

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Programa de Doctorado en
Biología Funcional y Molecular

Estrategias de genética reversa aplicadas al
vesivirus de conejo

Alberto García Manso

Oviedo 2014

Abreviaturas

5'-NT: región/secuencia 5' no traducida

ADN/DNA: ácido desoxirribonucleico

ARCA (AntiReverse Cap Analog): análogo de *cap* 3'-O-metil-m⁷GpppG

BEC: *calicivirus entérico bovino*

BSA: albumina de suero bovino

CCID₅₀: dosis infectiva media, que provoca efectos citopáticos en la mitad de los cultivos ensayados

CCV: *calicivirus canino*

CEF: fibroblastos de embrión de pollo

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

CITE: elementos de traducción independiente de *cap*

CMV: citomegalovirus

CNB: Centro Nacional de Biotecnología

CPE: efecto citopático

CRFK: células de riñón de gato desarrolladas por Crandell-Rees

EBHV: *virus del síndrome de la fiebre parda europea*

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

DMEM: medio de cultivo celular Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetil sulfóxido

ECL: sistema de detección por quimioluminiscencia

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EMBL: *European Molecular Biology Laboratory*

FCV: *calicivirus felino*

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GFP: proteína fluorescente verde

HBS: tampón salino de HEPES

H δ V: *virus de la hepatitis delta*

HEK293T: línea celular derivada de riñón de embrión humano

HeLa: línea celular derivada de adenocarcinoma de cérvix humano (Herietta Lacks)

HEPES: ácido N-2-hidroxietilpiperazina -N-2-etanosulfónico

hpi: horas post-infección

hpt: horas post-transfección

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus

INIA: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

IPTG: isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido

IRES: sitio interno de entrada al ribosoma

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

LC: péptido *leader* de la proteína de la capsida

luc: gen de la luciferasa de luciérnaga

MNV: *norovirus murino*

moi: multiplicidad de infección

MOPS: ácido 3-[N-*morfolino*]-propanosulfónico

Abreviaturas

NS: proteína no estructural	SBF: <u>s</u> uero <u>b</u> ovino <u>f</u> etal
NV: <i>virus Norwalk</i>	SDS: dodecilsulfato sódico
ORF (<i>Open Reading Frame</i>): pauta abierta de lectura	SIDA: <u>S</u> índrome de <u>I</u> nmunode <u>f</u> iciencia <u>A</u> dquirida
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida	SMSV: <i>virus del león marino de San Miguel</i>
PBS: tampón salino de fosfato	SPF: libre de patógenos específicos
PCR: reacción en cadena de la polimerasa	TAE: solución tampón compuesta de <u>T</u> ris, <u>A</u> cetato y <u>E</u> DTA
PCV/PCV-Pan1: <i>calicivirus de primate Pan-1</i>	TIV: <u>t</u> ranscripción <u>i</u> n <u>v</u> itro
PEC: <i>calicivirus entérico porcino</i>	T_m: temperatura de disociación
PTB: proteína de unión a secuencias ricas en pirimidinas	TPB: medio de cultivo triptosa y fosfato
RACE: amplificación rápida de extremos de cDNA	TURBS: <i><u>T</u>ermination <u>U</u>pstream <u>R</u>ibosomal <u>B</u>inding <u>S</u>ite</i>
RaV: <i>vesivirus de conejo</i>	TuV: <i>virus Tulane</i>
rFPV: <i>virus recombinante de la viruela aviar</i>	UA: <u>U</u> nidades <u>A</u> rbitrarias
RHDV: <i>virus de la enfermedad hemorrágica del conejo</i>	ufp: <u>u</u> nidad <u>f</u> ormadora de placa
RLB: (<i>Reporter <u>L</u>ysis <u>B</u>uffer</i>) solución tampón para preparar un lisado de células	VESV: <i>virus del exantema vesicular del cerdo</i>
RNA: ácido ribonucleico	VF: factor de virulencia
RNAg: ácido ribonucleico genómico	VIH: <i>virus de inmunodeficiencia humana</i>
RNAsg: ácido ribonucleico subgenómico	VLP: <i><u>V</u>irus-<u>L</u>ike <u>P</u>article</i>
RT: reacción de transcripción reversa	VP: proteína viral
SARS: <u>S</u> índrome <u>R</u> espiratorio <u>A</u> gudo <u>S</u> evero	WCV: <i>calicivirus de morsa</i>
	X-Gal: 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil - β -D-galactopiranosido

Indice

<i>1. Introducción</i>	<i>1</i>
<i>1.1.- Características generales de la familia Caliciviridae.</i>	<i>1</i>
1.1.1.- Estructura de los calicivirus (morfología).	3
1.1.2.- Organización genómica.	5
1.1.3.- Expresión génica.	7
1.1.4.- Ciclo de multiplicación de los calicivirus.	9
<i>1.2.- El vesivirus de conejo.</i>	<i>13</i>
<i>1.3.- Genética reversa en los virus de RNA de polaridad positiva.</i>	<i>15</i>
1.3.1.- Construcción de clones infecciosos para virus con genomas de RNA de polaridad positiva.	17
1.3.2.- Sistemas de genética reversa en Calicivirus.	18
<i>2. Objetivos</i>	<i>27</i>
<i>3. Materiales y métodos</i>	<i>29</i>
<i>3.1.- Material biológico.</i>	<i>29</i>
3.1.1.- Cepas bacterianas.	29
3.1.2.- Virus.	29
3.1.3.- Cultivos celulares eucariotas.	30
3.1.4.- Vectores plasmídicos.	30
<i>3.2.- Métodos de cultivo.</i>	<i>33</i>
3.2.1.- Cultivo de bacterias y transformación de células competentes.	33
3.2.2.- Cultivo de células eucariotas.	33
3.2.3.- Establecimiento de cultivos primarios de Fibroblastos de Embrión de Pollo	34
3.2.4.- Propagación de virus.	35
3.2.4.a.- Infección de cultivos celulares con el vesivirus de conejo.	35
3.2.4.b.- Amplificación del poxvirus recombinante rFPV/T7.	36

3.3.- Métodos de manipulación de ácidos nucleicos.	36
3.3.1.- Purificación de ácidos nucleicos.	37
3.3.1.a.- Extracción y manipulación de RNA.	37
3.3.1.b.- Purificación de DNA plasmídico.	37
3.3.1.c.- Recuperación de DNA modificado.	37
3.3.2.- Análisis de ácidos nucleicos.	38
3.3.2.a.- Electroforesis en gel de agarosa.	38
3.3.2.b.- Cuantificación de DNA.	38
3.3.2.c.- Secuenciación de DNA.	39
3.3.3.- Obtención de cDNA: transcripción reversa.	39
3.3.4.- Amplificación mediante PCR.	41
3.3.5.- Construcción de vectores de transcripción.	41
3.3.6.- Mutagénesis dirigida.	43
3.3.7.- Síntesis <i>in vitro</i> de RNA.	44
3.3.8.- Detección de RNA viral en cultivos infectados con RaV.	45
3.3.9.- Secuenciación del genoma de RaV.	45
3.3.10.- Determinación del extremo 5' del genoma de RaV.	46
3.4.- Métodos analíticos de proteínas.	47
3.4.1.- Obtención de extractos proteicos.	47
3.4.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).	47
3.4.3.- Ensayo Western Blot.	48
3.4.4.- Inmunodetección de proteínas virales en cultivos celulares.	48
3.4.5.- Síntesis <i>in vitro</i> de proteínas.	49
3.4.6.- Ensayo de actividad luciferasa.	49
3.5.- Ensayos en células animales.	50
3.5.1.- Transfección transitoria de cultivos celulares.	50
3.5.2.- Rescate de virus recombinantes.	50
3.5.3.- Titulación de suspensiones virales.	52
3.5.4.- Aislamiento de placas virales.	53
3.5.5.- Purificación de viriones de RaV.	53
3.5.6.- Curva de replicación viral.	54

4. Resultados	55
4.1.- Análisis de la eficiencia de transfección de RNA sintético en distintos tipos celulares.	55
4.2.- Estudio del papel de la secuencia 5' no traducida (5'-NT) en la traducción de RNAs sintéticos derivados del genoma del RaV.	57
4.2.1.- Construcción de vectores reporteros.	58
4.2.2.- Análisis funcional de la secuencia 5'-NT del RaV.	59
4.3.- Construcción de vectores de transcripción para los RNAs genómico y subgenómico del RaV.	63
4.3.1.- Creación de una etiqueta en el cDNA genómico.	64
4.3.2.- Modificación del extremo 3' del cDNA clonado en los vectores de transcripción.	65
4.3.3.- Sustitución de parte de la región 3' del genoma de RaV por el gen que codifica la proteína fluorescente verde GFP.	66
4.3.4.- Análisis funcional de los transcritos derivados del genoma del RaV en cultivos celulares.	68
4.4.- Producción y análisis funcional de transcritos sintéticos derivados del cDNA de RaV obtenidos mediante amplificación por RT-PCR de longitud genómica en un solo paso a partir del RNA de los viriones.	72
4.4.1.- Clonación del amplicón de longitud genómica y análisis funcional.	75
4.5.- Construcción de un vector de transcripción del genoma de RaV a partir de varios fragmentos de cDNA y análisis de su funcionalidad.	77
4.5.1.- Creación de una etiqueta diferencial en el genoma del clon A23.	78
4.5.2.- Análisis de la infectividad de los transcritos derivados del clon A23.	79
4.6.- Rescate del vesivirus de conejo con el virus auxiliar rFPV/T7.	80
4.6.1.- Análisis de la funcionalidad del virus auxiliar rFPV/T7.	80

4.6.2.- Análisis de las construcciones pF-RaVg y derivadas.	81
4.6.3.- Análisis de la construcción pF-RaVR/GFP.	82
4.6.4.- Análisis funcional de las construcciones derivadas del clon A23.	83
4.6.5.- Caracterización de los virus rescatados.	87
4.6.5.a.- <i>Caracterización de las secuencias genómicas de los virus rescatados.</i>	91
5. <i>Discusión</i>	95
5.1.- <i>Estudios previos sobre la transfección y la traducción de RNA sintético en cultivos celulares.</i>	95
5.2.- <i>Estrategias de genética reversa con RNA sintéticos de RaV.</i>	103
5.3.- <i>Estrategias de rescate con rFPV/T7</i>	108
6. <i>Conclusiones</i>	115
7. <i>Bibliografía</i>	117
Anexo	129

1. Introducción

1.1.- Características generales de la familia Caliciviridae.

Los virus son los patógenos más pequeños, genéticamente inestables y destructivos que se conocen. Son parásitos intracelulares obligados que infectan todo tipo de organismos, tanto eucariotas como procariotas.

