considerado y también si otras mutaciones se habían fijado en una proporción detectable en el ARN vírico durante la replicación. En general se secuenció parcialmente la cápsida en la zona en donde se encontraba la variación entre ambos

genomas. Los porcentajes aproximados de cada uno de los genomas competidores y de cualquier otra mutación que pudiese haber surgido durante la replicación, se estimaron mediante densitometría de los picos solapantes del cromatograma situados en la posición en donde se encontraban dichas mutaciones. La relación entre los genomas mutados y los no mutados en la posición correspondiente se calculó integrando las áreas debajo de los picos solapantes correspondientes a los nucleótidos presentes en el virus variante y en el virus no mutado respectivamente. Finalmente para seguir la evolución de la población, esta relación se representó en función del número de pases.

### **3.15. Análisis estructural de cápsidas víricas y modelado molecular**

Para el análisis estructural de la cápsida de VFA se utilizaron las coordenadas atómicas depositadas en el banco de datos *Protein Data Bank* (PDB) para los virus C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994), O<sub>1</sub>BFS (Acharya *et al.*, 1989; Fry *et al.*, 1999) y A22 (Curry *et al.*, 1996). Las estructuras cristalográficas, residuos aminoacídicos y contactos entre residuos se inspeccionaron, manipularon y analizaron en ordenadores personales y un ordenador gráfico O2 (Silicon Graphics) utilizando principalmente los programas *InsightII* (Biosym Technologies) y *RasMol* (Sayle y Milner-White, 1995). Los parámetros estructurales (número, naturaleza y parámetros de las interacciones entre átomos y residuos, accesibilidad al solvente de residuos, etc.) se analizaron utilizando el programa *Whatif* (Vriend, 1990). La mutagénesis virtual de residuos se realizó asimismo mediante los programas *Whatif* o *SwissPDBViewer* (Guex y Peitsch, 1997; <http://www.expasy.org/spdbv/>).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Análisis de la presencia de variantes termoestables en diferentes poblaciones de VFA**

#### **4.1.1. Elección de poblaciones de VFA para intentar el aislamiento e identificación de variantes de mayor resistencia frente a la inactivación térmica**

En nuestro laboratorio el Dr. R. Mateo había realizado intentos preliminares para tratar de aislar variantes resistentes a la inactivación térmica a partir de una población vírica derivada de un clon molecular de VFA. En estos intentos se sometió la población a varios ciclos de calentamiento a 55°C, cada uno de ellos seguido por la amplificación de la población de virus en cultivos celulares. La resistencia a la inactivación térmica de las poblaciones obtenidas en series duplicadas se comparó con la de la población inicial mediante ensayos cinéticos de reducción de infectividad, realizados como se indica en el apartado 3.12.1. En ninguna de las series se detectó un aumento significativo en la termoestabilidad media de la población, incluso en aquellos casos en los que la población de viriones remanentes tras cada ciclo de calentamiento fue del orden de solamente un 0,001% de la inicial. Tampoco pudieron obtenerse variantes termoestables mediante el aislamiento de un número elevado de clones biológicos a partir de esas poblaciones (Mateo, 2004). El resultado anterior sugería que la población analizada contenía muy pocos o ningún variante termoestable. Con el objeto de decidir si, de modo general, pueden o no encontrarse con cierta frecuencia variantes resistentes a la inactivación térmica en diferentes poblaciones de VFA, hemos analizado las siguientes poblaciones de este virus:

1- Una segunda población derivada del mismo clon molecular de VFA mediante amplificación en dos pases seriados en cultivos celulares. Estos experimentos eran necesarios para evaluar la reproducibilidad del resultado en poblaciones obtenidas mediante eventos de selección independientes.

2- Una población no clonal proveniente de amplificación en un número muy limitado de pases del aislado natural, C-S8, no sometido a clonaje molecular ni biológico. Estos experimentos se realizaron para establecer si podían encontrarse variantes termoestables en una población natural más heterogénea. Esta población no había estado sometida al cuello de botella que implica un clonaje molecular o biológico en el laboratorio, y por tanto constituye, probablemente, una cuasiespecie más diversa.

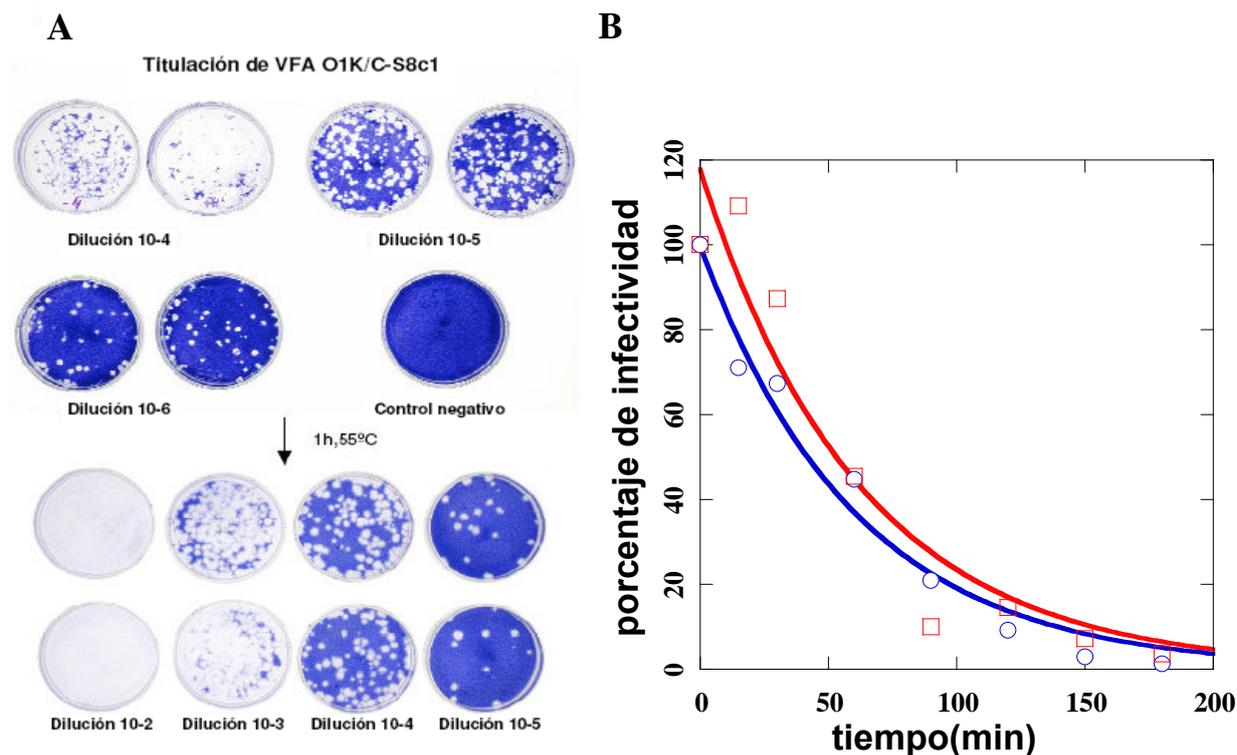
3- Dos poblaciones no clonales provenientes de la amplificación limitada de los aislados naturales A<sub>5</sub>Westerwald (A<sub>5</sub>WW) y O<sub>1</sub>Kaufbeuren (O<sub>1</sub>K), pertenecientes respectivamente a los serotipos A y O. Estos experimentos se realizaron para estudiar si lo observado con un aislado del serotipo C, ocurría igualmente con otros aislados y serotipos y por tanto podía generalizarse, en alguna medida, a poblaciones naturales de VFA.

4- Finalmente, tres poblaciones derivadas del clon biológico C-S8c1, pero sometidas a una considerable amplificación en condiciones de laboratorio diversas, mediante un elevado número de pases en cultivos de células BHK-21 en infecciones citolíticas o persistentes. Estos experimentos se realizaron para analizar la posibilidad de que en la plena adaptación a infecciones en condiciones de laboratorio, o a infección persistente, pudiera aumentar la frecuencia de variantes termoestables en la población, como se argumenta más extensamente en la Discusión.

#### **4.1.2. Determinación de las condiciones del ensayo de resistencia a la inactivación térmica**

El abordaje experimental que seguimos para tratar de obtener viriones de VFA de mayor resistencia a la inactivación térmica consistió en: i) someter las poblaciones víricas elegidas a la acción del calor en condiciones en las que se inactivaban la gran mayoría de los viriones presentes, con el objeto de inactivar todos aquellos que no presentaran una relativamente elevada termoresistencia; ii) amplificar los viriones supervivientes en cultivos celulares; iii) en su caso, repetir los pasos i) y ii) varias veces para enriquecer la población en variantes de mayor termoresistencia. Para determinar las condiciones de inactivación adecuadas y confirmar datos preliminares obtenidos en el laboratorio se realizaron ensayos preliminares de inactivación de la población de referencia (virus quimera O<sub>1</sub>K/C-S8c1, ver apartado 3.1.) a diferentes temperaturas y tiempos, y se titularon las poblaciones tras el proceso. El calentamiento a 60-70° C durante 60 min., generalmente no permitió recuperar viriones infecciosos (título por debajo del umbral de detección, que era de 50 unidades formadoras de placa (PFU) por ml. En cambio, el calentamiento entre 50°C y 59°C durante 60 minutos condujo a reducciones muy importantes en el título (entre 2 y 5 ordenes de magnitud), sin que se llegaran a inactivar todos los viriones. En la **Figura 6A** se muestra, a modo de ejemplo, el resultado de la titulación de la población de referencia antes y después de un paso de calentamiento a 55°C durante 60 min., en el que se inactivaron aproximadamente el 99 % de los viriones. Por lo tanto, decidimos que el calentamiento a una temperatura entre 50°C y 59°C durante 60 minutos sería el más adecuado para conseguir un importante enriquecimiento en variantes que poseyeran una resistencia térmica significativamente elevada, caso de que tales variantes estuvieran presentes en las poblaciones originales.

Para determinar el grado de resistencia a la inactivación de las poblaciones de VFA sometidas a calentamiento se realizaron cinéticas de inactivación de infectividad a temperatura constante (42°C) partiendo de una población inicial de 100 PFU como se indica en el apartado 3.12.1. Como control interno, en cada ensayo se repitió la cinética de inactivación térmica de la población de referencia, el virus O<sub>1</sub>K/C-S8c1, para la que se había determinado previamente en nuestro laboratorio el valor de la constante de inactivación a 42°C (Mateo *et al.*, 2003; Mateo, 2004). A partir de las correspondientes cinéticas, se calcularon las constantes de inactivación, tal y como se indica en el apartado 3.12.3. A título de ejemplo, en la **Figura 6B** se muestran las cinéticas de inactivación térmica de la población de referencia, el virus O<sub>1</sub>K/C-S8c1, antes y después de un tratamiento térmico a 55°C durante 60 min. Puede observarse que las curvas de reducción de infectividad y las constantes cinéticas obtenidas de ellas (**Tabla 3**) no son significativamente diferentes, lo que confirma los resultados previos de nuestro laboratorio obtenidos con la misma población de VFA (Mateo 2004).



**Figura 6. Inactivación térmica de poblaciones de VFA.** **A:** Titulación de una población de VFA O<sub>1</sub>K/C-S8c1 antes (parte superior) y después (parte inferior) de ser calentado 1 hora a 55°C. **B:** Cinética de inactivación térmica a 42°C de VFA O<sub>1</sub>K/C-S8c1. Círculos: población no calentada; cuadrados: población calentada 1 hora a 59°C. Las cinéticas de inactivación se obtuvieron partiendo del virus diluido a 100PFU como se indica en el apartado 3.12.1. y la caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden que tienden a 0 a tiempo infinito, como se indica en el apartado 13.12.3. Los datos se han normalizado y se indican como porcentaje de la infectividad presente a tiempo 0.

**Tabla 3. Estabilidad térmica de distintas poblaciones de VFA**

Tipo de población VFA	Virus <sup>a</sup>	Temp. (°C)	Reducción del título <sup>b</sup> (log)	$k$ (min <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>			Tasa relativa de inactivación (no calentada/calentada) <sup>e</sup>
				No calentada	Calentada	Control <sup>d</sup>	
Control	O1K/C-S8c1	55	2,0	0,016 ± 0,002	0,016 ± 0,003	NP	1,02
			4,6	0,025 ± 0,004	0,025 ± 0,004	0,019	1,00
	C-S8	59	2,95	0,025 ± 0,002	0,022 ± 0,004	0,018	1,16
Población natural	A5Ww	59	3,01	0,030 ± 0,002	0,033 ± 0,005	0,02	0,93
			2,7	0,019 ± 0,002	0,018 ± 0,002	0,012	1,05
	O1K	59	2,6	0,023 ± 0,002	0,028 ± 0,002	0,019	0,82
			55	2,52	0,045 ± 0,001	0,041 ± 0,003	0,023
R100	60	3,67	0,029 ± 0,005	0,029 ± 0,003	0,021	1,01	
Población adaptada a cultivos	C-S8c1 p51	59	3,52	0,036 ± 0,002	0,041 ± 0,006	0,03	0,88
	CS8c1 p114	59	3	0,037 ± 0,002	0,035 ± 0,004	0,023	1,05

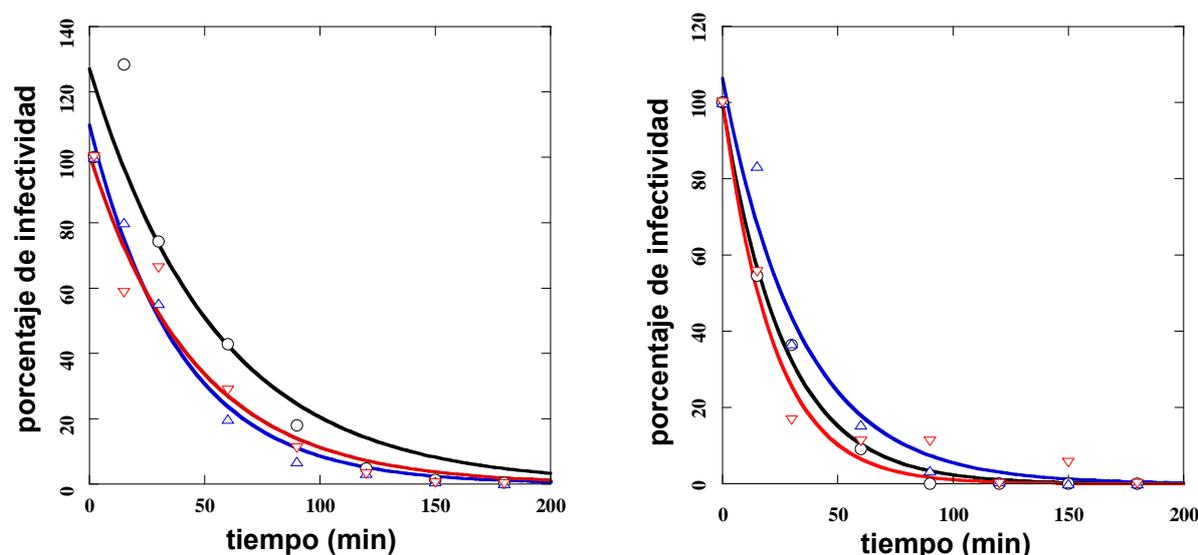
- <sup>a</sup> Para algunas poblaciones de virus se realizaron dos experimentos cuyos resultados se indican separadamente.
- <sup>b</sup> La reducción del título se indica como la diferencia entre los log de los títulos obtenidos antes y después del calentamiento a la temperatura indicada.
- <sup>c</sup> Constantes de inactivación térmica  $k$  a 42°C, obtenidas en ensayos realizados como se indica en el apartado 3.12.1. y ajustadas a curvas de decaimiento exponencial de primer orden que tienden a 0 a tiempo infinito, como se indica en el apartado 3.12.3.
- <sup>d</sup> En cada experimento se utilizó la misma población del virus O<sub>1</sub>K/C-S8c1 como control interno, para permitir la comparación entre experimentos.
- <sup>e</sup> Razón entre las constantes obtenidas para una misma población antes y después de ser calentada.

Una vez puestas a punto las condiciones de ensayo, se realizaron experimentos de selección por calor con cada una de las diferentes poblaciones enumeradas en el apartado 4.1.1., como se irá describiendo a continuación.

### 4.1.3. Análisis de la presencia de variantes termoestables en poblaciones naturales de VFA C-S8 (serotipo C)

La virtual ausencia de mutantes termoestables en la población previamente analizada (Mateo, 2004, Mateo *et al.*, 2007) podría ser debida a una baja heterogeneidad en la población utilizada. Por ello, se analizó una población obtenida a partir del aislado natural C-S8 y sometida a un número de pases en cultivo muy limitado (C-S8nc 27.4.82); esta población natural, no sometida a ninguna etapa de clonaje, debería presentar una heterogeneidad genética mayor.

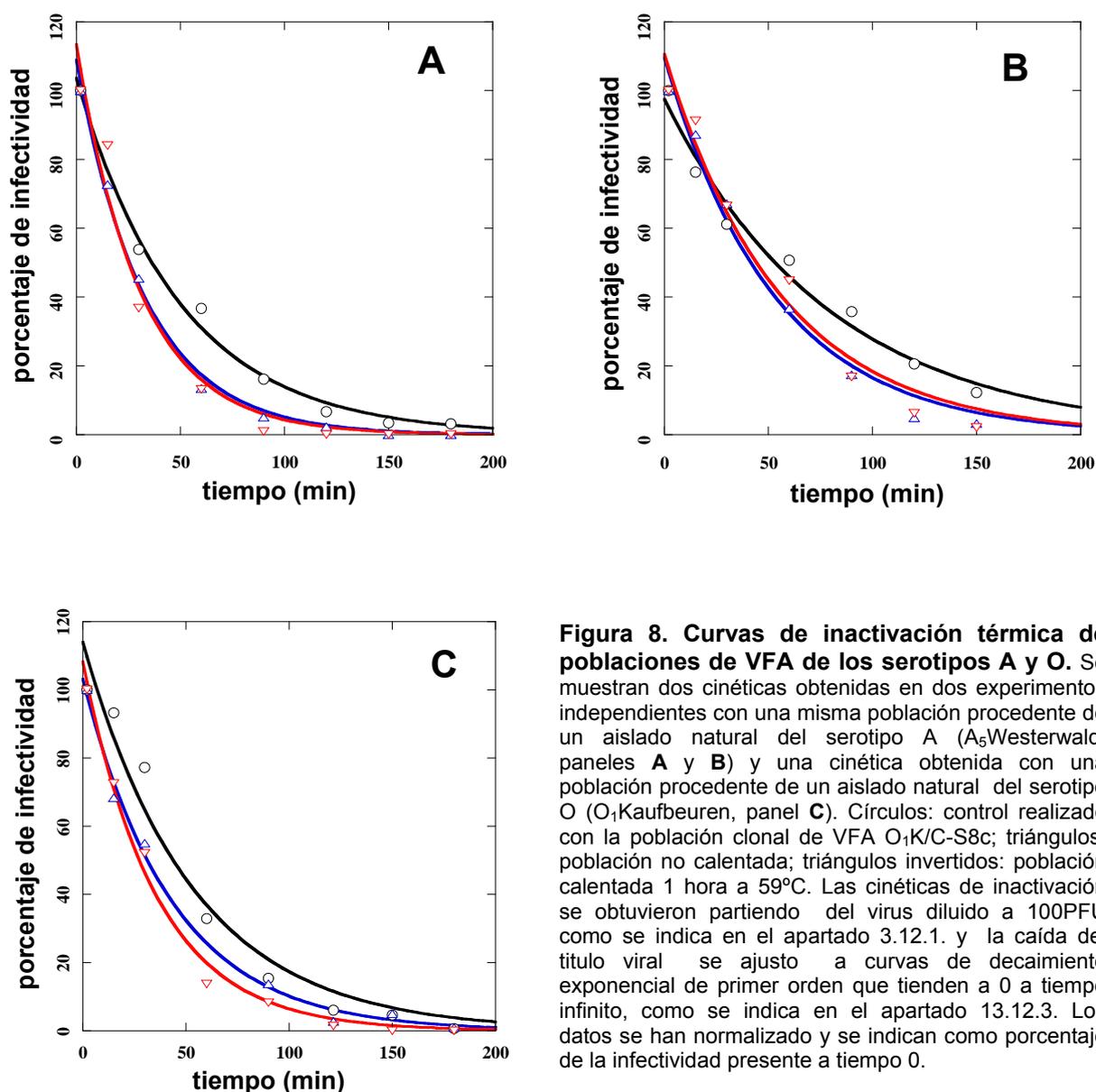
El calentamiento a 59°C durante 60 min de la población produjo una reducción de título de 3 y 5 ordenes de magnitud en dos experimentos independientes respectivamente. A continuación se compararon las cinéticas de inactivación térmica a 42°C de la población calentada con las de las correspondientes de la población sin calentar en ambos experimentos (**Figura 7**). No se encontró una disminución significativa en las constantes de inactivación térmica en ninguno de los dos casos (**Tabla 3**)



**Figura 7. Curvas de inactivación térmica de una población no clonal de VFA del serotipo C.** Se muestran dos experimentos independientes realizados con una misma población no clonal procedente del aislado natural C-S8 (C-S8nc 27.4.82). Círculos: control realizado con la población clonal de VFA O<sub>1</sub>K/C-S8c; triángulos: población no clonal sin calentar; triángulos invertidos: población no clonal calentada 1 hora a 59°C. Las cinéticas de inactivación se obtuvieron partiendo del virus diluido a 100PFU como se indica en el apartado 3.12.1. y la caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden que tienden a 0 a tiempo infinito, como se indica en el apartado 13.12.3. Los datos se han normalizado y se indican como porcentaje de la infectividad presente a tiempo 0.

#### 4.1.4. Análisis de la presencia de variantes termoestables en poblaciones naturales de VFA de serotipos A y O

Los resultados anteriormente descritos indican que, al menos en poblaciones heterogéneas derivadas de un aislado natural de VFA de serotipo C, los variantes de elevada resistencia a la inactivación térmica ocurren en proporciones bajas o no se encuentran presentes. Para averiguar si esto ocurría con otras cepas y serotipos de VFA, se sometieron al mismo tratamiento de inactivación por calor poblaciones derivadas de los aislados naturales A<sub>5</sub>WW (serotipo A) y O<sub>1</sub>K (serotipo O), y se compararon las correspondientes cinéticas de inactivación con las de las poblaciones correspondientes no calentadas (**Figura 8**). Como había sucedido con C-S8, las constantes de inactivación térmica que rindieron estas poblaciones antes y después de ser sometidas a calentamiento no presentaron una diferencia significativa (**Tabla 3**).



#### 4.1.5. Análisis de la presencia de variantes termoestables en poblaciones de VFA CS-8 adaptadas a cultivos

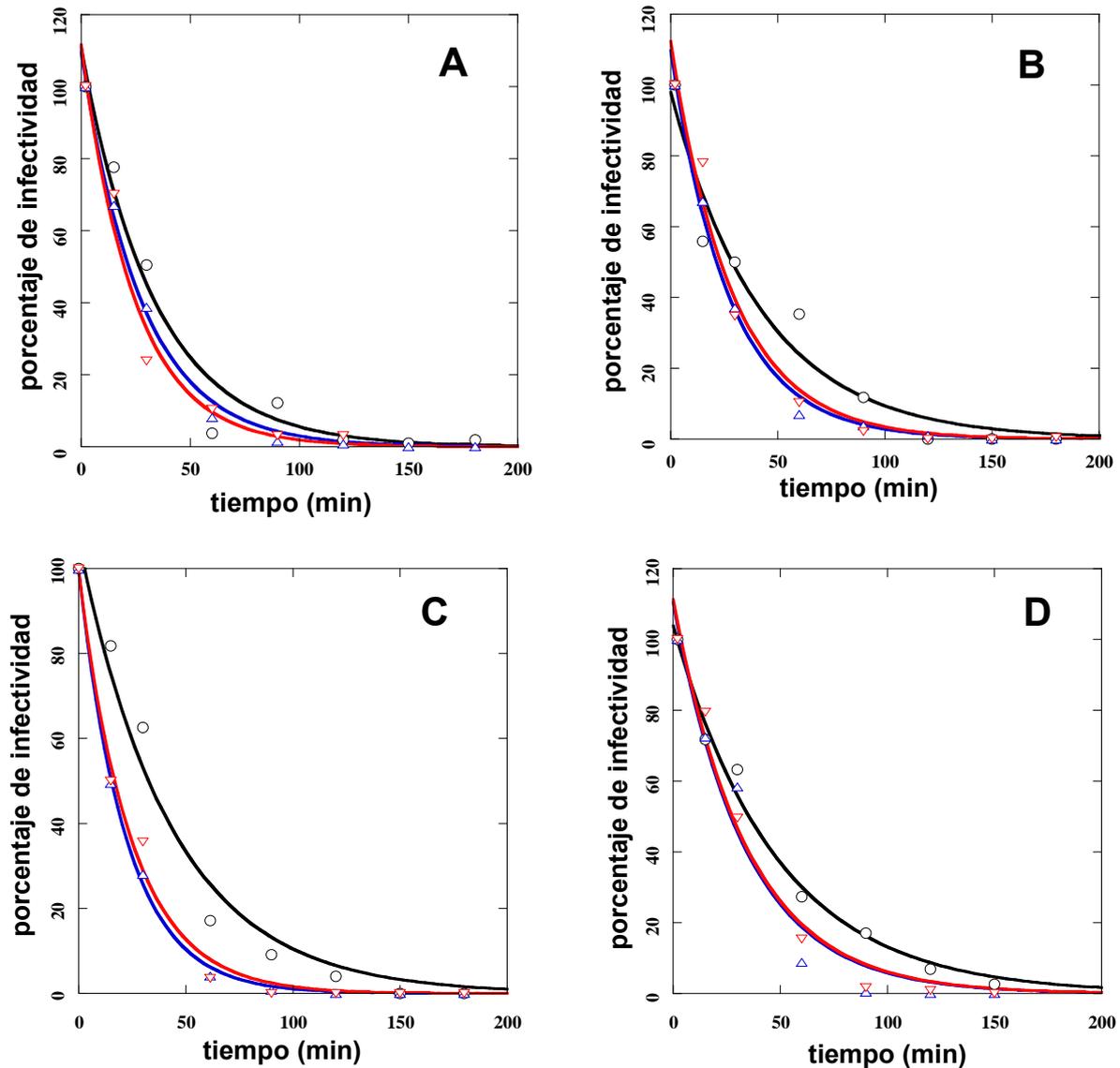
En contraste con estos resultados obtenidos con poblaciones naturales de VFA pasadas un escaso número de veces en cultivos, estudios pioneros de variación fenotípica realizados hace mucho tiempo por otro grupo habían puesto de manifiesto que la termoresistencia de una población de VFA del serotipo A derivada de la cepa 119 y pasada un elevado número de veces en el laboratorio (76 pases), podía ser significativamente incrementada tras ser sometida a sólo un ciclo de calentamiento y amplificación, y aún más incrementada en muy pocos ciclos sucesivos (Bachrach *et al.*, 1960). Por ello, consideramos la posibilidad de que la presencia de variantes termoestables en la población estuviera relacionada con la adaptación del virus a la infección en cultivos celulares *ex vivo*, en condiciones de laboratorio y sobre células que no son los hospedadores naturales de VFA. Se estudiaron tres poblaciones de VFA derivadas del aislado C-S8c1 que habían sido sometidas a un elevado número de pases en cultivos: i) R100, una población de VFA obtenida de células BHK-21 persistentemente infectadas y pasadas 100 veces en cultivo (Díez *et al.*, 1990); ii) C-S8c1p51 y C-S8c1p114, que son poblaciones de VFA obtenidas tras someter C-S8c1 a 51 y 114 pases citolíticos sucesivos en células BHK-21 (García-Arriaza *et al.*, 2004). Estas tres poblaciones se sometieron al mismo tratamiento de inactivación por calor a 59°C (C-S8c1p51 y C-S8c1p114) o 60°C (R100) durante 60 min y se compararon las cinéticas de inactivación térmica a 42°C de las poblaciones calentadas con las de las correspondientes poblaciones no calentadas (**Figura 9**). Al igual que ocurrió para las poblaciones no pasadas extensivamente en cultivos celulares, las constantes de inactivación térmica de estas tres poblaciones antes y después de ser sometidas a calentamiento no presentaron una diferencia significativa (**Tabla 3**).

Sin embargo, un hecho a destacar es que las constantes de inactivación térmica que rindieron las poblaciones sometidas a numerosos pases en cultivos celulares antes de ser sometidas a calentamiento son todas significativamente mayores que las obtenidas para las poblaciones derivadas de aislados naturales estudiadas previamente (**Tabla 4**), lo cual sugiere que la adaptación a cultivos puede implicar una reducción en la termoestabilidad de las poblaciones VFA (ver Discusión).

**Tabla 4. Estabilidad relativa de poblaciones VFA**

Población de VFA <sup>a</sup>	Virus <sup>b</sup>	Número de experimentos <sup>c</sup>	$k$ (min <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
<b>Control</b>	O1K / C-S8c1	11	0,022 ± 0,006
<b>Poblaciones naturales</b>	O1K	3	0,020 ± 0,003
	A5Ww	4	0,025 ± 0,005
	C-S8	5	0,027 ± 0,006
<b>Poblaciones adaptadas a cultivos</b>	C-S8c1 p51	2	0,035 ± 0,001
	C-S8c1 p114	1	0,037 ± 0,002
	R100	4	0,040 ± 0,008

- <sup>a</sup> Se indica el tipo de población, natural o de laboratorio, con la que se realizó el ensayo.
- <sup>b</sup> Se indica la población concreta de VFA con la que se realizó el ensayo.
- <sup>c</sup> Se indica el número de ensayos independientes realizados para cada población de VFA.
- <sup>d</sup> Para cada población estudiada se indica el valor medio y desviación estándar de las constantes de inactivación térmica ( $k$ ) obtenidas en varios ensayos independientes. Para C-S8c1- p114 sólo se realizó un ensayo, para el que se indica el valor de  $k$  y el error de ajuste. Estos ensayos se realizaron partiendo de una población de VFA inicial diluida a 100 PFU, como se indica en el apartado 3.12.1. y la caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden que tienden a 0 a tiempo infinito, como se indica en el apartado 3.12.3.



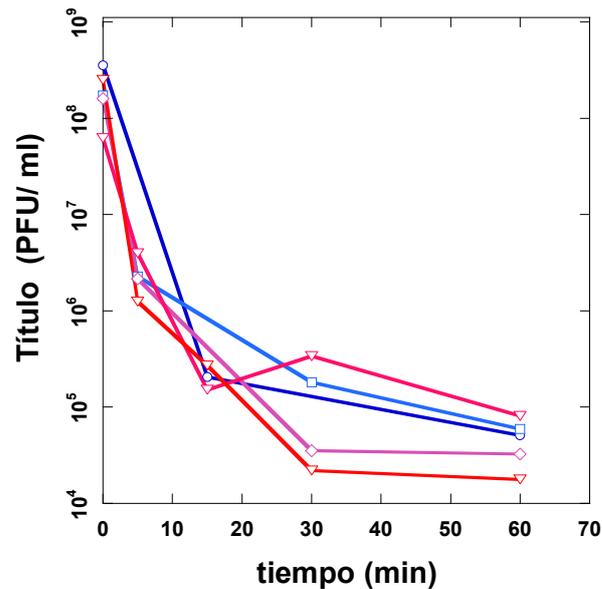
**Figura 9. Curvas de inactivación térmica de una población clonal de VFA del serotipo C sometida a un elevado número de pases.** (A, B) Se muestran las cinéticas obtenidas a 42°C con los pases 51(A) y 114 (B) en infecciones citolíticas de la población clonal de VFA C-S8c1 después de ser sometidas a calentamiento a 59°C durante 1h. (C, D) Se muestran las cinéticas obtenidas a 42°C con el pase 100 de la población clonal de VFA C-S8c1 en células persistentemente infectadas después de ser sometida a calentamiento a 55°C (C) o 60°C (D) durante 1h. Círculos: control realizado con la población clonal de VFA O<sub>1</sub>K/C-S8c1; triángulos: población no calentada; triángulos invertidos: población calentada 1 h a la temperatura correspondiente. Las cinéticas de inactivación se obtuvieron partiendo del virus diluido a 100PFU como se indica en el apartado 3.12.1. y la caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden que tienden a 0 a tiempo infinito, como se indica en el apartado 13.12.3. Los datos se han normalizado y se indican como porcentaje de la infectividad presente a tiempo 0.

#### **4.1.6. Análisis de la presencia de variantes termoestables en poblaciones sometidas a selección mediante calentamiento y amplificación en pases seriados**

Los experimentos anteriores indicaban que en diferentes poblaciones de VFA no se encuentran variantes significativamente más resistentes al calor con una frecuencia suficientemente elevada como para ser detectados mediante la inactivación de la gran mayoría de viriones (hasta el 99,999%). Para tratar de detectar variantes termoestables que pudieran encontrarse en una proporción aún más baja se habían llevado a cabo en el laboratorio experimentos consistentes en la realización seriada de un número de ciclos de selección mediante calentamiento, seguidos de amplificación en cultivos. Sin embargo, estos experimentos se habían realizado exclusivamente con una población derivada de un clon molecular mediante un número limitado de pases, por lo que era de esperar que la cuasiespecie resultante no fuera extremadamente heterogénea. Por ello, decidimos llevar a cabo un experimento similar, pero utilizando una población de VFA derivada del aislado natural heterogéneo C-S8 (no clonado). Se siguió un protocolo de ciclos de selección por calor y amplificación similar al descrito por Bachrach *et al.* (1960), (apartado 3.3.4) que había permitido a estos autores la selección de una población de mayor termoestabilidad promedio incluso tras un solo ciclo de calentamiento y amplificación a partir de una población fuertemente adaptada a cultivos celulares (ver apartado anterior). La población inicial de C-S8 (alrededor de  $10^8$  PFU /ml) fue calentada durante 60 min a 59°C, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, y estas se titularon para obtener directamente una cinética de inactivación térmica (apartado 3.12.2). La población remanente se amplificó en cultivos celulares, y la progenie resultante se sometió al mismo ciclo de calentamiento, determinación de la cinética de inactivación durante el calentamiento, y amplificación en cultivos celulares. Este ciclo se repitió cuatro veces, sin que se obtuviera tras ninguno de los ciclos un incremento significativo en la termoestabilidad de la población (**Figura 10**).

Consideramos posible, aunque poco probable, que en las poblaciones de VFA existan mutantes termoestables con una eficacia biológica respecto a los virus dominantes que fuera suficiente para mantenerse en cierta proporción en la población, pero insuficiente para evitar que fueran desplazados por los virus termolábiles en las etapas de amplificación realizadas tras las etapas de selección. Para tratar de mantener una presión selectiva por calor también durante la amplificación del virus, se trató de cultivar células BHK a temperaturas más elevadas. Sin embargo, como esperábamos, a temperaturas tan bajas como 41°C-42°C las células no resultaban viables.

Como resumen de este apartado, hemos realizado un estudio de diferentes poblaciones de VFA, clonales y no clonales, de diferentes serotipos, recuperadas de infecciones citolíticas o persistentes, o sujetas a un alto o bajo número de pases en cultivos, que en conjunto constituyen, a nuestro modo de ver, una muestra de tipos generales de poblaciones de VFA presentes tanto en la naturaleza como en el laboratorio. En ningún caso pudieron aislarse, ni siquiera detectarse, variantes termoestables (Mateo *et al.*, 2007). Estos resultados no excluyen la posibilidad de que, en algunas poblaciones concretas, sí pudiesen encontrarse presentes variantes termoestables de VFA, quizá con una eficacia biológica reducida, pero indican claramente que la presencia frecuente de variantes termoestables no es una característica general de las cuasiespecies de VFA.