Las enfermedades causadas por los virus animales son a menudo protagonistas de la actualidad, ya sea por los daños que ocasionan en la ganadería, como los últimos brotes de fiebre aftosa en el Reino Unido, o por su potencial riesgo de zoonosis, como el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) o, más recientemente, la gripe aviaria y la gripe A.

La familia *Caliciviridae* incluye virus animales de pequeño tamaño que carecen de envuelta lipídica y cuyo genoma está constituido por RNA monocatenario de polaridad positiva. En humanos, con el *virus Norwalk* como referencia, constituyen la principal causa de gastroenteritis aguda no bacteriana asociada a brotes epidémicos (Clark y McKendrick, 2004). Entre los patógenos animales destacan el *calicivirus felino* (FCV), que causa infecciones respiratorias en gatos (Radford *et al.*, 2007), y el *virus de la enfermedad hemorrágica del conejo* (RHDV), que provoca hemorragias en órganos internos con tasas de mortalidad cercanas al 90% en los conejos europeos (Ohlinger *et al.*, 1993).

En un principio los calicivirus fueron incluidos dentro de la familia *Picornaviridae*, con la que comparten una serie de características estructurales: los viriones tienen simetría icosaédrica, son de similar tamaño y presentan una proteína viral unida al extremo 5' de sus genomas en lugar de la estructura *cap*. La familia *Caliciviridae* fue propuesta como tal en 1979 por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), el cual definió las características diferenciales de los calicivirus: la cápsida icosaédrica está compuesta por una proteína estructural mayoritaria cuyo ensamblaje forma 32 depresiones en forma de copa, el genoma se organiza en varias pautas abiertas de lectura y presenta los genes de las proteínas estructurales en la región más cercana al extremo 3', que generalmente es expresada mediante un RNA mensajero subgenómico (Green *et al.*, 2000). Aunque inicialmente se establecieron cuatro géneros aceptados por la comunidad científica: Lagovirus, Sapovirus, Norovirus y Vesivirus, el último informe del ICTV (Clarke *et al.*, 2011) incorpora un quinto género denominado Nebovirus (Smiley *et al.*, 2002; Oliver *et al.*,

Introducción

2006) y propone la creación de otros dos: Recovirus (Farkas *et al.*, 2008) y Valovirus (L'Homme *et al.*, 2009). Más recientemente, se han descrito nuevas especies de calicivirus entéricos no asociadas a ningún género y que podrían establecer tres nuevos taxones pendientes de valoración: Nacovirus (Day *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 2012), Bavovirus (Wolf *et al.*, 2011) y Secalivirus (Ng *et al.*, 2012). En la tabla 1 se resumen las especies más representativas de cada género.

Género	Especie	Hospedador
Sapovirus	<i>Virus Sapporo</i>	Humano
	<i>Virus Manchester</i>	Humano
	<i>Calicivirus entérico porcino</i> (PEC)	Cerdo
Norovirus	<i>Virus Norwalk</i> (NV)	Humano
	<i>Calicivirus Entérico Bovino</i> (cepa Jena)	Ternero
	<i>Norovirus murino</i> (MNV)	Ratón
Lagovirus	<i>Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo</i> (RHDV)	Conejo
	<i>Virus del síndrome de la liebre parda europea</i> (EBHV)	Liebre
Vesivirus	<i>Virus del exantema vesicular del cerdo</i> (VESV)	Cerdo
	<i>Virus del león marino de San Miguel</i> (SMSV)	Mamíferos marinos
	<i>Calicivirus felino</i> (FCV)	Gato
	<i>Calicivirus canino</i> (CCV)	Perro
	<i>Calicivirus de primate Pan-1</i> (PCV)	Chimpancé
Nebovirus	<i>Vesivirus de conejo</i> (RaV)	Conejo
	<i>Calicivirus entérico bovino</i> , cepa NB (BEC)	Ganado bovino
	<i>Virus Newbury-1</i>	
Recovirus*	<i>Virus Tulane</i> (TuV)	Mono Rhesus
Valovirus*	<i>Virus de St-Valérien</i>	Cerdo

Tabla 1. Géneros aceptados o propuestos (*) y especies representativas de la familia *Caliciviridae*.

1.1.1.- Estructura de los calicivirus (morfología).

El hecho de carecer de envoltura lipídica hace que los viriones de los calicivirus tengan una estructura relativamente sencilla, compuesta por una cápsida proteica de aproximadamente 35 nm de diámetro que protege el material genético. La superficie de los viriones presenta unas depresiones características en forma de copa (o cáliz) que dan nombre a la familia y pueden ser observadas con ayuda de un microscopio electrónico (figura 1A). La cápsida, de estructura icosaédrica, está formada por dos proteínas virales diferentes: VP1 y VP2; aunque no existe consenso en la nomenclatura de estas proteínas y con frecuencia se denominan VP60 y VP10, en función de su masa molecular relativa.

El componente mayoritario, VP1, tiene una masa molecular aproximada de 60 kDa y es capaz de auto-ensamblarse espontáneamente formando partículas similares a viriones, o VLPs¹, cuando es producida en sistemas heterólogos (Jiang *et al.*, 1992; Laurent *et al.*, 1994; Boga *et al.*, 1997).

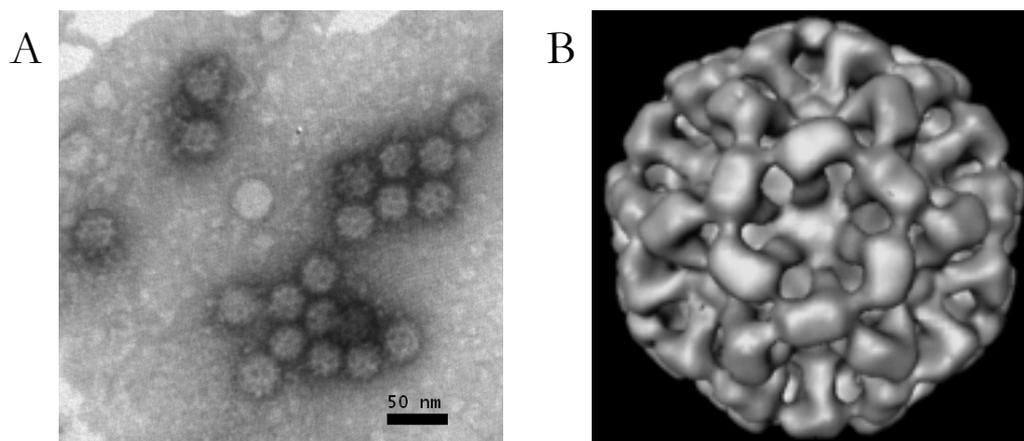


Figura 1. A) Micrografía electrónica de viriones del *vesivirus de conejo* (Martín-Alonso *et al.*, 2005) purificados a partir de células Vero en cultivo. B) Reconstrucción de VLPs recombinantes del *virus Norwalk* visualizadas por crio-microscopía electrónica (Prasad *et al.*, 1994).

Diversos estudios estructurales han permitido obtener, mediante cristalografía de rayos X, imágenes a una resolución elevada de VLPs recombinantes del *virus Norwalk* (figura 1B; Prasad *et al.*, 1994) y de viriones del SMSV (Chen *et al.*, 2006) y del *virus Tulane* (Yu *et al.*, 2013). Estos trabajos describen que los calicivirus presentan una cápsida de estructura icosaédrica con simetría T=3, compuesta de 180 copias de la proteína

¹ acrónimo proveniente del inglés: *Virus-Like Particle*

Introducción

mayoritaria de la cápsida (VP1) organizadas en 90 capsómeros. Se han identificado dos dominios principales en la VP1: el dominio S (*shell*), que conforma la cubierta interna que envuelve al material genético; y el dominio P (protuberancia) que mantiene los dímeros en contacto y se postula como responsable de la unión del virus a la célula (Lochridge *et al.*, 2005).

La VP2 tiene una masa molecular relativa de 10 kDa y presenta un bajo número de copias en cada virión (Sosnovtsev y Green, 2000). A pesar de no ser esencial para la formación de VLPs, la VP2 proporciona estabilidad a estas partículas y las hace más resistentes a la degradación por proteasas (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003; Di Martino y Marsilio, 2010). Su alto contenido en aminoácidos básicos parece indicar que actúa como una proteína de unión a ácidos nucleicos, pudiendo ejercer un importante papel en la encapsidación del RNA viral (Thiel y König, 1999; Sosnovtsev *et al.*, 2005). Aunque no se ha confirmado la relación directa de la VP2 con el RNA, se ha demostrado recientemente en el *virus Norwalk* que la VP2 interacciona con el dominio S de la VP1 (Vongpunsawad *et al.*, 2013). Esto implica que la VP2 se encontraría en el interior del virión, algo consecuente con su posible rol en el empaquetado del genoma.

El recubrimiento proteico encierra y protege al genoma viral, constituido por un RNA monocatenario de polaridad positiva de 6,5 a 8,3 kb que contiene la información para la síntesis de todas las proteínas del virus. Adicionalmente, se ha descrito la existencia de un RNA subgenómico (RNAsg) que promedia 2,5 kb y es co-terminal con la región 3' del RNA genómico (RNAg). Aunque se ha demostrado que el RNAsg puede ser empaquetado en partículas virales, no existen pruebas concluyentes sobre si lo hace en las mismas partículas que el genoma o de forma independiente (Meyers *et al.*, 1991; Neill, 2002).

Ambas especies de RNA presentan una cola de poli-A en el extremo 3' y una proteína viral unida de manera covalente a su extremo 5' (Burroughs y Brown, 1978; Meyers *et al.*, 1991). Esta proteína, denominada VPg², es similar a la de otras familias de virus de RNA de polaridad positiva, en las que se ha relacionado con los procesos de traducción, replicación y encapsidación del RNA viral (Sadowy *et al.*, 2001).

La eliminación de la VPg mediante digestión con proteasas reduce drásticamente la capacidad infectiva del RNA purificado de los viriones de distintos calicivirus (Burroughs y Brown, 1978; Dunham *et al.*, 1998; Guix *et al.*, 2007; González-Molleda, 2008). Esto puede ser debido a que, a diferencia de los poliovirus, la VPg de los calicivirus es necesaria para la

² del inglés *Viral Protein genome-linked*

traducción del RNAg (Herbert *et al.*, 1997). La interacción de esta proteína con los factores de iniciación de la traducción eIF3 y eIF4E (Daughenbaugh *et al.*, 2003; Goodfellow *et al.*, 2005) apoya la teoría de que la VPg funciona como un sustituto del *cap* reclutando los factores que inician la síntesis de proteínas.

Por otro lado, varios estudios *in vitro* con proteínas recombinantes han demostrado la uridililación de la VPg de los calicivirus en un residuo conservado de tirosina (Machin *et al.*, 2001; Rohayem *et al.*, 2006; Belliot *et al.*, 2008; Subba-Reddy *et al.*, 2011); evidencias que hacen suponer un posible papel como cebador de la replicación del genoma viral análogo al descrito para la VPg de Picornavirus (Paul *et al.*, 1998).

1.1.2.- Organización genómica.

Una de las características que diferencian a los Calicivirus es que, a excepción de los Nebovirus con 75 residuos, su genoma posee una región 5' no traducida (5'-NT) extremadamente corta, si la comparamos con los RNA de otros virus o con los mensajeros de un organismo eucariota. El codón AUG de inicio de la traducción se encuentra a una distancia variable del extremo 5' que oscila entre los 4 nucleótidos del virus Norwalk, los 9 residuos del RHDV o los 19 del FCV. Se ha especulado que esta región puede desempeñar una función relevante en la traducción o como promotor de la replicación viral, puesto que las secuencias 5'-NT del genoma y su correspondiente mensajero subgenómico presentan una alta homología en la mayoría de los calicivirus (tabla 2) (Lambden *et al.*, 1995; Hardy y Estes, 1996; Thiel y König, 1999; Simmonds *et al.*, 2008).

La organización del genoma se ha asentado como un rasgo distintivo de cada género de la familia *Caliciviridae*. Se pueden establecer dos claros modelos de organización genómica en función de la existencia de dos o tres pautas abiertas de lectura (ORFs³). En el primer modelo, que presentan los Lagovirus, los Sapovirus y los Nebovirus (así como los propuestos Valovirus), la ORF1 cubre prácticamente la totalidad del genoma y da lugar a una poliproteína precursora de las proteínas no estructurales y la proteína estructural mayoritaria VP1 (figura 2). El modelo seguido por Norovirus y Vesivirus (y el género propuesto Recovirus) se caracteriza por poseer una ORF exclusiva para la expresión de la VP1. En este caso, la ORF1 codifica una poliproteína de menor tamaño precursora únicamente de las proteínas no estructurales. En ambos modelos, la ORF más cercana al

³ del inglés *Open Reading Frame*, pauta abierta de lectura

Introducción

extremo 3' es la más pequeña y contiene la información para sintetizar la VP2. El inicio de la ORF del extremo 3' solapa en mayor o menor medida con los últimos nucleótidos de la ORF anterior (Meyers, 2003; Pöyry *et al.*, 2007). La organización del mensajero subgenómico es similar en todos los géneros, siendo equivalente al último tercio de su correspondiente genoma (figura 2).

Virus	Secuencia 5'	Alineamiento
PEC (AF182760)	RNAg	¹ GUGAUCGUGA AUG GCUAAUUGCCGUCGCUUG ³⁰
	RNAsg	⁵⁰³¹ GUGUUCGUGA AUG GAGGCGCCUGCCCAACC ⁵⁰⁶⁰
NV (M87661)	RNAg	¹ GUGAA AUG AUGAUGGCGUCAAAAGACGUCGU ³⁰
	RNAsg	⁵³⁵⁴ GUAA AUG AUGAUGGCGUCUAAGGACGCUAC ⁵³⁸³
RHDV (M67473)	RNAg	¹ GUGAAAGUU AUG CGGCUAUGUCGCGCCUU ³⁰
	RNAsg	⁵²⁹⁶ GUGAAUGUU AUG GAGGGCAAAGCCGUGCA ⁵³²⁵
RaV (AJ866991)	RNAg	¹ GUAAAUGAGAAUUUGAG---CU AUG GCUCAAAC ³⁰
	RNAsg	⁵⁶⁴⁸ GUGUUUGAGAAUU--AGCCACU AUG GCU-ACUA ⁵⁶⁷⁷
BEC (AY082891)	RNAg	¹ GUGAUUUAAUUUAGAGAGAUAG- (51 nts) - AUG GCUC ⁸⁰
	RNAsg	⁵⁰³⁵ GUGAUUUAAUUUAGAGAAGGAAAC----- AUG AGUG ⁵⁰⁶⁴

Tabla 2. Comparación de las secuencias 5' en el genoma y el mensajero subgenómico de varios calicivirus (entre paréntesis se indica el código de registro en las bases de datos de secuencias) realizado con el programa informático EMBOSS Needle (*Pairwise Sequence Alignment*). Las barras verticales señalan aquellos residuos idénticos en el RNAg y el RNAsg; mientras que los puntos indican las posiciones en las que no hay homología de secuencia. Los números que flanquean las secuencias representan la posición de la misma en el genoma viral. En cada secuencia de RNA se destaca en negrita el codón AUG de inicio de la traducción.

Pese a que la clasificación taxonómica de los calicivirus se basa principalmente en la comparación de secuencias, existen algunas peculiaridades en la organización del genoma que diferencian a cada género. Por ejemplo, cabe destacar que la ORF2 de los Vesivirus origina un polipéptido precursor de la VP1 que es procesado por la proteasa viral (Sosnovtsev *et al.*, 1998, Matsuura *et al.*, 2000). El péptido liberado se ha denominado “*leader*” de la proteína de la cápsida (LC) y posee cierta capacidad para promover la replicación viral (Chang *et al.*, 2008). En el FCV se considera esencial para que la infección de cultivos celulares curse con los efectos citopáticos característicos del virus (Abente *et al.*, 2013).

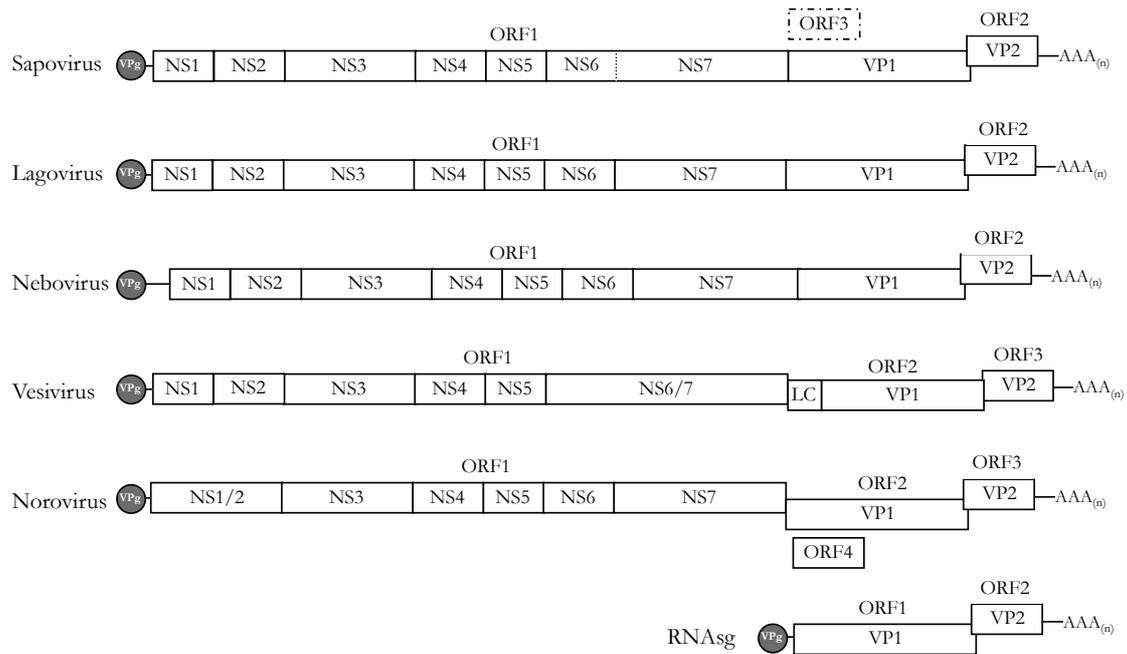


Figura 2. Organización genómica de los distintos géneros de la familia *Caliciviridae*. Tanto el genoma como el mensajero subgenómico (parte inferior) presentan una proteína unida covalentemente en el extremo 5' (VPg) y una cola de poli-A en el extremo 3'. Los cajones representan las diferentes pautas de lectura (ORFs), que dan lugar a las proteínas estructurales (VP), no estructurales (NS) y al péptido *leader* de la cápsida (LC) citadas según la nomenclatura propuesta por Sosnovtsev *et al.* (2006).

Recientemente se ha identificado una cuarta ORF en el *norovirus murino* (MNV) que solapa con la ORF2 (figura 2) y codifica una proteína que se ha caracterizado como VF1 o factor de virulencia 1 (Yunus *et al.*, 2010, McFadden *et al.*, 2011). Esta proteína no se ha descrito aún en otros calicivirus, aunque se encuentra codificada en la misma región que una posible ORF deducida para los Sapovirus mediante análisis informático de la secuencia de varios genomas (figura 2) (Clarke y Lambden, 2000; Schuffenecker *et al.*, 2001).

1.1.3.- Expresión génica.

El genoma de los Calicivirus se comporta como un RNA policistrónico cuya expresión se lleva a cabo mediante una combinación de estrategias adoptadas por otras familias virales. Por un lado, poseen una ORF muy extensa que codifica una poliproteína que debe sufrir un procesamiento proteolítico, como en los Picornavirus o en los Flavivirus. Por otro lado, al igual que los Coronavirus y los Alfavirus, presentan un mensajero subgenómico que posibilita la expresión de los productos estructurales codificados en la región 3'.

Introducción

La poliproteína codificada en la ORF1 se auto-procesa mediante una actividad proteasa que libera una serie de proteínas maduras no estructurales (NS) implicadas en la replicación del genoma viral (figura 2). El procesamiento de esta poliproteína ha sido descrito para el RHDV (Martín-Alonso *et al.*, 1996, Wirblich *et al.*, 1996), el FCV (Sosnovtsev *et al.*, 2002), el NV (Blakeney *et al.*, 2003), el MNV (Sosnovtsev *et al.*, 2006) y el *virus Tulane* (Farkas *et al.*, 2008). Se han utilizado varias nomenclaturas para denominar los productos maduros del procesamiento de la poliproteína. Inicialmente se nombraron en función de su tamaño molecular (p16, p23, p37, etcétera). Algunos de estos polipéptidos tienen dominios homólogos a las proteínas virales de la familia *Picornaviridae* (2C-helicasa, 3C-proteasa o 3D-polimerasa), razón por la que también se ha adoptado su nomenclatura (Rueckert y Wimmer, 1984). Puesto que el procesamiento de la poliproteína es similar en todos los calicivirus se ha propuesto un sistema de nomenclatura unificado para las proteínas no estructurales basado en su posición en el genoma: NS1 - NS7 (figura 2) (Sosnovtsev *et al.*, 2006).