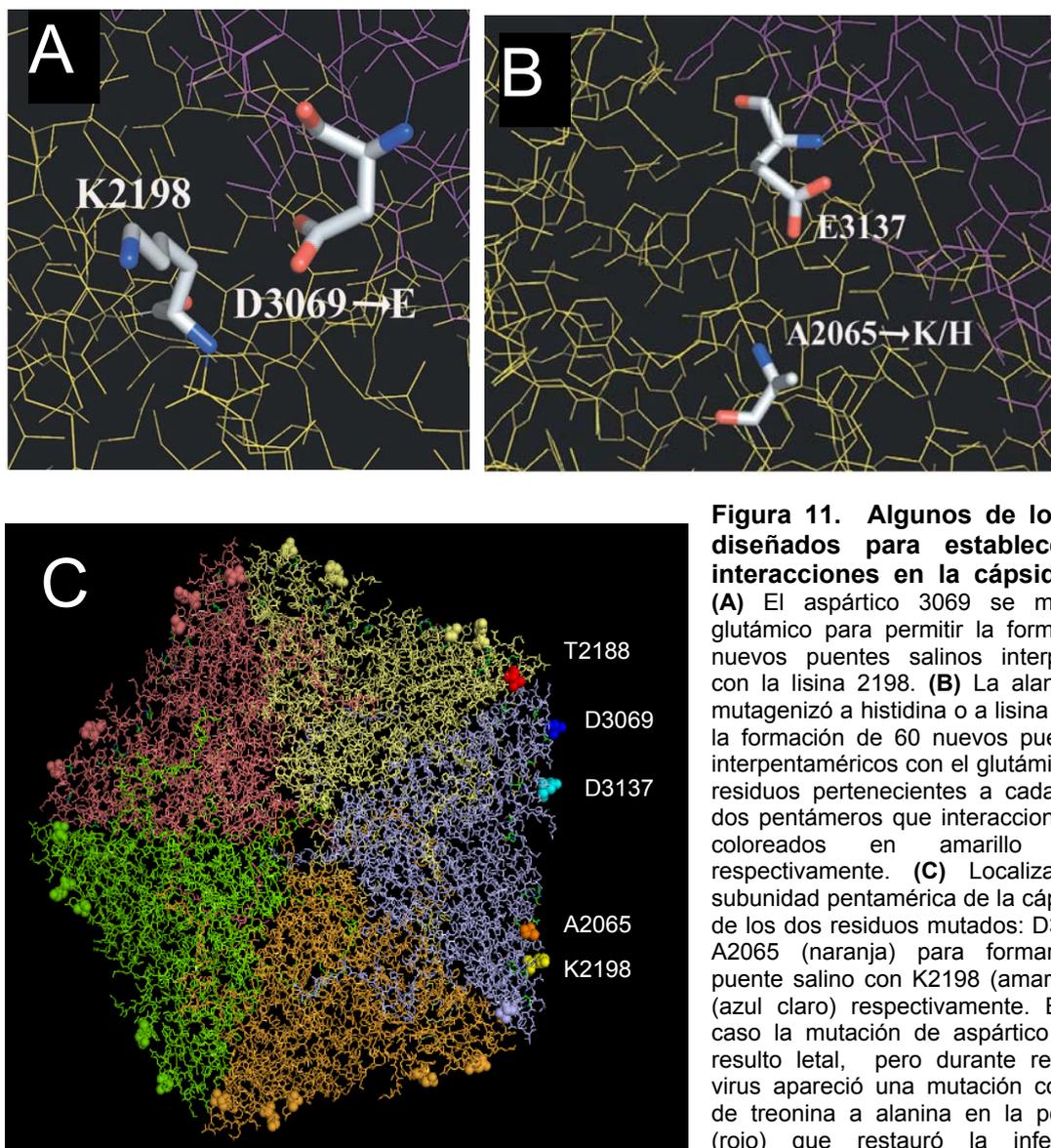


**Figura 10. Cinéticas de inactivación térmica obtenidas en ciclos sucesivos de calentamiento y amplificación de una población de VFA.** Se muestran las cinéticas obtenidas a 42°C tras someter varias veces a la población no clonal de VFA procedente del aislado natural C-S8 (C-S8nc 27.4.82) a calentamiento a 59°C durante 1h y posterior amplificación. Círculos, población inicial; cuadrados, pase 1; rombos, pase 2; triángulos, pase 3; triángulos invertido, pase 4. Las cinéticas de inactivación se obtuvieron con el virus procedente directamente de infección sin diluir como se indica en el apartado 3.12.2. y la caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden como se indica en el apartado 13.12.3.

## 4.2. Análisis de mutantes de VFA diseñados racionalmente para aumentar la termoestabilidad del virión

### 4.2.1. Elección de la estrategia de diseño racional

En nuestro laboratorio el Dr. R. Mateo había diseñado, construido y analizado parcialmente varios VFA modificados mediante la introducción de mutaciones encaminadas al establecimiento de interacciones iónicas adicionales entre las subunidades pentaméricas que forman la cápsida. En ese trabajo se obtuvieron tres mutantes prometedores en este sentido: D3069E/T2188A, A2065H y A2065K (Figura 11).



**Figura 11. Algunos de los residuos diseñados para establecer nuevas interacciones en la cápsida de VFA.**

(A) El aspártico 3069 se mutagenizó a glutámico para permitir la formación de 60 nuevos puentes salinos interpentaméricos con la lisina 2198. (B) La alanina 2065 se mutagenizó a histidina o a lisina para permitir la formación de 60 nuevos puentes salinos interpentaméricos con el glutámico 3137. Los residuos pertenecientes a cada uno de los dos pentámeros que interaccionan aparecen coloreados en amarillo y violeta respectivamente. (C) Localización en la subunidad pentamérica de la cápsida de VFA de los dos residuos mutados: D3069 (azul) y A2065 (naranja) para formar un nuevo puente salino con K2198 (amarillo) y D3137 (azul claro) respectivamente. En el primer caso la mutación de aspártico a glutámico resultó letal, pero durante replicación del virus apareció una mutación compensatoria de treonina a alanina en la posición 2188 (rojo) que restauró la infectividad del mutante.

Los resultados mostraron que: i) los tres mutantes son viables y alcanzan títulos similares al virus parental. ii) los valores obtenidos para la constante de inactivación térmica de A2065K y A2065H eran ligeramente inferiores a las del virus parental, lo que podría ser indicio de una estabilidad conformacional ligeramente incrementada. No obstante, debido al error del tipo de ensayo utilizado no se pudo considerar este incremento como significativo (Mateo, 2004). Además, para estos mutantes no se había llegado a determinar directamente su estabilidad frente a la disociación en subunidades por acción del calor. iii) el valor obtenido para la constante de inactivación térmica del mutante D3069E/T2188A era ligeramente superior al del virus parental, sin que, de nuevo, el error del experimento permitiera afirmar que la estabilidad conformacional de este mutante era menor. Por otra parte, para este mutante los ensayos preliminares de disociación térmica del virión en pentámeros indicaban claramente una mayor estabilidad que la del parental a 4°C, sin que pudiera afirmarse que lo mismo ocurría a temperaturas sustancialmente más elevadas. Como un aspecto fundamental de esta tesis de doctorado nosotros continuamos, con la colaboración para algunos aspectos del Dr. R.Mateo y más recientemente de V. Rincón de nuestro laboratorio, con la caracterización de estos

tres mutantes, para tratar de clarificar si alguno de ellos realmente poseía las características de termoestabilidad deseadas (apartado 4.2.3).

Por otra parte, el virión de VFA debe sufrir un conjunto de procesos que lleva a la disociación de la cápsida y la liberación del material genético encerrado en ella. Es por tanto posible que para este y otros virus exista una relación inversa entre termoestabilidad e infectividad, y los resultados obtenidos por nosotros y descritos en el apartado anterior son consistentes con esta posibilidad. Ello hacía aconsejable el diseño de variantes cuya termoestabilidad estuviera incrementada únicamente en el entorno extracelular, pero no en el entorno intracelular, de manera que no existiera interferencia con el proceso de disociación de la cápsida. Por ello, decidimos intentar, como estrategia para la termoestabilización únicamente extracelular del virión, un diseño racional alternativo basado en la introducción de puentes disulfuro interpentaméricos. Los puentes disulfuro estarían formados en el entorno extracelular, oxidante, pero se reducirían en el entorno intracelular, reductor, reduciendo de este modo la mayor estabilidad extracelular al nivel del virión natural, sin mutaciones introducidas. Los intentos realizados en este sentido por nosotros con la colaboración para algunos aspectos del Dr. R. Mateo se describen inmediatamente a continuación (apartado 4.2.2).

## **4.2.2. Intentos para incrementar la estabilidad térmica de VFA mediante la introducción de puentes disulfuro interpentaméricos**

### **4.2.2.1. Diseño de virus modificados**

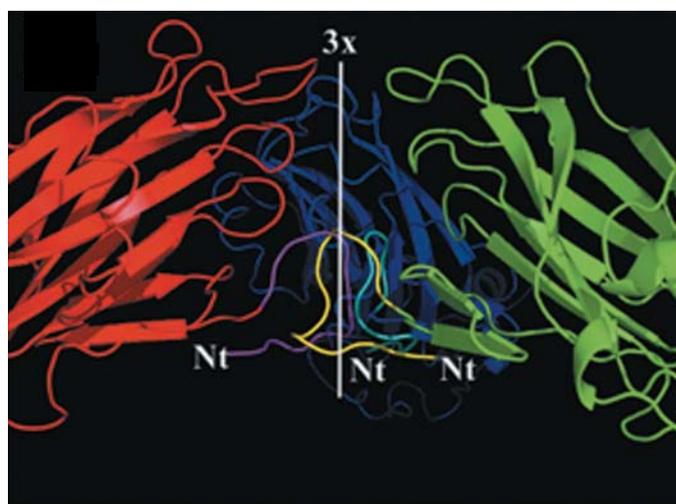
Se utilizaron dos programas bioinformáticos, *Disulfide by design* (Dombkoski, 2003) y *Modelling of disulphide bonds in proteins* (MODIP, Vardhan *et al.*, 2003). Estos programas analizan la estructura tridimensional de una proteína y predicen las posiciones más favorables para la introducción, mediante mutagénesis a cisteína, de nuevos puentes disulfuro que pudieran resultar estérica y energéticamente más favorables. La aplicación de estos programas a la estructura tridimensional de VFA C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994) nos permitió identificar aquellos residuos concretos en las interfases entre pentámeros o cerca de ellas que podrían reemplazarse por cisteínas para, en condiciones oxidantes, formar puentes disulfuro interpentaméricos sin introducir un costo energético demasiado elevado debido a una geometría inadecuada. Desafortunadamente, los resultados indicaron que sólo existen unas pocas posiciones en o cerca de las interfases entre pentámeros que serían razonablemente aceptables, desde el punto de vista estructural y energético, para la introducción de puentes disulfuro interpentaméricos (no mostrado).

En el caso de la cápsida de VFA era preciso tener en cuenta, además, que las cisteínas sólo deberían introducirse en aquellas posiciones para las que la cadena lateral aminoacídica original no fuera necesaria para la infectividad del virión, que debía permanecer infeccioso para permitir la producción de vacuna de la que constituye la base. El análisis mutacional exhaustivo de las interfases entre pentámeros en el virión mediante *alanine scanning*, realizado previamente en nuestro laboratorio (Mateo *et al.*, 2003; Mateo, 2004), permitió concluir que la casi totalidad de las cadenas laterales implicadas en interacciones entre pentámeros eran necesarias para el mantenimiento de la infectividad viral. Esto limitaba aún más seriamente la elección de posiciones en las interfases entre

pentámeros donde pudieran introducirse cisteínas para la formación de puentes disulfuro interpentaméricos sin comprometer la infectividad del virión.

Teniendo en cuenta las predicciones de los programas utilizados y las restricciones encontradas experimentalmente, decidimos construir y analizar cuatro mutantes dobles: E2011C/G3150C, N2114C/G3192C, T2023C/A3145C y T2053C/Q2057C (**Tabla 5**). En cada caso se tuvo que llegar a un compromiso delicado, debido a la virtual ausencia de posiciones adecuadas desde ambos puntos de vista, estructural y funcional. En los dos primeros casos las predicciones energéticas eran razonables, pero al menos una de los residuos originales (E2011 y N2114) no admitía la mutación a alanina sin una reducción drástica de infectividad. Esperamos que una sustitución estéricamente menos drástica por Cys en vez de Ala no resultara funcionalmente tan desfavorable. En el último caso, ambos residuos admitían el truncamiento de su cadena lateral mediante mutación a alanina sin afectar a la infectividad del virión. Sin embargo, la distancia entre sus C $\beta$  se encuentra en el límite para la formación de un puente disulfuro, y fue necesario relajar un poco las condiciones estrictas del programa *Disulfide by design* para que este programa lo incluyera como candidato.

A causa de estas limitaciones, decidimos explorar la posibilidad de introducir otros puentes disulfuro interpentaméricos en los anillos  $\beta$  de la cápsida (**Figura 12**). Cada anillo  $\beta$  se encuentra en un eje de simetría ternario y está formado por los segmentos N terminales de tres subunidades VP2 pertenecientes a pentámeros diferentes, y unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno cadena principal-cadena principal. Debido probablemente a su flexibilidad conformacional, las posiciones de los residuos pertenecientes a estos segmentos y el trazado del esqueleto polipeptídico de estos segmentos pudieron ser determinados sólo de modo aproximado. No obstante, utilizamos las coordenadas atómicas aproximadas de la cadena principal y aplicamos los programas de predicción de puentes disulfuro mencionados anteriormente, así como la inspección visual de la estructura de la cápsida, como una aproximación para elegir otros cinco mutantes dobles: K2002C/E2006C, K2003C/E2006C, E2006C/D2012C, T2007C/T2008C y T2007C/D2012C (**Tabla 5**). Las cadenas laterales de todos estos residuos se encuentran, total o parcialmente, expuestas al solvente en el interior de la cápsida, y la presumible flexibilidad conformacional del anillo podría ser suficiente para permitir la acomodación de los puentes disulfuro introducidos manteniendo una buena estereoquímica.



**Figura12.** Vista esquemática de la parte de la cápsida de VFA C-S8c1 que incluye parte de tres subunidades VP2 vecinas (en color rojo, azul o verde) que pertenecen a pentámeros distintos. Sus segmentos N-terminales (Nt) (en color violeta, azul claro y amarillo, respectivamente) forman un anillo  $\beta$  alrededor del eje de simetría ternario (línea blanca).

**Tabla 5. Viabilidad y resistencia a la inactivación de mutantes de VFA diseñados para la introducción de puentes disulfuro interpentaméricos.**

VFA <sup>a</sup>	TÍTULO (PFU/ml) <sup>b</sup>				<i>k</i> 42°C (min <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>		Localización en la cápsida <sup>d</sup>
	45h hpe	55h hpe	90 hpe	117 hpe	mutante	<i>wt</i>	
<b>Serie A</b>							
<i>wt</i>	2,0x10 <sup>6</sup>	5,0x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>6</sup>	ND <sup>g</sup>	NP <sup>h</sup>	0,018±0,006	NP
E2011C/ G3150C	<50	<50	<50	ND	NP	NP	Ocultos al solvente
N2114C/ G3192C	<50	<50	8,5x10 <sup>4</sup>	ND	0,022	0,012	Expuestos al exterior
N2114C	1.8 10 <sup>6</sup>	3.4 10 <sup>6</sup>	5.5 10 <sup>3</sup>	ND	0.029	0.027	Expuesto al solvente
N2114C/ G3192C <sup>e</sup>	ND	ND	ND	ND	0,031	0,013	Expuestos al exterior
E2006C/ D2012C	<50	<50	<50	ND	NP	NP	D2012 casi enterrada
K2002C/ E2006C	2,8x10 <sup>3</sup>	1,5 x10 <sup>5</sup>	2,0x10 <sup>4</sup>	ND	0,018	0,018	Expuestos al interior
<b>Serie B</b>							
<i>wt</i>	3,4 x 10 <sup>7</sup>	9,4x10 <sup>6</sup>	2,5x10 <sup>6</sup>	ND	NP	0,023±0,006	NP
T2023C/ A3145C	5,5x10 <sup>7</sup>	5,5x10 <sup>7</sup>	ND	≥ 6.6 10 <sup>4</sup>	0,02	0,02	Parcialmente expuestos interior
T2023C	6,7. 10 <sup>7</sup>	ND	3,25 10 <sup>6</sup>	ND	ND	ND	Parcialmente expuestos interior
K2003C/ E2006C	<50	<50	<50	ND	NP	NP	Expuestos al interior
T2007C/ T2008C	1x10 <sup>8</sup>	≥ 9x10 <sup>6</sup>	ND	ND	0,030	0,028	Parcialmente expuestos interior
T2007C/ D2012C <sup>f</sup>	NP	NP	NP	ND	NP	NP	Semiocultos al interior
T2053C/ Q2057C <sup>e</sup>	<50	<50	2,1.10 <sup>3</sup>	2.10 <sup>4</sup>	ND	ND	2053 oculto 2057 expuesto parcialmente al exterior
	<50	<50	1,43.10 <sup>5</sup>	3,8.10 <sup>4</sup>	ND	ND	

<sup>a</sup> Se indican dos series (A y B) entre las que las condiciones de titulación fueron algo distintas y condujeron a títulos algo diferentes para el virus parental (*wt*) obtenido en las electroporaciones control.

<sup>b</sup> Se indican los títulos obtenidos a diferentes horas post-electroporación (hpe). Los títulos indicados para el virus *wt* en las series A y B corresponden a los promedios obtenidos en 11 y 6 electroporaciones, respectivamente.

<sup>c</sup> Para aquellos mutantes que no resultaron letales se indican las constantes cinéticas de inactivación a 42°C del virus mutante y del *wt* obtenidas en paralelo en ensayos de inactivación térmica. Estos ensayos se realizaron partiendo de una población de VFA inicial diluida a 100 PFU, como se indica en el apartado 3.12.1. y la caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden que tienden a 0 a tiempo infinito, como se indica en el apartado 3.12.3. Para el virus parental la media ± desviación estándar en las series A y B corresponde a 30 y 28 medidas independientes, respectivamente.

<sup>d</sup> Se indica la posición de los residuos mutados en la cápsida respecto de su accesibilidad al solvente.

<sup>e</sup> El virus adquirió una o más mutaciones compensatorias, (ver apartado 4.3.4 y Tabla11).

<sup>f</sup> El virus revirtió.

<sup>g</sup> ND: no determinado.

<sup>h</sup> NP: no procede.

#### **4.2.2.2. Construcción y análisis de la infectividad de viriones modificados**

En total, se diseñaron nueve mutantes dobles que se construyeron mediante mutagénesis dirigida como se indica en el apartado 3.5. Cuatro de los mutantes fueron construidos por el Dr. Mateo y cinco por la autora de esta memoria. Todos fueron analizados como parte de este trabajo, en colaboración con el Dr. Mateo y con su supervisión para algunos aspectos.

La infectividad de cada mutante se ensayó mediante transfección con el ARN genómico derivado del clon infeccioso mutado como se describe en los apartados 3.6. y 3.7. En cada experimento se incluyó como control positivo el ARN genómico obtenido a partir del clon infeccioso no mutado. Se utilizó la misma cantidad de ARN transfectado para el control no mutado y cada mutante analizado. Tras la incubación a diferentes tiempos post-transfección, se determinó el título de la progenie vírica obtenida en cada caso (**Tabla 5**). Los resultados mostraron que la mitad de los mutantes (E2011C/G3150C, K2003C/E2006C, E2006C/D2012C, T2007C/D2012C) eran esencialmente inviables. En un experimento particular, a tiempos largos post-transfección pudo recuperarse progenie de los mutantes N2114C/G3192C y T2053C/T2057C pero los títulos fueron muy inferiores a los del control no mutado. Probablemente esta recuperación tardía de infectividad se debió a la aparición de mutaciones compensatorias (ver a continuación y también el apartado 4.3). El mutante K2002C/E2006C mostró una reducción importante de la infectividad. Únicamente dos de los nueve mutantes, T2023C/A3145C y T2007C/T2008C resultaron aproximadamente tan infecciosos como el virus no mutado.

Para asegurar que, en las progenies víricas de los mutantes viables las cisteínas introducidas seguían presentes, se secuenció la región de la cápsida, total (mutante N2114C/G3192C) o parcialmente (mutantes K2002C/E2006C, T2023C/A3145C y T2007C/T2008C), confirmándose en todos los casos la presencia de las cisteínas en las posiciones mutagenizadas, y no encontrándose ninguna otra mutación. La cápsida completa del mutante T2053C/T2057C fue secuenciada tras un pase de amplificación, confirmando la presencia de las cisteínas, aunque en este caso sí se encontró algún cambio de nucleótido adicional).

En resumen, el análisis de viabilidad de los nueve mutantes de puente disulfuro demuestra que únicamente cinco de estos mutantes son infectivos en alguna medida, y sólo dos de ellos presentan una infectividad comparable al virus parental. Estas observaciones contribuyen a aumentar la evidencia de la extrema intolerancia de VFA a mutaciones individuales en las interfases entre subunidades pentaméricas.

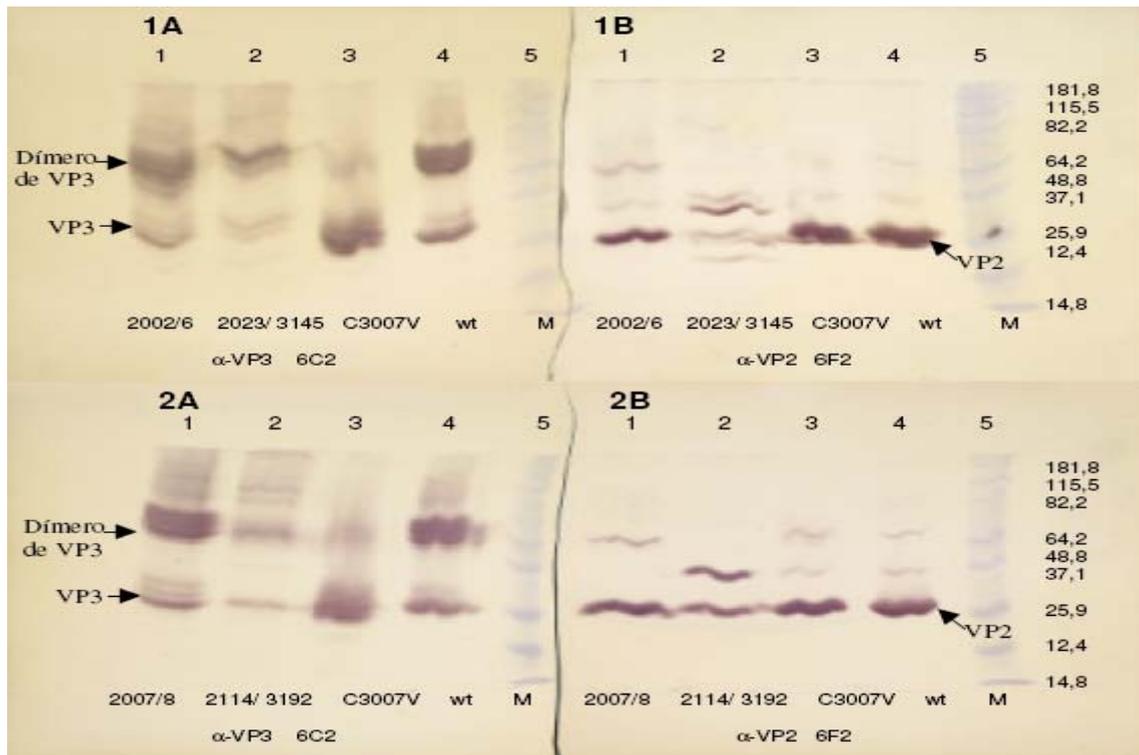
#### **4.2.2.3. Análisis de la presencia de puentes disulfuro en la cápsida de viriones modificados**

A pesar que se había comprobado que las cisteínas introducidas en los mutantes viables estaban presentes, y las condiciones durante la preparación de viriones y el ensayo de inactivación son oxidantes, existía alguna posibilidad de que los puentes disulfuro no se hubiesen podido formar. Para tratar de responder a esta última cuestión se utilizó la electroforesis en condiciones no reductoras de las proteínas de la cápsida, y posterior inmunodetección con anticuerpos específicos, tal y como se indica en el apartado 3.11. La formación de un puente disulfuro entre dos proteínas de la cápsida (VP3-VP2 en los mutantes T2023C/A3145C y N2114C/G3192C, o VP2-VP2 en los

mutantes T2007C/T2008C y K2002C/E2006C), debería traducirse en la aparición de una banda de tamaño superior a las de las proteínas monoméricas. Sin embargo, la presencia de un puente disulfuro natural entre subunidades VP3-VP3 (Díez *et al.*, 1990) dificulta este análisis, a pesar de que como controles utilizamos el virus no mutado y el mutante C3007V, que carece del puente disulfuro natural VP3-VP3 (Díez *et al.*, 1990). Para obtener suficiente cantidad de viriones purificados se realizó una amplificación de cuatro mutantes viables y de los virus parental y mutante C3007V (controles positivo y negativo del ensayo, respectivamente) tal y como se indica en el apartado 3.2. El mutante T2053C/T2057C no se incluyó en este análisis porque, aparte de haber mostrado una reducción importante de la infectividad, los residuos mutados se encuentran situados en el límite de la distancia óptima para la formación de un puente disulfuro.

El genoma de las poblaciones resultantes se secuenció en la zona de la cápsida correspondiente a la mutación, confirmándose que tras los tres pases de amplificación realizados las cisteínas en las posiciones mutagenizadas seguían presentes en todos los casos. En el caso del mutante N2114C/G3192C, que pudo recuperarse únicamente tras un largo tiempo post-transfección, se encontró además en la cápsida la mutación Q2115P, que podría ejercer un efecto restaurador de la viabilidad (ver apartado 4.3). Después se procedió a purificar parcialmente los virus amplificados tal y como se indica en el apartado 3.10., pero sin realizar el último paso, la centrifugación en gradiente de sacarosa (Díez *et al.*, 1990), y los seis virus parcialmente purificados se sometieron a análisis electroforético en condiciones no reductoras, e inmunodetección. Un ejemplo de uno de estos ensayos se muestra en la **Figura 13**. Es preciso tener en cuenta que estos geles contienen urea para separar la migración de las proteínas VP1, VP2 y VP3 de VFA, por lo que la posición de cada banda de proteína sólo sugiere, pero no precisa, su tamaño.

Como se esperaba, los inmunoensayos con un anticuerpo específico de VP3 permitieron detectar la presencia de dímeros VP3-VP3 en el virus parental control (paneles 1A y 2A, calle 4) y su ausencia en el mutante C3007V control (paneles 1A y 2A, calle 3). Estos dímeros parecen observarse igualmente en los cuatro mutantes con cisteínas introducidas (paneles 1A y 2A, calles 1 y 2), apareciendo además la banda del monómero claramente disminuida en el caso de los mutantes potencialmente formadores de puente disulfuro con VP3 (T2023C/A3145C y N2114C/G3192C ( paneles 1A y 2A, calle 2 ). En los inmunoensayos con un anticuerpo específico de VP2, los mutantes en los que la formación de nuevos puentes disulfuro deberían dar lugar a dímeros VP2-VP2 o VP2-VP3 presentaron un ligero o importante incremento de señal de VP2 a una altura netamente superior a la de los monómeros VP2 o VP3, (paneles 1B y 2B, calles 1 y 2), lo que sugiere la formación de puentes disulfuro en al menos una fracción de la población de viriones, especialmente en el caso de los mutantes T2023C/A3145C y N2114C/G3192C (calles 2 de los paneles 1B y 2B, respectivamente). En estos dos casos el tamaño aparente de la banda es menor que el esperado si la movilidad del dímero fuera lineal con relación a su peso molecular, pero la presencia de urea y además de un puente disulfuro intercatenario podría afectar a la movilidad del dímero. En cambio, resulta muy difícil explicar la presencia de esta banda de movilidad muy inferior (tamaño muy superior) a la del monómero de VP2 y la reducción de la banda del monómero de VP2 en los mutantes T2023C/A3145C y N2114C/G3192C (paneles 1B y 2B, calle 2) pero no en los virus controles (paneles 1B y 2B, calles 3 y 4), si no se debieran a la formación de un puente disulfuro. En resumen, aunque estos resultados no son concluyentes y requerirían un estudio más detallado, sugieren que los puentes disulfuro están realmente formados en los mutantes analizados.

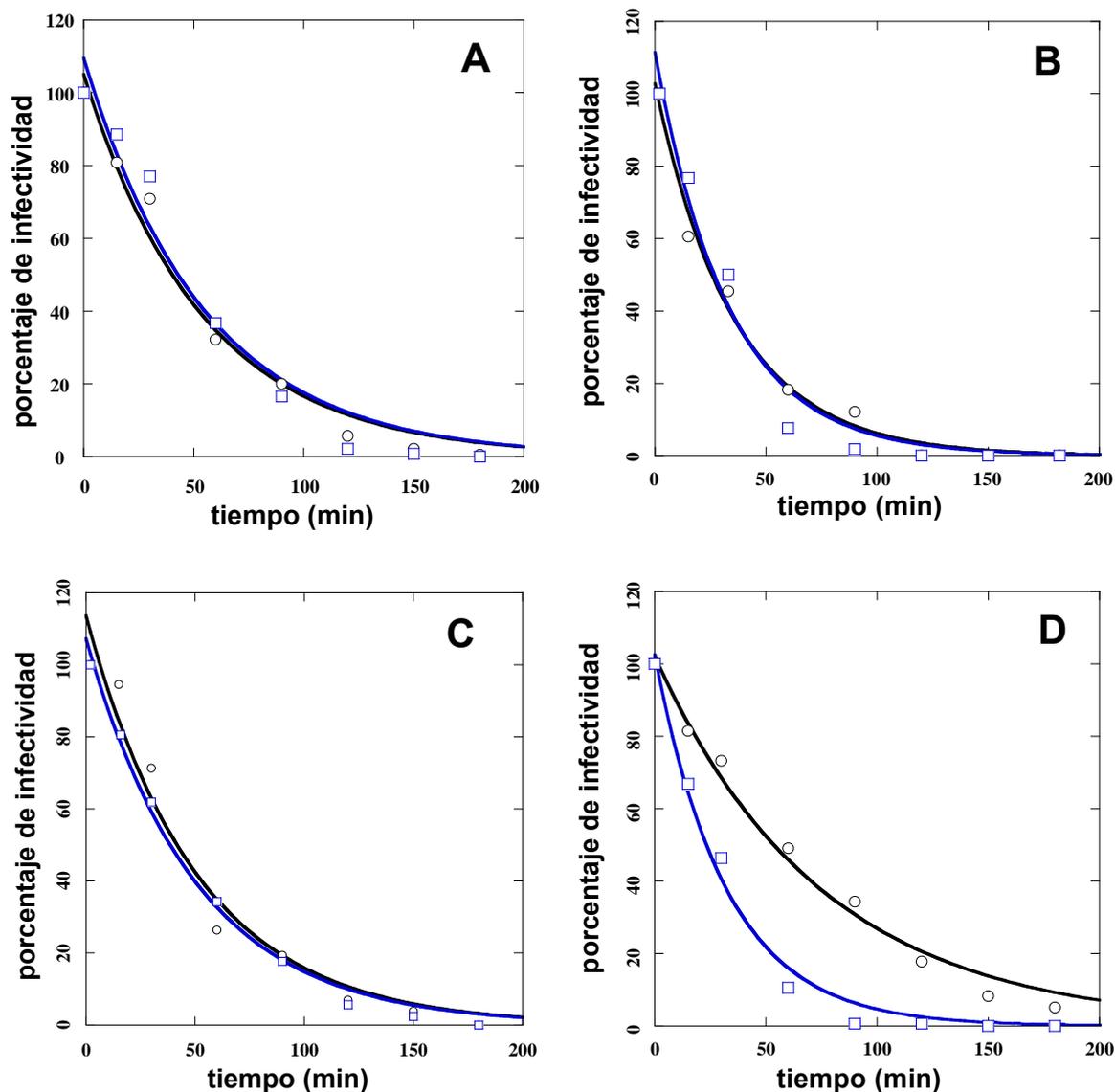


**Figura 13. Análisis de la presencia de puentes disulfuro en la cápsida de VFA mediante inmunotransferencia en condiciones reductoras.** Preparaciones parcialmente purificadas de los virus que se indican en la figura se sometieron a electroforesis en condiciones no reductoras (ausencia de 2-mercaptoetanol). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron en inmunoensayos con anticuerpos específicos: 1A y 2A: 6C2 (anti-VP3); 1B y 2B: 6F2 (anti VP-2). wt indica virus parental; M indica marcadores de tamaño (preteñidos). Todas las electroforesis se realizaron en presencia de urea, por lo que la posición de los marcadores no sirve como referencia para localizar las proteínas de la cápsida. Las flechas indican las posiciones aproximadas esperadas para las proteínas VP2 o VP3 monoméricas y para el dímero de VP3, deducidas de los controles positivo (wt) y negativo (mutante C3007V) y de resultados previos descritos en Díez *et al.* (1990).

#### 4.2.2.4. Análisis de la resistencia de viriones modificados frente a la inactivación térmica de su infectividad

Para determinar si alguno de los cuatro mutantes viables poseía una resistencia a la inactivación térmica superior a la del virus parental, se realizaron ensayos de reducción térmica de la infectividad como se indica en el apartado 3.12.1 (**Figura 14**), y se determinaron las constantes cinéticas de inactivación (**Tabla 5**).

Los resultados mostraron que las constantes cinéticas de inactivación de los cuatro mutantes viables con cisteínas introducidas en las interfases interpentaméricas eran indistinguibles, dentro del error experimental, de la del virus parental. Por tanto, ninguno de ellos presentaba una mayor estabilidad frente a la inactivación por calor.



**Figura 14. Cinéticas de inactivación térmica de mutantes de VFA C-S8c1 diseñados para la introducción de puentes disulfuro.** Se muestran las cinéticas obtenidas a 42°C con las poblaciones de los mutantes 2002/2006 (A), T2007C/T2008C (B), T2023C/A3145C (C) y N2114C/G3192C (D). Círculos: control realizado con el virus clonal de VFA O<sub>1</sub>K/C-S8c1; cuadrados: virus mutante. Las cinéticas de inactivación se obtuvieron partiendo del virus diluido a 100PFU como se indica en el apartado 3.12.1. y la caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden que tienden a 0 a tiempo infinito, como se indica en el apartado 13.12.3. Los datos se han normalizado y se indican como porcentaje de la infectividad presente a tiempo 0.

#### 4.2.2.5. Análisis de la resistencia de viriones modificados frente a su disociación térmica

Cierta evidencia obtenida previamente en el laboratorio, y observaciones anteriores de otros grupos, nos habían llevado al comienzo de este trabajo a aceptar como cierta la idea de que la inactivación de la infectividad de VFA por calor, en las condiciones de nuestros ensayos, se debería principalmente a la disociación de la cápsida en sus subunidades pentaméricas (Mateo *et al.*, 2003; Mateo, 2004). Sin embargo, resultados obtenidos durante este trabajo, que se describen en el apartado siguiente, demuestran que la inactivación térmica del virión no está necesariamente acoplada a la disociación térmica de la cápsida en las condiciones ensayadas. Por tanto, concluimos

que para determinar si la cápsida de un virión modificado mediante mutación es realmente más resistente frente a la disociación en pentámeros por acción del calor, es necesario realizar ensayos que determinen directamente el grado de disociación del virión sometido a tratamiento térmico. El ensayo elegido consiste en el seguimiento directo de la disociación del virión a pentámeros mediante ultracentrifugación de viriones en gradientes de sacarosa. Utilizamos preparaciones de viriones marcados radiactivamente y purificados, que se sometieron a la acción de calor por diferentes períodos de tiempo. Tras el tratamiento térmico, los viriones remanentes se separaron mediante centrifugación en gradiente de velocidad de las subunidades disociadas, en base a su diferente coeficiente de sedimentación (virión, 140S; pentámero, 12S). Las cantidades relativas de virión remanente se estimaron mediante determinación de la radiactividad asociada a las fracciones correspondientes, tal y como se indica en el apartado 3.13.

Para realizar este ensayo directo elegimos como primer candidato, de entre los mutantes con cisteínas introducidas, el mutante T2023C/A3145C. Este mutante es viable, produce un efecto citopático no retrasado y un título no reducido frente al virus parental, no presenta en toda la cápsida ningún cambio adicional a las dos mutaciones a cisteína, y muy probablemente tiene los puentes disulfuro entre C2023 y C3145 realmente formados en condiciones oxidantes. Este virus fue purificado por Verónica Rincón en el laboratorio, en colaboración con nosotros. Sorprendentemente, cuando las fracciones que contenían los viriones purificados fueron dializadas para eliminar la sacarosa del gradiente, el mutante T2023C/A3145C se disoció completamente a pentámeros, lo que no ocurrió con el virus parental no mutado sometido a las mismas condiciones (V.Rincón, resultados no mostrados). Aunque no fue, en consecuencia, posible llevar a cabo el análisis cinético de la disociación térmica de este VFA mutante, los resultados obtenidos revelaron claramente que este variante no presenta una estabilidad incrementada, sino disminuida, y por tanto no es un buen candidato para una utilización en vacunas.

### **4.2.3. Análisis de la estabilidad térmica y otras propiedades de viriones de VFA modificados para el establecimiento de nuevas interacciones electrostáticas interpentaméricas**

#### **4.2.3.1. Análisis de inactivación térmica de viriones modificados por un método más sensible**

En experimentos iniciales realizados en el laboratorio se había tratado de determinar si los mutantes D3069E/T2188A, A2065K y A2065H, en los que presumiblemente se habían introducido nuevas interacciones iónicas entre pentámeros (apartado 4.2.1) son más resistentes que el virión parental frente a la inactivación térmica de su infectividad. Los resultados no fueron concluyentes, debido a las limitaciones técnicas del tipo de ensayo realizado. La repetición de estos experimentos para obtener promedios más fiables y con menor error (**Tabla 6**) tampoco permitió extraer una conclusión definitiva.