Hasta la fecha, sólo se conoce la función de algunas de estas proteínas maduras en el ciclo de multiplicación de los calicivirus. La NS3 (2C-Hel) presenta actividad NTPasa similar a la helicasa 2C de picornavirus (Marin *et al.*, 2000; Pfister y Wimmer, 2001). La NS5 (3B-VPg) es la proteína de unión al genoma VPg, involucrada en la traducción y la replicación viral (Herbert *et al.*, 1997; Machín *et al.*, 2001); mientras que la NS6 (3C-Pro) contiene el dominio proteasa responsable del procesamiento de la poliproteína (Bonioti *et al.*, 1994; Martín-Alonso *et al.*, 1996; Blakeney *et al.*, 2003). La proteína NS7 (3D-Pol) posee actividad RNA polimerasa dependiente de RNA y es la encargada de sintetizar las copias del genoma viral (Vázquez *et al.*, 1998).

A pesar de no conocer su función exacta, existen evidencias que sugieren la participación de las proteínas NS2 (2B-p32) y NS4 (3A-p30) en la reorganización de membranas celulares inducida por la infección de los calicivirus y que da lugar a los complejos de replicación (Casais *et al.*, 2008; Bailey *et al.*, 2010a; Hyde y Mackenzie, 2010). El producto maduro NS1 (2A o proteína N-terminal) no ha sido estudiado en células infectadas, pero la expresión transitoria de su precursor NS1-2 (2AB-p48) en cultivos celulares es capaz de alterar el tráfico intracelular de proteínas de membrana (Ettayebi y Hardy, 2003) y desordenar la estructura del aparato de Golgi (Fernández-Vega *et al.*, 2004).

En cuanto a las proteínas estructurales, debido a su organización genómica los Norovirus y los Vesivirus sólo pueden obtener la VP1 y la VP2 mediante la expresión del mensajero subgenómico. Sin embargo, Sapovirus, Lagovirus y Nebovirus obtienen la

proteína mayoritaria de la cápsida por traducción del RNAsg y, de manera alternativa, tras el procesamiento del extremo carboxilo de la poliproteína codificada por la ORF1. En el RHDV se ha determinado que estos procesos generan sendas variantes de la VP1 que difieren en el extremo amino terminal (Parra *et al.*, 1993; Wirblich *et al.*, 1995). Aunque se desconoce con certeza la razón de esta doble producción de proteína estructural, la existencia de un RNAsg en estos virus se justifica por la necesidad de un mayor número de copias de la proteína estructural para la formación de la cápsida.

La expresión de la VP2 se produce a través de un mecanismo único de reiniciación de la síntesis proteica dependiente de la terminación de la traducción de la pauta de lectura precedente (Meyers, 2003). No se conocen a fondo los detalles de este mecanismo, aunque se ha descrito la importancia de una secuencia de 80 nucleótidos denominada TURBS⁴ situada en el final de la región codificadora de la VP1 y que presenta dos motivos esenciales para la expresión de la VP2 (Naphthine *et al.*, 2009). El primer motivo está conservado en muchos calicivirus y es complementario al RNA ribosómico 18S, lo que sugiere una interacción entre el RNA viral y el rRNA 18S. Por el contrario, el segundo motivo no está conservado, pero se le atribuye un papel clave en el posicionamiento del ribosoma sobre el sitio de inicio de la traducción (Luttermann y Meyers, 2007; Meyers, 2007).

1.1.4.- Ciclo de multiplicación de los calicivirus.

Las hipótesis planteadas sobre la replicación de los calicivirus son difíciles de demostrar y extrapolar al conjunto de la familia, pues existen miembros con tropismo muy diferente tanto de hospedador como de tejido. La incapacidad de propagar la mayoría de estos virus en sistemas de cultivo celular *in vitro* ha impedido de forma considerable el avance en el conocimiento de su biología. Únicamente los miembros del género Vesivirus, así como el MNV (Wobus *et al.*, 2004) y el recientemente caracterizado *virus Tulane* (Farkas *et al.*, 2008), pueden ser cultivados de manera eficaz en el laboratorio. También se ha conseguido adaptar la cepa Cowden del *calicivirus entérico porcino* (PEC) al crecimiento en una línea celular, aunque para ello es preciso complementar el medio de cultivo con un preparado de ácidos biliares (Chang *et al.*, 2004). El caso del RHDV es particular, ya que hay un grupo de investigadores que asegura haber obtenido un virus recombinante adaptado a la multiplicación en células inmortalizadas (Liu *et al.*, 2006b), pero sus

⁴ del inglés *Termination Upstream Ribosomal Binding Site*

Introducción

comunicaciones son contradictorias (Liu *et al.*, 2008b; Wang *et al.*, 2013) y se considera que el RHDV carece de un sistema de propagación en cultivos celulares (Abrantes *et al.*, 2012).

Las investigaciones con estos virus cultivables, acompañadas de numerosos estudios *in vitro* con proteínas recombinantes, han permitido diferenciar varias fases en el ciclo infectivo de los calicivirus (figura 3).

Las etapas tempranas de la infección viral comprenden la unión de los viriones a la superficie celular y su entrada en el interior de la célula para ser liberados en el citoplasma. Es muy probable que los calicivirus necesiten la mediación de varias moléculas de naturaleza glicoproteica y/o glicolípida que actúen como receptores en la superficie de la célula. Es conocida la participación de los antígenos sanguíneos de histocompatibilidad en la unión de los norovirus humanos a la membrana celular (Hutson *et al.*, 2002; Le Pendu *et al.*, 2006), de la misma manera que ciertos gangliósidos que presentan ácido α 2,6-sialico intervienen en la unión del *norovirus murino* (Taube *et al.*, 2009). En el caso del FCV se ha caracterizado un receptor funcional, la molécula de adhesión JAM-A (Makino *et al.*, 2006; Ossiboff y Parker, 2007). No obstante, se cree necesaria la contribución de glicoproteínas que contienen ácido α 2,6-sialico que podrían ser claves para el tropismo del FCV (Stuart y Brown, 2007). Recientemente, se ha identificado en nuestro laboratorio la implicación de la anexina A2 en el reconocimiento y entrada del RaV (González-Reyes *et al.*, 2009).

El proceso de entrada de los calicivirus en la célula ha sido estudiado en el FCV y en el MNV, llegándose a diferentes conclusiones. El FCV es introducido por endocitosis mediada por clatrina (Stuart y Brown, 2006) seguido de una acidificación del endosoma que desencadena la liberación del RNA viral en el citoplasma (Kreutz y Seal, 1995). Por contra, existen evidencias de que la infección del MNV es independiente de clatrina y de cambios en el pH (Perry *et al.*, 2009, Gerondopoulos *et al.*, 2010). Estos autores demuestran la mediación de la dinamina y de “rafts” (balsas o micro-dominios lipídicos) que apuntan a otros tipos de endocitosis o a la macropinocitosis. A falta de más investigaciones, se ha sugerido la existencia de diferentes mecanismos de entrada para los distintos virus de la familia, posiblemente condicionados por su tropismo. La unión a los receptores y la entrada del virión parecen ser uno de los factores limitantes para el cultivo de muchos calicivirus en células inmortalizadas, ya que en algunos casos la transfección de RNA viral es capaz de llevar a cabo procesos limitados de replicación (Asanaka *et al.*, 2005; Guix *et al.*, 2007; Thorne y Goodfellow, 2014).

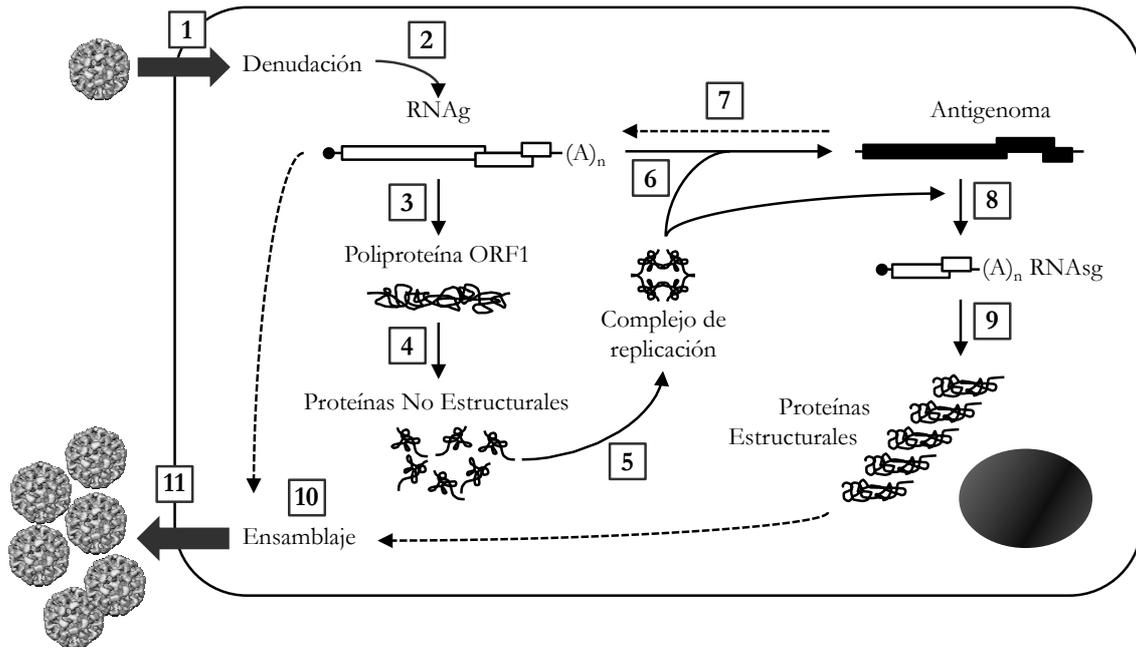


Figura 3. Esquema propuesto para el ciclo de replicación de los calicivirus. Tras la unión al receptor o receptores de la membrana, el virión penetra en el interior de la célula (1), donde sufre un proceso de denudación o descapsidación (2) que libera el genoma viral. La traducción de éste (3) da lugar a una poliproteína que se auto-procesa (4) en una serie de productos maduros no estructurales que, junto con factores celulares, dan lugar a los complejos de replicación (5). En estas estructuras se produce la replicación del genoma, generando en primer lugar una copia de RNA de polaridad negativa o antigenoma (6), que a su vez es utilizado como molde para la síntesis del RNAg (7) y del mensajero subgenómico (8). En Norovirus y Vesivirus, la traducción del RNAsg da como resultado la aparición de las proteínas estructurales (9), mientras que Sapovirus y Lagovirus también pueden obtenerlas por la traducción del RNAg. El ciclo replicativo finaliza con el empaquetado del RNAg (10) seguido de la liberación de viriones maduros (11). Figura adaptada de Rohayem *et al.* (2010) y Abrantes *et al.* (2012).