**Tabla 6. Viabilidad y resistencia a la inactivación de mutantes de VFA diseñados para la introducción de puentes salinos interpentaméricos.**

VFA <sup>a</sup>	$k$ (min <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>		Medidas <sup>c</sup>	Localización en la cápsida <sup>d</sup>
	Mutante	wt		
wt	NP <sup>i</sup>	0,018 ± 0,006	30	NP
T2053D/ Q2057K	NP	NP	NP	Interfase
Y2200H/ I3189D <sup>e</sup>	0,034 ± 0,006	ND <sup>j</sup>	2	Interfase
D3069E <sup>f</sup>	NP	NP	NP	Interfase
D3069E/ T2188A <sup>g</sup>	0,024 ± 0,007	0,04 ± 0,011	2	Interfase/ fuera interfase
T2188A	0.015	0.015	1	Fuera interfase
A2065K	0,015±0,003	0,016 ± 0,003	1	Fuera interfase Exposición solvente
A2065H <sup>h</sup>	0,013±0,002	0,014 ± 0,005	1	Fuera interfase Exposición solvente

<sup>a</sup> Se indican diferentes mutantes de VFA .

<sup>b</sup> Para aquellos mutantes que no resultaron letales se indican las constantes cinéticas de inactivación del virus mutante y del wt obtenidas en paralelo en los ensayos de inactivación térmica realizados partiendo de una población de VFA inicial diluida a 100 PFU, como se indica en el apartado 3.12.1. La caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden que tiende a 0 a tiempo infinito, como se indica en el apartado 3.12.3. En los casos indicados se da la media ± desviación estándar correspondiente a varios experimentos independientes.

<sup>c</sup> Se indica el número de experimentos independientes realizados

<sup>d</sup> Se indica la posición de los residuos mutados en la cápsida respecto de su accesibilidad al solvente.

<sup>e</sup> El virus adquirió una o más mutaciones compensatoria(s), (ver apartado 4.3.4 y Tabla 11).

<sup>f</sup> El virus revirtió.

<sup>g</sup> Virus obtenido introduciendo ambas mutaciones en el clon infeccioso. Los títulos obtenidos fueron 3,2.10<sup>5</sup> y 5,5.10<sup>5</sup> a las 45 y 55 horas post-transfección (h.p.t.), respectivamente. Este mutante produjo rendimientos similares al virus no mutado pero a tiempos post-transfección algo superiores.

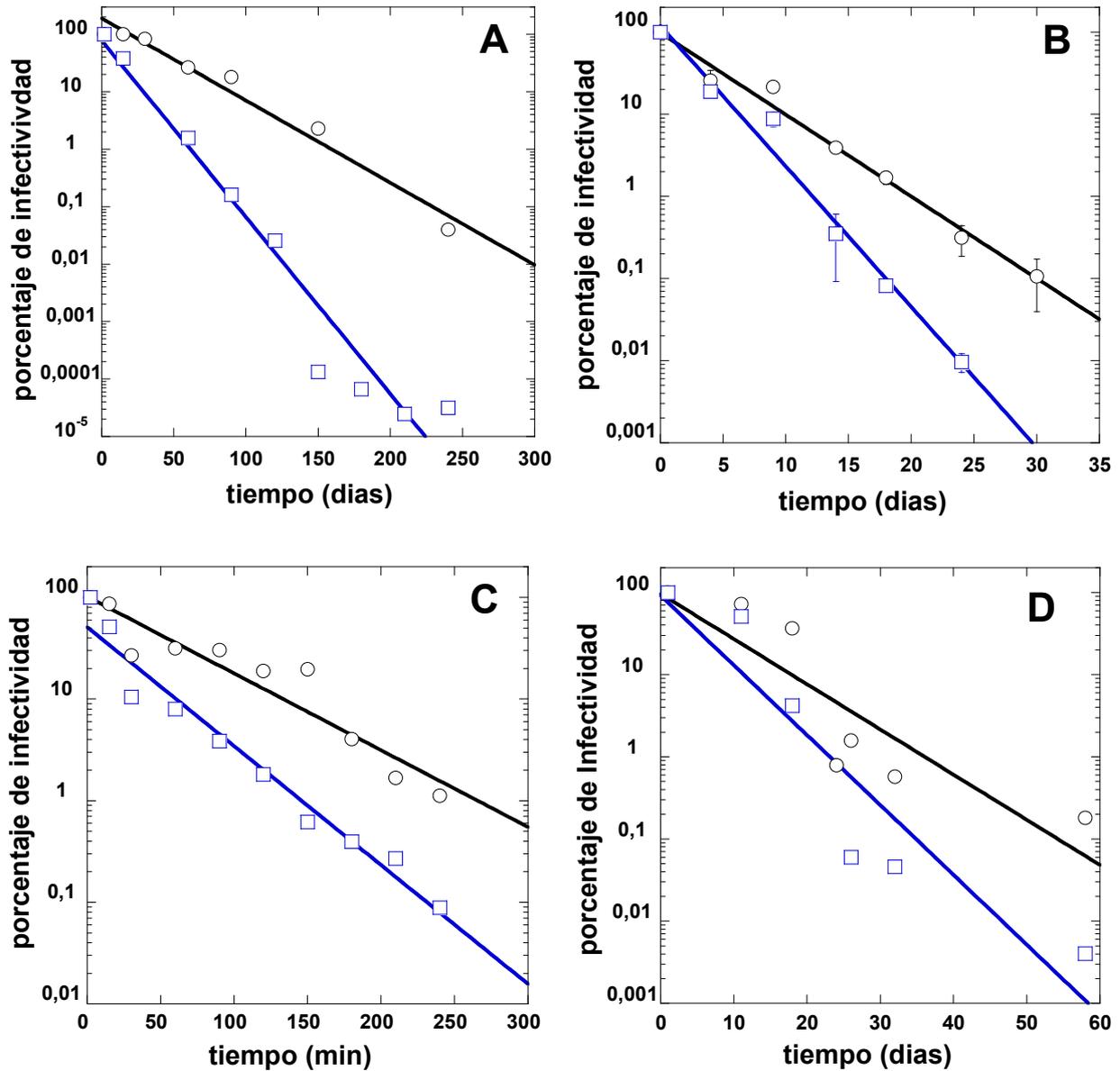
<sup>h</sup> Mutación introducida en el clon infeccioso en dos ocasiones. Los títulos obtenidos en la primera fueron 3,9.10<sup>4</sup> y 1,7.10<sup>5</sup> a las 45 y 55 h.p.t. respectivamente, y en la segunda 2,6.10<sup>6</sup> a las 55 h.p.t.

<sup>i</sup> NP: no procede

<sup>j</sup> ND: no determinado

Por lo tanto, para tratar de determinar sin incertidumbre si alguno de estos mutantes es realmente más estable que el virus parental frente a la inactivación térmica utilizamos una variante del ensayo anteriormente empleado, que se describe en 3.12.2. En esta variante se utiliza sin diluir una población de título elevado (superior a 10<sup>5</sup> PFU/ml, normalmente 10<sup>7</sup> o 10<sup>8</sup>), que se calienta a una temperatura definida, y la infectividad remanente se evalúa mediante la determinación del título vírico en alícuotas obtenidas a diferentes tiempos. Además se emplearon no sólo preparaciones crudas de virus como anteriormente, sino también preparaciones de virus purificados, para eliminar posibles interferencias debidas a contaminantes. Finalmente, los ensayos se realizaron tanto a 4°C y a 42°C (y con un recorrido más largo de tiempo), por si la estabilidad relativa presentara alguna dependencia de la temperatura.

**Mutante D3069E/T2188A:** Se realizaron ensayos de inactivación térmica por el nuevo método utilizando el virus sin purificar y/o purificado, tanto a 42°C como a 4°C. Los resultados se indican en la Figura 15.



**Figura 15. Cinéticas de inactivación térmica del doble mutante D3069E/T2188A.** Se muestran las cinéticas obtenidas a 42°C (A y C) o a 4°C (B y D), con el virus crudo (A y B) o después de ser sometido a purificación (C y D). En todos los casos se ensayaron en paralelo el mutante (cuadrados) y el virus parental como control (círculos). Las cinéticas de inactivación se obtuvieron con el virus sin diluir como se indica en el apartado 3.12.2. y la caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden como se indica en el apartado 13.12.3. Los datos se han normalizado y se indican como porcentaje de la infectividad remanente respecto del tiempo 0 en una escala logarítmica en función del tiempo de incubación. Para ambos virus no purificados y ensayados a 4°C (B) se muestran los valores medios y las barras de error correspondientes a dos experimentos independientes.

En todos los casos la estabilidad del mutante D3069E/T2188A frente a la inactivación de su infectividad resultó algo menor que la del virus parental, como se refleja numéricamente en las constantes cinéticas de inactivación obtenidas (**Tabla 7**). Por tanto, independientemente del grado de pureza del virus y del método utilizado y la temperatura del ensayo, todos los datos obtenidos indican que el virión infectivo de este mutante no es más resistente al calor que el virus parental, sino incluso algo menos resistente.

**Tabla 7. Constantes de inactivación térmica del mutante D3069E/ T2188A y del control no mutado**

T (°C) <sup>a</sup>	Purificación virus <sup>b</sup>	wt		Mutante D3069E/ T2188A	
		k (min <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	n <sup>d</sup>	k (min <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	n <sup>d</sup>
42	Crudo	0,029 ± 0,013	58	0,054 ± 0,007	2
		<i>0,039 ± 0,007</i>	5	<i>0,071</i>	1
	Puro	0,026 ± 0,016	3	0,055 ± 0,004	3
		<i>0,017 ± 0,002</i>	2	<i>0,027</i>	1
4	Crudo	<i>1,55.10<sup>-4</sup> ± 1,4.10<sup>-5</sup></i>	4	<i>2,76.10<sup>-4</sup> ± 1,05.10<sup>-5</sup></i>	2
	Puro	<i>9.10<sup>-5</sup> ± 3,1. 10<sup>-6</sup></i>	2	<i>1,36.10<sup>-4</sup></i>	1

<sup>a</sup> Temperatura a la que se calentó el virus durante el ensayo.

<sup>b</sup> Se indica si el virus fue o no sometido a purificación.

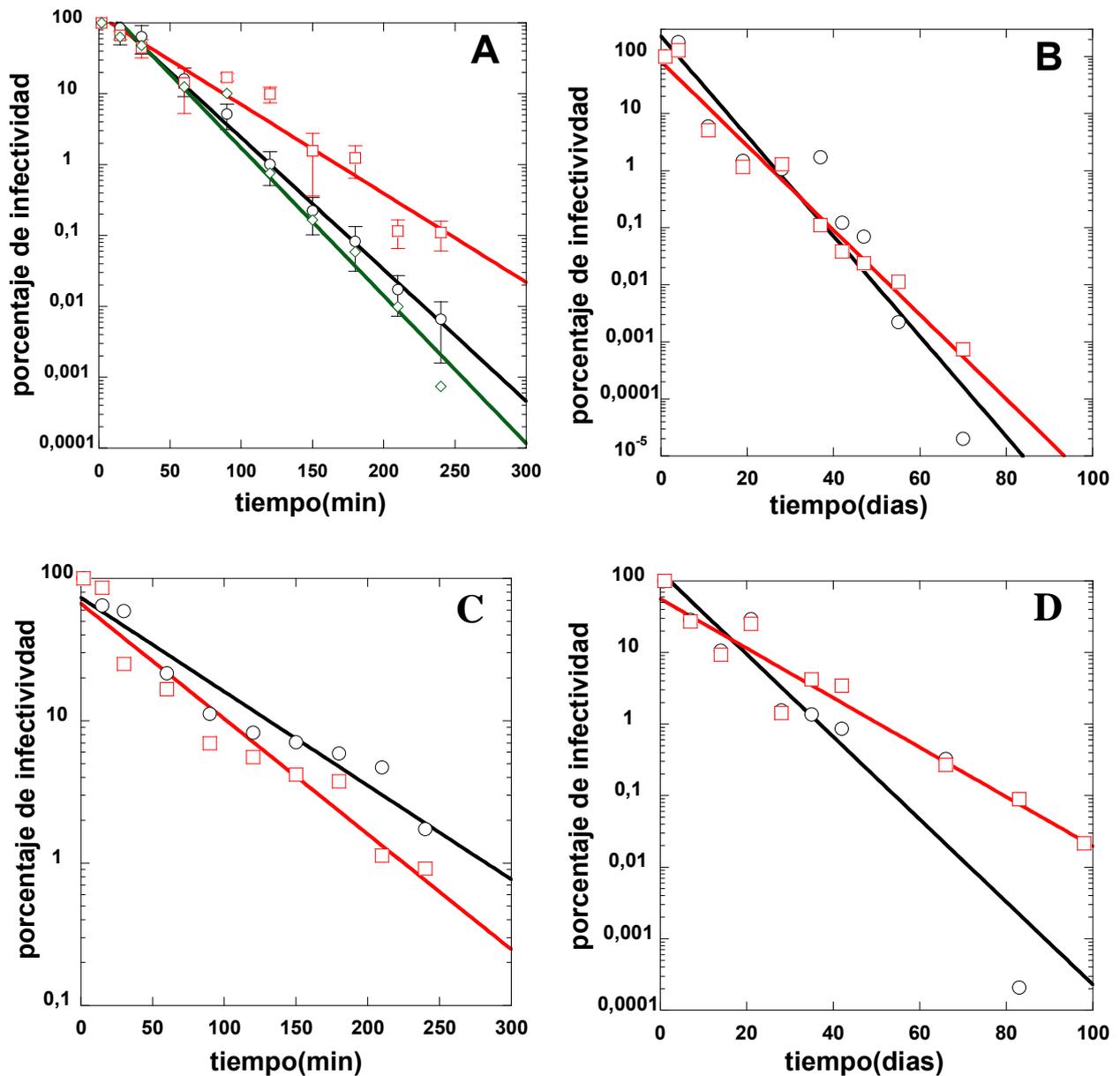
<sup>c</sup> Constantes de inactivación térmica del virus parental y del mutante obtenidas de las cinéticas de inactivación térmica partiendo i) del virus diluido a 100PFU (apartado 3.12.1., números no en cursiva) en cuyo caso la caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden que tienden a 0 a tiempo infinito, como se indica en el apartado 13.12.3. ii) del virus sin diluir (apartado 13.12.2., números en cursiva), en cuyo caso la caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden como se indica en el apartado 13.12.3. En los casos indicados se da la media ± desviación estándar correspondiente a varios experimentos independientes.

<sup>d</sup> Se indica el número de experimentos independientes realizados.

**Mutantes A2065K y A2065H:** De nuevo, se realizaron ensayos de inactivación térmica por el nuevo método utilizando el virus sin purificar y/o purificado, tanto a 42°C como a 4°C. Los resultados se indican en la **Figura 16**.

A 42°C la estabilidad del mutante A2065H no purificado frente a la inactivación de su infectividad resultó claramente mayor que la del virus parental, como se refleja numéricamente en las constantes cinéticas de inactivación obtenidas (**Tabla 8**). Esto mismo es lo que se intuía en los ensayos preliminares realizados por el método antiguo, menos sensible (ver **Tabla 4**), por lo que de nuevo los datos obtenidos por este método y el nuevo, coincidían. Para el resto de condiciones, aunque esta diferencia no es tan llamativa, también se aprecia una mayor resistencia a la inactivación del mutante respecto del virus parental. En el ensayo realizado con el virus purificado a 42°C las tasas de inactivación son similares pero también hay que tener en cuenta que en este caso se dispone de un único experimento para evaluar la posible diferencia. Por tanto, independientemente la temperatura del ensayo, los datos en su conjunto indican una termoestabilidad frente a la inactivación de su infectividad algo mayor para el mutante A2065H que para el virus parental.

El mutante A2065K se ensayó sin purificar y a 42°C. En estas condiciones, y a diferencia del mutante A2065H ensayado en las mismas condiciones, A2065K no resultó significativamente más estable que el parental frente a la inactivación, sino incluso ligeramente menos estable (**Tabla 8**). Por ello, se decidió no realizar más estudios de inactivación con este mutante, y proseguir únicamente con los mutantes A2065H y D3069E/T2188A.



**Figura 16. Cinéticas de inactivación térmica del mutante A2065H.** Se muestran las cinéticas obtenidas a 42°C (A y C) o a 4°C (B y D), con el virus crudo (A y B) o después de ser sometido a purificación (C y D). En todos los casos se ensayaron en paralelo el mutante (cuadrados) y el virus parental como control (círculos). Las cinéticas de inactivación se obtuvieron con el virus sin diluir como se indica en el apartado 3.12.2. y la caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden como se indica en el apartado 13.12.3. Los datos se han normalizado y se indican como porcentaje de la infectividad remanente respecto del tiempo 0 en una escala logarítmica en función del tiempo de incubación. Para el virus no purificado y ensayado a 42°C (A) se muestran las cinéticas de los mutantes A2065K y A2065H, correspondiendo los valores medios y las barras de error de este último a la media de dos experimentos independientes. Asimismo en el virus control se indican los valores medios y las barras de error de las tres cinéticas.

**Tabla 8. Constantes de inactivación térmica de los mutantes A2065K y A2065H y del control no mutado**

T(°C) <sup>a</sup>	Purificación virus <sup>b</sup>	wt		Mutante A2065H		Mutante A2065K	
		<i>k</i> (min <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	n <sup>d</sup>	<i>k</i> (min <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	n <sup>d</sup>	<i>k</i> (min <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	n <sup>d</sup>
42	Crudo	0,029 ± 0,013	58	0,019 ± 0,004	3	0,028 ± 0,015	2
		<i>0,039 ± 0,007</i>	5	<i>0,027 ± 0,005</i>	3	--	--
		<i>0,046</i>	1	--	--	<i>0,048</i>	1
	Puro	0,016 ± 0,002	2	0,019	1	ND	ND
4	Crudo	1,55.10 <sup>-4</sup> ± 1,4.10 <sup>-5</sup>	4	1,31.10 <sup>-4</sup> ± 1,77.10 <sup>-5</sup>	2	ND	ND
	Puro	9.10 <sup>-5</sup> ± 3,1.10 <sup>-6</sup>	2	5,53.10 <sup>-5</sup>	1	ND	ND

<sup>a</sup> Temperatura a la que se calentó el virus durante el ensayo.

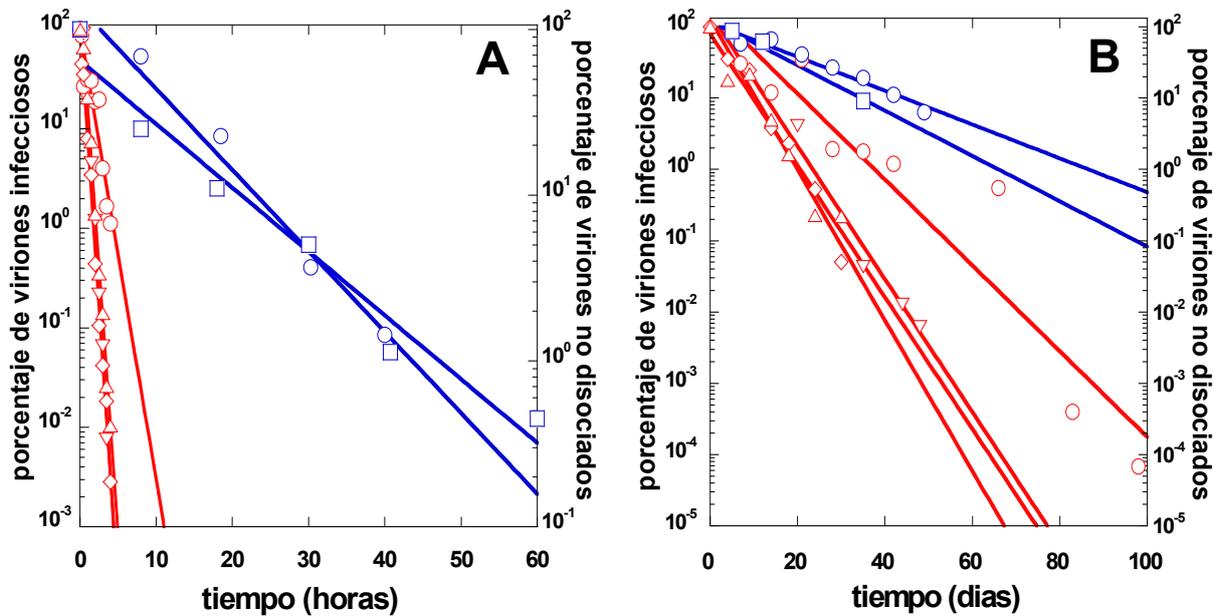
<sup>b</sup> Se indica si el virus fue o no sometido a purificación.

<sup>c</sup> Constantes de inactivación térmica del virus parental y del mutante obtenidas de las cinéticas de inactivación térmica partiendo i) del virus diluido a 100PFU (apartado 3.12.1., números no en cursiva) en cuyo caso la caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden que tienden a 0 a tiempo infinito, como se indica en el apartado 13.12.3. ii) del virus sin diluir (apartado 13.12.2., números en cursiva), en cuyo caso la caída del título viral se ajustó a curvas de decaimiento exponencial de primer orden como se indica en el apartado 13.12.3. En los casos indicados se da la media ± desviación estándar correspondiente a varios experimentos independientes.

<sup>d</sup> Se indica el número de experimentos independientes realizados.

#### 4.2.3.2. Estudio de la relación entre inactivación de la infectividad y disociación de viriones de VFA por acción del calor

Los resultados preliminares obtenidos hasta el momento con el mutante D3069E/T2188A (el único que había sido sometido a ensayos de disociación) indicaban que podía conseguirse un incremento en la estabilidad térmica del virión de VFA frente a su disociación en pentámeros, sin que necesariamente ocurra un incremento de su estabilidad frente a la inactivación térmica de su infectividad. Esto no sería posible si, como habíamos asumido anteriormente en base a algunas observaciones indirectas previas, en nuestras condiciones de ensayo la inactivación térmica de las partículas infectivas de VFA estuviese siendo causada directamente por su disociación a pentámeros. Decidimos por tanto establecer definitivamente cuál era el caso, mediante la realización de los experimentos apropiados. Para ello utilizamos viriones de VFA C-S8 (no mutado), que fueron marcados radiactivamente y purificados tal y como se indica en el apartado 3.10. Alícuotas de viriones purificados se incubaron a 4°C o a 42°C, y las constantes de disociación a pentámeros a ambas temperaturas fueron determinadas midiendo directamente la fracción de viriones remanentes tras distintos tiempos de incubación, tal y como se indica en el apartado 3.13. Paralelamente, otras alícuotas de esta misma preparación de viriones fueron utilizadas en ensayos de inactivación térmica de la infectividad a 4°C o a 42°C, y las constantes de inactivación térmica a ambas temperaturas fueron determinadas como se ha indicado en el apartado anterior. Las curvas de disociación e inactivación (**Figura 17**) y las correspondientes constantes de velocidad se compararon directamente. Los resultados obtenidos se confirmaron en otros experimentos realizados con otras preparaciones, de manera independiente.



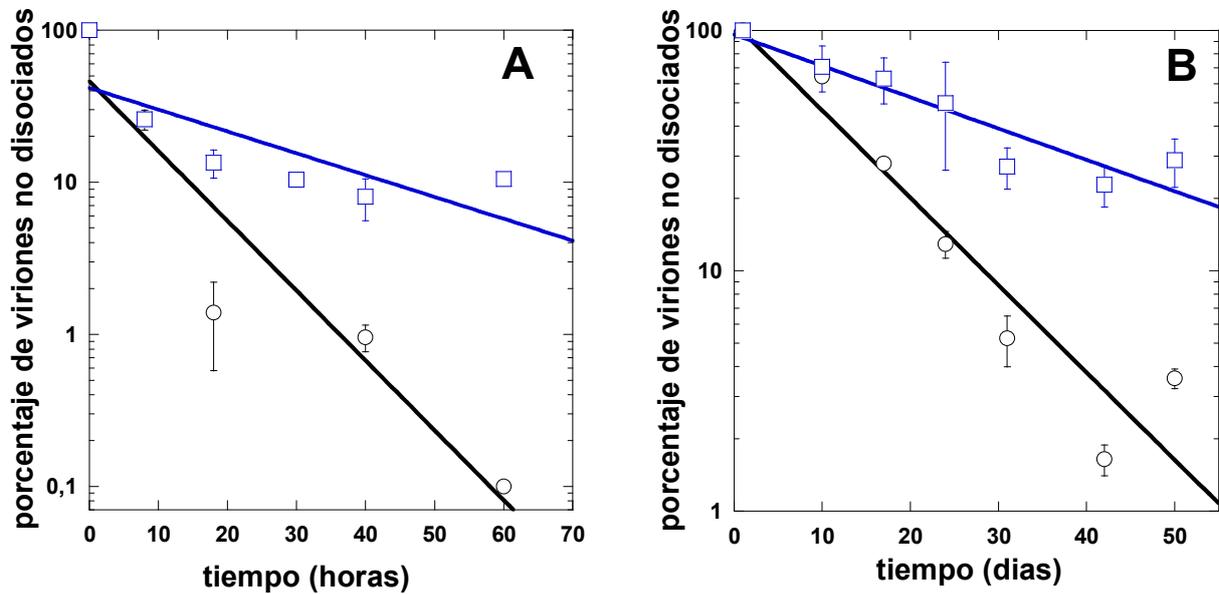
**Figura 17. Comparación entre las cinéticas de inactivación y disociación de VFA C-S8c1.** Se muestran las cinéticas obtenidas a 42°C (A) o a 4°C (B). En ambos paneles: i) en el eje de ordenadas izquierdo se indica el porcentaje de viriones infecciosos (rojo) obtenido usando tres preparaciones independientes de virus crudo (rombos, triángulos y triángulos invertidos) o una preparación de virus purificado (círculos); ii) en el eje de ordenadas derecho se indica el porcentaje de viriones no disociados (azul) obtenido usando dos preparaciones independientes de virus puro (círculos y cuadrados). La misma preparación de virus purificado se usó para obtener las curvas de inactivación y disociación representadas por círculos. Todas las cinéticas se ajustaron a curvas de decaimiento exponencial de primer orden como se indica en el apartado 13.12.3. Los datos se han normalizado y se indican en una escala logarítmica en función del tiempo de incubación.

Los resultados revelaron que tanto a 42°C (Figura 17A) como a 4°C (Figura 17B), los viriones purificados se inactivaban mucho más rápidamente que se disociaban en subunidades. Por tanto, los fenómenos de inactivación y disociación térmica del virión de VFA no ocurren a la vez, sino que se trata de procesos independientes con constantes de velocidad muy diferentes entre sí, en un amplio rango de temperaturas que alcanzan al menos los 42°C. En estas condiciones, el evento limitante en el proceso de pérdida de infectividad no es la disociación de la cápsida, sino que esa pérdida de infectividad ocurre en la partícula aún no disociada. La comparación entre inactivación y disociación realizada previamente en el laboratorio, en la que se obtuvieron constantes de velocidad similares para ambos procesos, fue realizada a una temperatura más elevada, 50°C. A esta temperatura el mayor incremento en la velocidad del proceso de disociación con respecto a la del proceso de inactivación hace que la disociación se acerque al punto de ser el proceso limitante de la inactivación del virión. Estas observaciones implican que para medir la estabilidad física de las partículas víricas frente a la acción del calor es necesario determinar directamente su cinética de disociación a subunidades (pentámeros).

#### 4.2.3.3. Análisis de disociación térmica de viriones modificados

Para el análisis de la disociación térmica de viriones modificados se emplearon preparaciones purificadas de virus marcado radiactivamente, y el análisis se realizó incubando tanto a una temperatura moderada (42°C), la cual podría ser alcanzada en caso de fallo en la cadena de frío durante el transporte, como a una temperatura baja (4°C), que simularía las condiciones en las cuales se mantiene la vacuna refrigerada.

**Mutante de puente salino D3069E/T2188A:** Los resultados obtenidos con viriones marcados radiactivamente y purificados se indican en la **Figura 18**.

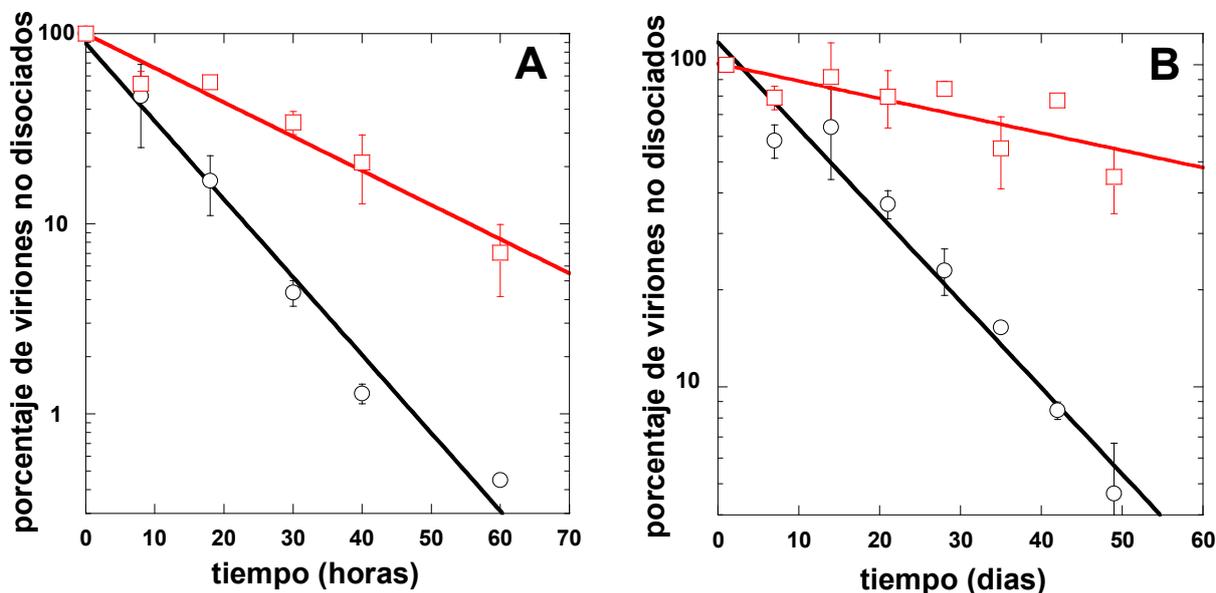


**Figura 18. Cinéticas de disociación térmica del doble mutante D3069E/ T2188A.** Se muestran las cinéticas de disociación a pentámeros de la cápsida del virus purificado obtenidas a 42°C (A) o a 4°C (B). En todos los casos se ensayaron en paralelo el mutante (cuadrados) y el virus parental como control (círculos). Los datos se obtuvieron como se indica en el apartado 3.13 y se ajustaron a curvas de decaimiento exponencial de primer orden como se indica en el apartado 13.12.3. Los datos se han normalizado y se indican como el porcentaje de partículas víricas intactas remanentes respecto del tiempo 0 en una escala logarítmica en función del tiempo de incubación. En ambos paneles se indican los valores medios y las barras de error (desviaciones estándar) correspondientes a dos medidas independientes. Ensayos realizados en el laboratorio por V. Rincón con una preparación independiente de D3069E/T2188A y su control no mutado rindieron resultados similares (no mostrado).

El mutante D3069E/T2188A resultó ser mucho más estable frente a la disociación térmica que el virus parental, no solo a 4°C (como indicaban los resultados preliminares obtenidos con anterioridad) sino también a 42°C. A 4°C la tasa media de disociación del mutante fue  $k_{mut} = 0.030$  días<sup>-1</sup> frente a la tasa media de disociación del virus parental que fue  $k_{mut} = 0.084$  días<sup>-1</sup>. A 42°C la tasa media de disociación del mutante fue  $k_{mut} = 0.033$  h<sup>-1</sup>, frente a la tasa media de disociación del virus parental que fue  $k_{wt} = 0.106$  h<sup>-1</sup>.

Estos resultados han sido confirmados recientemente por V. Rincón en nuestro laboratorio, utilizando preparaciones independientes de virus mutante y parental purificados, dentro de un estudio encaminado a entender las causas moleculares de la termoestabilización de este virus modificado.

**Mutante A2065H:** Para el análisis de disociación a pentámeros se emplearon viriones marcados radiactivamente y purificados, y el análisis se realizó igualmente tanto a 42°C como a 4°C. Los resultados se indican en la **Figura 19**.



**Figura 19. Cinéticas de disociación térmica del mutante A2065H.** Se muestran las cinéticas de disociación a pentámeros de la cápsida del virus purificado obtenidas a 42°C (A) o a 4°C (B). En todos los casos se ensayaron en paralelo el mutante (cuadrados) y el virus parental como control (círculos). Los datos se obtuvieron como se indica en el apartado 3.13. y se ajustaron a curvas de decaimiento exponencial de primer orden como se indica en el apartado 13.12.3. Los datos se han normalizado y se indican como el porcentaje de partículas víricas intactas remanentes respecto del tiempo 0 en una escala logarítmica en función del tiempo de incubación. En ambos paneles se indican los valores medios y las barras de error (desviaciones estándar) correspondientes a dos medidas independientes. Ensayos realizados en el laboratorio por V. Rincón con una preparación del mutante A2065H clonado independientemente y su control no mutado rindieron resultados similares (no mostrado).

El mutante A2065H resultó ser, como el mutante D3069E/T2188A, mucho más estable frente a la disociación térmica que el virus parental, tanto a 4°C como a 42°C. A 4°C la tasa media de disociación del mutante fue  $k_{mut} = 0,012 \text{ días}^{-1}$  frente a la tasa media de disociación del virus parental que fue  $k_{wt} = 0.063 \text{ días}^{-1}$ . A 42°C la tasa media de disociación del mutante fue  $k_{mut} = 0.041 \text{ h}^{-1}$  frente a la tasa media de disociación del virus parental que fue  $k_{wt} = 0.094 \text{ h}^{-1}$ .

De nuevo, estos resultados han sido reproducidos en el laboratorio por V. Rincón en experimentos independientes y utilizando preparaciones del virus mutante y del parental procedentes de un clonaje distinto.

#### 4.2.3.4. Análisis de la estabilidad genética de viriones modificados

Resultaba de interés averiguar si los virus modificados termoestables D3069E/T2188A y A2065H son asimismo genéticamente estables. Además de su interés básico para analizar la posible relación inversa entre estabilidad de la cápsidas víricas e infectividad, una cierta estabilidad genética es un requisito necesario para la eventual utilización de estos mutantes termoestables (u otros similares) como base de vacunas contra la fiebre aftosa que presenten una mayor estabilidad, objetivo biotecnológico último de estos estudios.

**Mutante D3069E/T2188A:** Se realizaron dos series paralelas de ocho pases en cultivos celulares para, tras algunos de los pases, secuenciar el genoma consenso de la población resultante. Tras el pase 3 se secuenció la región de la cápsida completa, tras los pases 5 y 8 sólo se secuenció una parte de la región de la cápsida. Durante los ocho pases, las dos mutaciones se mantuvieron y no se encontraron mutaciones acompañantes (resultados no mostrados).

**Mutante A2065H:** Se realizaron dos series paralelas de diez pases en cultivos celulares para, tras los pases 4, 6 y 10, secuenciar parcialmente el genoma consenso de la población resultante. Después de los cuatro primeros pases la mutación se mantenía en ambas series. Además se apreció que una pequeña proporción de la población vírica habría adquirido la mutación H2065P y una segunda mutación acompañante, V2107I en un residuo espacialmente muy cercano a la mutación original. Sin embargo, la mutación original A2065H se mantuvo presente en un elevado porcentaje de los virus en las poblaciones obtenidas, incluso tras los diez pases de amplificación (resultados no mostrados).

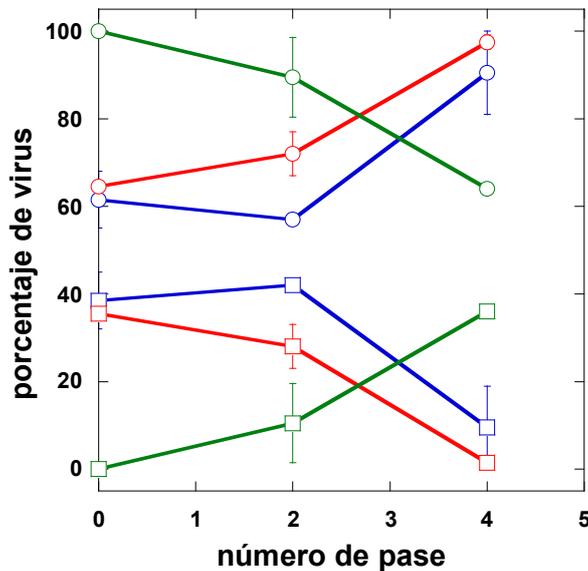
Por tanto los VFA modificados D3069E/T2188A y A2065H son por lo menos suficientemente estables para poder ser considerados como semilla para la producción de vacuna contra la fiebre aftosa de estabilidad incrementada, ya que ambos mantienen las mutaciones los pases suficientes como para realizar una amplificación a muy gran escala.

#### 4.2.3.5. Análisis de la eficacia biológica de viriones modificados

Dentro de un estudio en curso para determinar si existe una relación inversa entre estabilidad frente a la disociación del virión e infectividad, y hasta qué punto puede ser limitante esta posible relación para la ingeniería de virus de mayor termoestabilidad, consideramos muy interesante comparar la eficacia biológica de los mutantes de termoestabilidad incrementada D3069A/T2188A y A2065H con respecto al virus parental. Para ello se realizaron experimentos de competición tal y como se indica en el apartado 3.14. (Martínez *et al.*, 1991; Domingo y Holland, 1997; Domingo *et al.*, 1999; Mateo *et al.*, 2007). La proporción de una mutación en la población resultante tras una serie de pases se estimó mediante la comparación de los picos en densitogramas de secuenciación de gran calidad técnica.

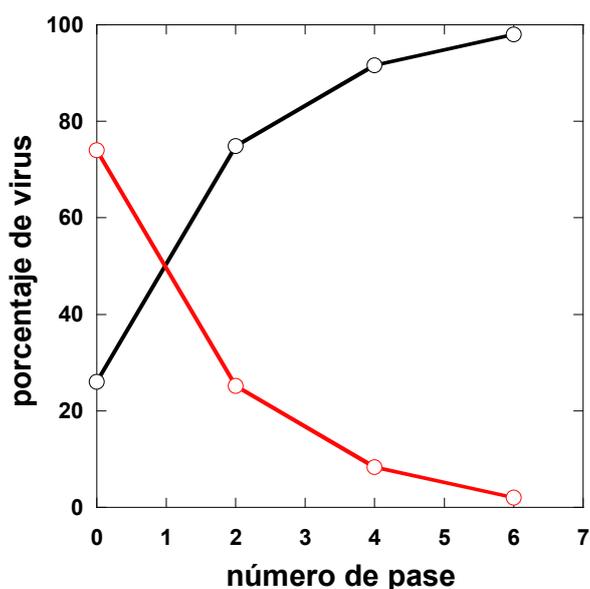
**Mutante D3069E/T2188A:** Una mezcla de cantidades similares de viriones mutante y no mutado se pasó en serie y por duplicado en células en cultivo cuatro veces, para posteriormente secuenciar parcialmente (aproximadamente la cuarta parte de la región de la cápsida) el genoma de la población resultante. Comprobamos que, al tercer pase las dos mutaciones originales habían desaparecido casi por completo de la secuencia de la población. Además en el segundo pase apareció la mutación acompañante A3125V en aproximadamente un quinto de la población, y tras el

cuarto pase esta mutación se encontró presente en aproximadamente dos quintos de la población (**Figura 20**). Dado que no se secuenció la cápsida completa, es posible que hayan aparecido otras mutaciones secundarias.



**Figura 20. Ensayos de competición entre VFA C-S8c1 y el mutante D3069E/T2188A.** Se muestra la proporción estimada en la población de viriones progenie de los amonácidos E (cuadrados) ó D (círculos) en la posición 3069 (azul); de los amonácidos A (cuadrados) ó T (círculos) en la posición 2188 (rojo); y de los aminoácidos V (cuadrados) ó A (círculos) en la posición 3025 (verde). Los datos se obtuvieron a partir de los densitogramas de secuenciación de cada población vírica analizada. En todos los casos se muestran los valores medios y las barras de error correspondientes a las dos series de pases realizadas en paralelo.

**Mutante A2065H:** Una mezcla de cantidades similares de viriones mutante y no mutado se pasó en serie y por duplicado en células en cultivo seis veces, para posteriormente secuenciar parcialmente (aproximadamente la cuarta parte de la región de la cápsida) el genoma de la población resultante. A pesar de que al iniciar el experimento la cantidad de mutante resultó un poco superior a la del virus no mutado, comprobamos que tras el segundo pase la mutación original se encontraba presente en aproximadamente un cuarto de la población, y había desaparecido casi completamente en el sexto pase (**Figura 21**). No se detectaron mutaciones secundarias, aunque siempre es posible que se impusiera alguna en la región no secuenciada



**Figura 21. Ensayos de competición entre VFA C-S8c1 y el mutante A2065H.** Se muestra la proporción estimada en la población de viriones progenie de los amonácidos A (negro) ó H (rojo) en la posición 2065. Los datos se obtuvieron a partir de los densitogramas de secuenciación de cada población vírica analizada. Se muestran los valores medios y las barras de error correspondientes a las dos series de pases realizadas en paralelo.

En resumen, ambos mutantes de termoestabilidad incrementada presentan una cierta desventaja biológica frente al virus parental.

### 4.3. Estudio sistemático de la respuesta genética de VFA como respuesta a la introducción de mutaciones deletéreas en las interfases interpentaméricas

#### 4.3.1. Diseño experimental

Como ya se ha mencionado, con anterioridad a este estudio el Dr. R. Mateo había llevado a cabo en nuestro laboratorio un análisis mutacional sistemático de las interfases entre subunidades pentaméricas en el virión de VFA C-S8c1. Los resultados de transfecciones únicas con cada mutante mostraron que la mutación individual a alanina de 28 de los 42 residuos de cada protómero de la cápsida de VFA implicados en interacciones entre subunidades pentaméricas es particularmente deletérea para el virus, ya que: i) con 16 mutantes no se obtuvo progenie viral detectable; ii) con 7 mutantes se obtuvo un título muy bajo (alrededor del 0,01% del título del virus parental), que aumentó sólo hasta cierto punto a tiempos largos post-transfección; en alguno de estos casos se observaron fortuitamente, en la secuencia parcial obtenida de la progenie, mutaciones secundarias en la cápsida; iii) con los restantes 5 mutantes se observó una reversión genotípica o la adquisición de una mutación distinta en el mismo codón de la mutación original (pseudoreversión), probablemente en respuesta a un efecto letal de la mutación original (Mateo *et al.*, 2003; Mateo, 2004).

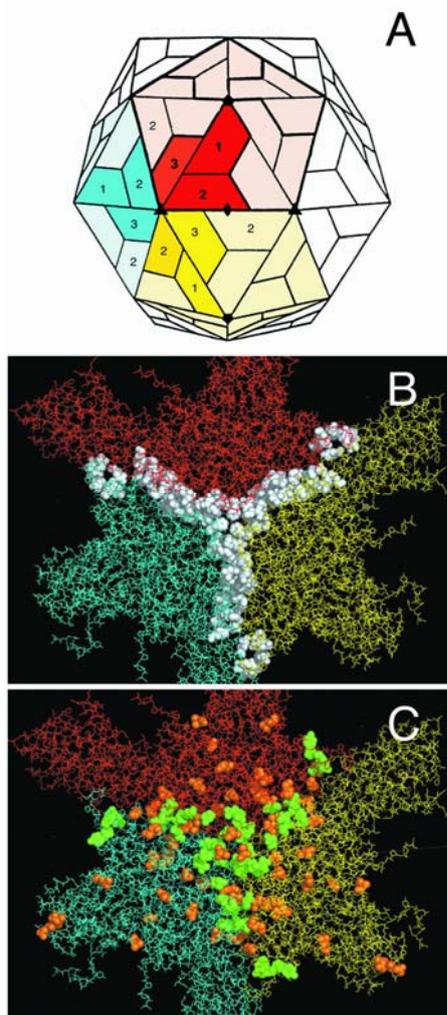
Estas observaciones preliminares nos han llevado a explorar, de una manera sistemática, la frecuencia, tipos y patrones de mutaciones compensatorias que pueden ocurrir en la cápsida de VFA en respuesta a la introducción de sustituciones intrínsecamente deletéreas de residuos funcionalmente críticos localizados en las interfases interpentaméricas. Para ello, hemos utilizado una colección de 28 mutantes sencillos derivados de C-S8c1 que contienen, en conjunto, cada una de las 28 mutaciones a alanina en la interfase entre pentámeros que resultaron deletéreas (**Figuras 22A y 22B**). Además hemos construido y utilizado en este estudio algunos otros variantes con mutaciones potencialmente deletéreas en la interfase entre pentámeros.

La aproximación seguida consistió en dar a cada uno de esos virus con mutaciones deletéreas la oportunidad de recuperar su viabilidad, bien mediante reversión genotípica, pseudoreversión, o adquisición de mutaciones adicionales capaces de restaurar la viabilidad. Para ello utilizamos el ARN genómico de cada mutante, obtenido a partir del correspondiente clon infeccioso, para realizar varias transfecciones independientes de células susceptibles a la infección por VFA. Muchas de las poblaciones progenie obtenidas se sometieron a amplificación mediante la realización de uno o varios pases en cultivos celulares. En los casos en los que no se detectaron virus tras la transfección, se realizaron dos o tres pases en ciego. Partes de este trabajo, en especial el análisis de secuenciación, se realizaron con la eficaz ayuda de A. Rodríguez de nuestro laboratorio.

En total, se realizaron 96 experimentos con 39 mutantes diferentes. La presencia o ausencia de la mutación original en la secuencia consenso de la población vírica obtenida al final de cada experimento se determinó mediante secuenciación de nucleótidos de la región de la mutación. Si la mutación original no había revertido al nucleótido parental, se determinó la secuencia de nucleótidos consenso de toda la región de la cápsida, para identificar cualquier mutación secundaria que pudiera haber aparecido en la población en esta región. Los resultados obtenidos previamente en el laboratorio sugerían que el efecto deletéreo de al menos una buena parte de las mutaciones

ensayadas, localizadas en las interfases entre intermediarios de ensamblaje, podría ser debido a deficiencias en el ensamblaje o estabilidad de la cápsida (Mateo *et al.*, 2003, Mateo, 2004). Por lo tanto, era de esperar que las mutaciones responsables de devolver al virus su funcionalidad ocurrieran en la región de la cápsida y dieran lugar a sustituciones de aminoácidos en la misma (ver más adelante).

Era importante excluir la posibilidad de que las mutaciones secundarias que pudiéramos encontrar en la secuencia consenso de las poblaciones víricas recuperadas fueran mutaciones neutrales fijadas mediante deriva genética durante los múltiples ciclos de replicación del ARN vírico en las células. Con este objetivo, utilizamos el ARN derivado del clon infeccioso del VFA parental (sin mutaciones introducidas) para realizar cuatro transfecciones independientes, respectivamente seguidas por 3, 5, 6 o 18 pases independientes en cultivos celulares. Al final de cada experimento la región de la cápsida se secuenció completamente (excepto en los experimentos que implicaron 3 o 18 pases, en los que se secuenció un tercio o un quinto de la región de la cápsida, respectivamente). No se encontraron mutaciones con sentido erróneo, y únicamente se encontró una mutación sin sentido (codón 3115), en un único experimento a las 118 hpt. Además, en otros experimentos que implicaron muchos ciclos de multiplicación del virus modelo C-S8c1, nunca o muy raramente se encontraron mutaciones en la secuencia consenso de las poblaciones progenie. Por tanto, todas o la casi totalidad de las mutaciones secundarias que pudiéramos encontrar en los mutantes analizados, se habrían fijado en respuesta a la mutación introducida.



**Figura 22. Sustituciones primarias y secundarias en la cápsida de VFA.** **A)** Esquema de la estructura cuaternaria de la cápsida. Cada subunidad protomérica está representada por un trapecoide. Los números 1, 2 y 3 señalan las proteínas de la cápsida VP1, VP2, y VP3 respectivamente. Los pentágonos, triángulos y elipses en negro indican la posición en la cápsida de los ejes de simetría 5x, 3x y 2x, respectivamente. Tres subunidades protoméricas, que pertenecen cada una de ellas a una subunidad pentamérica distinta, aparecen alrededor de un eje 3x coloreadas en rojo, amarillo y azul intensos, respectivamente. Los tres pentámeros adyacentes a los que pertenecen los tres protómeros señalados, aparecen coloreados débilmente en rojo, amarillo y azul, claros, respectivamente. **(B, C)** Sustituciones primarias y secundarias sobre un modelo parcial de la estructura de la cápsida de FMDV C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994). La imagen representa tres protómeros que pertenecen a tres pentámeros adyacentes, equivalentes a los esquematizados en el panel (A) (colores intensos) más una subunidad VP2 (igualmente señalada en (A)) de cada uno de los tres pentámeros. En el centro de la imagen aparece uno de los ejes de simetría 3x coloreado como en el panel (A). El código de colores es como en el panel (A) y las interfases entre los tres pentámeros aparecen definidas por los límites entre los diferentes colores. En **(B)**, los residuos interfásicos en los que se han introducido sustituciones deletéreas aparecen señalados en color blanco. En **(C)**, los residuos de la cápsida en donde han aparecido sustituciones secundarias fijadas total o parcialmente en la progenie viral aparecen señalados en color verde para los 13 residuos donde aparecieron sustituciones secundarias dominantes, y en color naranja para los residuos donde aparecieron sustituciones terciarias no dominantes en la población.

### 4.3.2. Comparación de la frecuencia de reversión genotípica y de mutación compensatoria como alternativas para restaurar la infectividad en los mutantes analizados

En la naturaleza, las sustituciones de aminoácido que requieren un evento mutacional único (un único cambio de nucleótido) se ven probabilísticamente muy favorecidas con respecto a aquellas que requieren dos eventos mutacionales. Por ello, nos centramos en primer lugar en un subconjunto de 11 de los 28 residuos críticos en las interfases interpentaméricas, aquellos cuya mutación a alanina requirió un único cambio de nucleótido. En esta situación, el virus podría evitar el efecto deletéreo de la mutación introducida no sólo mediante pseudoreversión o mutación compensatoria, sino sencillamente mediante reversión al genotipo original.

Con estos 11 mutantes a alanina realizamos un total de 28 experimentos (**Tabla 9**), obteniendo en 26 de ellos un e.c.p. comparable al del fenotipo parental. Además los únicos dos mutantes (E2213A y S2024A) que no dieron progenie tras una transfección particular, sí rindieron e.c.p. normal en otras transfecciones. Por lo tanto, la totalidad de estos 11 mutantes deletéreos, cuando se les da la oportunidad, son capaces de recuperar la infectividad y alcanzar títulos similares al del virus parental. Los resultados obtenidos en la secuenciación de las poblaciones de virus progenie obtenidas (**Tabla 9**) muestran que la reversión genotípica no fue el fenómeno que ocurrió con más frecuencia en estas poblaciones. La recuperación de la infectividad se debió a reversión en únicamente 10 de los 26 experimentos, correspondientes a 5 de los 11 mutantes analizados. En los restantes 16 experimentos, correspondientes a 8 de los 11 mutantes, la mutación deletérea original se conservó (en un caso, como mezcla con el genotipo revertiente). Para dos de estos 8 mutantes (E2011A y T2026A) no se encontró ninguna otra mutación en toda la región de la cápsida (ver la Discusión). Para los otros 6 mutantes, la recuperación de la infectividad vino asociada con la fijación en la población de una (o ocasionalmente más de una) sustitución secundaria de aminoácido que implicó un único evento mutacional (**Tabla 9**). No se encontró una correlación clara entre el tipo de mutación primaria (transición o transversión) y el resultado (reversión o compensación). Las mutaciones secundarias dominantes implicaron transición o transversión, sin que se detectara ninguna tendencia en este sentido. En resumen, aunque la reversión genotípica habría requerido igualmente un evento mutacional único, la fijación de mutaciones secundarias compensatorias resultó ser el mecanismo más frecuente por el que estos virus restauraron su función e infectividad.

**Tabla 9. Mutaciones compensatorias aparecidas en la cápsida de VFA en respuesta a la introducción de sustituciones deletéreas que implican un cambio de nucleótido**

Experimento	Mutación original <sup>a</sup>	Cambios de nucleótido	Número de pases post -transf.	Mutaciones adquiridas en la población final <sup>a</sup>	Tipo de mutación adquirida	Localización de las sustituciones secundarias <sup>b</sup>
1	E2011A	1	1			
2	E2011A	1	1			
3	T2022A	1	2	A2022T	Reversión	
4	S2024A	1	3	Letal		
5	S2024A	1	1	T2188S	Sust. secund.	III
6	T2026A	1	0			
7	T2026A	1	1			
8	T2026A	1	1	V3215G (4:1) <sup>c</sup> (1116) (3:1)	Sust. secund. Silenciosa	III
9	E2108A	1	0	T2053S (1:1)	Sust. secund.	II
10	E2108A	1	1	N2019H (4009) (3:1)	Sust. secund. Silenciosa	I
11	E2108A	1	0	N2019H E3146D (2:1) (2104) (4:1)	Sust. secund. Sust. secund. Silenciosa	I I
12	T2110A	1	1	A2110T (1:1) T2188S (2:3) (2192) (3:1)	Reversión Sust. secund. Silenciosa	III
13	T2110A	1	1	T2188S (1:2) V2199L (2:1)	Sust. secund. Sust. secund.	III I
14	T2110A	1	0	T2188S (3:4) L2125F (1:1)	Sust. secund. Sust. secund.	III III
15	T2110A	1	2	T2189P	Sust. secund.	II
16	V2112A	1	1	T2188A (1:5)	Sust. secund.	III
17	E2213A	1	0	Letal		
18	E2213A	1	1	A2213E	Reversión	
19	E2213A	1	2	N2019H (1:3) K2088T (2:1) T3190P (3:1)	Sust. secund. Sust. secund. Sust. secund.	I I II
20	D3069A	1	0	A3069D (3065)	Reversión Silenciosa	
21	D3069A	1	1	A3069D	Reversión	
22	D3069A	1	1	A3069D	Reversión	
23	D3069A	1	2	A3069D	Reversión	
24	E3146A	1	1	A3146E	Reversión	
25	E3146A	1	1	A3146E	Reversión	
26	E3146A	1	1	A3146E	Reversión	
27	E3146A	1	2	A2192V P2150S	Sust. secund. Sust. secund.	II II
28	T3190A	1	1	A3190T	Reversión	
29	T2022G	2	0	T2188S (2:3) T2191A (2:1)	Sust. secund. Sust. secund.	III II
30	D3069A	2	1	A3069T K2198E	Forward Sust. secund.	I
31	T3190F	2	0	F3190I	Forward	

<sup>a</sup> Se indica la sustitución de aminoácido correspondiente en la cápsida de VFA. Los números entre parentesis indican que ocurrió una mutación silenciosa en el codon especificado.

<sup>b</sup> La localización de las sustituciones secundarias, o patrón (I, II o III) identifica la relación espacial existente entre las posiciones del residuo originalmente mutado y del residuo en donde apareció la sustitución secundaria. I, los residuos están muy cercanos o contactan; II, los residuos están separados pero el residuo en donde aparece la sustitución secundaria está cerca de o en las interfases interpentaméricas; III, los residuos están separados, y además el residuo en donde aparece la sustitución secundaria está también lejos de las interfases interpentaméricas (ver Fig. 23)

<sup>c</sup> El cociente entre paréntesis indica la proporción aproximada en la población entre el residuo original y el residuo introducido en respuesta a una mutación primaria. Este cociente se estimó a partir de los densitogramas de secuenciación. Por ejemplo, V3215G (4:1) indica que la proporción de valina y glicina en la posición 3215 es, aproximadamente de 4/ 5 y 1/ 5, respectivamente. Si no se indica ningún cociente es que la mutación está presente en aproximadamente el 100% de los genomas que constituyen la población.

En casos muy raros (mutante D3069A) siempre ocurrió una reversión al aminoácido original. Nos preguntamos si, incluso para estos casos extremos, era factible la aparición de mutaciones compensatorias como alternativa a la reversión. Para ello construimos tres mutantes con una sustitución de aminoácido que en cada caso implicaba dos cambios de nucleótido, en tres posiciones de las interfases interpentaméricas para las que sólo se había observado reversión genotípica. En los tres nuevos mutantes (T2022G, T3190F y D3069A), la reversión al aminoácido original requeriría dos eventos mutacionales en el mismo codón, en lugar de sólo uno. Tras la transfección y el pase en cultivos de células se observó e.c.p. en los tres casos. La secuenciación de toda la región de la cápsida mostró que no había ocurrido reversión y que, en cada caso, la recuperación de la infectividad podía asociarse a una seudoreversión y/o a sustituciones secundarias en la cápsida, cada una de ellas producida por un único cambio de nucleótido (**Tabla 9**). Por lo tanto, también la barrera genética a la reversión fenotípica que introdujimos en estos casos más favorables a la reversión pudo ser superada por el virus mediante un mecanismo basado en mutaciones compensatorias.

En conclusión, aun en los casos en los que tanto la reversión como la mutación compensatoria requerirían únicamente de un cambio de nucleótido, la estrategia a la que el virus recurre más frecuentemente para recuperar la viabilidad, al menos en el modelo analizado, es la aparición de sustituciones secundarias, y no la reversión genotípica.

#### **4.3.3. Análisis de la mutación compensatoria como un mecanismo general para restaurar el efecto deletéreo causado por la eliminación de grupos funcionales implicados en interacciones entre pentámeros en el virión de VFA**

A continuación evaluamos si la adquisición de mutaciones secundarias compensatorias era accesible al virus como estrategia para anular o reducir el efecto deletéreo de una sustitución de aminoácido en cualquiera de las 28 posiciones funcionalmente críticas presentes en las interfases entre pentámeros. Además, mediante un análisis sistemático de muchas posiciones en las interfases, en experimentos repetidos para cada posición, esperábamos ser capaces de identificar posibles patrones en los tipos de mutaciones compensatorias adquiridas, así como los lugares de la cápsida donde pueden ocurrir estas mutaciones.

Además de recoger los resultados del análisis indicado en el apartado anterior con 11 residuos críticos en las interfases entre pentámeros, nos centramos ahora en el subconjunto de los 17 residuos críticos restantes. La mutación a alanina de estos 17 residuos requirió de dos cambios de nucleótido, por lo que estos casos la reversión se encontraría seriamente dificultada. Por tanto, la aparición de virus progenie tras la transfección (y en su caso la amplificación del virus en cultivos celulares) implicaría muy probablemente una seudoreversión o una mutación secundaria compensatoria en el genoma. Con esta aproximación evitábamos el tiempo y esfuerzo necesarios para secuenciar poblaciones que fueran el resultado de reversión genotípica, y que no aportarían información relevante a esta parte de nuestro estudio.

A estos 17 mutantes a alanina sumamos un mutante interfásico adicional algo menos deletéreo con una sustitución, R3120A, que requería asimismo dos cambios de nucleótido. Con este conjunto de 18 mutantes realizamos un total de 51 experimentos (**Tabla 10**). En 29 de estos experimentos, correspondientes a 12 de los 18 mutantes, obtuvimos un e.c.p. comparable al del fenotipo parental. Para una mayoría (8) de estos 12 mutantes, se observó un fuerte e.c.p. en cada experimento en que se utilizaron; para el resto (4 mutantes) se observó en algunos experimentos, aunque no en todos. Únicamente para 6 de los 18 mutantes no se obtuvo progenie viral detectable. En todos (excepto uno) de estos últimos casos sólo se realizaron uno o dos experimentos, mientras que con la mayoría de los restantes mutantes se realizaron tres o más experimentos. Por tanto, la proporción de mutaciones deletéreas en las interfases y con efectos que pueden ser susceptibles de compensación, podría ser incluso mayor que la encontrada en este estudio.

La secuenciación de toda la región de la cápsida de las poblaciones obtenidas demostró que no había ocurrido una reversión genotípica en ninguno de los 29 experimentos que rindieron virus viables. En únicamente 6 casos (21%) de los experimentos, correspondientes a 3 mutantes distintos, la recuperación se debió a pseudoreversión a través de un único cambio de nucleótido en el codón original, lo que se tradujo en la incorporación de un aminoácido diferente en la posición originalmente mutada.

En dos experimentos, correspondientes a una de las dos y una de las tres transfecciones realizadas con los mutantes R2018A y K3118A respectivamente, la mutación deletérea original se conservó sin que apareciera en la región de la cápsida ninguna otra sustitución acompañante.

En la gran mayoría (21 de los 29 casos (72%) correspondientes a 11 mutantes distintos de los 18 totales analizados, la recuperación pudo asociarse a la fijación en la población de una (a veces más de una) sustitución secundaria compensatoria que implicó, asimismo, un único evento mutacional (**Tabla 10**).

Teniendo en cuenta tanto los resultados descritos en el apartado anterior con un subconjunto de 11 mutantes, como los descritos en este apartado con otros 17 mutantes, podemos concluir que el efecto deletéreo de sustituciones a alanina en al menos 80% de las 28 posiciones más críticas en las interfases entre pentámeros en la cápsida de VFA C-S8c1 puede ser evitado por el virus sin necesidad de reversión genotípica. En la gran mayoría (91%) de estos casos, el efecto se debió a la fijación de una sustitución compensatoria (o, menos frecuentemente, más de una) en un segundo residuo de la cápsida. En conclusión, los resultados demuestran que VFA puede utilizar la estrategia de mutación compensatoria para restaurar la infectividad perdida por mutación (a alanina) de casi cualquiera de los residuos críticamente implicados en interacciones entre subunidades pentaméricas de la cápsida.

**Tabla 10. Mutaciones compensatorias aparecidas en la cápsida de VFA en respuesta a la introducción de sustituciones deletéreas que implican dos cambios de nucleótido.**

Experimento	Mutación original <sup>a</sup>	Cambios de nucleótido	Número de pases post-transf.	Mutaciones adquiridas en la población final <sup>a</sup>	Tipo de mutación adquirida	Localización de las sustituciones secundarias <sup>b</sup>
32	I2014A	2	2	Letal		
33	I2014A	2	3	Letal		
34	R2018A	2	1			
35	R2018A	2	1	T2188S (3:1) <sup>c</sup>	Sust. secund.	III
				N2019H (5:1)	Sust. secund.	I
				Y2138C (4:1) (1211) (4:1)	Sust. secund.	III
36	H2021A	2	1	A2021T	Forward	
				A2021T	Forward	
37	H2021A	2	1	N2019H (2:3) (1193)	Sust. secund.	I
				Silenciosa		
38	H2021A	2	0	A2021T (1:1)	Forward	
				N2019H (1:1)	Sust. secund.	I
39	Q2027A	2	2	Letal		
40	Q2027A	2	2	Letal		
41	Q2027A	2	3	Letal		
42	Q2027A	2	2	Letal		
43	Q2027A	2	3	Letal		
44	Q2027A	2	2	Letal		
45	Q2027A	2	3	Letal		
46	R2060A	2	2	Letal		
47	R2060A	2	3	Letal		
48	R2060A	2	0	N2019H	Sust. secund.	I
				E1171K (3:1)	Sust. secund.	III
				A1170E (5:1)	Sust. secund.	III
				(1172) (4:1)	Silenciosa	III
49	K2063A	2	3	Letal		
50	K2063A	2	1	A2063V	Forward	
51	K2063A	2	1	A2063V	Forward	
				(2072)	Silenciosa	
52	Y2098A	2	2	Letal		
53	Y2098A	2	3	Letal		
54	N2114A	2	0	N2019H	Sust. secund.	II
55	N2114A	2	1	Q2115P	Sust. secund.	I
				A2114(S+T)	Forward	
				(3:2)	Sust. secund.	I
56	N2114A	2	0	Q2115P (4:5)	Sust. secund.	I
				Q2115L	Sust. secund.	I
				T3068N	Sust. secund.	II
57	N2114A	2	0	Q2115L	Sust. secund.	I
				H3144Q (2:3)	Sust. secund.	I
				L1159F (4:5)	Sust. secund.	III
58	F2116A	2	0	Letal		
59	M2154A	2	2	Letal		
60	M2154A	2	3	Letal		
61	M2154A	2	2	Letal		
62	N2202A	2	0	K2063I	Sust. secund.	I
63	N2202A	2	0	K2063I (2:1)	Sust. secund.	I
				K2063I	Sust. secund.	I
64	N2202A	2	1	M2064T (3:2)	Sust. secund.	I
				N1047K (2:1)	Sust. secund.	III
65	K3118A	2	3	Letal		
66	K3118A	2	1			
67	K3118A	2	3	Q2115R	Sust. secund.	I
				G3070W (1:1)	Sust. secund.	II
				F2034L (3:2)	Sust. secund.	III
				E3146G (5:1)	Sust. secund.	II
				H3191R (5:1)	Sust. secund.	I
68	R3120A	2	0	E3146G	Sust. secund.	I
				E3146G (1:1)	Sust. secund.	I
69	R3120A	2	0	E3146G (2:1)	Sust. secund.	I
				T3115I (1:3)	Sust. secund.	II
70	R3120A	2	2	Letal		
71	H3141A	2	3	Letal		
72	H3141A	2	1	N2019H (1:5)	Sust. secund.	I
				N2019H (1:2)	Sust. secund.	I
73	H3141A	2	0	R2060W (3:1)	Sust. secund.	I
				Letal		
74	H3144A	2	2	Letal		
75	H3144A	2	3	Letal		
76	L3151A	2	3	Letal		
77	N3152A	2	1	T1003A (3:1)	Sust. secund.	I
78	K3193A	2	3	T2188S (1:1)	Sust. secund.	III
				T2188S (1:3)	Sust. secund.	III
79	K3193A	2	1	A2185V (3:1)	Sust. secund.	III
				T2188S (1:1)	Sust. secund.	III
				A2185V (5:1)	Sust. secund.	III
80	K3193A	2	0	D3195G (3:1)	Sust. secund.	III
				(3171)	Silenciosa	I
81	K3193A	2	2	D3195G (2:3)	Sust. secund.	I
				T3068S (2:1)	Sust. secund.	II
82	K3193A	2	2	E1171K (3:1)	Sust. secund.	III

<sup>a, b, c</sup> Mismo significado que las notas señaladas como a, b y c (respectivamente) en el pie de la Tabla 9. 85

a, b, c Mismo significado que las notas señaladas como a, b y c (respectivamente) en el pie de la Tab

#### 4.3.4. Análisis de mutaciones compensatorias en respuesta a mutaciones deletéreas que implican la sustitución de grupos funcionales en las interfases entre pentámeros en el virión de VFA

A continuación nos planteamos el analizar si el virus era capaz de utilizar mutaciones compensatorias para restaurar la infectividad perdida a causa de la introducción, en las interfases interpentaméricas, de sustituciones de aminoácido presumiblemente más drásticas que la sustitución a alanina. Para ello elegimos una pequeña muestra de sustituciones que no solamente eliminarían interacciones entre pentámeros (como en el caso de las mutaciones a alanina), sino que también introducirían otros grupos funcionales, que podrían impedir estéricamente la asociación de los pentámeros. Además de las sustituciones T3190F y D3069E que ya habíamos analizado (apartado 4.3.2 y Mateo *et al.*, 2008), elegimos analizar el efecto de tres mutaciones dobles, Y2200H/I3189D, N2114C/G3192C y T2053C/Q2057C, provenientes de los intentos de estabilización de viriones de VFA (ver apartado 4.2). Estas sustituciones, en conjunto, implican a seis residuos de la cápsida que son individualmente tolerantes a sustitución por alanina, pero no a las sustituciones introducidas en los mutantes dobles analizados aquí. Todas las sustituciones individuales, excepto una, implicaban al menos dos cambios de nucleótido, dificultando grandemente la reversión. Se realizaron en total 5 experimentos con estos 3 mutantes (Tabla 11).

**Tabla 11. Mutaciones compensatorias aparecidas en la cápsida de VFA en respuesta a la introducción de sustituciones deletéreas distintas de alanina**

Experimento	Mutación original <sup>a</sup>	Cambios de nucleótido	Número de pases post-transf.	Mutaciones adquiridas en la población final <sup>a</sup>	Tipo de mutación adquirida	Localización de las sustituciones secundarias <sup>b</sup>
83	Y2200H/I3189D	2/1	0	D3189A	Forward	
84	N2114C/G3192C	2/2	3	Q2115P (3115) (5:1) <sup>c</sup>	Sust. secund. Silenciosa	I
85	T2053C/Q2057C	2/2	1	N2114S (1:3)	Sust. secund.	II
86	T2053C/Q2057C	2/2	1	C2057S (5:1) Y2098H (1:4)	Forward Sust. secund.	I
87	T2053C/Q2057C	2/2	1	Y2100F (1:5) T1153A (1:3) L3107V (3:2)	Sust. secund. Sust. secund. Sust. secund.	I III III
88	D3069E <sup>d</sup>	1	0	E3069D	Reversión	
89	D3069E	1	0	E3069D	Reversión	
90	D3069E	1	2	E3069D	Reversión	
91	D3069E	1	3	T2188A	Sust. secund.	III

<sup>a, b, c</sup> Mismo significado que las notas señaladas como a, b y c (respectivamente) en el pie de la Tabla 9.

<sup>d</sup> La mutación fijada en la progenie viral del mutante D3069E fue encontrada de forma fortuita en un estudio previo sobre la estabilidad de la cápsida de VFA (Mateo *et al.*, 2003). En el presente estudio se ha completado la secuencia de la cápsida en los cuatro casos en los que se transfeció este mutante, con el objeto de confirmar que no había ninguna otra mutación presente.

En el experimento con el mutante Y2200H/I3189D se observó una pseudoreversión en una de las dos posiciones originalmente mutadas (posición 3189), lo que se tradujo en la sustitución por un aminoácido diferente del original. En todos los experimentos con los otros dos mutantes ocurrieron mutaciones compensatorias (**Tabla 11**). Recientemente, V. Rincón en nuestro laboratorio ha utilizado otros mutantes con sustituciones diferentes de alanina en las interfases interpentaméricas, obteniendo resultados similares a los aquí descritos. En resumen, la adquisición de mutaciones secundarias compensatorias se revela como una estrategia válida, usada por VFA para restaurar su infectividad incluso cuando ocurren una o más mutaciones diferentes de alanina que pueden introducir impedimentos estereoquímicos al ensamblaje y estabilidad de la cápsida.

#### **4.3.5. Localización espacial de las mutaciones compensatorias en la cápsida de VFA**

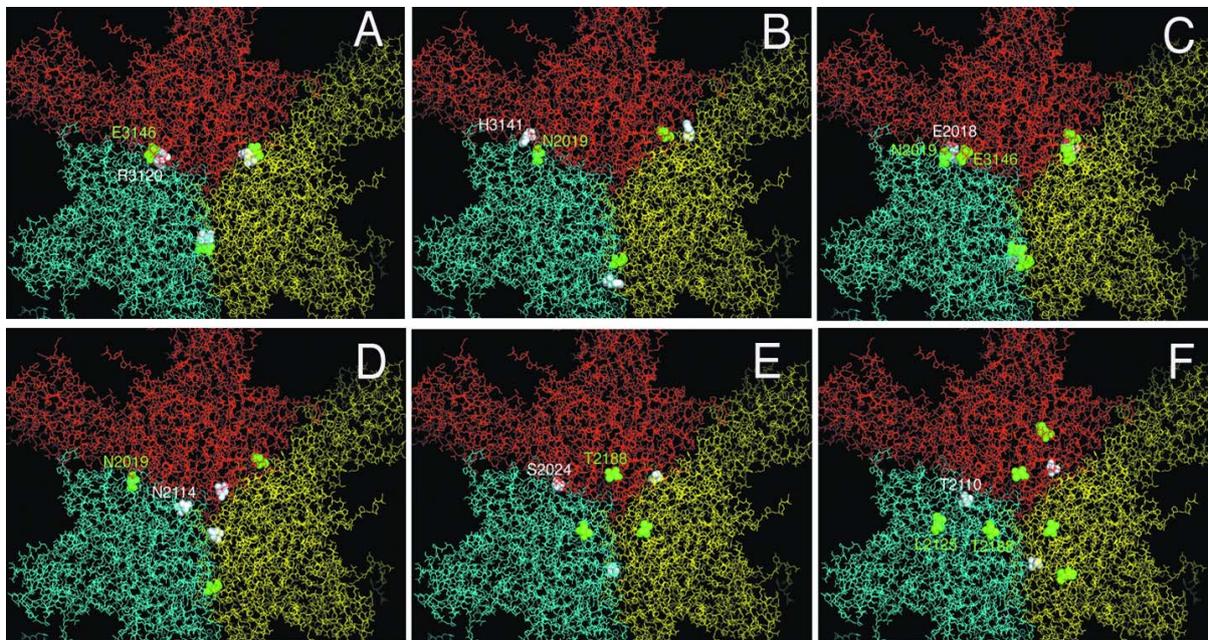
En este trabajo hemos realizado un total de 96 experimentos en los que se han analizado 36 mutantes sencillos y 3 dobles con sustituciones deletéreas de 34 de los 42 residuos interfásicos de cada protómero. Han aparecido 80 sustituciones secundarias, 49 de ellas diferentes, que se fijaron total o parcialmente en la cápsida en 38 posiciones distintas de la misma (**Tablas 9, 10 y 11**). Hemos mapeado estas posiciones en la estructura tridimensional del virión de VFA C-S8c1 (**Figura 22C**).