Una vez en el citoplasma, y liberado de su revestimiento proteico, el genoma de los calicivirus utiliza una estrategia de traducción novedosa. El RNA de calicivirus carece de estructura *cap* y su corta región 5'-NT parece no dejar lugar a secuencias internas de reconocimiento del ribosoma (IRES⁵). Se acepta que la proteína VPg que lidera el RNA viral es la responsable de establecer interacciones con los componentes de la maquinaria de traducción. En particular, se ha descrito la interacción de la VPg con los factores de inicio de la traducción eIF4E (Goodfellow *et al.*, 2005) y eIF3 (Daughenbaugh *et al.*, 2003 y 2006), que reclutan a la subunidad 40S del ribosoma, formando parte del complejo que permite el inicio de la síntesis proteica.

La traducción del RNAg da lugar a una poliproteína, que se auto-procesa mediante la actividad proteasa NS6 generando los productos no estructurales maduros responsables de

⁵ del inglés *Internal Ribosome Entry Site*

Introducción

la replicación del genoma. Entre los productos liberados se encuentran las proteínas NS2 y NS4, que son capaces de modificar los compartimentos membranosos de la célula facilitando la formación de los llamados complejos de replicación (Bailey *et al.*, 2010a), estructuras que proporcionan un microambiente membranoso característico en el que se confina la maquinaria de síntesis de RNA (Green *et al.*, 2002; Casais *et al.*, 2008). En el MNV la reorganización celular afecta al citoesqueleto, que es utilizado para posicionar los complejos de replicación próximos al centro organizador de los microtúbulos, donde se desarrolla la replicación del genoma (Hyde *et al.*, 2012).

Al igual que ocurre en otros virus, los extremos del genoma establecen interacciones entre sí que son estabilizadas por factores celulares que permiten la circularización del genoma (Sandoval-Jaime y Gutiérrez-Escolano, 2009; López-Manríquez *et al.*, 2013), a la vez que regulan la traducción y la replicación viral (Vashist *et al.*, 2012; Thorne y Goodfellow, 2014).

La replicación del genoma requiere la síntesis de un RNA complementario de polaridad negativa (antigenoma), que a su vez será utilizado como molde para la síntesis de nuevas copias de RNAsg, así como del mensajero subgenómico que da lugar a las proteínas estructurales. El mecanismo por el que se obtienen las distintas especies de RNA viral es una incógnita. Se ha descrito que la polimerasa NS7 tiene capacidad de iniciar la síntesis de RNA *de novo* y utilizando la VPg como cebador (Rohayem *et al.*, 2006; Machin *et al.*, 2009). Esto ha servido para plantear un modelo en el que las copias de antigenoma se generan por un proceso de síntesis *de novo*, mientras que la progenie de genomas de polaridad positiva son obtenidos mediante extensión de VPg, necesaria para la infectividad del RNA viral. El proceso podría estar regulado por la proteína VP1 del virión que produce la infección, pues el dominio S de la proteína estructural tiene un efecto positivo en la síntesis *de novo*, favoreciendo la síntesis de hebras negativas en las primeras rondas de replicación (Shubba-Reddy *et al.*, 2011 y 2012; Thorne y Goodfellow, 2014). La aparición del RNAsg aumenta los niveles de VP1, la cual forma complejos multiméricos que impiden su interacción con la polimerasa, permitiendo la síntesis de las copias de polaridad positiva que constituyen la progenie viral por extensión de la proteína VPg.

Para la síntesis del mensajero subgenómico se proponen dos mecanismos. El modelo de iniciación interna propone la existencia de estructuras secundarias en el antigenoma que ejerzan de promotor para la síntesis del RNAsg utilizando la VPg como cebador. El RNA resultante serviría de molde para la síntesis *de novo* de copias subgenómicas de polaridad negativa. El mecanismo alternativo sugiere que durante la síntesis del antigenoma se

produce una terminación prematura que da lugar a un RNA subgenómico de polaridad negativa, que ejerce de molde para la síntesis del RNAsg (Green *et al.*, 2002; Thorne y Goodfellow, 2014). Aunque no se ha demostrado con certeza, existen predicciones bioinformáticas (Simmonds *et al.*, 2008) y estudios *in vitro* (Morales *et al.*, 2004) que apoyan la existencia de un promotor subgenómico en calicivirus.

Es posible que la acumulación de proteínas virales produzca una inhibición de la síntesis proteica para favorecer la transcripción del genoma. La transición entre la traducción y la replicación del genoma ha sido estudiada en el FCV por Karakasiliotis y colaboradores, que han propuesto un modelo regulado por la translocación de la proteína PTB⁶ (proteína de unión a secuencias ricas en pirimidinas) del núcleo al citoplasma. Estos autores suponen la unión de PTB a la región 5' del RNAsg estableciendo un complejo ribonucleoproteico (probablemente con la participación de otros factores celulares o virales) que impide la síntesis de proteínas y a la vez promueve la transcripción del RNA viral (Karakasiliotis *et al.*, 2010).

La fase tardía de la infección es la etapa menos estudiada. Se asume que cuando los niveles de proteína y RNA viral son suficientes, se produce el ensamblado de las proteínas estructurales y el empaquetado del RNAsg dando lugar a partículas virales infectivas. Por último, los viriones maduros son liberados de la célula listos para un nuevo ciclo infectivo.

1.2.- El vesivirus de conejo.

El *vesivirus de conejo* (RaV) fue aislado inicialmente en el laboratorio de diagnóstico de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad del Estado de Oregón (EE.UU.) a partir de muestras fecales de cinco conejos de la especie *Oryctolagus cuniculus* que presentaban signos de gastroenteritis. El contenido fecal clarificado de estos animales producía efectos citopáticos en la línea celular PK-15 (derivada de riñón porcino). El microscopio electrónico reveló la presencia de partículas con morfología de calicivirus (figura 1A).

Posteriormente, en nuestro laboratorio, el virus se adaptó al crecimiento en la línea celular Vero, en la que se realizaron tres rondas sucesivas de aislamiento de placas. El virus produce un efecto citopático muy evidente en esta línea celular. Comienza con un cambio en la morfología de las células, que adquieren una apariencia redondeada y refringente, para finalmente desencadenar la pérdida de adherencia al sustrato de cultivo (figura 4). Si la

⁶ del inglés *Polyypyrimidine Tract Binding Protein*

Introducción

infección se produce a una baja multiplicidad (relación número viriones/célula) se puede apreciar la formación de focos de infección.

Los estudios realizados han dado lugar a un conjunto de evidencias que permitieron proponer la inclusión de este virus en el género *Vesivirus* con el nombre de *vesivirus de conejo*. En primer lugar, los estudios filogenéticos y el análisis de su secuencia nucleotídica revelaron la presencia de tres ORFs y una alta homología con otros *Vesivirus* (Martín-Alonso *et al.*, 2005). Adicionalmente, la actividad proteasa (3C-Pro) se encuentra ligada a la actividad polimerasa (3D-Pol) en un producto NS6-7 bifuncional (3CD-ProPol) que no se procesa (Sosnovtseva *et al.*, 1999; González-Molleda, 2008). En el resto de los géneros, estas actividades se encuentran en dos proteínas maduras independientes (Liu *et al.*, 1999, Meyers *et al.*, 2000, Fullerton *et al.*, 2007); salvo en Sapovirus, donde todavía no se han identificado estas dos proteínas maduras, pero sí el precursor NS6-7 (Oka *et al.*, 2006). Por último, su proteína estructural VP1 se sintetiza exclusivamente a partir del RNAsg; sin embargo, a diferencia de los Norovirus, el mensajero subgenómico da lugar a un precursor que es procesado por la proteasa viral para liberar el péptido *leader* (LC) y la proteína de la cápsida (Sosnovtsev *et al.*, 1998; Matsuura *et al.*, 2000; González-Molleda, 2008).

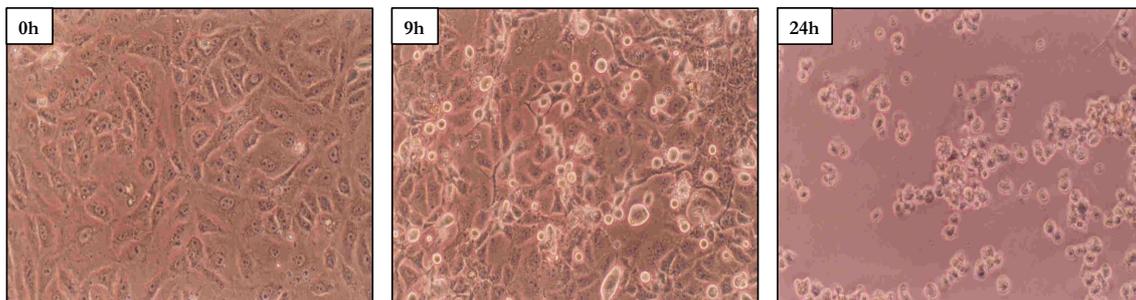


Figura 4. Micrografía en contraste de fases a 100 aumentos de un cultivo de células Vero a las 0, 9 y 24 horas post-infección con RaV a una multiplicidad de infección de 1. Adaptación de González-Molleda (2008).

Una de las particularidades de este virus que le hace atractivo para ser utilizado como modelo en el estudio de los calicivirus es su gran capacidad de proliferación en cultivos celulares. De hecho, es capaz de infectar eficazmente diversas líneas provenientes de diferentes organismos, como las células Vero (riñón de mono), CRFK (riñón de gato), HEK293T (riñón embrionario humano) o HeLa-S3 (adenocarcinoma humano). Esta gran versatilidad no se ha observado hasta el momento en ningún otro miembro de la familia *Caliciviridae*. Además, la posibilidad de realizar una infección en cultivos de células de origen humano permite utilizar aproximaciones genómicas y proteómicas que facilitarían la identificación de factores celulares claves en la replicación de estos virus (González-Reyes *et al.*, 2009).