**Posición de las sustituciones secundarias relativa a las sustituciones deletéreas primarias y a la interfase entre pentámeros.** La mayoría de las posiciones de la cápsida donde aparecieron mutaciones secundarias se localizan en, o relativamente cerca de, las interfases interpentaméricas, y aparecen distribuidas a lo largo de toda la interfase. Únicamente unas pocas sustituciones se localizan lejos de las interfases (comparar la **Figura 22C** con la **Figura 22B**, que muestra cada posición en la interfase donde se introdujo una mutación primaria deletérea. Se encontraron tres patrones muy diferentes (**Tablas 9, 10 y 11 y Figura 23**). i) El primer patrón (I) engloba sustituciones secundarias de residuos que se encuentran en contacto o muy cerca del residuo originalmente sustituido, e incluye el 48% de las sustituciones secundarias (véanse tres ejemplos en las Figuras **23A, 23B y 23C**). ii) El segundo patrón (II) engloba sustituciones secundarias de residuos de la cápsida localizados lejos del residuo originalmente sustituido, pero todavía en, o cerca de, las interfases interpentaméricas, e incluye el 18% de las sustituciones secundarias (véase un ejemplo en la Figura **23D**). iii) El tercer patrón (III) engloba sustituciones secundarias de residuos de la cápsida que se encuentran a alguna distancia tanto del residuo originalmente sustituido, como de las interfases interpentaméricas, e incluye el 34% de las sustituciones secundarias (véanse dos ejemplos en las Figuras **23E y 23F**).

**Sustituciones secundarias y terciarias.** En la mayoría de los casos (57%) sólo ocurrió una sustitución secundaria en toda la cápsida. Sin embargo, en 25, 16 y 2% de los casos aparecieron, respectivamente, dos, tres o cinco sustituciones secundarias. Es importante destacar que en el 92% de los casos en el que ocurrió únicamente una mutación secundaria la mutación era dominante en la población, o al menos se encontraba presente en aproximadamente la mitad de los genomas, como dedujimos de los densitogramas de las secuencias consenso. En el 84% de los casos en los que se detectaron dos o más sustituciones secundarias, una de las dos era dominante en la población vírica;

por el contrario, el 83% de las sustituciones adicionales ocurrió solamente en una fracción minoritaria de los genomas en la población. Además, la gran mayoría de estas sustituciones no dominantes no se observó en ausencia de la sustitución dominante (**Tablas 9, 10 y 11**). Cuando se mapearon en la estructura de la cápsida, todas las sustituciones secundarias dominantes se localizaron en, o relativamente cerca de, las interfases interpentaméricas (**Figura 22C**), y la mayoría (57%) pertenecen al patrón I. Por el contrario, muchas de las sustituciones adicionales (o “terciarias”) se localizan a cierta distancia de las interfases interpentaméricas (**Figura 22C**), y la mayoría (63%) pertenecen a los patrones II o III. En la Discusión proponemos un modelo para integrar la mayoría de las observaciones realizadas en este sentido.

**Descubrimiento de “hot spots” de mutaciones compensatorias.** Hemos encontrado que la frecuencia y posición en la cápsida de las diferentes sustituciones secundarias no es en absoluto al azar. Aunque detectamos 49 sustituciones secundarias diferentes en 38 residuos de la cápsida, tres cuartas partes de los experimentos implicaron únicamente 9 sustituciones diferentes de 5 residuos de la cápsida (T2188, N2019, Q2115, E3146, K2063) (**Tabla 12**). Sustituciones en sólo dos de estos residuos (T2188 y N2019) dieron cuenta de casi la mitad de los casos que implicaron sustituciones secundarias. La mutación en estos “hot spots de mutación secundaria” en la cápsida fue acompañada algunas veces por mutaciones secundarias en otros lugares. Sin embargo, en bastantes experimentos las mutaciones en los “hot spots” fueron las únicas mutaciones secundarias que ocurrieron en toda la cápsida. Por lo tanto, pueden considerarse responsables de la mayor parte del efecto compensatorio en los casos en que aparecieron, es decir, en la mayoría de los casos.



**Figura 23. Ejemplos de la posición relativa entre sustituciones primarias y secundarias en la cápsida de VFA.** Se muestran ejemplos de sustituciones secundarias pertenecientes a los patrones I (**A, B y C**), II (**D**) y III (**E y F**). La estructura parcial de la cápsida que se representa aquí es la misma que la de las Figs. 22B y 22C. En cada ejemplo, el residuo que se mutagenizó originalmente a alanina se indica en color blanco y el, o los residuos que aparecieron sustituidos en la población progenie en respuesta a la mutación original deletérea se indican en color verde. En los ejemplos mostrados en los paneles C y F se fijaron dos mutaciones secundarias en respuesta a la mutación primaria. Los residuos implicados en cada caso se indican con su número de posición en la cápsida.

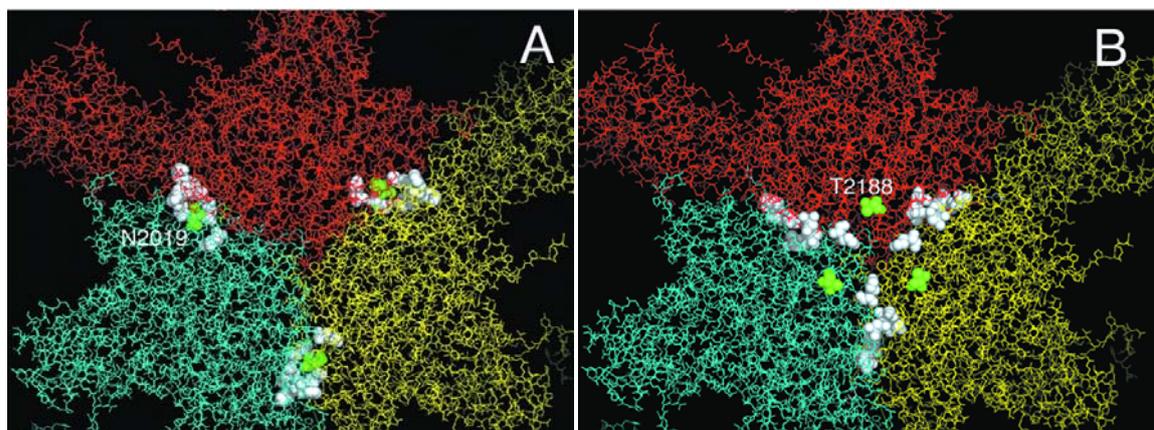
**Tabla 12. Sustituciones secundarias recurrentes en la cápsida de VFA.**

Sustitución secundaria en una posición recurrente <sup>a</sup>	Experimento	Sustitución primaria <sup>a</sup>	Otras sustituciones secundarias <sup>a</sup>
T2188S	5	S2024A	No
T2188S (2:3) <sup>b</sup>	12	T2110A	A2110T (1:1)
T2188S (1:2)	13	T2110A	V2199L (2:1)
T2188S (3:4)	14	T2110A	L2125F (1:1)
T2188A (1:5)	16	V2112A	No
T2188A	96	D3069E	No
T2188S (2:3)	29	T2022G	T2191A (2:1)
T2188A (3:1)	35	R2018A	N2019H (5:1), Y2138C (4:1)
T2188S (1:1)	78	K3193A	No
T2188S (1:3)	79	K3193A	A2185V (3:1)
T2188S (1:1)	80	K3193A	D3195G (3:1), A2185V (5:1)
N2019H	10	E2108A	No
N2019H	11	E2108A	E3146D (2:1)
N2019H (1:3)	19	E2213A	K2088T (2:1), T3190P (3:1)
N2019H (5:1)	35	R2018A	T2188S (3:1), T2138C (4:1)
N2019H (2:3)	37	H2021A	A2021T
N2019H (1:1)	38	H2021A	A2021T (1:1)
N2019H	48	R2060A	E1167K (3:1), A1166E (5:1)
N2019H	54	N2114A	No
N2019H (1:5)	72	H3141A	No
N2019H (1:2)	73	H3141A	R2060W (3:1)
Q2115P	55	N2114A	No
Q2115P (4:5)	56	N2114A	A2114(S+T) (3:2)
Q2115L	57	N2114A	T3068N
Q2115L	58	F2116A	H3144Q (2:3), L1155F (4:5)
Q2115R	67	K3118A	G3070W (1:1), F2034L (3:2) E3146G (5:1), H3191R (5:1)
Q2115P	89	N2114C/G3192C	No
E3146D (2:1)	11	E2108A	N2019H
E3146G	68	R3120A	No
E3146G (1:1)	69	R3120A	No
E3146G (2:1)	70	R3120A	T3115I (1:3)
E3146G (5:1)	67	K3118A	Q2115R, G3070W (1:1) F2034L (3:2), H3191R (5:1)
K2063I	62	N2202A	No
K2063I (2:1)	63	N2202A	No
K2063I	64	N2202A	M2064T (3:2), N1047K (2:1)

<sup>a, b</sup> Mismo significado que las notas señaladas como a y b (respectivamente) en el pie de la Tabla 9.

Los residuos N2019, Q2115, E3146 y K2063 se localizan en posiciones mutuamente separadas en la cápsida, pero las sustituciones secundarias en estos residuos pertenecen todas al patrón I (es decir, se encuentran cerca de los residuos originalmente sustituidos). Un caso particularmente revelador es el de la sustitución secundaria más frecuente, N2019H, que puede compensar el efecto deletéreo de sustituciones a alanina de nada menos que siete diferentes residuos aminoacídicos en la cápsida, seis de ellos rodeando estrechamente a N2019 (**Figura 24A**). En la mayoría de estos casos, así como en los casos de las sustituciones secundarias Q2115R y E3146G (**Tabla 12**), una compensación total o parcial de carga podría contribuir a restaurar la infectividad, como se explica en la Discusión.

En contraste con las otras sustituciones secundarias recurrentes, las sustituciones secundarias de T2188, extremadamente frecuentes, pertenecen al patrón III. Este residuo se localiza en la interfase entre protómeros dentro de cada pentámero, a cierta distancia de la interfase entre pentámeros. En la **Figura 24B** se muestra que las sustituciones de T2188 compensaron los efectos deletéreos de sustituciones en nada menos que otros siete residuos de carácter estereoquímico diverso, todos ellos localizados lejos de T2188 y no agrupados, sino dispersos a lo largo de la interfase entre pentámeros. Esta observación sugiere que el efecto de sustituciones secundarias en el “hot spot” T2188 podría estar mediado por reordenamientos conformacionales en la cápsida (ver la Discusión).



**Figura 24. “Puntos calientes” (“hot spots”) de sustituciones secundarias en la cápsida de VFA.** La estructura parcial de la cápsida que se representa aquí es la misma que la de las Figs. 22B y 22C. Los residuos que aparecen señalados en color blanco son aquellos para los cuales una sustitución deletérea fue compensada por una sustitución secundaria en las posiciones N2019 (**A**) o T2188 (**B**), ambas coloreadas en verde. En el panel (A), el residuo N2114 no se indica.

Para concluir nuestro estudio sobre mutaciones compensatorias, podemos decir que los resultados han revelado una frecuencia muy elevada de fijación en la cápsida de VFA de sustituciones secundarias estereoquímicamente diversas, que compensan el efecto deletéreo de sustituciones primarias en muchas posiciones localizadas en las interfases interpentaméricas. La mayoría de las sustituciones compensatorias ocurrieron en o cerca de las interfases entre pentámeros, y muchas de ellas implicaron residuos espacialmente cercanos al residuo originalmente sustituido; sin embargo, otras mutaciones compensatorias ocurrieron lejos de las interfases y de las

sustituciones originales. De modo muy notable, la mayoría de las sustituciones compensatorias implicaron unos pocos residuos de la cápsida, que actúan como “hot spots” de mutaciones compensatorias. Las sustituciones en estos “hot spots” fueron capaces de compensar el efecto de muchas sustituciones diferentes en posiciones diversas en la cápsida de este virus.

#### **4.3.6. Análisis de la conservación en VFA de los residuos localizados en las interfases entre pentámeros de VFA C-S8c1, y de aquellos en los que ocurrieron sustituciones compensatorias**

Nos planteamos finalmente si en aislados naturales de VFA ocurrían con elevada frecuencia mutaciones en las interfases entre pentámeros y/o en las posiciones de la cápsida donde aparecieron sustituciones secundarias en respuesta a las mutaciones deletéreas introducidas en las interfases en C-S8c1, con especial interés en los “hot spots” identificados en este estudio. Con este objetivo empleamos un alineamiento de 250 secuencias de las proteínas VP2 y VP3 de la cápsida pertenecientes a los 7 serotipos de VFA. De este alineamiento entresacamos las posiciones equivalentes a los 42 residuos por protómero cuya cadena lateral (más allá del C $\beta$ ) está implicada en interacciones entre pentámeros en C-S8c1, incluidos los 34 residuos donde se introdujeron las mutaciones deletéreas (**Tabla I del anexo**). Entresacamos asimismo 32 de las 38 posiciones en donde ocurrieron sustituciones secundarias en CS-8c1, en respuesta a las mutaciones deletéreas que introdujimos (**Tabla II del anexo**). No se consideraron 6 posiciones en VP1, alejadas de las interfases y en las que sólo aparecieron sustituciones acompañantes de modo infrecuente.

**Análisis de conservación de los residuos de la interfase entre pentámeros.** La Tabla I del anexo muestra que en los aislados naturales de VFA analizados la conservación global de los 42 residuos de la interfase es muy elevada: la media de conservación del aminoácido consenso en cada posición es del 93%. De las 42 posiciones, 14 muestran una conservación absoluta, otras 21 muestran una conservación del aminoácido consenso superior al 87%, y únicamente 7 (2088, 2096, 2110, 3069, 3071, 3120 y 3193) muestran un grado de conservación menor, entre el 52% y el 84%. En los aislados naturales analizados no se encontró prácticamente ninguna alanina entre los aminoácidos presentes en estas posiciones.

**Análisis de conservación de los residuos donde aparecieron mutaciones compensatorias.** La Tabla II del anexo muestra que en los aislados naturales de VFA analizados la media de conservación del aminoácido consenso en las 32 posiciones de VP2 y VP3 donde aparecieron mutaciones secundarias en respuesta a la introducción de mutaciones deletéreas en la interfase es del 83%. Este grado de conservación global es claramente menor que el grado de conservación global de los residuos que forman las interfases entre pentámeros. De las 32 posiciones donde aparecieron mutaciones secundarias, 8 muestran una conservación absoluta, otras 12 muestran una conservación del aminoácido consenso superior al 87%, y un número sustancial de posiciones (otras 12) muestran una conservación relativamente baja, entre el 36% y el 82%.

A continuación nos centramos en estas 24 posiciones no absolutamente conservadas, y para cada posición comparamos los aminoácidos presentes en los diferentes aislados naturales con los aminoácidos que aparecieron en C-S8c1 en respuesta a la introducción de mutaciones primarias deletéreas en la interfase. Se observaron en total 1764 diferencias con la secuencia de C-S8c1. De modo notable, se encontró que 503 de ellas coinciden con alguna de las sustituciones secundarias diferentes aparecidas en VP2 o VP3 de CS-8c1. Es de destacar además que, en más de la mitad de estas posiciones, alguno o todos los residuos presentes en virus de serotipos SAT son los mismos que aparecieron en C-S8c1 en respuesta a la introducción de mutaciones deletéreas en las interfases interpentaméricas.

El caso más llamativo en este sentido implica a la mutación N2019H. La posición 2019 en la cápsida de VFA es uno de los cinco “hot spots” de mutaciones compensatorias que hemos identificado en C-S8c1, y uno de los dos donde aparecieron con más frecuencia mutaciones en respuesta a la introducción de sustituciones deletéreas en la interfase. El resto de los “hot spots” identificados en C-S8c1 presentan un muy elevado grado de conservación en las poblaciones naturales analizadas. Sin embargo, en el “hot spot” 2019 se observa la misma mutación, N2019H, en los 30 aislados naturales de serotipos SAT disponibles, cuando se comparan con C-S8c1 o cualquier virus de cualquier otro serotipo diferente de los SAT (Tabla II del anexo). La única excepción es un aislado de tipo C que contiene una glutamina (químicamente similar a asparagina) en esta posición. La mutación N2019H apareció en C-S8c1 como respuesta a la introducción de las mutaciones deletéreas H20121A, E2108A, N2114A y R2018A. Cuando se comparó la secuencia en estas posiciones de los 30 aislados SAT, que de modo natural contienen la mutación N2019H, se encontró que todos contienen además las mutaciones H2021T, E2108Q y N2114T, y 16 de ellos la mutación R2018S; estas mutaciones nunca ocurrieron en los aislados de otros serotipos analizados: Es decir, parece existir una clara covariación entre estas posiciones y 2019 en la evolución de VFA. Hemos observado además otros casos en los que podría igualmente existir una covariación en aislados naturales de VFA entre las posiciones donde se introdujo la mutación primaria en C-S8c1 y las posiciones donde apareció una mutación secundaria en este virus. Todos estos análisis de secuencia, aunque preliminares, sugieren la posibilidad de que durante la evolución de VFA en la naturaleza, hayan ocurrido mutaciones compensatorias en al menos uno de los “hot spots” identificados en este estudio, y posiblemente en otras posiciones de la cápsida. Esta posibilidad será objeto de estudio en el laboratorio.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Estabilidad de VFA

#### 5.1.1. ¿Existen variantes termoestables en poblaciones de VFA?

El enorme potencial de adaptación que poseen los virus que forman poblaciones con estructura genética de cuasiespecie puede estar seriamente limitado en el caso de que la proporción de mutaciones en el genoma que causen una disminución en la eficacia biológica (*fitness*) sea elevada. Por ejemplo, para VFA y otros virus las mutaciones de resistencia a neutralización por anticuerpos no afectan a todos los aminoácidos fuertemente implicados en la interacción con los anticuerpos, sino sólo a una fracción muy limitada de estos, y sólo parecen ser posibles un número muy limitado de sustituciones de aminoácido en estas posiciones (revisado en Mateu, 1995; Mateu y Verdaguer, 2004). Además, incluso las mutaciones que sí ocurren y confieren resistencia a anticuerpos pueden llevar asociada una significativa pérdida de eficacia biológica en VFA (Diez *et al.*, 1989; Baxt *et al.*, 1989; Martínez *et al.*, 1991; Borrego *et al.*, 1993; Rieder *et al.*, 1994; Mason *et al.*, 1994; Tami *et al.*, 2003) y otros picornavirus (Murray *et al.*, 1988; Zurbriggen y Fujinami, 1989; Lemon *et al.*, 1990; Compton *et al.*, 1990; Reynolds *et al.*, 1991; Zurbriggen *et al.*, 1991). En el caso de que la pérdida de eficacia biológica sea grande, los mutantes pueden estar representados con muy baja frecuencia, o encontrarse ausentes, en la mayoría de poblaciones individuales del virus en cuestión.

Los estudios sobre diversas relaciones estructura-función en cápsidas y viriones de VFA y otros virus pequeños sin envuelta están revelando que, a diferencia de lo que generalmente ocurre en proteínas celulares, una gran proporción de las sustituciones de aminoácido introducidas en las proteínas de la cápsida de estos virus conducen a letalidad o afectan desfavorablemente a la viabilidad o a la eficacia biológica de los mismos (Mateu, 1995; Mateo *et al.*, 2003; Mateu y Verdaguer, 2004; Reguera *et al.*, 2004). Una parte del presente estudio se ha centrado en investigar si la estructura en cuasiespecies, y por tanto la capacidad potencial de adaptación, de VFA (como modelo de virus ARN pequeño y sin envuelta), se encuentra limitada en cierta medida por alguna restricción biológica al incremento de estabilidad térmica del virión. Además de contribuir a una mejor comprensión de las limitaciones adaptativas, este estudio posee un importante valor práctico para evaluar la posibilidad de obtener VFAs de mayor termoestabilidad, y por tanto potencialmente útiles para el desarrollo de una vacuna contra la fiebre aftosa menos dependiente de una cadena de frío libre de fallos.

Para ello, hemos analizado en primer lugar si existen variantes termoestables frente a la inactivación de la infectividad en diferentes poblaciones de VFA que en conjunto constituyen, a nuestro modo de ver, una representación razonable de tipos de poblaciones VFA existentes en la naturaleza o en el laboratorio. La identificación de variantes termoestables minoritarios en las poblaciones, seleccionables por calor, indicaría que VFA presenta un cierto potencial de adaptación a incrementos de temperatura, muy frecuentes en las regiones cálidas de la Tierra donde el virus es

enzoótico. El aislamiento y secuenciación de estos variantes termoestables, la introducción de las mutaciones encontradas en un clon infeccioso, y el análisis estructura-función de estos mutantes permitiría conocer las bases moleculares de la limitada termoestabilidad de VFA frente a la inactivación y suministrar información para tratar de incrementar la estabilidad de partículas víricas. Además, los virus termoestables así obtenidos podrían constituir la base de vacunas termoestables, pero basadas en los procedimientos actualmente en uso, y por tanto eficaces y comercialmente viables. Por el contrario, la ausencia de variantes termoestables sería consistente con la posibilidad de que las poblaciones de VFA se encuentren en general cerca del umbral de estabilidad máxima, que no puede superarse sin conducir a una disminución importante de eficacia biológica y eventualmente a la extinción.

En contra de lo que esperábamos, en ningún caso pudimos aislar de poblaciones de VFA, ni siquiera detectar, variantes de mayor resistencia frente a la inactivación térmica de su infectividad. Por el contrario, resulta muy sencillo aislar de poblaciones de VFA variantes de resistencia a anticuerpos (Mateu, 1995) o de diferente sensibilidad al pH (Twomey *et al.*, 1995; Curry *et al.*, 1995; van Vlijmen *et al.*, 1998; Martín-Acebes, 2008), que se encuentran en proporciones relativamente elevadas. La utilización de diferentes procedimientos de selección por calor, previamente utilizados por otros autores (ver más abajo), y de diferentes poblaciones de VFA indican que el que obtuvimos no es un resultado fortuito e irreproducible. La posibilidad de mezcla fenotípica no es probable que afecte en gran medida a los resultados. En principio, algunas partículas termoresistentes podrían estar encápsidando a un genoma no portador de las mutaciones que confieren esta propiedad, e igualmente algunas partículas termosensibles podrían encápsidar a un genoma portador de alguna de estas mutaciones. No obstante, si los genomas que confieren termoestabilidad fueran mínimamente abundantes, y no muestran preferencia en su encapsidación por alguno de los dos tipos de partículas, su presencia se debería haber puesto de manifiesto aunque algunos de estos genomas hubiesen sido encápsidados en partículas termosensibles.

Lo inesperado del hecho de no haber encontrado variantes termoestables en poblaciones de VFA se debe a la existencia de algunos estudios pioneros, realizados hace mucho tiempo, en los que Bachrach y cols. (1960) y Pringle y cols. (1964) fueron capaces de seleccionar poblaciones de VFA de estabilidad incrementada frente a la inactivación térmica. Debido a la época en que estos experimentos se realizaron, y a que estos estudios nunca se continuaron por estos u otros grupos, no se identificaron las mutaciones responsables de este fenotipo termoestable, que era el aspecto en que originalmente habíamos planeado centrarnos. Los abordajes y condiciones experimentales que hemos utilizado han sido similares, o esencialmente los mismos, que utilizaron estos autores (en base a la descripción publicada de sus experimentos). Los resultados obtenidos en nuestro estudio con poblaciones de VFA procedentes tanto de virus clonados como no clonados, de tres serotipos diferentes, recuperados de infecciones citolíticas o persistentes, y/o sujetas a un bajo o relativamente elevado número de pases en cultivos, no excluyen la posibilidad de que en algunas poblaciones concretas de VFA, como en la utilizada por Bachrach y cols., sí puedan encontrarse variantes termoestables. Sin embargo, nuestros resultados indican que la presencia de variantes termoestables, incluso en pequeñas proporciones, no es una característica general de las cuasiespecies de VFA.

### 5.1.2. ¿Es la estabilidad frente a la inactivación de la infectividad una característica sometida a selección negativa en VFA?

Una explicación al hecho de que en algunas poblaciones de VFA puedan existir variantes termoestables, y en otras no, podría basarse en la consideración de dos aspectos: i) el número, tipo y localización de las mutaciones capaces de conferir termoestabilidad en cada contexto genético y ii) el efecto de cada una de estas mutaciones en la eficacia biológica.

Como se ha puesto de manifiesto en este trabajo, para VFA en condiciones similares a las fisiológicas la inactivación térmica de la infectividad ocurre mucho más rápidamente que la disociación de la cápsida en subunidades pentaméricas (apartado 4.2; ver también una discusión del hecho en el siguiente apartado, 5.1.3). Es importante resaltar que aún no se conocen las bases moleculares de la resistencia del virión de VFA frente a la inactivación térmica de su infectividad. No obstante, la cápsida debe estar implicada, puesto que los resultados de nuestro laboratorio han puesto en evidencia que diversas mutaciones concretas en la misma, situadas en o cerca de las interfases entre subunidades pentaméricas, afectan claramente a la velocidad de inactivación térmica (Mateo *et al.*, 2003).

Estos y otros resultados relacionados permiten proponer, *a priori*, que al menos una parte importante de las mutaciones capaces de conferir una mayor resistencia frente a la inactivación podrían ocurrir en algunas de las posiblemente muchas posiciones de la cápsida que no admiten variación sin causar un efecto desfavorable en alguna etapa del ciclo vírico. En particular, es posible, aunque no está probado, que un incremento en la resistencia a la inactivación dificultara la desencapsidación del ARN genómico, reduciendo la viabilidad y eficacia biológica del virus (ver 5.2).

En esta hipótesis de trabajo ciertos contextos genéticos particulares, como el de la población utilizada por Bachrach y cols., podrían fortuitamente admitir una mutación estabilizante que afecte a una posición tolerante, sin producir por tanto un efecto negativo lo suficientemente drástico como para conducir a la extinción al virus que la portara. Desafortunadamente, la población de virus utilizada en ese estudio provenía de una larga historia de pases en cultivos y, posiblemente, condiciones particulares actualmente imposibles de trazar, y menos de reproducir.

Por otra parte, es importante recalcar que la población termoresistente obtenida por Bachrach y cols. revirtió a un fenotipo termosensible cuando se relajó la presión selectiva por calor. Además, de una de las cuatro poblaciones analizadas por Pringle (1964) no se pudieron aislar variantes termoresistentes. En un trabajo reciente con poblaciones de otro picornavirus (PV) realizado por Shiomi y cols. (2004), se consiguieron aislar variantes de termoestabilidad incrementada frente a la inactivación a 50°C durante 30 min y se demostró que una única mutación en la cápsida puede ser suficiente para conferir este fenotipo, sin causar un efecto aparente sobre la estabilidad genética. Sin embargo, estos variantes no eran capaces de soportar una temperatura moderada de 37°C durante mucho tiempo (5 días); y lo mismo le sucedía a Pringle y cols. cuando ensayaban a 25-37 °C variantes de VFA que habían mostrado un incremento de la estabilidad a 54-60°C. Existe, por tanto, la posibilidad de que tanto este variante de PV, como los VFA termoresistentes obtenidos por Bachrach y cols. y por Pringle y cols. presente una eficacia biológica reducida (por ejemplo por realizar una desencapsidación más lenta). Estas observaciones son consistentes con la evidencia

creciente acerca de fuertes restricciones selectivas a la variación en la cápsida de VFA que conferirían letalidad, o al menos una importante desventaja selectiva, a una gran cantidad de genotipos variantes, los cuales serían potencialmente posibles, pero no estarían necesariamente presentes en la mayoría de poblaciones de este virus.

Otra observación que puede contribuir a explicar los resultados obtenidos es que distintas variantes de VFA pueden mostrar algunas diferencias en su nivel de termoestabilidad (Doel & Baccarini, 1981; Nettleton *et al.*, 1982). En nuestro estudio encontramos, de modo análogo, que las poblaciones sometidas a numerosos pases en cultivos celulares son significativamente más inestables frente a inactivación que las poblaciones derivadas de aislados naturales mediante un número muy limitado de pases en cultivo. Este hecho sugiere que la adaptación a cultivos podría implicar una reducción en la termoestabilidad de las poblaciones de VFA. Si fuera así, tal vez las poblaciones utilizadas por Bachrach y cols., fuertemente adaptadas a cultivos celulares mediante un gran número de pases en infecciones agudas, podrían haber reducido su estabilidad claramente por debajo del umbral que conferiría una desventaja selectiva al virus en ese contexto genético en la naturaleza; de modo que en la cola de esa cuasispecie particular podrían existir variantes de estabilidad mayor que el promedio (pero aún algo por debajo del umbral máximo permisible). Esta situación permitiría fácilmente un incremento en la termoestabilidad *relativa* de la población mediante selección por calor. Las poblaciones utilizadas por nosotros, en general más próximas a poblaciones naturales no adaptadas a cultivos, u obtenidas en condiciones probablemente muy diferentes a las poblaciones utilizadas por esos otros autores, podrían encontrarse mucho más cerca del umbral de estabilidad permisible, dificultando cualquier incremento apreciable de termoestabilidad relativa porque éste, al superar el umbral, conduciría a una fuerte selección en contra de los mutantes termoestables.

Finalmente, existe otra observación que también podría contribuir a explicar esos resultados. En el apartado 4.3 de este trabajo, y como se discute en el apartado 5.2, se ha puesto de manifiesto una sorprendente dinámica de cambios compensatorios en la cápsida de VFA que restauran la viabilidad de virus que portan mutaciones intrínsecamente letales. Estas mutaciones letales afectan a residuos en las interfases entre subunidades pentaméricas de la cápsida, y varias de las analizadas presentaron efectos sobre la tasa de inactivación térmica del virión (Mateo *et al.*, 2003). Por tanto, es posible que el efecto de algunas de las mutaciones compensatorias fijadas en la cápsida de estos variantes esté relacionado con la resistencia frente a la estabilidad térmica, o compense de algún modo un posible efecto deletéreo de una resistencia elevada frente a la inactivación, restaurando la eficacia biológica. Sin embargo, genomas variantes que porten combinaciones particulares de dos o más mutaciones que puedan compensar sus efectos serían muy poco abundantes en términos probabilísticos y estarían tal vez presentes en algunas cuasispecies individuales, pero no en la mayoría.

Cualquiera que sea la explicación para estos resultados, es un hecho que en ninguna de las poblaciones de VFA analizadas en el presente trabajo, a pesar de su diferente procedencia e historia, se han podido detectar y menos aislar variantes termoestables. Además, todas las poblaciones de VFA estudiadas son sorprendentemente termolábiles, a pesar de que los viriones de VFA en las regiones donde este virus es endémico probablemente están sujetos a una fuerte presión selectiva

por calor. Estas observaciones sugieren que los viriones de VFA se encuentran cerca del umbral máximo de estabilidad térmica frente a la inactivación que es compatible con una máxima eficacia biológica (Mateo *et al.*, 2007).

### **5.1.3. La estabilidad térmica de los viriones de VFA frente a su disociación en subunidades puede incrementarse sin efectos desfavorables sobre la función biológica y la infectividad**

Los resultados de la primera parte de este estudio (apartado 4.1), que se acaban de discutir en el apartado anterior (5.1.2) indican que en poblaciones de VFA no existen variantes víricas de resistencia aumentada frente a la inactivación por calor, y sugieren la posibilidad de que exista una presión selectiva que se opone a un incremento de esa estabilidad. Por otra parte, los resultados de la segunda parte de este trabajo (apartado 4.2), demuestran que es posible obtener viriones de VFA de mayor termoestabilidad frente a la disociación en subunidades, sin dañar de forma notoria ninguna de las funciones del virus. En los experimentos de infectividad realizados con cada uno de los dos mutantes termoestables obtenidos (A2065H y D3069E/T2188A) el rendimiento fue similar al del virus parental, y experimentos recientes de nuestro laboratorio indican que la multiplicación de estos mutantes ocurre a la misma velocidad que la del virus parental.

Estas dos observaciones, la posible limitación selectiva al incremento de termoestabilidad frente a *inactivación*, y la posibilidad de obtener mutantes de mayor termoestabilidad frente a la *disociación*, resultarían contradictorias si se asume que la inactivación térmica de los viriones de VFA está causada por su disociación en subunidades. Sin embargo, no lo son en el momento en el que, comparando ambos procesos, comprobamos que la inactivación y la disociación del virus en subunidades no ocurren simultáneamente. El calor reduce la infectividad de VFA en varios ordenes de magnitud mucho antes de provocar una disociación apreciable de los viriones en subunidades. A 42°C la infectividad se redujo a un 1% de la inicial en uno o dos minutos, sin que en el mismo tiempo ocurriera una disociación apreciable de las partículas víricas. Este hecho ha sido descrito para otros sistemas víricos. Por ejemplo para HAV, en donde la velocidad a la que desaparecía la conformación nativa de la cápsida (seguida como el mantenimiento de la antigenicidad) resulto ser bastante menor que la velocidad de inactivación de la infectividad, tanto a 4°C como a 25°C (Biziagos *et al.*, 1988).

Como ya se ha mencionado antes, el hecho de que algunas mutaciones situadas en las interfases entre subunidades pentaméricas de la cápsida aumenten apreciablemente la velocidad de inactivación indica que el proceso de inactivación implica a la cápsida. Una posibilidad a explorar es que el virión de VFA, como los de otros picornavirus, sea metaestable, y el calor moderado suministre la energía necesaria para disparar un cambio conformacional del virión que, al ocurrir en el entorno extracelular, implicaría su inactivación biológica. En condiciones fisiológicas, este cambio conformacional ocurriría en el interior celular, quizás provocado por una bajada en el pH en los endosomas, y podría constituir un paso que facilitara la disociación de la cápsida, siendo en este caso favorable para la infectividad, al permitir la liberación del genoma vírico en el entorno intracelular. En experimentos realizados con diversos sistemas víricos existen evidencias de que el calor puede

proporcionar la energía necesaria para disparar los mismos procesos de cambio conformacional y/o disociación de la cápsida, que son *in vivo* provocados por otros procedimientos, como por ejemplo la unión al receptor celular (PV: Tsang *et al.* 2000) o una bajada del pH en los endosomas (VFA: Bachrach, 1968, 1977; Rueckert, 1996; Racaniello, 2001; o el virus de la gripe: Carr *et al.*, 1997)

Si esta hipótesis es correcta, la presión de selección favorecería en VFA aquellos variantes cuyo virión sea capaz de realizar fácilmente este cambio conformacional hipotético, por lo que la presencia de variantes resistentes a la *inactivación* térmica de la infectividad en las cuasiespecies de VFA sería, debido a su eficacia biológica severamente disminuida, muy escasa o nula, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos. Hay que mencionar que en el caso del mutante A2065H este sí mostró (en algunas condiciones) un cierto descenso en su constante de inactivación respecto de la del virus parental, pero este descenso fue realmente muy pequeño, por lo que la correspondiente disminución de eficacia biológica, que se ha comprobado experimentalmente para este mutante, no sería suficiente para mostrar un efecto apreciable sobre la viabilidad e infectividad.

Por el contrario, no podemos descartar la posible presencia de variantes de mayor resistencia frente a la *disociación* térmica en subunidades. Los variantes A2065H y D3069E/T2188A obtenidos en este trabajo presentan una resistencia mucho mayor a la disociación en subunidades, manteniendo sin embargo una infectividad y rendimiento similares a los del virus parental, por lo que parece razonable proponer que, dentro de ciertos límites, la facilidad para la disociación de las partículas víricas no estaría críticamente favorecida por la selección natural. No obstante, los experimentos de competición han puesto de manifiesto que estos dos mutantes presentan una cierta desventaja selectiva con respecto al virus parental. Por tanto, el incremento de termoestabilidad frente a la disociación estaría también sometido a cierta selección negativa, pero no tan drástica como la selección de variantes resistentes a inactivación térmica. En cualquier caso, esta menor eficacia biológica no impide en absoluto la normal infectividad y propagación del virus que son necesarias, por ejemplo, durante la fase de producción de las vacunas contra la fiebre aftosa.

En resumen, al menos en el caso de VFA, el mantenimiento de las funciones biológicas necesarias para el correcto desarrollo del ciclo viral y el mantenimiento de una relativamente elevada inestabilidad de la cápsida frente a su disociación en subunidades (y consiguiente liberación del genoma), son aspectos que no parecen estar inexorablemente ligados. Por el contrario, el mantenimiento de una relativamente elevada inestabilidad de la cápsida frente a la *inactivación* de la infectividad, sí que parece estar directamente relacionada con un desarrollo normal del ciclo vírico.

#### **5.1.4. Bases moleculares de la estabilidad frente a la disociación térmica de variantes de VFA diseñados racionalmente**

La aproximación que consideramos como más prometedora para aumentar la estabilidad de las partículas de VFA frente a la disociación térmica fue la introducción de puentes disulfuro interpentaméricos en la cápsida. Mediante la introducción de este tipo de interacciones esperábamos no causar ningún efecto adverso sobre la infectividad del virus, incluso en el caso de que existiese una relación inversa entre estabilidad e infectividad del virión. Los puentes disulfuro introducidos

estarían formados en el entorno extracelular, oxidante (por ejemplo, los medios en que se formulan las vacunas contra la fiebre aftosa), pero en el ambiente intracelular, reductor, se romperían. La ausencia de esta modificación artificial en todas las etapas intracelulares del ciclo viral evitaría cualquier interferencia con un cambio conformacional de la cápsida, con la separación de subunidades necesaria para la desencapsidación, y con cualquier otro proceso intracelular necesario para la infectividad. De hecho, algunas cápsidas víricas presentan de forma natural puentes disulfuro entre subunidades, que parecen contribuir a su estabilización extracelular (Zhou y Standring, 1992; Li *et al.*, 1998; Aschroft *et al.*, 2005). Además, se ha conseguido estabilizar complejos proteicos mediante la formación de puentes disulfuro entre cisteínas introducidas en posiciones en las que éstas se encuentran presentes de forma natural en complejos proteicos homólogos (ver, por ejemplo, Heikoop *et al.*, 1997). En un único caso, esta aproximación de estabilización mediante puentes disulfuro basada en la homología se ha aplicado a la cápsida de un virus, un bacteriófago (Aschroft *et al.*, 2005). Desafortunadamente, la gran mayoría de proteínas oligoméricas, incluyendo la cápsida de VFA, no presentan homólogos naturales que sirvan de guía para elegir las posiciones apropiadas para la introducción de puentes disulfuro.

En los casos en los que se ha intentado la estabilización de oligómeros proteicos mediante la introducción de puentes disulfuro *de novo*, en posiciones no homólogas, ha habido resultados tanto de estabilización (ver por ejemplo Sauer *et al.*, 1986; Gokhale *et al.*, 1994; Bjork *et al.*, 2003) como de desestabilización (ver por ejemplo Varsani *et al.*, 1993; Gopal *et al.*, 1999; Bunting *et al.*, 2002), ya que el éxito depende en gran medida de las características específicas, incluyendo restricciones estéricas y otros efectos estructurales, de cada caso. Nuestra aproximación de puentes disulfuro no tuvo éxito, en parte quizás porque los residuos cercanos a las interfaces entre subunidades pentaméricas y propuestos por los programas bioinformáticos como aquellos más adecuados para introducir cisteínas que puedan formar puentes disulfuro favorables energéticamente (sin impedimentos estéricos ni distorsiones), resultaron estar implicados en la infectividad del virus, por lo que hubieron de probarse otros menos favorables.

Los enlaces iónicos pueden ser más fáciles de introducir en un complejo proteico que los puentes disulfuro, por presentar muchos menos requerimientos de ángulos y distancias. Quizá por ello, es esta aproximación la que, en nuestro caso, ha dado lugar a viriones de VFA de estabilidad incrementada. Dos de los seis mutantes en los que se ha pretendido introducir enlaces iónicos interpentaméricos (A2065H y D3069A/T2188A) resultaron ser bastante más estables que el virus parental frente a la disociación térmica del virión, y además su infectividad resultó comparable a la de este. Como también ocurre en el caso de los puentes disulfuro, se sabe que el efecto neto que tienen los puentes salinos en la estabilidad y asociación de proteínas es función de muchos factores (Sheinerman y Honig, 2002; Bosshard *et al.*, 2004). A pesar de esto, en varios estudios se ha logrado favorecer la asociación de proteínas mediante la introducción de enlaces iónicos (Schreiber y Fersht, 1995; Ibarra-Molero *et al.*, 2004).

Es preciso, no obstante, hacer énfasis en que la mayor parte de estos resultados que se acaban de mencionar no son directamente aplicables a nuestro caso de estudio, la estabilización del virión de VFA. En primer lugar, muchos de esos estudios con oligómeros proteicos se han centrado en la estabilización del complejo en equilibrio reversible con sus constituyentes. En cambio, el

desensamblaje de la cápsida de VFA es un proceso irreversible, y por ello a la hora de intentar su estabilización hay que considerar los factores cinéticos más bien que los termodinámicos. Una estabilización termodinámica puede conseguirse actuando sobre la constante cinética de asociación, la constante de disociación, o ambas, de modo que se altere el equilibrio. Una estabilización frente a la disociación irreversible debe conseguirse disminuyendo la constante cinética de disociación, mediante el aumento de la energía de activación del proceso. Además, en el caso de VFA y debido a su composición en muchas subunidades iguales, es preciso tener en cuenta que la introducción de una mutación sencilla estaría introduciendo no una, sino 60 interacciones idénticas adicionales en las interfases entre las subunidades de la cápsida. Por lo tanto, el efecto sobre la estabilidad de una nueva interacción, aunque sea muy débil, puede verse muy favorecido debido a un fenómeno de cooperatividad (Zlotnick, 1994).

Desconocemos todavía las bases moleculares por las que las mutaciones A2065H y D3069E/T2188A han producido el efecto estabilizante observado. Como hipótesis de trabajo, sugerimos inicialmente las siguientes:

**Mutante D3069A/T2188A.** Una posibilidad que explicaría los resultados obtenidos es que si, como se pretendía, se han formado 60 nuevas interacciones entre Glu3069 y Lys2198, la disociación de la cápsida puede haber quedado desfavorecida hasta el punto de comprometer la viabilidad del virus. Thr2188 se encuentra situada relativamente cerca de Asp3069 y de la interfase interpentamérica (**Figura 11A**). La mutación T2188A, que implica una reducción de volumen de la cadena lateral, podría facilitar, únicamente en el contexto del doble mutante que lleva además la mutación D3069E, un reordenamiento conformacional local que provocase la ruptura de algunas de las interacciones interpentaméricas. Esto contrarrestaría una parte de la estabilización causada por D3069E, lo suficiente para permitir la normal infectividad del virión. Resultados preliminares obtenidos por V. Rincón en nuestro laboratorio parecen indicar que, en efecto, existe (como esperábamos y este modelo hipotético contempla) un efecto de naturaleza electrostática implicado en la termoestabilización del doble mutante D3069A/T2188A con respecto al virus parental.

**Mutante A2065H.** El efecto estabilizante de la mutación A2065H puede ser explicado postulando simplemente que, como se pretendía, se han formado 60 nuevas interacciones entre las His2065 protonadas y los respectivos Glu3137 (**Figura 11B**), y que estas interacciones son suficientes para incrementar la termoestabilidad del virión frente a la disociación, pero no tan fuertes como para comprometer la viabilidad del virus (como sí sucedería en el caso de la mutación D3069E). De nuevo, los resultados preliminares de V. Rincón sugieren que un efecto de naturaleza electrostática está implicado en la termoestabilización del mutante A2065H.

Es preciso insistir en que estos modelos son simples suposiciones razonables, y que existen otras explicaciones posibles. La introducción (o cambio de lugar, en el caso de la mutación D3069E) de 60 cargas equivalentes en la cápsida no sólo puede establecer nuevas interacciones iónicas con otros residuos vecinos con carga de signo contrario, sino que variará la distribución de potencial electrostático de la cápsida. De este modo, podrían en principio ocurrir cambios tanto favorables

como desfavorables para la estabilidad debidos a cambios en las interacciones entre otros grupos cargados (Acharya *et al.*, 1989; Curry *et al.*, 1995). En el caso de los mutantes termoestables A2065H y D3069E/T2188A, es posible que el cambio de posición en la carga negativa del residuo 3069, o la introducción de una carga en la posición 2065 puedan haber generado una distribución del potencial electrostático más favorable para la estabilidad. Por ejemplo, V. Rincón ha obtenido evidencia preliminar de que estas mutaciones podrían haber reducido en los mutantes repulsiones electrostáticas presentes en el virión parental. Este trabajo continúa actualmente en el laboratorio.

### **5.1.5. Posible aplicación de virus termoestables en la mejora de vacunas contra la fiebre aftosa**

**Posible mejora en las vacunas actuales basadas en virus inactivados.** Este trabajo suministra una clara prueba de principio de que es posible, al menos para VFA, diseñar viriones viables pero que presentan una estabilidad incrementada frente a la disociación en subunidades. Nuestro objetivo fundamental en este estudio está relacionado con aspectos básicos de las relaciones estructura-función en virus, pero existe una posible aplicación biotecnológica real a la mejora de las vacunas contra la fiebre aftosa, que se discute a continuación.

Con el objetivo de lograr un mutante de estabilidad incrementada en mayor medida que la de cada uno de los mutantes por separado, V. Rincón en nuestro laboratorio ha combinado las tres mutaciones de los dos mutantes termoestables, D3069A/T2188A y A2065H para crear un triple mutante. Los resultados obtenidos muestran que estos efectos individuales no son aditivos, lo que es consistente con la posibilidad de que algún reordenamiento conformacional esté implicado en el efecto estabilizante. A pesar de este resultado, desde un punto de vista aplicado las mutaciones presentes en los mutantes D3069A/T2188A y A2065H ya confieren por separado una elevada resistencia de la partícula vírica a la disociación por calor; probablemente la suficiente como para permitir una relajación en la estricta cadena de frío que es necesaria para evitar una pérdida dramática de inmunogenicidad durante la distribución y uso de la vacuna.

Además de poseer una mayor termoestabilidad, nuestros resultados demuestran que estos mutantes de VFA son normalmente infecciosos, y lo suficientemente estables genéticamente como para permitir su crecimiento normal a gran escala durante la fase de producción de vacuna, sin necesidad de variar los métodos empleados actualmente. Además, su tasa de inactivación de la infectividad es similar a la del virus parental; por tanto, estos mutantes no deben presentar ningún problema a la hora de ser inactivados mediante tratamiento con calor, o químicamente mediante etilénimina binaria, al igual que se hace actualmente con las cepas vacunales naturales de VFA durante la producción de la vacuna. Este punto ha sido confirmado experimentalmente por V. Rincón en nuestro laboratorio. Finalmente, las mutaciones introducidas se encuentran lejos de los sitios antigénicos de VFA, por lo que no era de esperar un cambio de la antigenicidad del virus con respecto a la cepa vacunal parental menos estable. Recientemente, V. Rincón ha confirmado experimentalmente también este aspecto (Mateo *et al.*, 2008).

En resumen, estos variantes de VFA y la aproximación realizada para construirlos en el laboratorio parecen cumplir los requisitos iniciales necesarios para servir como base en el desarrollo

de vacunas de VFA de mayor termoestabilidad. Una vez disponible como “semilla” el VFA recombinante termoestable y con la especificidad inmunológica adecuada (serotipo, variante), el proceso de obtención de vacuna no diferiría en ningún aspecto del que se sigue actualmente para las vacunas comerciales basadas en virus naturales (pero menos termoestables). Entre las ventajas potenciales de la aproximación considerada con respecto a las vacunas actuales se encuentra, en primer lugar, la posibilidad de reducir las pérdidas de inmunogenicidad causadas por fallos en la cadena de frío. El ahorro económico y beneficio social originado por una vacuna que no pierda potencia inmunogénica de modo inadvertido durante su transporte, y evite brotes de enfermedad entre animales vacunados con vacunas estropeadas, puede ser enorme. Además, la reducción en la cantidad de partículas disociadas en la vacuna podría aumentar la respuesta inmune y, según otros autores que han comentado nuestros resultados (Hedge *et al.*, 2009), reducir la posibilidad de que en animales que entren en contacto con el virus se establezca una infección persistente inaparente y actúen de reservorio para el virus. Finalmente puede mencionarse la posibilidad de reducir directamente el coste de producción y administración de la vacuna, debido a factores como un posible aumento en el tiempo de almacenamiento o una cierta relajación tolerable de la costosa cadena de frío.

Entre los aspectos que deben contemplarse para el desarrollo práctico de estas vacunas termoestables hay que considerar, en primer lugar, la necesidad de realizar estudios del efecto de las mutaciones exitosas encontradas aquí, u otras que se identifiquen mediante una aproximación similar, sobre otros virus vacunales correspondientes a serotipos y variantes circulantes en el mundo. Por supuesto, sería necesario también realizar una serie de estudios técnicos y económicos para evaluar la viabilidad práctica de este abordaje. Además de los costes del proceso de desarrollo, sería preciso introducir en los clones infecciosos de partida (al menos uno por serotipo circulante), y validar, las modificaciones genéticas necesarias para conferir a los virus vacunales termoestables de cada serotipo una especificidad inmunogénica similar a la de las estirpes circulantes. Sin embargo, la actualización de vacunas contra la fiebre aftosa no suele ser muy frecuente, y el excelente conocimiento de los sitios antigénicos de VFA y la secuenciación sistemática que se viene realizando de los virus circulantes puede permitir que este proceso de manipulación genética, que por supuesto no forma parte del actual procedimiento de actualización de vacunas, sea relativamente eficaz, fácil y económico de implementar.

**Nuevas vacunas basadas en cápsidas vacías.** Otro resultado que podría suponer un gran avance en la lucha contra la fiebre aftosa es la obtención de cápsidas vacías suficientemente estables. Estas mantendrían intactas la especificidad antigénica y la inmunogenicidad conseguidas con las vacunas actuales formuladas a base de viriones completos, pero evitarían la necesidad de crecer y manipular el virus infeccioso, lo que eliminaría totalmente el riesgo de un escape de virus o de infección causada por una inactivación insuficiente durante la producción de la vacuna (Beck y Strohmaier, 1987; Suttmöller *et al.*, 2003); además haría posible la distinción inequívoca entre animales vacunados y animales que han pasado la enfermedad. Sin embargo, los rendimientos de los distintos métodos por los que hasta ahora se ha logrado obtener cápsidas vacías de VFA son todos menores que el que requeriría la producción de vacuna a gran escala (Roosien *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1991; Abrams *et al.*, 1995; Mason *et al.*, 2003; Grubman, 2005; Li *et al.*, 2008). Este problema

técnico, que sigue investigándose pero que por el momento es el limitante para la obtención de una vacuna basada en cápsidas vacías, podría superarse considerando la utilización de una vacuna ADN que contenga la región P1 de VFA. Aún en el caso de que se produjeran suficientes cápsidas vacías para obtener una respuesta inmune adecuada, podría plantearse un nuevo problema: las cápsidas vacías son aún menos estables que los viriones, porque parece ser que la pérdida del ARN desestabiliza al virión (Curry *et al.*, 1997). Por tanto, las vacunas contra la fiebre aftosa basadas en cápsidas vacías naturales serían aún más sensibles que el virión a su inactivación por calor. Este grave problema podría resolverse mediante la introducción de mutaciones estabilizantes como las encontradas en este estudio, u otras de características similares, que podrían aumentar la estabilidad térmica de las cápsidas vacías hasta niveles similares o incluso superiores al del virión natural. La utilización de vacunas basadas en cápsidas vacías, además de los importantísimos beneficios mencionados, permitiría integrar, en el mismo proceso de actualización de la vacuna mediante técnicas de ADN recombinante, tanto los cambios en la especificidad antigénica como las mutaciones estabilizantes. Además, al no ser necesario mantener la infectividad de la partícula vírica para la producción de la vacuna, podrían explorarse mutaciones estabilizantes potencialmente letales para el virus, incluyendo por ejemplo las mutaciones para la introducción de puentes disulfuro o algunas de las interacciones electrostáticas que en este estudio no pudimos valorar sobre el virión a causa de su efecto letal. El desarrollo de vacunas contra la fiebre aftosa basadas en cápsidas vacías suficientemente estabilizadas mediante ingeniería de proteínas contribuiría sin duda en gran medida al control global de ésta importante enfermedad.

## **5.2. Mutaciones compensatorias en la cápsida de VFA**

### **5.2.1. La estrategia más frecuentemente empleada para revertir el efecto de mutaciones letales no es la reversión al fenotipo parental, sino la aparición de mutaciones secundarias compensatorias**

La mayoría de las sustituciones de aminoácidos de la cápsida de VFA realizadas en diferentes laboratorios han resultado ser desfavorables para la infectividad, y estas observaciones se suman a la evidencia creciente de que las cápsidas de virus pequeños y sin envuelta pueden haber sido optimizadas durante su evolución hasta un punto en que la mayoría de las sustituciones individuales de aminoácido que puedan ocurrir en adelante comprometerían la eficacia biológica (ver Introducción). En tal situación, muy diferente de la que ocurre en general con las proteínas celulares, podría esperarse que la restauración de la infectividad perdida por introducción de mutaciones deletéreas en las interfases interpentaméricas (o en cualquier otra región funcionalmente relevante de la cápsida) no sea fácil de conseguir mediante la sustitución sencilla de otros aminoácidos de la cápsida. De acuerdo con esta suposición, la pseudo-reversión de los residuos originalmente mutados ocurrió sólo de forma muy infrecuente en los cerca de 100 experimentos que llevamos a cabo.

Sin embargo, y en contra de esa misma suposición, hallamos que el virus era capaz de responder, de modo frecuente y repetido, a la introducción de sustituciones diferentes en muchas

posiciones de las interfases interpentaméricas, mediante la rápida fijación en la población de mutaciones compensatorias (ver apartado 4.3; Luna *et al.*, 2009). Podría argumentarse que las mutaciones compensatorias simplemente constituirían una solución de emergencia, que comprometería la eficacia biológica, y que por tanto sería adecuada en aquellos casos en que la reversión genotípica estaría probabilísticamente muy desfavorecida por requerir dos o más cambios de nucleótido (como en la segunda serie de mutantes que analizamos). Esta posibilidad no puede excluirse para explicar algunos casos particulares, y para evaluarla se van a realizar en el laboratorio experimentos de competición entre algunos de los variantes obtenidos en donde la recuperación de la infectividad necesariamente implicaba la aparición de una sustitución secundaria, y el virus parental.

No obstante, es importante destacar que para la primera serie de mutantes que analizamos, la reversión al aminoácido original habría requerido un único evento mutacional, y sin embargo las mutaciones compensatorias ocurrieron incluso más frecuentemente que las reversiones genotípicas. Estos resultados son consistentes con los de un estudio realizado recientemente, en el que el análisis de las sustituciones aparecidas en el fago  $\phi$ X174 como consecuencia de la introducción arbitraria de mutaciones deletéreas a lo largo de su genoma mostró que la tasa global de aparición de mutaciones compensatorias frente a la reversión era del 70% (Poon y Chao, 2005).

Este hecho sugiere que en VFA muchas mutaciones compensatorias pueden ser capaces de neutralizar el efecto deletéreo de mutaciones en las interfases interpentaméricas sin incurrir en pérdidas importantes de eficacia biológica. Las observaciones anteriores son consistentes con i) la falta de conservación estricta de los residuos de la cápsida en o cerca de las interfases interpentaméricas, y ii) la presencia en VFA naturales de una mutación (D3069E) que resultó letal en el contexto de secuencia de la cepa de referencia que hemos utilizado (Mateo *et al.*, 2004; apartado 4.3.6 y **Tabla II del anexo**).

### **5.2.2. Mutaciones acompañantes: sustituciones “terciarias”**

En más de la mitad de los casos de compensación mediada por sustituciones secundarias, la secuenciación completa de la cápsida reveló la presencia de una única mutación. En un caso, que implicó al “hot spot” de mutación secundaria más recurrente (T2188), se secuenció el genoma vírico completo y no se encontró ninguna otra mutación. Además, la gran mayoría de las mutaciones secundarias sencillas ocurrieron en o cerca de las interfases interpentaméricas, la región donde la mutación primaria, deletérea, había sido introducida. Por tanto, tomados en conjunto, los resultados dejan pocas dudas de que estas mutaciones secundarias encontradas en la cápsida, por sí mismas, son capaces de compensar el efecto letal de la mutación primaria.

Sin embargo, es preciso considerar también otros casos menos frecuentes. En primer lugar, en unos pocos casos se recuperó la infectividad sin reversión genotípica y sin que se encontrara una mutación secundaria en toda la región de la cápsida. En el laboratorio se está explorando la posibilidad de que, en estos casos infrecuentes, mutaciones en otras zonas del genoma pudieran ejercer de modo indirecto un efecto compensatorio, bien al nivel de proteína o de ARN.

En segundo lugar, en un pequeño y decreciente número de casos se encontró un número creciente de sustituciones secundarias (de dos a cinco). En tales casos, en general sólo una de estas múltiples sustituciones resultó ser dominante en la población (como lo son las mutaciones

secundarias para las que no se observaron otras mutaciones acompañantes). Además, la mayor parte de las sustituciones secundarias no dominantes no se observaron en ausencia de la sustitución dominante. Las sustituciones dominantes se encontraron en o cerca de las interfases interpentaméricas, y con frecuencia cerca de la sustitución primaria. En cambio, las sustituciones adicionales se encontraron más frecuentemente localizadas en posiciones más distantes de las interfases y de la sustitución primaria. Es de resaltar que en otro estudio del grupo (Mateo et al 2007) se ha encontrado evidencia de una cadena de eventos mutacionales ligados en respuesta a la introducción de una mutación primaria en otro lugar de la cápsida. Tomando todas estas observaciones en conjunto, sugerimos como hipótesis de trabajo que las mutaciones no dominantes (mutaciones “terciarias”) observadas pueden estar en proceso de fijación en la región de la cápsida como una respuesta adicional a la fijación de las mutaciones secundarias dominantes. Las mutaciones secundarias, que pueden ocurrir solas, serían las responsables de la mayor parte del efecto compensatorio; las mutaciones terciarias ocasionales, que generalmente no ocurren solas, podrían contribuir a una mejor compensación y a un mayor incremento de la eficacia biológica, en una cascada de eventos mutacionales ligados.

### **5.2.3. Frecuencia, diversidad y distribución de las sustituciones secundarias**

La frecuencia de fijación de sustituciones secundarias y su diversidad fueron ambas muy elevadas. En total, encontramos 49 sustituciones secundarias diferentes en 38 posiciones de la cápsida como respuesta a sustituciones letales de 34 aminoácidos en las interfases interpentaméricas. En general, en respuesta a la misma mutación original se fijaron sustituciones secundarias diferentes, pero normalmente entre ellas había una o dos mutaciones que tendían a aparecer repetidamente. Esta última observación concuerda con los resultados del trabajo realizado por Warner y cols., los cuales encontraron que en respuesta a una mutación deletérea que impedía la maduración proteolítica de la cápsida del virus del herpes simple (bastante distinto estructuralmente de VFA), se fijó repetidamente la misma sustitución secundaria (Warner *et al.*, 2000). Por tanto parece claro que aunque para muchas de las mutaciones deletéreas existe más de una solución compensatoria, las posibilidades son relativamente restringidas y siempre hay alguna(s) que tiende(n) aparecer más frecuentemente que el resto.

La elevada frecuencia y diversidad encontradas no implica, sin embargo, que pueda existir un número muy elevado de combinaciones de mutaciones intrínsecamente desfavorables pero mutuamente compensatorias. Por el contrario, observamos que 9 de los 49 tipos de mutaciones secundarias, aparecían en tres cuartas partes de todos los casos, y estas 9 mutaciones implicaban únicamente a 5 residuos distintos de la cápsida. Los codones correspondientes no son secuencias para las que se haya descrito una frecuencia de mutación más elevada que para otras posiciones dentro del genoma de VFA y las mutaciones encontradas en estas posiciones no aparecieron en ausencia de la mutación letal primaria. Por tanto, parece que la muy notable capacidad de VFA de acomodar mutaciones deletéreas en las interfases entre pentámeros depende de la existencia de unas posiciones definidas en la cápsida (que podemos definir como “hot spots” de sustituciones secundarias). Estos parecen ser lugares privilegiados para la introducción de mutaciones capaces de compensar los efectos desfavorables de muchos tipos diferentes de sustituciones en muchas posiciones dispersas a lo largo de las interfases entre subunidades de la cápsida.

En aislados naturales de VFA cuatro de los “hot spots” identificados están bastante conservados. Esto puede ser debido a que las mutaciones letales que nosotros introdujimos a propósito en las interfases entre subunidades tampoco ocurren frecuentemente en aislados naturales (apartado 4.3.6.). Esta observación suministra otro ejemplo del elevado potencial de VFA para adaptarse incluso a mutaciones muy infrecuentes y deletéreas como las introducidas por nosotros, sin comprometer la función biológica. Sería interesante introducir en el aislado C-S8c1 mutaciones encontradas con frecuencia en otros aislados naturales de VFA, pero letales en el contexto de secuencia de C-S8c1, e investigar qué tipo de mutaciones compensatorias ocurren. Consideramos posible que en estos experimentos se identificaran otros “hot spots” diferentes de los encontrados en este trabajo. En cualquier caso, es de destacar que en uno de los cinco “hot spots” (posición 2019), precisamente en uno de los dos en que aparecieron con mayor frecuencia mutaciones compensatorias en nuestro estudio, y quizá en otras posiciones de la cápsida, sí podrían haber ocurrido mutaciones compensatorias durante la evolución de VFA en la naturaleza (ver apartado 4.3.6). Las mutaciones compensatorias podrían estar ocurriendo de modo relativamente frecuente en la cápsida de virus como VFA, dando lugar a soluciones de similar funcionamiento y eficacia biológica a la estructura original, y contribuyendo de modo importante a la diversificación y evolución de los virus.

#### **5.2.4. Aproximaciones a las bases estructurales de la compensación funcional en la cápsida**

El objetivo del estudio que hemos realizado sobre mutaciones compensatorias ha sido analizar la respuesta genética de VFA a la introducción sistemática de mutaciones sencillas deletéreas en una región definida de su genoma relacionada con la estabilidad del virión, tema central de esta tesis de doctorado; la comprensión de las bases estructurales de la compensación de cada una de los muchos tipos de sustituciones secundarias aparecidas, incluidas las de los “hot-spots”, deberá ser objeto de otro(s) estudio(s) basados en análisis estructurales y bioquímicos. Por el momento, estudios estructura-función para explicar los mecanismos moleculares de los efectos compensatorios de sustituciones de aminoácidos en proteínas se han llevado a cabo en un limitado número de casos, que implican en su mayoría proteínas de pequeño tamaño (Klig *et al.*, 1988; Blacklow y Knowles, 1990; Brown *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1994; Bouvier y Poteete, 1996; Desai y Person, 1999; Nikolova *et al.*, 2000; Joerger *et al.*, 2004; Chanel-Vos y Kielian, 2006). Estos estudios han puesto de manifiesto la dificultad, en muchas ocasiones, de demostrar sin género de duda las razones estructurales de los efectos compensatorios, debido a su complejidad. Por lo tanto, nos limitaremos aquí a discutir algunas hipótesis que podrían explicar algunos casos concretos entre los efectos compensatorios que hemos observado en la cápsida de VFA.

En el trabajo previo realizado por el Dr. R. Mateo en el laboratorio se concluyó que el efecto deletéreo observado en las sustituciones a alanina de la interfase interpentamérica parecía deberse, en bastantes casos, a defectos en el ensamblaje y estabilidad del virión, aunque hay que señalar que en algunas ocasiones aparecieron evidencias de que otro tipo de factores, adicionales o alternativos a los anteriormente mencionados, también estaban interviniendo (actualmente en estudio). Si el

efecto deletéreo de muchas mutaciones primarias en las interfases se debe a la pérdida de estabilidad y/o a la dificultad en el ensamblaje, podría suponerse que las sustituciones secundarias que aparezcan vayan encaminadas a restaurar, directa o indirectamente, la pérdida de interacciones entre las subunidades; y, efectivamente, los resultados obtenidos en el presente estudio parecen apuntar esta dirección, porque casi todas las sustituciones secundarias dominantes y muchas de las sustituciones terciarias no dominantes han aparecido situadas en o muy cerca de las interfases interpentaméricas, y además se encuentran cerca de la mutación deletérea original. Las sustituciones secundarias aparecidas en cuatro de los cinco “hot-spots” (N2019, Q2115, E3146 y K2063) pertenecen a este patrón.

La base estructural de la compensación en muchos de estos casos podría estar relacionada con la restauración de la carga eléctrica perdida. N2019H es una de las dos sustituciones secundarias que aparecieron más frecuentemente, y la mayoría de las mutaciones deletéreas a las que compensa (R2018A, R2060A, H2021A y H3141A) implican la pérdida de una carga positiva que N2019H estaría devolviendo en una posición cercana a la original. Este último caso es especialmente relevante, ya que existen muchos indicios que indican que la histidina 3141 juega un papel fundamental en el desensamblaje de la cápsida de VFA (Acharya *et al.*, 1989; Curry *et al.*, 1995; Ellard *et al.*, 1999): en los endosomas de las células infectadas el pH ácido conduce a la protonación de His3141 apareciendo fuerzas electrostáticas repulsivas con el dipolo de una de una  $\alpha$ -hélice cercana perteneciente al pentámero vecino, lo que facilitaría la disociación de las subunidades. Cuando esta histidina se reemplaza por aspártico o por fenilalanina, la cápsida aumentó su estabilidad a pH ácido (Ellard *et al.*, 1999). Por lo tanto, predecimos que: i) la mutación a alanina de H3141, y quizá también las mutaciones de H2021, R2018 y R2060, incrementarán la estabilidad de la cápsida (a pH ácido en el caso de His y a pH ácido o neutro en el caso de Arg); ii) la introducción adicional de la mutación compensatoria N2019H reducirá el aumento de estabilidad causado por cualquiera de las cuatro mutaciones primarias propuestas (actualmente en estudio). Si estas predicciones se confirman, se podría afirmar que el efecto de compensación de una de las dos sustituciones secundarias con mayor frecuencia de aparición, N2019H, se debe a la restauración de las repulsiones electrostáticas entre subunidades necesarias para provocar el desensamblaje en VFA. Además, el mecanismo de compensación de las sustituciones secundarias Q2115R y E3146G se podría explicar de una forma similar, ya que también implican compensaciones de carga locales (Tabla 12).

Las bases estructurales de los efectos compensatorios del resto de sustituciones secundarias ya resulta más difícil de predecir a partir de los datos obtenidos. No obstante, en muchos de los casos la compensación podría estar mediada por cambios estructurales de la interfase que resultarían en un establecimiento de nuevas interacciones interpentaméricas para reemplazar las pérdidas a causa del truncamiento de la cadena lateral del aminoácido originalmente sustituido. Sin embargo en el caso de las sustituciones secundarias pertenecientes al grupo III, incluyendo aquellas localizadas en la posición “hot-spot” más frecuente, T2188, esta explicación no resulta válida: T2188 está localizada en las interfases interprotoméricas, y relativamente alejada de las interfases interpentaméricas. Además, las mutaciones originales compensadas en esta posición fueron de naturaleza estereoquímica muy diversa y se sitúan en posiciones muy dispares de la interfase interpentamérica, alejadas unas de otras, y sin estar ninguna de ellas cercana a la posición 2188. Las sustituciones secundarias en esta

posición siempre conllevaron la pérdida de grupos químicos, por lo que el establecimiento de nuevas interacciones interpentaméricas como posible causa de compensación queda excluido; resultados previos indican que la mutación T2188A por sí sola no parece tener efecto alguno en la infectividad del virus, pero por otro lado es capaz de compensar el efecto letal de la mutación D3069E y además las dos mutaciones juntas producen un incremento de la termoestabilidad del virus frente a la disociación de su cápsida (Mateo *et al.*, 2008). Se han descrito varios casos de mutaciones que compensan los efectos de otras en puntos espacialmente alejados ("efectos a distancia"), tal vez mediante la propagación de alteraciones conformacionales, incluso a distancias superiores que las que separan la mutación original y la compensatoria en el doble mutante D3069E/T2188A. Por ejemplo en PV, un picornavirus como VFA, se han encontrado mutaciones alejadas del sitio de reconocimiento celular que modulan la interacción virus-célula (Colston y Racaniello, 1994). En un revertiente de una mutación desestabilizante de la lisozima del fago T4, el efecto de la mutación supresora, localizada lejos de la mutación primaria, se debió a reordenamientos conformacionales (Wray *et al.*, 1999). Por tanto, una posible explicación del efecto compensatorio mediado por las mutaciones que aparecen en la posición 2188 sería que estas sustituciones, que siempre conllevan una reducción del tamaño de la cadena lateral, estuvieran provocando un reordenamiento local en las interfases interprotoméricas dentro de cada pentámero capaz de propagarse a las relativamente cercanas interfases interpentaméricas. Esta posibilidad podría ser evaluada en un futuro mediante cristalografía y/o otros estudios biofísicos de estos mutantes de VFA (en particular de D3069D/T2188A). Aunque en ausencia de estos estudios es difícil proponer con cierta base una razón que explique el efecto compensatorio de las mutaciones en T2188, el hecho de que las diferentes mutaciones compensadas por ella no estén localizadas en el mismo lugar de la cápsida, sino en posiciones dispersas por la interfase entre pentámeros o cercanas a ella, indica que estas no están afectando a una misma función localizada en una parte concreta de la cápsida, sino a alguna función propia de la cápsida entera como el ensamblaje o la estabilidad, lo cual iría en la línea de la hipótesis anteriormente expuesta.

## 6. CONCLUSIONES

**1. La presencia de variantes más estables frente a la inactivación por calor (incluso en pequeñas proporciones), no es una característica general de las cuasiespecies de VFA.** Esto sugiere que un incremento en la estabilidad del virión frente a su inactivación por calor podría resultar, en general, en una importante desventaja selectiva.

**2. Poblaciones de VFA sometidas a un elevado número de pases en cultivos presentaron una estabilidad frente a la inactivación por calor significativamente menor que la de las poblaciones de aislados naturales sometidos a un número mínimo de pases.** Esto sugiere que la adaptación de VFA a cultivos podría implicar una reducción en su termoestabilidad, quizás debido a una reducción en la presión selectiva por las elevadas temperaturas que se alcanzan en la naturaleza.

**3. La velocidad de inactivación térmica de la infectividad de los viriones de VFA es muy superior a la velocidad de disociación del virión en subunidades, especialmente a temperaturas moderadas. La velocidad del proceso de inactivación térmica puede modificarse mediante mutaciones en la cápsida.** Estas observaciones son consistentes con la posibilidad de que la inactivación térmica del virión de VFA se relacione con un cambio de conformación de la cápsida sin desintegración de la misma.

**4. Mediante diseño racional se han obtenido dos variantes de VFA (D3069E/T2188A y A2065H) que presentan una estabilidad frente a la disociación a diferentes temperaturas muy superior a la del virus natural del que derivan. Estos mutantes presentan una infectividad comparable al virus parental, y son genéticamente estables.** Por tanto, es posible modificar un virus animal como VFA para aumentar su termoestabilidad frente a la disociación en subunidades sin reducir sustancialmente su infectividad.

**5. Los virus variantes de mayor estabilidad frente a la disociación muestran una eficacia biológica reducida con relación al virus parental.** Proponemos que existe una fuerte presión selectiva que se opone a la estabilización de VFA frente a la inactivación térmica. En cambio, la presión selectiva que se opone a la estabilización de VFA frente a la disociación en subunidades por el calor sería considerablemente menor.

**6. VFA acepta de modo general la aparición de mutaciones compensatorias en la cápsida como mecanismo para restaurar la infectividad perdida a causa del truncamiento individual de la cadena lateral de la gran mayoría de los residuos que participan en interacciones no covalentes entre subunidades de la cápsida.** Este resultado apoya la posibilidad de que en poblaciones víricas ocurran con mucha frecuencia múltiples combinaciones de mutaciones compensatorias, lo que presenta implicaciones profundas para la variabilidad y evolución de virus ARN.

**7. Aunque la diversidad de las mutaciones compensatorias encontradas es muy elevada, muchas de éstas se localizan en unas pocas posiciones (“hot spots”) de la cápsida.** Estas posiciones parecen constituir “comodines” para la compensación de mutaciones deletéreas en las interfases entre subunidades pentaméricas de diferente naturaleza y localización.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrams, C.C., King, A.M. y Belsham, G.J. (1995). Assembly of foot-and mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *J. Gen. Virol.* **76**, 3089–98.
- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D. y Brown, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**, 709-16
- Agosto, M.A., Middleton, J.K., Freimont, E.C., Yin J. y Nibert, M.L. (2007). Thermolabilizing pseudoreversions in reovirus outer-capsid protein micro 1 rescue the entry defect conferred by a thermostabilizing mutation. *J Virol.* **81**, 7400-9.
- Airaksinen, A., Roivainen, M. y Hovi, T. (2001). Coxsackievirus A9 VP1 mutants with enhanced or hindered A particle formation and decreased infectivity. *J Virol* **75**, 952-60
- Argos, P., Kamer, G., Nicklin, M.J. y 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**, 7251-67
- Arnold, F.H., ed. (2001). Evolutionary protein design. *Adv Protein Chem.* **55**, 1–438
- Ashcroft, A. E., Lago, H., Macedo, J.M.B., Horn, W.T., Stonehouse, N.J. y Stockley, P.G. (2005). Engineering thermal stability in RNA phage capsids via disulphide bonds. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **5**, 2034–41.
- Bachrach, H.L. (1968). Foot-and-mouth disease. *Annu Rev Microbiol* **22**, 201-44
- Bachrach, H.L. (1977). Foot-and-mouth disease virus. Properties, molecular biology and immunogenicity. En Romberger, J.A. (ed.), pp 3-31. Allanheld, Osmun & Co. Montclair.
- Bachrach, H.L., Patty, R.E. y Pledger, R.A. (1960). Thermal-resistant populations of foot-and-mouth disease virus. *Proc Soc Exp Biol Med* **103**, 540-2
- Bae, Y.S. y Yoon, J.W. (1993). Determination of diabetogenicity attributable to a single amino acid, Ala776, on the polyprotein of encephalomyocarditis virus. *Diabetes* **42**, 435-43
- Baranowski, E., Sevilla, N., Verdaguer, N., Ruiz-Jarabo, C.M., Beck, E. y Domingo, E. (1998). Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **72**, 6362-72
- Barteling, S.J. (2004). Modern inactivated foot-and-mouth disease (FMD) vaccines: historical background and key elements in production and use, p.305–334. En F. Sobrino y E.Domingo (ed.), *Foot and mouth disease. Current perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk.
- Barteling, S.J. y Woortmeyer, R. (1987). Multiple variants in foot-and-mouth disease virus (FMDV) populations: the Achilles heel for peptide and rec. DNA vaccines? *Dev Biol Stand* **66**, 511-21
- Barton, D.J., O'Donnell, B.J. y Flanagan, J.B. (2001). 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J.* **20**, 1439-48
- Baxt, B. (1987). Effect of lysosomotropic compounds on early events in foot-and-mouth disease virus replication. *Virus Res* **7**, 257-71
- Baxt, B. y Becker, Y. (1990). The effect of peptides containing the arginine-glycine-aspartic acid sequence on the adsorption of foot-and-mouth disease virus to tissue culture cells. *Virus Genes* **4**, 73-83
- Baxt, B. y Rieder, E. (2004). Molecular aspects of foot-and-mouth disease virus virulence and host range: role of host cell receptors and viral factors. En: Sobrino, F. y Domingo, E. (eds.). *Foot and mouth disease. Current perspectives*. pp 145-172. Horizon Bioscience, Norfolk.
- Baxt B., Vakharia .V, Moore D.M., Franke A.J. y Morgan, D.O. (1989). Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* **63**, 2143-51.