Su parecido con el *calicivirus felino*, otro Vesivirus cultivable, convierte al RaV en un candidato ideal para la construcción de un clon de cDNA infeccioso similar a los establecidos para el FCV (Sosnovtsev y Green, 1995; Thumfart y Meyers, 2002) que permita desarrollar posteriormente diversas aplicaciones biotecnológicas mediante genética reversa. Esto podría constituir una herramienta de gran valor para investigar la biología de éste y otros calicivirus (especialmente el RHDV, ya que comparten el mismo hospedador); así como para la construcción de vectores de expresión basados en replicones subgenómicos virales.

1.3.- Genética reversa en los virus de RNA de polaridad positiva.

El estudio genético clásico busca relacionar las variantes fenotípicas conocidas con determinadas regiones génicas responsables de sus características. En cambio, la genética reversa pretende comprender la función de una región del genoma, codificante o no, mediante el análisis de los cambios fenotípicos ocasionados por la modificación de su secuencia.

Históricamente, el estudio de los virus RNA se ha visto condicionado por la incapacidad de modificar directamente su material genético, pues no existen herramientas adecuadas para alterar de forma controlada los ácidos ribonucleicos. En la década de los 70 se publicaron una serie de trabajos sobre el bacteriófago Q β en los que se utilizaban complejos procedimientos capaces de introducir en su genoma de RNA un rango limitado de mutaciones (Flavell *et al.*, 1974; Lai, 2000). La aparición de la tecnología del DNA recombinante hizo posible la conversión de los genomas de RNA en copias de DNA complementario (cDNA), abriendo un nuevo horizonte en la Virología. Estas copias de cDNA pueden ser replicadas como insertos de plásmidos bacterianos, que a su vez facilitan la manipulación genética.

Fueron Taniguchi y colaboradores (1978) los pioneros en obtener un plásmido que contenía el cDNA completo del genoma del fago Q β , el cual resultó infeccioso al ser introducido en bacterias. Años después, Racaniello y Baltimore (1981) desarrollaron el primer clon de cDNA infeccioso para un virus de mamífero, el poliovirus. Esto constituyó un hito que impulsó la investigación en la biología de este virus hasta el punto de que, hoy día, la poliomielitis es una de las enfermedades en proceso de ser erradicadas a nivel mundial. Rápidamente, el rescate de partículas infecciosas a partir de clones de cDNA se aplicó a otros virus de animales y plantas con genomas de RNA monocatenario de

Introducción

polaridad positiva. Este éxito temprano se ha asociado a la naturaleza infecciosa del RNA viral, puesto que la transfección del genoma desnudo (purificado de los viriones) en células susceptibles al virus desencadena un proceso de infección idéntico al ocasionado por el virión completo. Una vez en el interior de la célula, el RNA viral es reconocido por la maquinaria celular como si fuera un RNA mensajero y, sin necesidad de otros factores virales, es capaz de dirigir la síntesis de todas las proteínas necesarias para la replicación del virus. En cambio, para los virus de RNA de polaridad negativa (Schnell *et al.*, 1994) y los de doble cadena (Kobayashi *et al.*, 2007) resultó más complicado debido a las dificultades inherentes a su biología, ya que además de la expresión del genoma necesitan el aporte de alguna proteína presente en el virión para completar el ciclo de multiplicación (Neumann *et al.*, 2002).

La metodología de clones de cDNA infecciosos persigue reproducir el efecto de la infección viral, ya sea mediante el uso de vectores que expresen el genoma en células susceptibles o mediante la transfección de copias sintéticas del RNA genómico transcritas *in vitro* a partir del clon de cDNA. Independientemente de la estrategia seguida, la obtención de un clon infeccioso proporciona una poderosa herramienta para el uso de técnicas de genética reversa que permiten manipular de manera indirecta el genoma viral. De este modo, se pueden estudiar los efectos producidos por determinados cambios genéticos (mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, inversiones o translocaciones) en la biología del virus, desde su ciclo de replicación, hasta el papel de las proteínas virales en la patogenicidad o las relaciones entre el virus y los componentes de la respuesta inmune celular (Ebihara *et al.*, 2005).

Asimismo, la genética reversa abre nuevos caminos para el desarrollo de vacunas de virus atenuados y para el uso de replicones o virus recombinantes como vectores de expresión con potencial aplicación biotecnológica. Los replicones son RNAs basados en el genoma de un virus que mantienen la capacidad de replicarse autónomamente en el citoplasma de la célula. Es común que los replicones contengan la deleción parcial o completa de los genes que codifican los componentes estructurales para prevenir la formación de partículas infecciosas, lo que puede ser aprovechado para insertar genes de interés sin alterar la capacidad de replicación del RNA. En ocasiones, la suplementación *trans* de las proteínas estructurales hace posible que un replicón pueda ser empaquetado en partículas virales, comportándose como un virus defectivo que puede expresar genes de interés. A diferencia de los retrovirus, los replicones basados en otros virus de RNA de polaridad positiva evitan la integración de información genética exógena en el genoma

celular. Se han descrito varios sistemas de expresión de genes heterólogos basados en clones de cDNA infecciosos de Picornavirus (Andino *et al.*, 1994), Flavivirus (Khromykh y Westaway, 1997), Alfavirus (Liljeström, 1994) o Coronavirus (Enjuanes *et al.*, 2001).

1.3.1.- Construcción de clones infecciosos para virus con genomas de RNA de polaridad positiva.

La construcción de un vector que contenga el cDNA del genoma completo de un virus y que permita la obtención de transcritos infecciosos puede ser un proceso largo y tedioso. La síntesis del cDNA, la estrategia de clonación y el diseño de las secuencias que flanquean el inserto viral (promotores, etc...) pueden tener una fuerte influencia en la capacidad infectiva del transcrito derivado.

Generalmente, la síntesis del cDNA consiste en la transcripción reversa del RNA viral utilizando un cebador complementario a la región 3' del genoma. Tras la eliminación del RNA viral, el DNA de cadena simple es amplificado en forma de DNA de doble cadena mediante una reacción de PCR, la cual necesita un segundo cebador que incluye la secuencia de nucleótidos del extremo 5' viral. Este procedimiento puede encontrar ciertas limitaciones para la síntesis de una copia completa de cDNA, como puede ser la longitud del genoma o la existencia de estructuras secundarias en el molde de RNA viral. Por ello es habitual completar este proceso en varias etapas, en las que se obtienen fragmentos que pueden ser ensamblados mediante el uso de enzimas de restricción.

Puede suceder que algunas secuencias de cDNA viral insertadas en plásmidos sean inestables o tóxicas durante su propagación en bacterias. Como consecuencia, nos encontramos con algunos virus en los que resulta imposible ensamblar el cDNA completo de su genoma; o que, una vez ensamblado, es difícil de mantener por su predisposición a sufrir reordenamientos o mutaciones estabilizadoras no controladas que afectan a la funcionalidad de los transcritos. En ocasiones, esto se ha solventado con la sustitución del vector plasmídico o de la cepa bacteriana; en otros casos, como en algunos Flavivirus, la alternativa consiste en utilizar fragmentos del cDNA del virus ligados *in vitro* para obtener un molde del genoma completo (Rice *et al.*, 1989; Mandl *et al.*, 1997).

El diseño del vector de expresión de un clon de cDNA se orienta a la obtención de transcritos que imiten en la medida de lo posible al RNA viral, prestando especial atención a la secuencia de los extremos del genoma por su implicación en los procesos de traducción y replicación. En general, se admite que la presencia de nucleótidos no virales en el extremo

5' de los transcritos reduce drásticamente la infectividad. A este respecto, la elección de la secuencia promotora y de la RNA polimerasa que lleve a cabo la transcripción del genoma son de extrema importancia, puesto que afectan directamente al rendimiento y a la estructura de los transcritos.

La expresión de un clon de cDNA es controlada mediante secuencias promotoras de la transcripción, como la de citomegalovirus (CMV) o la del virus SV40, que son reconocidas por la RNA polimerasa II celular. No obstante, en los sistemas de genética reversa es habitual el uso de RNA polimerasas recombinantes de *Escherichia coli* o de los bacteriófagos SP6, T3 o T7. Los mecanismos de transcripción de estas polimerasas son bien conocidos y permiten obtener transcritos sintéticos con los extremos bien definidos, idénticos a las secuencias naturales del RNA viral. Esta aproximación ha resultado muy fructífera para la obtención de clones infecciosos de Alfavirus (Rice *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1989; Liljeström *et al.*, 1991), Flavivirus (Rice *et al.*, 1989; Lai *et al.*, 1991), Picornavirus (Zibert *et al.*, 1990) y gran variedad de virus de plantas con genomas segmentados (Boyer y Haenni, 1994). Además, los sistemas de expresión de cDNA que utilizan promotores de bacteriófagos también permiten la transcripción *in vivo* mediante el aporte en *trans* de la RNA polimerasa. Para ello, es necesario suplementar el sistema con un vector plasmídico o un virus recombinante que exprese la polimerasa adecuada. Esta estrategia ha dado excelentes resultados, incluso en virus con genomas de gran tamaño como los Coronavirus (Almazán *et al.*, 2000, Casais *et al.*, 2001).

A pesar del éxito en el rescate de muchos ejemplares, los métodos de genética reversa no son procedimientos de rutina para todos los virus de RNA de polaridad positiva. La obtención de transcritos a partir de un clon de cDNA con el genoma completo del virus es indispensable, pero no asegura su actividad biológica. El RNA sintético debe ser reconocido por la maquinaria celular para que se produzcan las proteínas virales y posteriormente interactuar con ellas de manera adecuada para completar el ciclo de replicación. También es imprescindible disponer de líneas celulares, o en su defecto de un modelo animal, susceptibles a la infección por el virus y que puedan ser transfectadas de manera eficiente con el cDNA de su genoma o con los transcritos de RNA derivados del mismo.

1.3.2.- Sistemas de genética reversa en Calicivirus.

Los estudios de genética reversa en Calicivirus se han visto condicionados por la escasez de ejemplares capaces de ser propagados de manera eficaz en cultivos celulares. En

este apartado se describen los clones infecciosos publicados para la familia *Caliciviridae*, resaltando el diseño de los vectores y las estrategias de expresión del genoma viral.