- Bazan, J.F. y Fletterick, R.J. (1988). Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 7872-6
- Beard, C.W. y Mason, P.W. (2000). Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* **74**, 987-91
- Beck, E. y Strohmaier, K. (1987). Subtyping of european foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determinations. *J. Virol.* **61**,1621-29.
- 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**, 241-60
- Belsham, G.J. y Sonenberg, N. (1996). RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiol Rev* **60**, 499-511
- Belsham, G.J. y Martinez-Salas, E. (2004). Genome organisation, translation and replication of foot-and-mouth disease viral RNA. En: Sobrino, F. y Domingo, E. (eds.). *Foot and mouth disease. Current perspectives*. pp 19-52. Horizon Bioscience, Norfolk
- Bendahmane, M., Fitchen, J.H., Zhang, G. y Beachy, R.N. (1997). Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *J Virol* **71**, 7942-50
- Berinstein, A., Roivainen, M., Hovi, T., Mason, P.W. y 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**, 2664-6
- Biziagos, E., Passagot, J., Crance, J.M. y Deloince, R. (1988). Long-term survival of hepatitis A virus and poliovirus type 1 in mineral water. *Appl Environ Microbiol.* **54**, 2705-10.
- Bjørk, A., Dalhus, B., Mantzilas, D., Eijsink, V.G. y Sirevåg, R. (2003). Stabilization of a tetrameric malate dehydrogenase by introduction of a disulfide bridge at the dimer-dimer interface. *J Mol Biol.* **334**, 811-21.
- Blacklow, S.C. y Knowles, J.R. (1990). How can a catalytic lesion be offset? The energetics of two pseudorevertant triosephosphate isomerases. *Biochemistry* **29**, 4099-108.
- Boletín OIE (2000) nº13 vol.26.
- Borrego, B., Novella, I.S., Giralt, E., Andreu, D. y 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**, 6071-9.
- Borrego, B., Camarero, J.A., Mateu, M.G. y Domingo, E. (1995). A highly divergent antigenic site of foot-and-mouth disease virus retains its immunodominance. *Viral Immunol* **8**, 11-8
- Bosshard, H.-R., Marti, D.N. y Jelesarov, I. (2004). Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *J. Mol. Recognit.* **17**, 1-16.
- Bouvier, S.E. y Poteete, A.R. (1996). Second-site reversion of a structural defect in bacteriophage T4 lysozyme. *FASEB J.* **10**,159-63.
- Brown, F. (1989). Towards a molecular vaccine for Foot-and-Mouth disease virus. En: Semler, BL y Ehrenfeld, E (eds.). *Molecular Aspects of Picornavirus Infection and Detection*, pp 179-191. American Society for Microbiology, Washington DC
- Brown, F. (2004). Stepping stones in foot-and-mouth research: a personal view. En: Sobrino, F. y Domingo, E. (eds.). *Foot and mouth disease. Current perspectives*. pp 1-17. Horizon Bioscience, Norfolk
- Brown, F. y Crick, J. (1959). Application of agar gel diffusion analysis to a study of the antigenic structure of inactivated vaccines prepared from the virus of foot-and-mouth disease. *J. Immunol.* **82**, 444-47.

- Brown, F. y Stewart, D.L. (1960). The Influence of Proflavine on the Synthesis of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J Gen Microbiol* **23**, 369-79
- Brown, K. A., Howell, E.E. y Kraut, J. (1993). Long-range structural effects in a second-site revertant of a mutant dihydrofolate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11753–56.
- Bunting, K. A., Cooper, J.B., Tickle, I.J. y Young, D.B. (2002). Engineering of an intersubunit disulfide bridge in the iron-superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**, 69–76.
- Carr, C.M., Chaudhry, C. y Kim, P.S. (1997). Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**, 14306-13
- Carrasco, C., Carreira, A., Schaap, I., Serena, P., Gómez-Herrero, J., Mateu, M. G. y de Pablo, P. J. (2006). DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 13706–11.
- Carrasco, C., Castellanos, M., de Pablo, P.J. y Mateu, M.G. (2008). Manipulation of the mechanical properties of a virus by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 4150-5.
- Carreira, A. y Mateu, M. G. (2006). Structural tolerance versus functional intolerance to mutation of hydrophobic core residues surrounding cavities in a parvovirus capsid. *J.Mol. Biol.* **360**, 1081–93.
- Carreira, A., Menéndez, M., Reguera, J., Almendral, J.M. y Mateu, M.G. (2004). In vitro disassembly of a parvovirus capsid and effect on capsid stability of heterologous peptide insertions in surface loops. *J Biol Chem* **279**, 6517-25
- Carrillo, E.C., Giachetti, C. y Campos, R.H. (1984). Effect of lysosomotropic agents on the foot-and-mouth disease virus replication. *Virology*. **135**, 542-5
- Casjens, S. (1997). Principles of virion structure, function and assembly. En Chiu, W., Garcea, R., y Burnette, R, (eds), *Structural biology of viruses*, pp 3-37. Oxford University Press, Oxford.
- Ceglowski, W. S. (1965). Antibody response to the noninfectious 7 m $\mu$  component of the virus of foot-and-mouth disease. *Virology* **25**, 328–30.
- Chanel-Vos, C. y Kielian, M. (2006). Second-site revertants of a semliki forest virus fusion-block mutation reveal the dynamics of a class II membrane fusion protein. *J. Virol.* **80**, 6115-22.
- Chen, C.H., Wu, R., Roth, L.G., Guillot, S. y Crainic, R. (1997). Elucidating mechanisms of thermostabilization of poliovirus by D2O and MgCl<sub>2</sub>. *Arch Biochem Biophys.* **342**, 108-16.
- Cheng, R.H., Reddy, V.S., Olson, N.H., Fisher, A.J., Baker, T.S. y Johnson, J.E. (1994). Functional implications of quasi-equivalence in a T = 3 icosahedral animal virus established by cryo-electron microscopy and X-ray crystallography. *Structure* **2**, 271-82
- Chiu, W., Burnett, R.M. y Garcea, R.L., eds. (1997). *Structural biology of viruses*. Oxford University Press, Oxford
- Chow, M., Basavappa, R., y Hogle, J.M. (1997). The role of conformational transitions in poliovirus pathogenesis. En Chiu, W., Garcea, R., y Burnette, R. (eds), *Structural biology of viruses*, pp 157-186. Oxford University Press, Oxford
- Christodoulou, C., Colbere-Garapin, F., Macadam, A., Taffs, L.F., Marsden, S., Minor, P. y Horaud, F. (1990). Mapping of mutations associated with neurovirulence in monkeys infected with Sabin 1 poliovirus revertants selected at high temperature. *J Virol.* **64**, 4922-9.
- Cimarelli, A., Sandin, S., Hogle, S. y Luban, J. (2000). Rescue of multiple viral functions by a second-site suppressor of a human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid mutation. *J. Virol.* **74**, 4273-83.
- Clarke, B.E. y Sangar, D.V. (1988). Processing and assembly of foot-and-mouth disease virus proteins using subgenomic RNA. *J Gen Virol.* **69**, 2313-25

- Colston, E. y Racaniello, V.R. (1994). Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J.* **13**, 5855-62
- Compton, S.R., Nelsen, B. y Kirkegaard, K. (1990). Temperature-sensitive poliovirus mutant fails to cleave VP0 and accumulates provirions. *J Virol.* **64**, 4067-75.
- Correa Melo, E. y Lopez, A. (2002). Control of foot and mouth disease: the experience of the Americas. *Rev. Sci. Tech.* **21**, 695-8, 689-94
- Correa Melo, E., Saraiva, V. y Astudillo, V. (2002). Review of the status of foot and mouth disease in countries of South America and approaches to control and eradication. *Rev. Sci. Tech.* **21**, 429-36
- Culver, J.N., Dawson, W.O., Plonk, K. y Stubbs, G. (1995). Site-directed mutagenesis confirms the involvement of carboxylate groups in the disassembly of tobacco mosaic virus. *Virology* **206**, 724-30
- Curry, S., Abrams, C.C., Fry, E., Crowther, J.C., Belsham, G.J., Stuart, D.I. y King, A.M. (1995). Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Virol* **69**, 430-8
- Curry, S., Fry, E., Blakemore, W., Abu-Ghazaleh, R., Jackson, T., King, A., Lea, S., Newman, J., Rowlands, D. y Stuart, D. (1996). Perturbations in the surface structure of A22 Iraq foot-and-mouth disease virus accompanying coupled changes in host cell specificity and antigenicity. *Structure* **4**, 135-45
- Curry, S., Fry, E., Blakemore, W., Abu-Ghazaleh, R., Jackson, T., King, A., Lea, S., Newman, J. y Stuart, D. (1997). Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **71**, 9743-52
- Dalboge, H. y Borchert, T.V., eds. (2000). Protein engineering of enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1543**, 203-455
- Dam, E., Quercia, R., Glass, R.B., Descamps, D., Launay, O., Duval, X., Kräusslich, H.-G., Hance, A.J. y Clavel, F.; ANRS 109 Study Group. (2009). Gag mutations strongly contribute to HIV resistance to protease inhibitors in highly drug-experienced patients besides compensating for fitness loss. *PLoS Pathog. Mar*; **5** (3):e1000345.
- Dani, V.S., Ramakrishnan, C., y Varadarajan, R. (2003). MODIP revisited: re-evaluation and refinement of an automated procedure for modeling of disulfide bonds in proteins. *Prot. Eng.* **16**, 187-193
- Das, G., Hickey, D.R., McLendon, D., McLendon, G. y Sherman, F. (1989). Dramatic thermostabilization of yeast iso-1-cytochrome c by an asparagineisoleucine replacement at position 57. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 496-9.
- Deom, C.M. y He, X.Z. (1997). Second-site reversion of a dysfunctional mutation in a conserved region of the tobacco mosaic tobamovirus movement protein. *Virology* **232**, 13-8.
- de la Torre, J.C., Martínez-Salas, E., Díez, J., Villaverde, A., Gebauer, F., Rocha, E., Dávila, M. y Domingo, E. (1988). Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol.* **62**, 2050-8
- del Álamo, M., Neira, J.L. y Mateu, M.G. (2003). Thermodynamic dissection of a low affinity protein-protein interface involved in human immunodeficiency virus assembly. *J Biol Chem.* **278**, 27923-9
- Desai, P. y Person, S. (1999). Second-site mutations in the N-terminus of the major 31 capsid protein (VP5) overcome a block at the maturation cleavage site of the capsid scaffold 32 proteins of herpes simplex virus type 1. *Virology* **261**, 357-66.
- Devaney, M.A., Vakharia, V.N., Lloyd, R.E., Ehrenfeld, E. y Grubman, M.J. (1988). Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J Virol.* **62**, 4407-9
- Díez, J., Mateu, M.G. y Domingo, E. (1989). Selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an in situ assay. *J Gen Virol.* **70**, 3281-9.

- Díez, J., Dávila, M., Escarmís, C., Mateu, M.G., Domínguez, J., Pérez, J.J., Giralte, E., Melero, J.A. y Domingo, E. (1990). Unique amino acid substitutions in the capsid proteins of foot-and-mouth disease virus from a persistent infection in cell culture. *J Virol* **64**, 5519-28
- Doedens, J.R. y Kirkegaard, K. (1995). Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J.* **14**, 894-907
- Doel, T. R. (1985). Prospects for improved foot and mouth disease vaccines. *Vaccine* **3**, 35–36
- Doel, T.R. (2003). FMD vaccines. *Virus Res.* **91**, 81-99
- Doel T.R. y Baccharini P.J. (1981). Thermal stability of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.* **70**, 21-32
- Dombkoski, A.A. (2003). Disulfide by design: A computational method for the rational design of disulfide bonds in proteins. *Bioinformatics*, **19** (14): 1852-3.
- Domingo, E. (editor) (2006). Quasispecies: Concept and implications for Virology. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. vol. **299**. Springer, Berlin.
- Domingo, E. y Holland, J.J. (1992). Complications of RNA heterogeneity for the engineering of virus vaccines and antiviral agents. *Genet Eng* **14**, 13-31
- Domingo, E. y Holland, J.J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* **51**, 151-78
- Domingo, E., Dávila, M. y Ortín, J. (1980). Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* **11**, 333-46
- Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J.C., Portela, A., Ortín, J., López-Galíndez, C., Pérez-Breña, P., Villanueva, N. y Nájera, R. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance—a review. *Gene* **40**, 1-8
- Domingo, E. y Holland, J. J. (1988). High error rates, population equilibrium and evolution of RNA replication systems. En Domingo E., Holland J.J. y Ahlquist P. (eds). *RNA genetics*, pp **3-36**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Domingo, E., Mateu, M.G., Martínez, M.A., Dopazo, J., Moya, A. y Sobrino, F. (1990). genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. En: Kurstak, E., Marusyk, R. G., Murphy, F. A., van Regenmortel, M. H. V. (eds). *Applied Virology Research*, pp.233-266. Plenum Press, New York.
- Domingo, E., Escarmís, C., Menendez-Arias, L. y Holland, J.J. (1999). Viral quasispecies and fitness variations. En: Domingo, E., Webster, R.G., Holland, J.J. (eds). *Origin and evolution of Viruses*, pp 141-161. Academic Press, San Diego.
- Domingo, E., Biebricher, C.K., Holland, J.J. y Eigen, M. (2001). *Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences*. Landes Bioscience, Austin.
- Domingo, E., Escarmís, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Carrillo, E., Núñez, J.I. y Sobrino, F. (2003). Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Research* **91**, 47-63
- Domingo, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Arias, A., García-Arriaza, J. y Escarmís, C. (2004). Quasispecies dynamics and evolution of foot-and-mouth disease virus. En F. Sobrino y E. Domingo (Eds.), *Foot-and-mouth disease. Current perspectives*, pp. 261-304. Horizon Bioscience, Norfolk, UK.
- Domingo, E., Martín, V., Perales, C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J. y Arias, A. (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol.*; **299**, 51-82.
- Dorval, B.L., Chow, M. y Klibanov, A.M. (1989). Stabilization of poliovirus against heat inactivation. *Biochem Biophys Res Commun* **159**, 1177-83
- Dorval, B.L., Chow, M. y Klibanov, A.M. (1990). Lysine and other diamines dramatically stabilize poliovirus against thermoinactivation. *Biotechnol Bioeng* **35**, 1051-54

- Dunn, C.S. y Donaldson, A.I. (1997). Natural adaption to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus. *Vet Rec* **141**, 174-5
- Duque, H. y Palmenberg, A.C. (2001). Phenotypic characterization of three phylogenetically conserved stem-loop motifs in the mengovirus 3' untranslated region. *J Virol* **75**, 3111-20
- Ebert, C. E. y Beattie, D.S. (2004). A compensatory double mutation of the alanine-86 to leucine mutant located in the hinge region of the iron-sulfur protein of the yeast cytochrome bc1 complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **429**, 16–22.
- Eigen, M. y Biebricher C.K. (1988). Sequence space and quasispecies distribution. En: Domingo, E., Ahlquist, P., Holland J. J. (eds). *RNA genetics*, pp. 211-145. CRC Press, BocaRaton, FL.
- Eigen, M., Winkler-Oswatitsch, R. y Dress, A. (1988). Statistical geometry in sequence space: a method of quantitative comparative sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 5913-7.
- Eijsink, V. G., Bjørk, A., Gåseidnes, S., Sirevåg, R., Synstad, B., B. van den Burg, B. y G. Vriend, G. (2004). Rational engineering of enzyme stability. *J. Biotechnol.***113**,105–20.
- Ellard, F.M., Drew, J., Blakemore, W.E., Stuart, D.I. y King, A.M. (1999). Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Gen Virol* **80**, 1911-8
- Escarmís, C., Toja, M., Medina, M. y Domingo, E. (1992). Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res* **26**, 113-25
- Escarmís, C., Dopazo, J., Dávila, M., Palma, E.L. y Domingo, E. (1995). Large deletions in the 5'-untranslated region of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virus Res* **35**, 155-67
- Escarmís, C., Dávila, M., Charpentier, N., Bracho, A., Moya, A. y Domingo, E. (1996). Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J Mol Biol* **264**, 255-67
- Escarmís, C., Carrillo, E.C., Ferrer, M., Arriaza, J.F., López, N., Tami, C., Verdaguer, N., Domingo, E. y 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**, 10171-9
- Escarmís, C., Dávila, M. y 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
- Farr, GA, Cotmore, S.F. y Tattersall, P. (2006).VP2 cleavage and the leucine ring at the base of the fivefold cylinder control pH-dependent externalization of both the VP1 N terminus and the genome of minute virus of mice. *J Virol. Jan* ; **80**, 161-71.
- Ferguson, N.M., Donnelly, C.A. y Anderson, R.M. (2001). The foot-and-mouth epidemic in Great Britain: pattern of spread and impact of interventions. *Science* **292**, 1155-60
- Ferreira, E., Mendes, Y.S., Silva J.L., Galler, R., Oliveira A.C., Freire, M.S. y Gaspar, L.P. (2009). Effects of hydrostatic pressure on the stability and thermostability of poliovirus: a new method for vaccine preservation. *Vaccine.* **27**, 5332-7
- Ferrer-Orta, C. y Fita, I. (2004). Structure of foot-and-mouth disease virus particles. En: Sobrino, F. y Domingo, E. (eds.). *Foot and mouth disease. Current perspectives*, pp 77-92. Horizon Bioscience, Norfolk
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Pérez-Luque, R., Escarmís, C., Domingo, E. y 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**, 47212-21
- Fox, G., Parry, N.R., Barnett, P.V., McGinn, B., Rowlands, D.J. y Brown, F. (1989). The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J Gen Virol* **70**, 625-37
- 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. y Stuart, D.I. (1999). The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. *EMBO J.* **18**, 543-554

- Fry E.E., Stuart D.I. y Rowlands D.J. (2005). The structure of foot-and-mouth disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol.*; **288**, 71-101.
- Gallagher, T.M. y Rueckert, R.R. (1988). Assembly-dependent maturation cleavage in provirions of a small icosahedral insect ribovirus. *J Virol* **62**, 3399-406
- García-Arriaza, J., Manrubia, S.C., Toja, M., Domingo, E. y Escarmís, C. (2004). Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J Virol* **78**, 11678–85
- Gay, C.G., Salt J. y C. Balaski. (2003). Challenges and opportunities in developing and marketing vaccines for OIE List A and emerging animal diseases. *Dev. Biol.* **114**, 243–50.
- Gebauer, F., de la Torre, J.C., Gomes, I., Mateu, M.G., Barahona, H., Tiraboschi, B., Bergmann, I., de Mello, P.A. y Domingo, E. (1988). Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J Virol* **62**, 2041-9
- Giles, J. (2001). Farmers act to avert foot-and-mouth crisis. *Nature* **410**, 4
- Giraudou, A.T., Beck, E., Strebel, K., de Mello, P.A., La Torre, J.L., Scodeller, E.A. y Bergmann, I.E. (1990). Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology* **177**, 780-3
- Glaser, W. y Skern, T. (2000). Extremely efficient cleavage of eIF4G by picornaviral proteinases L and 2A in vitro. *FEBS Lett* **480**, 151-5
- Gobara, F., Itagaki, A., Ito, Y., Saito, K. y Katsumoto, T. (1977). Properties of virus isolated from an epidemic of hand-foot-and-mouth disease in 1973 in the city of Matsue. Comparison with Cocksackievirus group A type 16 prototype. *Microbiol Immunol.* **21**, 207-17.
- Gokhale, R.S., Agarwalla, S., Francis, V.S., Santi, D.V. y Balaram, P. (1994). Thermal stabilization of thymidylate synthase by engineering two disulfide bridges across the dimer interface. *J. Mol. Biol.* **235**, 89–93.
- Golmohammadi, R., Fridborg, K., Bundule, M., Valegard, K. y Liljas, L. (1996). The crystal structure of bacteriophage Q beta at 3.5 Å resolution. *Structure* **4**, 543-54
- Goodman, S. (2001). Standards needed for foot-and-mouth tests. *Nature* **410**, 1012
- Gopal, B., Ray, S.S., Gokhale, R.S., Balaram, H., Murthy, M.R. y Balaram, P. (1999). Cavity-creating mutation at the dimer interface of Plasmodium falciparum triosephosphate isomerase: restoration of stability by disulfide cross-linking of subunits. *Biochemistry*.**38**, 478-86.
- Gorbalenya, A.E., Donchenko, A.P., Blinov, V.M. y Koonin, E.V. (1989). Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Lett.* **243**, 103-14
- Graff, J., Normann, A., Feinstone, S.M. y Flehmig, B. (1994). Nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus GBM in comparison with two cell culture-adapted variants. *J Virol* **68**, 548-54
- Gromeier, M., Wimmer, E. y Gorbalenya, A.E. (1999). Genetics, pathogenesis and evolution of picornaviruses. En: Domingo E, Webster RG, Holland JJ (eds). *Origin and Evolution of Viruses*, pp. 287-343. Academic Press, San Diego.
- Grubman, M.J. (2005). Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: marker vaccines and antivirals. *Biologicals* **33**, 227–34.
- Gutiérrez, A., Martínez-Salas, E., Pintado, B. y Sobrino, F. (1994). Specific inhibition of aphthovirus infection by RNAs transcribed from both the 5' and the 3' noncoding regions. *J Virol* **68**, 7426-32
- Hansen, J.L., Long, A.M. y Schultz, S.C. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **5**, 1109-22

- Hedge, N.R., Maddur, M.S., Panduranga Rao, P.P., Kaveri, S.V. y Bayry, J. (2009). Thermostable foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate for endemic countries: A perspective. *Vaccine* **27**, 2199-201
- Heikoop, J.C., van den Boogaart, P., Mulders, J.W.M. y Grootenhuis, P.D.J. (1997). Structure-based design and protein engineering of intersubunit disulfide bonds in gonadotropins. *Nat. Biotechnol.* **15**, 658-662.
- Heringa, J. y Argos, P. (1994). Evolution of viruses as recorded from their polymerase sequences. En: Morse SS (ed) *The evolutionary biology of viruses*, pp.87-103. Raven Press, Nueva York.
- Hernando, E., Llamas-Saiz, A.L., Foces-Foces, C., McKenna, R., Portman, I., Agbandje-McKenna, M. y Almendral, J.M. (2000). Biochemical and physical characterization of parvovirus minute virus of mice virus-like particles. *Virology* **267**, 299-309.
- Herold, J. y Andino, R. (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* **7**, 581-91
- Hewat, E.A., Verdaguer, N., Fita, I., Blakemore, W., Brookes, S., King, A., Newman, J., Domingo, E., Mateu, M.G. y Stuart, D.I. (1997). Structure of the complex of an Fab fragment of a neutralizing antibody with foot-and-mouth disease virus: positioning of a highly mobile antigenic loop. *EMBO J.* **16**, 1492-500.
- Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S. y Van de Pol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**, 1577-85
- Holland, J.J., de la Torre, J.C., Clarke, D.K. y Duarte, E. (1991). Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J. Virol.* **65**, 2960-7
- Ibarra-Molero, B., Zitzewitz, J.A. y Matthews, C.R. (2004). Salt bridges can stabilize but do not accelerate the folding of the homodimeric coiled-coil peptide GCN4-p1. *J. Mol. Biol.* **336**, 989-96.
- Ikegami, N., Yoshikawa, E. y Tagaya, I. (1964). I. The stabilizing effect of L-cystine on the thermal inactivation of poliovirus. II. Role of L-cystine on the stabilization of poliovirus against heat-inactivation and on the selection of thermostable mutants. *Jpn J Med Sci Biol.* **17**, 13-22.
- Ishizu, K.I., Watanabe, H., Han, S.I., Kaneshashi, S.N., Hoque, M., Yajima, H., Kataoka, K. y Handa, H. (2001). Roles of disulfide linkage and calcium ion-mediated interactions in assembly and disassembly of virus-like particles composed of simian virus 40 VP1 capsid protein. *J Virol* **75**, 61-72
- Ismail-Cassim, N., Chezzi, C. y Newman, J.F. (1990). Inhibition of the uncoating of bovine enterovirus by short chain fatty acids. *J Gen Virol* **71**, 2283-9
- Jackson, T., Blakemore, W., Newman, J.W., Knowles, N.J., Mould, A.P., Humphries, M.J. y King, A.M. (2000a). Foot-and-mouth disease virus is a ligand for the high-affinity binding conformation of integrin alpha5beta1: influence of the leucine residue within the RGD motif on selectivity of integrin binding. *J Gen Virol* **81**, 1383-91
- Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W. y King, A.M. (2000b). The epithelial integrin alpha6beta1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **74**, 4949-56
- Jackson, T., Mould, A.P., Sheppard, D. y King, A.M. (2002). Integrin alpha6beta1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **76**, 935-41
- Jackson, T., King, A.M., Stuart, D.I. y Fry, E. (2003). Structure and receptor binding. *Virus Res* **91**, 33-46
- Jang, S.K., Pestova, T.V., Hellen, C.U., Witherell, G.W. y Wimmer, E. (1990). Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme* **44**, 292-309
- Jarvik, J. y Botstein, D. (1975). Conditional-lethal mutations that suppress genetic defects in morphogenesis by altering structural proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **72**, 2738-42.

- Joerger, A.C., Allen, M.D. y Fersht, A.R. (2004). Crystal structure of a superstable 23 mutant of human p53 core domain. Insights into the mechanism of rescuing oncogenic 24 mutations. *J.Biol.Chem.* **279**, 1291-6.
- Johnson, J.E. (1996). Functional implications of protein-protein interactions in icosahedral viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 27-33
- Kim, H.-W., Shen, T.J., Sun, D.P., Ho, N.T., Madrid, M., Tam, M.F., Zou, M., Cottam, P.F. y Ho, C. (1994). Restoring allostereism with compensatory mutations in hemoglobin. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **91**, 11547-51
- King, J. y Chiu, W. (1997). The procapsid-to-capsid transition in double-stranded DNA bacteriophages. En: Chiu, W., Burnett, R.M. y Garcea, R.L. (eds). *Structural biology of viruses*, pp 288-311. Oxford University Press, Oxford.
- Klig, L.S., Oxender, D.L. y Yanofsky, C. (1988). Second-site revertants of 29 Escherichia coli trp repressor mutants. *Genetics* **120**, 651-5.
- Knowles, N.J. y Samuel, A.R. (2003). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* **91**, 65-80
- Kondrashov, A.S., Sunyaev, S. y Kondrashov, F.A.. (2002). Dobzhansky-Muller incompatibilities in protein evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14878–83.
- Kuhn, R., Luz, N. y Beck, E. (1990). Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **64**, 4625-31
- Kulathinal, R.J., Bettencourt, B.R. y Hartl, D.L. (2004). Compensated deleterious mutations in insect genomes. *Science* **306**, 1553–4.
- Lea, S., Hernandez, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J., Stuart, D. y Mateu, M.G. (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**, 123-39
- Leal, M.L., Lopes, F.J., Carvalho, M.H., Moura, H.A. y Soares, S.A. (1990). Study on thermostabilizers for trivalent oral poliomyelitis vaccine. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **85**, 329-38.
- Lehmann, M. y Wyss, M. (2001). Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Curr Opin Biotechnol* **12**, 371-5
- Lehmann, M., Pasamontes, L., Lassen, S.F. y Wyss, M. (2000). The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochim Biophys Acta* **1543**, 408-15
- Leippert, M., Beck, E., Weiland, F. y Pfaff, E. (1997). Point mutations within the betaG-betaH loop of foot-and-mouth disease virus O1K affect virus attachment to target cells. *J Virol* **71**, 1046-51
- Lemon, S.M., Binn, L.N., Marchwicki, R., Murphy, P.C., Ping, L.H., Jansen, R.W., Asher, L.V., Stapleton, J.T., Taylor, D.G. y LeDuc, J.W. (1990). In vivo replication and reversion to wild type of a neutralization-resistant antigenic variant of hepatitis A virus. *J Infect Dis.* **161**, 7-13.
- Lentz, K.N., Smith, A.D., Geisler, S.C., Cox, S., Buontempo, P., Skelton, A., DeMartino, J., Rozhon, E., Schwartz, J., Girijavallabhan, V., O'Connell, J. y Arnold, E. (1997). Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent SCH48973: comparison of the structural and biological properties of three poliovirus serotypes. *Structure* **5**, 961-78
- Lewis, S. A., Morgan, D.O. y Grubman, M.J. (1991). Expression, processing and assembly of foot-and-mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: induction of a neutralizing antibody response in guinea pigs. *J. Virol.* **65**, 6572–80.
- Li, M., Beard, P., Estes, P.A., Lyon, M.K. y Garcea, R.L. (1998). Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J. Virol.* **72**, 2160–7.
- Li, P.P., Nakanishi, A., Clark, S.W. y Kasamatsu, H. (2002). Formation of transitory intrachain and interchain disulfide bonds accompanies the folding and oligomerization of simian virus 40 Vp1 in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 1353-8

- Li, Z., Yi, Y., Yin, X., Zhang, Z. y Liu, J. (2008). Expression of foot-and mouth disease virus capsid proteins in silkworm-baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. *PlosOne* **3**:e2273.
- Liljas, L. (1986). The structure of spherical viruses. *Prog Biophys Mol Biol* **48**, 1-36
- Liljas L. (1999). Virus assembly. *Curr Opin Struct Biol.* Feb; **9**, 129-34.
- Limn, C.K., Staeuber, N., Monastyrskaya, K., Gouet, P. y Roy, P. (2000). Functional dissection of the major structural protein of bluetongue virus: identification of key residues within VP7 essential for capsid assembly. *J Virol* **74**, 8658-69
- Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Lea, S., Lewis, R., Newman, J. y Parry, N. (1993). Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature*. **362**, 566-8.
- López-Bueno, A., Mateu, M.G. y Almendral, J.M. (2003). High mutant frequency in populations of a DNA virus allows evasion from antibody therapy in an immunodeficient host. *J Virol.* **77**, 2701-8.
- López-Bueno, A., Villarreal, L.P. y Almendral, J.M. (2006). Parvovirus variation for disease: a difference with RNA viruses?. *Curr Top Microbiol Immunol.* **299**, 349-70.
- Lu, B., Taraporewala, F., Stubbs, G. y Culver, J.N. (1998). Intersubunit interactions allowing a carboxylate mutant coat protein to inhibit tobamovirus disassembly. *Virology* **244**, 13-9
- Lucas, R.W., Larson, S.B., Canady, M.A. y McPherson, A. (2002). The structure of tomato aspermy virus by X-ray crystallography. *J Struct Biol* **139**, 90-102
- Luna E, Rodríguez-Huete A, Rincón V, Mateo R, Mateu MG. (2009). Systematic study of the genetic response of a variable virus to the introduction of deleterious mutations in a functional capsid region. *J Virol.* **83**, 10140-51.
- Mahy, B.W. J. (ed.). 2005. Foot-and-mouth disease virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* vol. **288**. Springer Verlag, Berlin.
- Mani, B., Baltzer, C., Valle, N., Almendral, J.M., Kempf, C. y Ros, C. (2006). Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. *J Virol.* **80**, 1015-24.
- Martín-Acebes, M.A. (2008). Mecanismos de entrada y de organización del complejo de replicación del virus de la fiebre aftosa: estudio comparativo con el virus de la enfermedad vesicular del cerdo y el virus de la estomatitis vesicular. *Tesis doctoral*. Universidad Autónoma de Madrid
- Martín-Acebes, M.A., Rincón, V., Armas-Portela, R., Mateu, M.G. y Sobrino, F. (2010). A single amino acid substitution in the capsid of foot-and-mouth disease virus can increase acid lability and confer resistance to acid-dependent uncoating inhibition. *J Virol.* **84**, 2902-12.
- Martínez, M.A., Carrillo, C., González-Candelas, F., Moya, A., Domingo, E. y Sobrino, F. (1991). Fitness alteration of foot-and-mouth disease virus mutants: measurement of adaptability of viral quasispecies. *J Virol.* **65**, 3954-7.
- Martinez-Salas, E., Ortín, J. y Domingo, E. (1985). Sequence of the viral replicase gene from foot-and-mouth disease virus C1-Santa pau (C-S8). *Gene* **35**, 55-61
- Martínez-Salas, E., Ramos, R., Lafuente, E. y López de Quinto, S. (2001). Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J Gen Virol* **82**, 973-84
- Mason, P.W., Rieder, E. y Baxt, B. (1994). RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 1932-6

- Mason, P.W., Bezborodova, S.V. y 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**, 9686-94
- Mason, P.W., Grubman, M.J. y Baxt, B. (2003). Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res* **91**, 9-32
- Mateo, R. (2004). Disección funcional de las interfases entre subunidades de la cápsida del virus de la fiebre aftosa y aproximaciones al diseño de cápsidas más estables. *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Madrid
- Mateo, R. y Mateu, M.G. (2007). Deterministic, compensatory mutational events in the capsid of foot-and-mouth disease virus in response to the introduction of mutations found in viruses from persistent infections. *J. Virol.* **81**, 1879-87.
- Mateo, R., Díaz, A., Baranowski, E. y Mateu, M.G. (2003). Complete alanine scanning of intersubunit interfaces in foot and mouth disease virus capsid reveals critical contributions of many side chains to particle stability and viral function. *J. Biol. Chem.* **278**, 41019-27
- Mateo, R., Luna, E. y Mateu M.G. (2007). Thermostable variants are not generally represented in foot-and-mouth disease virus quasispecies. *J. of General Virology.* **88**, 859-64.
- Mateo, R., Luna, E., Rincón, V. y Mateu, M.G. (2008). Engineering viable foot-and-mouth disease viruses with increased thermostability as a step in the development of improved vaccines. *J. Virol.* **82**, 12232-40.
- Mateu, M.G. (1995). Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res* **38**, 1-24
- Mateu, M.G. y Fersht, A.R. (1999). Mutually compensatory mutations during evolution of the tetramerization domain of tumor suppressor p53 lead to impaired hetero-oligomerization. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**, 3595-9.
- Mateu, M.G. y Verdaguer, N. (2004). Functional and structural aspects of the interaction of foot-and-mouth disease virus with antibodies. En: Sobrino, F. y Domingo, E. (eds.). *Foot and mouth disease. Current perspectives*, pp 77-92. Horizon Bioscience, Norfolk.
- Mateu, M.G., Da Silva, J.L., Rocha, E., De Brum, D.L., Alonso, A., Enjuanes, L., Domingo, E. y Barahona, H. (1988). Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology* **167**, 113-24
- Mateu, M.G., Martínez, M.A., Rocha, E., Andreu, D., Parejo, J., Giralt, E., Sobrino, F. y Domingo, E. (1989). Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5883-7
- Mateu, M.G., Martínez, M.A., Capucci, L., Andreu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E. y 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**, 629-37
- Mateu, M.G., Hernández, J., Martínez, M.A., Feigelstock, D., Lea, S., Pérez, J.J., Giralt, E., Stuart, D., Palma, E.L. y Domingo, E. (1994). Antigenic heterogeneity of a foot-and-mouth disease virus serotype in the field is mediated by very limited sequence variation at several antigenic sites. *J Virol* **68**, 1407-17
- Mateu, M.G., Andreu, D. y Domingo, E. (1995a). Antibodies raised in a natural host and monoclonal antibodies recognize similar antigenic features of foot-and-mouth disease virus. *Virology* **210**, 120-7
- Mateu, M.G., Camarero, J.A., Giralt, E., Andreu, D. y Domingo, E. (1995b). Direct evaluation of the immunodominance of a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus in a natural host. *Virology* **206**, 298-306
- Mateu, M.G., Valero, M.L., Andreu, D. y Domingo, E. (1996). Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition. *J Biol Chem* **271**, 12814-9

- McKenna, T.S., Lubroth, J., Rieder, E., Baxt, B. y Mason, P.W. (1995). Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J Virol* **69**, 5787-90
- Medina, M., Domingo, E., Brangwyn, J.K. y Belsham, G.J. (1993). The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology* **194**, 355-9
- Melnick, J.L. (1996). Thermostability of poliovirus and measles vaccines. *Dev Biol Stand.* **87**, 155-60.
- Meloan, R.H., Rowlands, D.J. y Brown, F. (1979). Comparison of the antibodies elicited by the individual structural polypeptides of foot-and-mouth disease and polio viruses. *J. Gen. Virol.* **45**, 761-763.
- Middleton, J.K., Severson, T.F., Chandran, K., Gillian, A.L., Yin, J. y Nibert, M.L. (2002). Thermostability of reovirus disassembly intermediates (ISVPs) correlates with genetic, biochemical, and thermodynamic properties of major surface protein mu1. *J Virol* **76**, 1051-61
- Middleton, J.K., Agosto, M.A., Severson, T.F., Yin, J. y Nibert, M.L. (2007). Thermostabilizing mutations in reovirus outer-capsid protein mu1 selected by heat inactivation of infectious subvirion particles. *Virology.* **361**, 412-25.
- Milstien, J.B. y Lemon, S.M. (1994). The thermostability of vaccines. Technologies for improving the thermostability of the oral poliovirus vaccine. *Int J Technol Assess Health Care.* **10**, 177-84.
- Milstien, J.B., Lemon, S.M. y Wright, P.F. (1997). Development of a more thermostable poliovirus vaccine. *J. Infect. Dis.* **175**, S247-S253.
- Mirmomeni, M.H., Hughes, P.J. y Stanway, G. (1997). An RNA tertiary structure in the 3' untranslated region of enteroviruses is necessary for efficient replication. *J Virol* **71**, 2363-70
- Morace, G., Pisani, G., Beneduce, F., Divizia, M. y Pana, A. (1993). Mutations in the 3A genomic region of two cytopathic strains of hepatitis A virus isolated in Italy. *Virus Res* **28**, 187-94
- Mosser, A.G. y Rueckert, R.R. (1993). WIN 51711-dependent mutants of poliovirus type 3: evidence that virions decay after release from cells unless drug is present. *J Virol* **67**, 1246-54
- Munshi, S., Liljas, L., Cavarelli, J., Bomu, W., McKinney, B., Reddy, V. y Johnson, J.E. (1996). The 2.8 Å structure of a T = 4 animal virus and its implications for membrane translocation of RNA. *J Mol Biol* **261**, 1-10
- Murray, M.G., Kuhn, R.J., Arita, M., Kawamura, N., Nomoto, A. y Wimmer, E. (1988). Poliovirus type 1/type 3 antigenic hybrid virus constructed in vitro elicits type 1 and type 3 neutralizing antibodies in rabbits and monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May; **85**, 3203-7.
- Nam, H.J., Gurda, B., Miller, E.B., McKenna, R., Aslanidi, G., Zolotukhin, S., Porter, M., Byrne, B.J., Salganik M., Muzyczka, N., Kozyreva, O., Samulski, R.J. y Agbandje-McKenna, M.(2008). Structural studies of AAV transitions associated with endosomal processing and trafficking. *XII Parvovirus Workshop*, Cordoba, Spain.
- Nelson, C.D., Minkinen, E., Bergkvist, M., Hoelzer, K., Fisher, M., Bothner, B. y Parrish C.R. (2008). Detecting small changes and additional peptides in the canine parvovirus capsid structure. *J.Virol.* **82**, 10397-407
- Nettleton, P.F., Davies, M.J., y Rweyemamu, M.M. (1982). Guanidine and heat sensitivity of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strains. *J. Hyg (Lond).* **89**, 129-38.
- Nijhuis, M., Schuurman R., de Jong D., Erickson, J., Gustchina, E., Albert, J., Schipper, P., Gulnik, S. y Boucher, C.A. (1999). Increased fitness of drug-resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS* **13**, 2349-59
- Nikolova, P. V., Wong, K.B., DeDecker, B., Henckel, J. y Fersht, A.R. (2000). Mechanism of rescue of common p53 cancer mutations by second-site suppressor mutations. *EMBO J.* **19**, 370-78.