El primer clon infeccioso de un calicivirus fue establecido para una cepa cultivable de FCV (Sosnovtsev y Green, 1995). La construcción del clon de cDNA se realizó a partir de una genoteca, mediante el ensamblaje secuencial de tres fragmentos que completaban una copia del genoma. El diseño del vector incluía la fusión de la región 5' del genoma viral a continuación de la secuencia promotora de la RNA polimerasa del bacteriófago T7, de manera que el inicio de la transcripción con esta polimerasa coincidía con el primer nucleótido del genoma del FCV. En la región 3' de la secuencia insertada, tras la cola de poliA, se emplazó la secuencia reconocida por el enzima de restricción *NotI*. Esto permite la obtención de moldes lineales para la síntesis *in vitro* de transcritos de longitud genómica, pero supone la adición de dos nucleótidos de origen no viral a continuación de la cola de poliA. La transfección de estos transcritos sintéticos en células CRFK dio lugar a un proceso infeccioso idéntico al ocasionado por el RNA purificado de viriones. Para confirmar que los virus rescatados provenían del vector que expresaba el genoma de FCV se llevó a cabo la mutagénesis dirigida del clon de cDNA para transformar una secuencia reconocida por el enzima de restricción *StuI* por la que reconoce *HindIII*. Este tipo de etiqueta molecular de fácil detección ha sido utilizada en otros sistemas de genética reversa para comprobar el origen de los virus rescatados (Liu *et al.*, 2006a; Ward *et al.*, 2007; Chaudhry *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2008). El RNA sintético derivado de este clon modificado también resultó infeccioso, dando lugar a virus FCV recombinantes en cuyos genomas se detectaron las mutaciones introducidas. Estos autores subrayan la necesidad de utilizar un análogo de *cap* en la transcripción *in vitro* de RNA, puesto que los transcritos sin *cap* no reproducen la infección. Este clon infeccioso de FCV ha sido utilizado posteriormente para investigar, mediante la introducción de mutaciones puntuales, el procesamiento del precursor de la proteína de la cápsida (Sosnovtsev *et al.*, 1998) y de la poliproteína codificada en la ORF1 (Sosnovtsev *et al.*, 2002), así como para determinar el residuo de la VPg responsable de la unión al RNA viral (Mitra *et al.*, 2004). Empleando técnicas de genética reversa también se ha estudiado la variación antigénica en el FCV (Neill *et al.*, 2000) y se ha obtenido valiosa información sobre el mecanismo de replicación del virus (Sosnovtsev *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2008; Karakasiliotis *et al.*, 2010; Abente *et al.*, 2010 y 2013).

Posteriormente, y siguiendo un planteamiento similar, se han descrito clones infecciosos para otra cepa de FCV (Thumfart y Meyers, 2002), para el *calicivirus entérico*

Introducción

porcino (PEC) (Chang *et al.*, 2005) y para el *virus Tulane* (Wei *et al.*, 2008). En todos ellos, el vector de expresión contiene el cDNA del genoma completo del virus correspondiente flanqueado por la secuencia promotora de la RNA polimerasa del fago T7 y por un sitio de restricción que permite la obtención de moldes lineales para la transcripción *in vitro* (tabla 3). La incorporación del *cap* es indispensable para la funcionalidad del RNA sintético derivado de todos estos clones infecciosos, si bien su capacidad infectiva es del orden de 100 a 1.000 veces menor que el RNA purificado de los viriones (Thumfart y Meyers, 2002).

En el caso del FCV se ha conseguido optimizar el rescate del clon infeccioso mediante una estrategia de expresión alternativa (Sosnovtsev *et al.*, 1996; Thumfart y Meyers, 2002), la cual se vale de un *virus Vaccinia* recombinante defectivo para la replicación y que expresa la RNA polimerasa de T7 (MVA/T7). La transfección del vector con el clon de cDNA en células infectadas con este virus auxiliar permite que la transcripción del RNA genómico se produzca en el citoplasma celular, aumentando la cantidad de copias disponibles para iniciar el ciclo de replicación viral.

Esta aproximación también ha sido utilizada en el estudio de la replicación y el empaquetamiento del *virus Norwalk* (NV) a partir del cDNA completo de dos aislados del virus (Asanaka *et al.*, 2005; Katayama *et al.*, 2006). Ambos clones se generaron de manera independiente pero con idéntico planteamiento, basado en vectores de expresión diseñados para la obtención de transcritos de longitud genómica sin nucleótidos ajenos a la secuencia viral. Para ello, el cDNA fue flanqueado por el promotor de T7 en el extremo 5' y por la secuencia de la ribozima del virus de la Hepatitis Delta (H δ V) seguida del terminador de T7 en el extremo 3' (tabla 3). La ribozima del H δ V tiene una actividad auto-catalítica que realiza un corte en la cadena de RNA en el enlace que precede a su secuencia, de manera que si se posiciona a continuación de la cola de poliA, libera un transcrito sin nucleótidos adicionales. A pesar de que el NV no es capaz de completar su ciclo infectivo en cultivos celulares, la expresión de estos clones en células infectadas con el *virus Vaccinia* auxiliar mostró evidencias de replicación, como la aparición de las proteínas no estructurales y del RNAsg de NV. El rescate de partículas virales solo fue posible cuando el sistema fue suplementado con un vector similar que expresa el cDNA del mensajero subgenómico del virus. En cualquier caso, como ocurre en la transfección del RNA purificado de viriones, las partículas rescatadas no son capaces de infectar cultivos celulares, lo que probablemente está relacionado con la ausencia de receptores funcionales para el *virus Norwalk* en las líneas celulares en cultivo (Guix *et al.*, 2007).

Virus	Publicación	Estrategia	Esquema Vector
FCV	Sosnovtsev y Green, 1995	TIV + cap	
FCV	Thumfart y Meyers, 2002	TIV + cap < MVA/T7	
PEC	Chang et al., 2005	TIV + cap (MVA/T7 no)	
RHDV	Liu et al., 2006a	TIV – cap (conejos)	
RHDV	Liu et al., 2008a	CMV con HθV (RK13)	
TuV	Wei et al., 2008	TIV + cap	
NV	Asanaka et al., 2005 Katayama et al., 2006	MVA/T7 (replicón, solo capsida + cDNAsg)	
NV	Chang et al., 2006	TIV + cap (replicón Neomicina)	
MNV-1	Ward et al., 2007	Baculovirus inducibles	
MNV-1	Chaudhry et al., 2007	FPV/T7 (ultimo nucleótido crítico)	
MNV-1	Yunus et al., 2010	TIV + capping post-transcripción	
MNV-3	Arias et al., 2012	FPV/T7 TIV + capping post-transcripción	

Tabla 3. Sistemas de genética reversa descritos en la familia *Caliciviridae*. Los virus se nombran por sus abreviaturas (ver tabla 1) y se indica la estrategia utilizada para obtener virus infecciosos y un esquema del sistema de expresión del clon de cDNA. TIV: Transcripción *in vitro*. MVA/T7: *virus Vaccinia* auxiliar que expresa la RNA polimerasa de T7. Flecha roja: promotor de T7. Flecha verde: promotor de SP6. Flecha violeta: promotor reconocido por polimerasas eucariotas. CMV: promotor de citomegalovirus. Pol-II*: promotor inducible de la RNA polimerasa II. El cajón azul representa al genoma del calicivirus correspondiente; el cajón naranja simboliza la secuencia de la ribozima del HθV; y el cajón de color carne la secuencia con la señal de terminación para la RNA polimerasa. Se indican los sitios de restricción utilizados para la obtención de moldes lineales.

Al igual que el NV, el RHDV es incapaz de completar el ciclo infeccioso en cultivos celulares. No obstante, se ha descrito un clon de cDNA del RHDV capaz de causar una infección sistémica en conejos que transcurre con síntomas de la enfermedad hemorrágica (Liu *et al.*, 2006a). En este caso, el genoma del virus fue clonado en un vector bajo el control del promotor de la RNA polimerasa del fago SP6 y con la secuencia reconocida por el enzima de restricción *NruI* en el extremo 3' para la obtención de moldes lineales (ver tabla 3). Siguiendo una estrategia utilizada para otros virus no cultivables, como el de la Hepatitis C (Yanagi *et al.*, 1997), inyectaron el RNA sintético derivado de este clon de cDNA en conejos. En contra de lo conocido hasta la fecha, los transcritos generados *in vitro* no necesitan *cap* para desencadenar la infección de los conejos inoculados. Asimismo,

Introducción

el diseño del vector supone la incorporación de nucleótidos no virales en el RNA sintético (un residuo en el extremo 5' y tres a continuación de la cola de poliA) que, además de no impedir el rescate del RHDV, son reparados durante la replicación y no aparecen en la progenie viral.

Estos autores aseguran que el virus recuperado de los conejos inoculados con los transcritos sintéticos fue capaz de ser adaptado a la multiplicación en una línea celular de conejo (RK-13) (Liu *et al.*, 2006b), lo que ha facilitado el desarrollo de otra estrategia para el rescate de RHDV (Liu *et al.*, 2008b). En esta ocasión, el cDNA del virus adaptado a la replicación en RK-13 fue ensamblado en un vector cuya expresión es controlada por el promotor de citomegalovirus (CMV). Este promotor es reconocido por las polimerasas celulares, por lo que la transcripción del genoma viral se lleva a cabo en el núcleo de la célula. Para la obtención de RNAs de longitud genómica se insertó a continuación de la cola de poliA la ribozima del H δ V seguida de una señal de poliadenilación eucariota (tabla 3). La transfección del vector plasmídico en células RK-13 dio lugar a efectos citopáticos y el rescate de una progenie viral infecciosa. Este clon de cDNA se ha utilizado para el estudio de la región 3' del genoma y, al contrario que en el FCV (Sosnovtsev *et al.*, 2005) o en el *virus Tulane* (Wei *et al.*, 2008), la delección de la región codificante de la VP2 no impide el rescate del virus (Liu *et al.*, 2008b). En un trabajo similar, estos autores afirman que los transcritos sintéticos derivados del cDNA genómico de RHDV no necesitan la incorporación de una cola de poliA para ser infecciosos, y que además ésta se restablece de alguna manera durante la replicación (Liu *et al.*, 2008a).

La expresión intracelular de un clon de cDNA también fue utilizada para la obtención de un sistema de genética reversa en el *norovirus murino* (Ward *et al.*, 2007). La estrategia elegida es compleja e implica el uso de dos baculovirus. El primero contiene el cDNA del genoma del MNV1 insertado entre un promotor inducible de la RNA polimerasa II y la secuencia de la ribozima del H δ V (tabla 3). El segundo baculovirus expresa el transactivador del promotor inducible que permite la transcripción del genoma del MNV. De esta manera, la transcripción del RNA se produce en el núcleo y es posteriormente procesado y exportado al citoplasma, donde se produce la traducción para la síntesis de las proteínas virales y la consiguiente replicación del RNA. A pesar de que el funcionamiento de los promotores eucariotas no es conocido hasta el punto de dominar la posición exacta en la cual la polimerasa comienza la transcripción, el virus recuperado con el sistema inducible de baculovirus presentaba la secuencia correcta en su extremo 5'. Esto es importante para la autenticidad del virus rescatado, puesto que las manipulaciones

llevadas a cabo mediante genética reversa no deben verse comprometidas por variaciones no controladas en el extremo 5', que podrían causar efectos desconocidos. En este sentido, las estrategias que utilizan promotores para las polimerasas eucariotas pueden resultar menos eficientes si se comparan con los sistemas que utilizan un promotor de bacteriófagos, los cuales permiten un control absoluto sobre la secuencia inicial del RNA derivado del vector.