- Núñez, J.I., Baranowski, E., Molina, N., Ruiz-Jarabo, C.M., Sánchez, C., Domingo, E. y 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**, 3977-83
- O'Donnell, V.K., Pacheco, J.M., Henry, T.M. y 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**, 151-62
- Olivares, I., Sánchez-Merino, V., Martínez, M.A., Domingo, E., López-Galíndez, C., y Menéndez-Arias, L. (1999). Second-site reversion of a human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutant that restores enzyme function and replication capacity. *J.Virol.* **73**, 6293-8.
- Olivares, I., Gutiérrez-Rivas, M., López-Galíndez, C., y Menéndez-Arias, L. (2004). Tryptophan scanning mutagenesis of aromatic residues within the polymerase domain of HIV-1 reverse transcriptase: critical role of Phe-130 for p51 function and second-site revertant restoring viral replication capacity. *Virology* **324**, 400-11.
- Oliveira, A.C., Ishimaru, D., Gonçalves, R.B., Smith, T.J., Mason, P., Sá-Carvalho, D., y Silva, J.L. (1999). Low temperature and pressure stability of picornaviruses: implications for virus uncoating. *Biophys J.* **76**, 1270-9.
- Oliveira, A.C., Gomes, A.M., Almeida, F.C., Mohana-Borges, R., Valente, A.P., Reddy, V. S., Johnson, J.E. y Silva, J.L. (2000). Virus maturation targets the protein capsid to concerted disassembly and unfolding. *J Biol Chem* **275**, 16037-43
- Ono, A., Huang, M. y Freed, E.O. (1997). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 matrix revertants: effects on virus assembly, Gag processing, and Env incorporation into virions. *J.Virol.* **71**, 4409-18.
- Parry, N., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F., Fry, E., Acharya, R., Logan, D. y Stuart, D. (1990). Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature.* **347**, 569-72.
- Pazhanisamy, S., Stuver, C.M., Cullinan, A.B., Margolin, N., Rao, B.G. y Livingston, D.J. (1996). Kinetic characterization of human immunodeficiency virus type-1 protease-resistant variants. *J.Biol.Chem.* **271**, 17979-85.
- Pelemans, H., Esnouf, R., Min, K.L., Parniak, M., De Clercq, E. y Balzarini, J. (2001). Mutations at amino acid positions 63, 189, and 396 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) partially restore the DNA polymerase activity of a Trp229Tyr mutant RT. *Virology* **287**, 143-50.
- Pereira, H.G. (1981). Foot-and-mouth disease. En: Gibbs EPJ (ed) *Virus diseases of food animals*. pp 167-174. Academic Press, New York.
- Pfaff, E. (1997). Recognition sites of RGD-dependent integrins. En: Eble JA, Kühn K (eds). *Integrin ligand interactions*. pp 101-21. Landes Co., Austin.
- Pickrell, J. y Enserink, M. (2001). Foot-and-mouth disease. U.K. outbreak is latest in global epidemic. *Science* **291**, 1677
- Poon, A. y Chao, L.. (2005). The rate of compensatory mutation in the DNA bacteriophage  $\phi$ X174. *Genetics* **170**, 989-99.
- Poteete, A.R., Rennell, D., Bouvier, S.E. y Hardy, L.W. (1997). Alteration of T4 lysozyme structure by second-site reversion of deleterious mutations. *Protein Sci.* **6**, 2418-25.
- Prevelige, P.E., Jr. (1998). Inhibiting virus-capsid assembly by altering the polymerisation pathway. *Trends Biotechnol* **16**, 61-5
- Pringle, C.R. (1964). Genetic aspects of the thermal inactivation properties of foot-and-mouth disease virus strains. *Bull Off int Epiz* **61**, 619-28
- Racaniello, V.R. (2007). Picornaviridae: The viruses and their replication. En: Knipe D. M., Howley P.M., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus S.E. (eds). *Fields Virology*. pp 795-838. Wolters Kluwer/ Lippincot Williams and Wilkins. Philadelphia.

- Ramos, R. y Martínez-Salas, E. (1999). Long-range RNA interactions between structural domains of the aphthovirus internal ribosome entry site (IRES). *RNA* **5**, 1374-83
- Reguera, J., Carreira, A., Riobobos, L., Almendral, J.M. y Mateu, M.G. (2004). Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 2724-9
- Reguera, J., Grueso, E., Carreira, A., Sánchez Martínez, C., Almendral, J.M. y Mateu, M.G. (2005). Functional relevance of aminoacid residues involved in interactions with ordered nucleic acid in a spherical virus. *J. Biol. Chem.* **280**, 17969-77.
- Reynolds, C., Page, G., Zhou, H. y Chow, M. (1991). Identification of residues in VP2 that contribute to poliovirus neutralization antigenic site 3B. *Virology*. **184**, 391-6.
- Reynolds, C., Birnby, D. y Chow, M. (1992). Folding and processing of the capsid protein precursor P1 is kinetically retarded in neutralization site 3B mutants of poliovirus. *J Virol* **66**, 1641-8
- Rieder, E., Bunch, T., Brown, F. y Mason, P.W. (1993). Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *J Virol* **67**, 5139-45
- Rieder, E., Baxt, B. y Mason, P.W. (1994). Animal-derived antigenic variants of foot-and-mouth disease virus type A12 have low affinity for cells in culture. *J Virol.* **68**, 5296-9.
- Roosien, J., Belsham, G.J., Ryan, M.D., King, A.M. y Vlak., J.M. (1990). Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insect cells using baculovirus expression vectors. *J. Gen. Virol.* **71**, 1703-11.
- Ros, C., Burckhardt, C.J. y Kempf, C. (2002). Cytoplasmic trafficking of minute virus of mice: low-pH requirement, routing to late endosomes, and proteasome interaction. *J Virol.* **76**, 12634-45.
- Rossmann, M.G. y Johnson, J.E. (1989). Icosahedral RNA virus structure. *Annu Rev Biochem* **58**, 533-73
- Rossmann, M.G., Greeve, J.M., Kolatkar, P.R., Olson, N.H., Smith, T.J., McKinlay, M.A. y Rueckert, R.R. (1997). Rhinovirus attachment and cell entry. En Chiu, W., Burnett, R.M. y Garcea, R.L. (eds), *Structural biology of viruses*. pp.105-133. Oxford University Press, Oxford.
- Rowlands, D.J. (1999). Foot-and-mouth disease viruses (Picornaviridae). En: Granoff, A., Webster R.G. (eds) *Encyclopedia of virology*, pp. 568-575. Academic Press, London.
- Rowlands, D.J. (2004). Foot-and-mouth disease virus peptide vaccines. En F. Sobrino y E. Domingo (eds.), *Foot and mouth disease. Current perspectives*. pp.335-354. Horizon Bioscience, Norfolk.
- Rowlands, D., Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Lea, S., Lewis, R. y Newman, J. (1994). The structure of an immunodominant loop on foot and mouth disease virus, serotype O1, determined under reducing conditions. *Arch Virol Suppl.* **9**, 51-8.
- Rueckert, R.R. (1996). Picornaviridae: The viruses and their replication. En Fields, B., Knipe, D. M., Howley, P. M. (eds), *Virology* (tercera edición), pp. 609-654. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia.
- Rweyemamu, M.M., Terry, G. y Pay, T.W. (1979). Stability and immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol.* **59**, 69-79.
- Ryan, M.D., King, A.M. y Thomas, G.P. (1991). Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol* **72**, 2727-32
- Ryan, M.D., Donnelly, M., Lewis, A., Mehrotra, A.P., Wilkie, J. y Gani, D. (1999). A novel model for nostoichiometric, cotranslational protein scission in eukaryotic ribosomes. *Biorganic Chem* **27**, 55-79
- Sáiz, M., Gómez, S., Martínez-Salas, E. y Sobrino, F. (2001). Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol* **82**, 93-101
- Sakamoto, K. y Yoshida, K. (2002). Recent outbreaks of foot and mouth disease in countries of east Asia. *Rev Sci Tech* **21**, 459-63

- Salt, J.S. (1993). The carrier state in foot and mouth disease: an immunological review. *Br Vet J* **149**, 207-23
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Samuel, A.R. y Knowles, N.J. (2001). Foot-and-mouth disease virus: cause of the recent crisis for the UK livestock industry. *Trends Genet* **17**, 421-4
- Sanchez-Ruiz, J.M. y Makhatadze, G.I. (2001). To charge or not to charge? *Trends Biotechnol* **19**, 132-5
- Sastri, M., Reddy, D.S., Krishna, S.S., Murthy, M.R. y Savithri, H.S. (1999). Identification of a discrete intermediate in the assembly/disassembly of physalis mottle tymovirus through mutational analysis. *J Mol Biol* **289**, 905-18
- Sauer, R.T., Hehir, K., Stearman, R.S., Weiss, M.A., Jeitler-Nilsson, A., Suchanek, E.G., y Pabo, C.O. (1986). An engineered intersubunit disulfide enhances the stability and DNA binding of the N-terminal domain of lambda repressor. *Biochemistry* **25**, 5992-8.
- Schreiber, G. y Fersht, A.R. (1995). Energetics of protein-protein interactions: analysis of the barnase-barnstar interface by single mutations and double mutant cycles. *J. Mol. Biol.* **248**, 478-86.
- Sheinerman, F.B. y Honig, B. (2002). On the role of electrostatic interactions in the design of protein-protein interfaces. *J. Mol. Biol.* **318**, 161-77.
- Shiomi, H., Urasawa, T., Urasawa, S., Kobayashi, N., Abe, S. y Taniguchi, K. (2004). Isolation and characterization of poliovirus mutants resistant to heating at 50°C for 30min. *J. Med. Virol.* **74**, 484-91.
- Smith, T.J., Chase, E.S., Schmidt, T.J., Olson, N.H. y Baker, T.S. (1996). Neutralizing antibody to human rhinovirus 14 penetrates the receptor-binding canyon. *Nature* **383**, 350-4
- Smyth, M.S. y Martin, J.H. (2002). Picornavirus uncoating. *Mol Pathol* **55**, 214-9
- Sobrinho, F. y Domingo, E. (2001). Foot-and-mouth disease in Europe. FMD is economically the most important disease of farm animals. Its re-emergence in Europe is likely to have consequences that go beyond severe alterations of livestock production and trade. *EMBO Rep* **2**, 459-61
- Sobrinho F. y Domingo, E. eds. (2004). Foot and mouth disease. Current perspectives. Horizon Bioscience, Norfolk.
- Sobrinho F., Dávila, M., Ortín, J. y Domingo, E. (1983). Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**, 310-8
- Sobrinho, F., Sáiz, M., Jiménez-Clavero, M.A., Núñez, J.I., Rosas, M.F., Baranowski, E. y Ley, V. (2001). Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet Res* **32**, 1-30
- Sonenberg, N. y Pelletier, J. (1989). Poliovirus translation: a paradigm for a novel initiation mechanism. *Bioessays* **11**, 128-32
- Steipe, B. (1999). Evolutionary approaches to protein engineering. *Curr Top Microbiol Immunol* **243**, 55-86
- Steven, A.C., Heymann, J.B., Cheng, N., Trus, B.L. y Conway, J.F. (2005). Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol.* **15**, 227-36.
- Stocker, M. y MacPherson, I. (1964). Syrian hamster fibroblasts cell line and its derivatives. *Nature* **203**, 155-7
- Stonehouse, N.J. y Stockley, P.G. (1993). Effects of amino acid substitution on the thermal stability of MS2 capsids lacking genomic RNA. *FEBS Lett* **334**, 355-9
- Sutmöller, P., Barteling, S.J., Olascoaga, R.C. y Sumption, K.J. (2003). Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* **91**, 101-144.

- Tachedjian, G., Aronson, H.E. y Goff, S.P. (2000). Analysis of mutations and suppressors affecting interactions between the subunits of the HIV type 1 reverse transcriptase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **97**, 6334-9.
- Tami, C., Taboga, O., Berinstein, A., Núñez, J.I., Palma, E.L., Domingo, E., Sobrino, F. y Carrillo, E. (2003). Evidence of the coevolution of antigenicity and host cell tropism of foot-and-mouth disease virus in vivo. *J Virol.* **77**, 1219-26.
- Takeda, N., Kuhn, R.J., Yang, C.F., Takegami, T. y Wimmer, E. (1986). Initiation of poliovirus plus-strand RNA synthesis in a membrane complex of infected HeLa cells. *J Virol* **60**, 43-53
- Terry, G.M., Syred, A. y Rweyemamu, M.M. (1983). Studies on the stability of foot-and-mouth disease virus using absorbance-temperature profiles. *Dev. Biol. Stand.* **55**,117-20.
- Thompson, D., Muriel, P., Russell, D., Osborne, P., Bromley, A., Rowland, M., Creigh-Tyte, S. y Brown, C. (2002). Economic costs of the foot-and-mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Rev. Sci. Tech.* **21**, 675-87.
- Thomson, G.R., Vosloo, W. y Bastos, A.D. (2003). Foot and mouth disease in wildlife. *Virus Res* **91**, 145-61
- Thompson, J.R., S. Doun y K.L. Perry. (2006). Compensatory capsid protein mutations in cucumber mosaic virus confer systematic infectivity in squash (*Cucurbita pepo*). *J.Virol.* **80**, 7740-3.
- Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W. y Barlough J.E. (1988) En: Hagan and Bruner's *Microbiology and infectious diseases of domestic animals*, pp. 647-667. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca.
- Toja, M., Escarmís, C. y 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**, 161-71
- Tsang, S.K., Danthi, P., Chow, M. y Hogle, J.M. (2000). Stabilization of poliovirus by capsid-binding antiviral drugs is due to entropic effects. *J Mol Biol* **296**, 335-40
- Tu, Z., Chapman, N.M., Hufnagel, G., Tracy, S., Romero, J.R., Barry, W.H., Zhao, L., Currey, K. y Shapiro, B. (1995). The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region. *J Virol* **69**, 4607-18
- Twomey, T., France, L.L., Hassard, S., Burrage, T.G., Newman, J.F. y Brown, F. (1995). Characterization of an acid-resistant mutant of foot-and-mouth disease virus. *Virology* **206**, 69-75
- Vakharia, V.N., Devaney, M.A., Moore, D.M., Dunn, J.J. y Grubman, M.J. (1987). Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *J Virol* **61**, 3199-207
- van Bekkum, J.G., Frenkel, H.S., Fredericks, H.H.J. y Frenkel, S. (1959). Observations on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr. diergeneeskd.* **84**, 1159-64
- van Vlijmen, H.W., Curry, S., Schaefer, M. y Karplus, M. (1998). Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J Mol Biol* **275**, 295-308
- Varsani, L., Cui, T., Rangarajan, M., Hartley, B.S., Goldberg, J., Collyer, C. y Blow, D.M. (1993). *Arthrobacter* D-xylose isomerase: protein-engineered subunit interfaces. *Biochem J.* **291**, 575-83.
- Vasquez, C., Denoya, C.D., La Torre, J.L. y Palma, E.L. (1979). Structure of foot-and-mouth disease virus capsid. *Virology* **97**, 195-200
- Verdaguer, N., Mateu, M.G., Andreu, D., Giralt, E., Domingo, E. y Fita, I. (1995). Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction. *EMBO J* **14**, 1690-6

- Verdaguer, N., Sevilla, N., Valero, M.L., Stuart, D., Brocchi, E., Andreu, D., Giralt, E., Domingo, E., Mateu, M.G. y Fita, I. (1998). A similar pattern of interaction for different antibodies with a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus: implications for intratypic antigenic variation. *J Virol* **72**, 739-48
- Verheyden, B., Andries, K. y Rombaut, B. (2001). Capsid and RNA stabilisation of the oral polio vaccine. *Vaccine*. **28**,1899-905.
- Virudachalam, R., Low, P.S., Argos, P. y Markley, J.L. (1985). Turnip yellow mosaic virus and its capsid have thermal stabilities with opposite pH dependence: studies by differential scanning calorimetry and <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Virology* **146**, 213-20
- Wang, W., Lee, W.M., Mosser, A.G. y Rueckert, R.R. (1998). WIN 52035-dependent human rhinovirus 16: assembly deficiency caused by mutations near the canyon surface. *J Virol*. **72**,1210-8.
- Warner, S.C., Desai, P. y Person, S. (2000). Second-site mutations encoding residues 34 and 78 of the major capsid protein (VP5) of herpes simplex virus type 1 are important for overcoming a blocked maturation cleavage site of the capsid scaffold proteins. *Virology* **278**, 217-26.
- White, J.M., Hoffman, L.R., Arevalo, J.H. y Wilson, I.A. (1997). Attachment and entry of influenza virus into host cells: pivotal roles of the hemagglutinin. En Chiu, W., Garcea, R., y Burnette, R. (eds), *Structural biology of viruses* pp 80-104. Oxford University Press, Oxford.
- Wintrode, P.L., Miyazaki, K. y Arnold, F.H. (2001). Patterns of adaptation in a laboratory evolved thermophilic enzyme. *Biochim Biophys Acta* **1549**, 1-8
- Wray, J.W., Baase, W.A., Lindstrom, J.D., Weaver, L.H., Poteete, A.R. y Matthews, B.W. (1999). Structural analysis of a non-contiguous second-site revertant in T4 lysozyme 2 show that increasing the rigidity of a protein can enhance its stability. *J.Mol.Biol.* **292**, 1111- 20.
- Wu, P., Xiao, W., Conlon, T., Hughes, J., Agbandje-McKenna, M., Ferkol, T., Flotte, T. y Mucyczka, N. (2000). Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 capsid vectors with altered tropism. *J Virol* **74**, 8635-47.
- Wu, T. D., Schiffer, C.A., Gonzales, M.J., Taylor, J., Kantor, R., Chou, S., Israelski, D., Zolopa, A.R., Fessel, W.F. y Shafer, R.W. (2003). Mutation patterns and structural correlates in human immunodeficiency virus type 1 protease following different protease inhibitor treatments. *J. Virol.* **77**, 4836-47.
- Xiang, W., Cuconati, A., Hope, D., Kirkegaard, K. y 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**, 6732-41
- Yamaguchi, A., O'vauchi, R., Someva, Y., Akasaka, T. y Sawai, T. (1993). Second-site mutation of Ala-220 to Glu or Asp suppresses the mutation of Asp-285 to Asn in the transposon Tn10-encoded metal tetracycline/H antiporter of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **268**, 26990-5.
- Yuan, T.T. y Shih, C. (2000). A frequent, naturally occurring mutation (P130T) of 9 human hepatitis B virus core antigen is compensatory for immature secretion phenotype of 10 another frequent variant (I97L). *J. Virol.* **74**, 4929-32.
- Zhang, L., Chandran, K., Nibert, M.L. y Harrison, S.C. (2006). Reovirus mu1 structural rearrangements that mediate membrane penetration. *J Virol.* **80**, 12367-76.
- Zhao, R., Hadfield, A.T., Kremer, M.J. y Rossmann, M.G. (1997). Cations in human rhinoviruses. *Virology*. **227**, 13-23.
- Zhou, S. y Standring, D.N. (1992). Cys residues of the hepatitis B virus capsid protein are not essential for the assembly of viral core particles but can influence their stability. *J. Virol.* **66**, 5393-8.
- Zibert, A., Maass, G. Strebel, K., Falk, M.M. y Beck, E. (1990). Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J. Virol.* **64**, 2467-73.
- Zlotnick, A. (1994). To build a virus capsid. An equilibrium model of the self assembly of polyhedral protein complexes. *J. Mol. Biol.* **241**, 59-67.

Zlotnick, A. y Stray, S.J. (2003). How does your virus grow? Understanding and interfering with virus assembly. *Trends Biotechnol.* **21**, 536-42.

Zurbriggen, A. y Fujinami, R.S. (1989). A neutralization-resistant Theiler's virus variant produces an altered disease pattern in the mouse central nervous system. *J Virol.* **63**, 1505-13.

Zurbriggen, A., Yamada, M., Thomas, C. y Fujinami R.S. (1991). Restricted virus replication in the spinal cords of nude mice infected with a Theiler's virus variant. *J Virol.* **65**, 1023-30.

## 8. ANEXO

Tabla I. Análisis de la conservación en VFA de los 42 residuos por protómero localizados en las interfaces entre pentámeros en la cápsida de C-S8c1 <sup>a</sup>

Serotipo		RESIDUO INTERFASICO <sup>b</sup>										
C-S8c1	E2011	I2014	R2018	H2021	T2022	T2023	S2024	T2026	Q2027	L2051	T2053	Q2057
C	E 39	I 39	R 38	H 37	T 38	T 38	S 39	T 39	Q 39	L 39	T 39	Q 39
			T 1	Q 2	E 1	P 1						
A	E 56	I 55	R 56	H 56	T 56	T 47	S 56	T 56	Q 55	L 56	T 56	Q 56
		L 1				I 9			H 1			
O	E 88	I 88	R 88	H 87	T 87	T 88	S 87	T 88	Q 87	L 88	T 88	Q 88
				gap 1	H 1		T 1		T 1			
Asia 1	E 37	I 37	R 37	H 37	T 37	T 37	S 37	T 37	Q 37	L 37	T 37	Q 37
Sat 1	E 17	I 17	S 16	T 17	T 17	T 17	S 17	T 17	Q 17	L 17	T 17	Q 17
			R 1									
Sat 2	E 8	I 8	R 8	T 8	T 8	T 8	S 8	T 8	Q 8	L 8	T 8	Q 8
Sat 3	E 5	I 5	R 5	T 5	T 5	T 5	S 5	T 5	Q 5	L 5	S 3	Q 5
											T 2	
TODOS	E 250	I 249	R 233	H 217	T 248	T 240	S 249	T 250	Q 248	L 250	T 247	Q 250
		L 1	S 16	T 30	E 1	I 9	T 1		H 1		S 3	
			T 1	Q 2	H 1	P 1			T 1			
				gap 1								

Serotipo		RESIDUO INTERFASICO <sup>b</sup>										
C-S8c1	R2060	K2063	K2088	K2096	Y2098	E2108	T2110	V2112	N2114	Q2115	F2116	M2154
C	R 38	K 39	K 37	K 33	Y 38	E 39	T 36	V 39	N 39	Q 39	F 39	M 39
	1 X		H 2	D 5	F 1		S 2					
				G 1			C 1					
A	R 56	K 56	H 27	D 40	Y 48	E 56	S 42	V 56	N 56	Q 56	F 53	M 56
			K 20	E 11	F 8		T 14				gap 3	
			R 6	N 5								
			N 1									
			S 1									
O	R 88	K 88	K 82	D 84	Y 87	E 88	T 82	V 88	N 88	Q 88	F 87	M 86
			H 5	E 2	F 1		S 6				gap 1	L 1
			T 1	G 1								V 1
Asia1	R 37	K 37	K 35	D 30	Y 37	E 37	T 35	V 37	N 37	Q 37	F 37	M 37
			H 2	A 3			S 2					
			G 3									
			S 1									
Sat1	R 17	K 17	K 17	D 17	H 12	Q 11	S 17	T 17	T 17	Q 17	F 17	T 17
Sat2	R 8	K 8	K 8	D 7	Y 8	Q 8	T 6	T 8	T 8	Q 8	F 8	T 8
				E 1			S 2					
Sat3	R 5	K 5	K 5	D 4	H 5	Q 5	S 3	T 5	T 5	Q 5	F 5	T 5
				E 1			T 2					
TODOS	R 249	K 250	K 204	D 187	Y 223	E 226	T 175	V 220	N 220	Q 250	F 246	M 218
	X 1		H 36	K 33	H 17	Q 24	S 74	T 30	T 30		gap 4	T 30
			R 6	E 15	F 10		C 1					L 1
			T 2	N 6								V 1
			N 1	G 5								
		S 1	A 3									
			S 1									

Tabla I (continuación)

Serotipo	RESIDUO INTERFASICO <sup>b</sup>											
C-S8c1	K2198	Y2200	N2202	E2213	D3069	Q3071	K3118	R3120	M3122	H3141	H3144	E3146
<b>C</b>	K 39	Y 39	N 39	E 39	D 33	Q 34	K 34	R 34	M 34	H 34	H 34	E 34
					gap 1							
	K 56	Y 56	N 56	E 56	D 43	T 33	K 57	R 57	M 57	H 57	H 57	E 57
<b>A</b>					G 9	Q 13						
					E 2	S 5						
					gap 3							
						N 3						
						D 2						
						R 1						
<b>O</b>	K 88	Y 87	N 88	E 88	D 71	D 72	K 71	R 71	M 72	H 72	H 72	E 72
		T 1			E 1		N 1	X 1				
<b>Asia 1</b>	K 36	Y 37	N 37	E 37	S 37	D 37	K 37	R 37	M 37	H 36	H 37	E 37
	R 1									D 1		
<b>Sat 1</b>	E 17	Y 17	N 17	E 17	N 22	S 23	K 25	K 25	M 25	H 25	H 25	E 25
					S 2	N 1						
					E 1	D 1						
<b>Sat 2</b>	E 8	Y 8	N 8	E 8	N 11	D 13	K 13	K 13	M 13	H 13	H 13	E 13
					S 2							
<b>Sat 3</b>	E 5	Y 5	N 5	E 5	S 8	S 8	K 9	R 9	M 9	H 9	H 9	E 9
					I 1	D 1						
<b>tauyuan</b>					D 1	D 1	K 1	R 1	M 1	H 1	H 1	E 1
<b>HKN</b>					D 1	D 1	K 1	R 1	M 1	H 1	H 1	E 1
<b>Chu-pei</b>					D 1	D 1	K 1	R 1	M 1	H 1	H 1	E 1
	K 219	Y 249	N 250	E 250	D 150	D 129	K 249	R 211	M 250	H 249	H 250	E 250
	E 30	T 1			S 49	Q 47	N 1	K 38		D 1		
	R 1				N 33	S 36		X 1				
<b>TODOS</b>					G 9	T 33						
					E 4	N 4						
					gap 4							
						R 1						
					I 1							

Serotipo	RESIDUO INTERFASICO <sup>b</sup>					
C-S8c1	D3148	L3151	N3152	I3189	T3190	K3193
<b>C</b>	D 32	L 34	N 34	I 33	T 34	K 34
	X 2			V 1		
<b>A</b>	D 57	L 57	N 57	I 57	T 57	K 57
<b>O</b>	D 72	L 72	N 72	I 72	T 72	K 71
<b>Asia 1</b>	D 37	L 37	N 37	I 37	T 37	K 36
						H 1
<b>Sat 1</b>	D 25	L 25	N 25	I 19	T 25	H 25
				V 6		
<b>Sat 2</b>	D 13	L 13	N 13	V 13	T 13	H 13
<b>Sat 3</b>	D 9	L 9	N 9	I 8	T 9	H 9
				V 1		
<b>tauyuan</b>	D 1	L 1	N 1	I 1	T 1	K 1
<b>HKN</b>	D 1	L 1	N 1	I 1	T 1	K 1
<b>Chu-pei</b>	D 1	L 1	N 1	I 1	T 1	K 1
	D 248	L 250	N 250	I 229	T 250	K 201
<b>TODOS</b>	X 2			V 21		H 48
						N 1

<sup>a</sup> Para cada una de las proteínas de la cápsida de VFA VP2 y VP3 se ha realizado un alineamiento de 250 secuencias, de las cuales 224 resultaron comunes entre ambos alineamientos. X: En la posición indicada hay un residuo pero no está determinado; gap: deleción en la posición indicada.

<sup>b</sup> Para cada posición analizada se indican los aminoácidos presentes en C-S8c1 (negrita), en cada uno de los siete serotipos y el número de veces que estos se encontraron presentes en el total de los 250 aislados.

**Tabla II. Análisis de la conservación en VFA de los residuos de la cápsida de C-S8c1 en los que han aparecido mutaciones compensatorias <sup>a</sup>.**

Serotipo		RESIDUO CON MUTACION COMPENSATORIA <sup>b</sup>										
C-S8c1	N2019	T2023	F2034	T2053	R2060	K2063	M2064	K2088	Y2098	Y2100	N2114	Q2115
<b>C</b>	N38	T38	Y20	T39	R38	K39	M32	K37	Y38	Y39	N39	Q 39
	Q1	R1	F19		X1		K4 T2 I1	H2	F1			
<b>A</b>	N56	T47	Y51	T56	R56	K56	K45	H27	Y48	Y56	N56	Q 56
		I9	gap 2 F1 H1 L1				T7 M4	K20 R6 N1 S1 T1	F8			
<b>O</b>	N88	T88	Y85	T88	R88	K88	T80	K82	Y87	Y88	N88	Q 88
			F1 H1 gap 1				K7 M1	H5 T1	F1			
<b>Asia 1</b>	N37	T37	Y37	T37	R37	K37	K36	K35	Y37	N32	N37	Q 37
							T1	H2		T4 N1		
<b>Sat 1</b>	H17	T17	Y16	T17	R17	K17	H11	K17	H12	Y17	T17	Q 17
			R1				Q5 E1		Y5			
<b>Sat 2</b>	H8	T8	Y8	T8	R8	K8	E6	K8	Y8	Y8	T8	Q 8
							K1 Q1					
<b>Sat 3</b>	H5	T5	Y5	S3	R5	K5	E5	K5	H5	Y5	T5	Q 5
			T2									
<b>TODOS</b>	N219	T240	Y222	T247	R249	K250	K93	K204	Y223	Y245	N220	Q250
	H30	I9	F21	S3	X1		T90	H36	H 17	T4	T30	
	Q1	R1	gap 3 H2 L1 R1				M37 E12 H11 Q6 I1	R6 T2 N1 S1	F10	N1		
Serotipo		RESIDUO CON MUTACION COMPENSATORIA <sup>b</sup>										
	L2125	Y2138	P2150	A2185	T2188	T2189	T2191	A2192	K2198	V2199	T3068	G3070
<b>C</b>	L34	Y38	P39	A36	T39	T20	T34	A21	K39	V39	T31	G34
	M5	X1		S3		V19	N4	S10			A2	
							A1	V3			1gap	
								E2 T2 G1				
<b>A</b>	M50	Y56	P56	S43	T56	V45	T23	T29	K56	V56	T43	D22
	L6			A13		T 10	N11	A10			A9	E16
						N1	A9	E7			3 gap	G6
							D7	V5			E1	Q5
							S4	G2			I1	N4
							Q1	I2				S3
							X1	N1				A1
<b>O</b>	M86	Y86	P88	A82	T88	V85	T62	E80	K88	V88	T72	S71
	L2	F2		S6		T2	N22	T5				T1
						I1	S3	A1				
							A1	I1 G1				
<b>Asia 1</b>	L34	Y37	P37	A35	T37	V37	T34	G34	K36	V37	N37	G35
	M3			S2			N3	T2	R1			A2
								E1				
<b>Sat 1</b>	M16	Y17	P17	A15	T17	N16	T16	I16	E17	V17	N12	G25
	L1			S1		T1	A1	Q1			S7	
				T1							A5 H1	
<b>Sat 2</b>	M8	F7	P8	T8	T8	T8	A6	Q8	E8	V8	N13	G13
		Y1					T2					
<b>Sat 3</b>	M5	S5	P5	A5	T5	T5	S3	M5	E5	V5	N8	G8
							N2				T1	V1
<b>tauyuan</b>											T1	S1
<b>HKN</b>											T1	S1
<b>Chu-pei</b>											T1	S1
<b>TODOS</b>	M173	Y235	P250	A186	T250	V186	T171	E90	K219	V250	T150	G121
	L77	F9		S55		T46	N42	G38	E30		N70	S77
		S5		T9		N17	A18	T38	R1		A16	D22
		X1				I1	S10	A32			S7	E16
							D7	I19			4 gap	Q5
							Q1	S10			E1	N4
							X1	Q9			H1	A3
								V8			I1	T1
								M5				V1
								N1				

**Tabla II (continuación)**

Serotipo	RESIDUO CON MUTACION COMPENSATORIA <sup>b</sup>							
C-S8c1	L3107	T3115	K3118	H3144	E3146	T3190	H3191	D3195
<b>C</b>	L34	T34	K34	H 34	E34	T34	H32 R2	D32 G1 S1
<b>A</b>	L57	T56 A1	K57	H 57	E57	T57	H57	E47 D9 Q1
	L69 P2 S1	T72	K71 N1	H 72	E72	T72	H72	D69 E3
<b>O</b>	V20 I13 N3 G1	T37	K37	H37	E37	T37	H34 Q2 T1	E37
<b>Sat 1</b>	L24 I1	T25	K25	H 25	E25	T25	D25	K24 T1
<b>Sat 2</b>	Y13	T13	K13	H 13	E13	T13	D13	A11 S1 T1
<b>Sat 3</b>	L9	T9	K9	H 9	E9	T9	D9	P9
<b>tauyuan</b>	L1	T1	K1	H 1	E1	T1	H1	D1
<b>HKN</b>	L1	T1	K1	H 1	E1	T1	H1	D1
<b>Chu-pei</b>	L1	T1	K1	H 1	E1	T1	H1	D1
	L196	T249	K249	H250	E250	T250	H198	D113
	V20	A1	N1				D47	E87
	I14						R2	K24
<b>TODOS</b>	Y13						Q2	A11
	N3						T1	P9
	P2							S2
	G1							T2
	S1							G1
								Q1

<sup>a</sup> Ver la nota correspondiente en la Tabla I de este anexo.

<sup>b</sup> Ver la nota correspondiente en la Tabla I de este anexo.