Entre los sistemas de expresión de cDNA *in vivo* sobresalen aquellos que utilizan el virus *Vaccinia* auxiliar MVA/T7, principalmente por dos razones: 1) el promotor de T7 asegura un inicio controlado de la transcripción; y 2) la localización citoplasmática de la RNA polimerasa producida por el MVA/T7 evita posibles modificaciones del RNA derivadas del procesamiento o del transporte núcleo-citoplasma. Con la ayuda del virus MVA/T7 ha sido posible rescatar el FCV y el NV a partir de sus respectivos clones de cDNA (Sosnovtsev *et al.*, 1996; Thumfart y Meyers, 2002; Asanaka *et al.*, 2005; Katayama *et al.*, 2006). No obstante, esta estrategia no ha funcionado para otros virus de la familia, como el calicivirus porcino PEC (Chang *et al.*, 2005). Los estudios de Chaudhry y colaboradores (2007) muestran que el virus *Vaccinia* MVA/T7 ejerce efectos negativos sobre la replicación del *norovirus murino*. En cambio, encontraron que el poxvirus de aves recombinante rFPV/T7 (el cual también expresa la RNA polimerasa de T7) no interrumpe la replicación del RNA purificado de los viriones de MNV. Es más, emplearon este rFPV/T7 como virus auxiliar en el rescate de MNV a partir de un clon de cDNA insertado en un vector entre el promotor de T7 y la secuencia de la ribozima del H δ V (tabla 3). Estos autores señalan la importancia de la secuencia de los extremos del RNA derivado del clon de cDNA, puesto que la mutación del nucleótido previo a la cola de poliA afecta de manera crucial a la funcionalidad de los transcritos (Chaudhry *et al.*, 2007). Este clon infeccioso ha permitido establecer un sistema de genética reversa de gran utilidad para el estudio de estructuras secundarias del RNA viral claves en la replicación del MNV (Simmonds *et al.*, 2008; Bailey *et al.*, 2010b), así como para la investigación de los factores que determinan su virulencia (Bailey *et al.*, 2008; McFadden *et al.*, 2011).

Los estudios iniciales con el clon infeccioso del MNV indicaban que, a diferencia del RNA purificado de los viriones, la transfección de transcritos sintéticos (con o sin *cap*) no daba lugar al rescate de partículas virales (Chaudhry *et al.*, 2007). Sin embargo, recientemente se ha descrito la optimización de este sistema de genética reversa basada en la transfección de RNA (Yunus *et al.*, 2010). El sistema consiste en someter a los transcritos sintéticos a una reacción post-transcripcional *in vitro* de incorporación del *cap* mediante una

Introducción

guanilil-transferasa recombinante del *virus Vaccinia*, la cual asegura una eficiencia cercana al 100%, mucho mayor que el procedimiento tradicional. La transfección de este RNA desarrolla un proceso infeccioso en cultivos celulares, aumentando la recuperación de partículas virales infecciosas del orden de 10 a 100 veces en relación a los sistemas de transcripción *in vivo* con el virus auxiliar (Chaudhry *et al.*, 2007) y al sistema de baculovirus (Ward *et al.*, 2007) respectivamente. Este sistema de genética reversa con transcritos sintéticos optimizados ha permitido estudios sobre los dominios funcionales de las distintas regiones del genoma de MNV (Thorne *et al.*, 2012) y sobre otros aspectos de la biología de los norovirus (Subba-Reddy *et al.*, 2012; López-Manríquez *et al.*, 2013).

Este sistema de *capping* post-transcripcional se ha utilizado con un clon de cDNA infeccioso de otra cepa de *norovirus murino* (MNV3), que también puede ser rescatado con el virus auxiliar rFPV/T7 (Arias *et al.*, 2012) (tabla 3). La mayor persistencia de esta cepa del virus en los animales infectados se ha relacionado con estructuras secundarias que afectan a la totalidad del genoma. La modificación de estas estructuras mediante genética reversa es capaz de alterar la persistencia del virus sin afectar a la cinética de replicación (McFadden *et al.*, 2013).

Algunos de estos clones infecciosos de calicivirus han permitido obtener replicones que permiten la expresión de genes exógenos en células eucariotas. Por ejemplo, en el FCV se ha insertado el gen de la GFP en la región que codifica la proteína VP1 sin que el RNA pierda su capacidad de replicación y siendo posible rescatar el replicón mediante el aporte en *trans* de la proteína de la cápsida. Las partículas virales resultantes son capaces de infectar cultivos susceptibles a FCV, comenzando un nuevo ciclo de replicación y expresando la proteína fluorescente (Thumfart y Meyers, 2002).

Se han descrito varios replicones basados en el *virus Tulane* que demuestran que las regiones que codifican las proteínas estructurales son prescindibles para la replicación del RNA. También se ha obtenido un replicón *quimera* en el que se ha reemplazado el gen de la VP1 por la secuencia equivalente del *virus Norwalk*. Este replicón provoca efectos citopáticos en las células transfectadas, pero a pesar de expresar la proteína de la cápsida de NV no es capaz de producir viriones infecciosos (Wei *et al.*, 2008).

El replicón del *virus Norwalk* desarrollado por Chang y colaboradores (2006) requiere una mención especial, puesto que ha permitido establecer una línea celular que expresa el replicón de manera estable. Para ello, sustituyeron un fragmento de la región que codifica la VP1 por un gen de resistencia a neomicina (tabla 3), que proporciona el mecanismo de selección de las células que han incorporado el replicón. Este sistema ha habilitado estudios

sobre la replicación de este virus no cultivable (Chang y George, 2007; Chang 2009) y la evaluación de inhibidores específicos (Bok *et al.*, 2009; Tiew *et al.*, 2011).

No todas las regiones del genoma son susceptibles de incorporar secuencias exógenas. En el *virus Tulane* la inserción del gen de la GFP al inicio de la ORF1 del clon de cDNA completo anula la capacidad infectiva del RNA, el cual tampoco es capaz de expresar la proteína fluorescente (Wei *et al.*, 2008). Es por esto que en los últimos años se han realizado estudios dirigidos a identificar las regiones que toleran inserciones (Thorne *et al.*, 2012), y que permiten una mayor efectividad en la obtención de replicones etiquetados con genes reporteros (Abente *et al.*, 2010).

Llama la atención la diversidad de estrategias utilizadas por los investigadores para desarrollar un sistema de genética reversa en los distintos calicivirus, lo que refleja la complejidad de esta tecnología. Independientemente de las dificultades asociadas a estas investigaciones, no hay duda de que los clones infecciosos y replicones descritos hasta la fecha constituyen herramientas de gran utilidad para esclarecer la función de las proteínas virales y su interacción con la célula hospedadora para el desarrollo del ciclo replicativo de estos virus.

2. Objetivos

Los calicivirus incluyen patógenos de humanos y animales contra los que no se dispone de vacunas eficaces ni, en su mayoría, de sistemas que permitan su propagación en el laboratorio o la manipulación de sus genomas mediante técnicas de genética reversa. El *vesivirus de conejo* (RaV), caracterizado en nuestro laboratorio, tiene la capacidad de propagarse en varias líneas celulares de distinto origen. Esto le convierte en un candidato ideal para el establecimiento de un sistema de genética reversa del que podrían derivarse importantes aplicaciones biotecnológicas. Para tal fin, y conociendo las dificultades que entraña la construcción de clones de cDNA infeccioso, se abordarán los siguientes objetivos:

1. Estudio del papel de la región 5' no traducida (5'-NT) del genoma en la traducción de RNAs sintéticos modelo.

Uno de los procesos cruciales en la consecución de un clon infeccioso para un virus RNA puede ser la traducción eficaz de los transcritos derivados del cDNA viral. En este punto, consideramos relevante comprobar, entre otros factores, el papel de la región 5'-NT del genoma o la influencia del cap. Dado que el genoma del RaV es de gran tamaño (8,3 kb) y resulta difícil evaluar de una forma sencilla los niveles de traducción, se construirán fusiones de la región 5'-NT del RaV con el gen de la luciferasa. A su vez, esto nos proporcionará un sistema para optimizar las condiciones de la transcripción *in vitro* y la transfección de RNA en cultivos celulares, necesarias para el establecimiento de un sistema de genética reversa.

2. Obtención de vectores de transcripción que expresen el genoma del RaV.

Para la obtención de un clon de cDNA infeccioso de RaV se utilizarán diferentes vectores de expresión que permitan la síntesis de transcritos de longitud genómica que emulen al RNA viral. En el diseño de los vectores se dedicará especial atención a la secuencia de los extremos del genoma, por ser consideradas esenciales en los procesos de replicación del virus. Mediante genética reversa, se llevarán a cabo modificaciones en el cDNA que permitan diferenciar los eventuales virus recombinantes del RaV parental.

3. Análisis de la funcionalidad de los clones de cDNA del RaV.

Se considerarán funcionales aquellos clones cuyos transcritos sean capaces de imitar funcionalmente al genoma viral, desencadenando un proceso infeccioso en los cultivos. Como alternativa a la transfección de RNA sintético, se plantea el aporte en *trans* de la RNA polimerasa del fago T7 para llevar a cabo la transcripción intracelular de los vectores que contienen el cDNA del RaV.

4. Caracterización de los virus recombinantes y comparación con el virus parental.

En el caso de obtener algún clon funcional, se caracterizarán los virus generados *de novo*, analizando si las modificaciones introducidas en el cDNA, o las sufridas en el proceso de rescate, afectan a las propiedades del virus, en comparación con el RaV parental.

3. Materiales y métodos

3.1.- Material biológico.

3.1.1.- Cepas bacterianas.

Las siguientes cepas bacterianas se utilizaron para ser transfectadas con vectores plasmídicos con el objeto de obtener un alto número de copias de los mismos.

- *Escherichia coli* XL1-Blue {endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, lac, F' [proAB⁺, lacI^q, Δ(lacZ)M15, Tn10(Tet^R)] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)}.
- *Escherichia coli* DH5α {F⁻, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, Φ80Δ(lacZ)M15, Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ⁻}.
- *Escherichia coli* OneShot TOP10 F⁺ {mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araD139, Δ(ara-len)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG, F⁺ [lacI^q, Tn10 (Tet^R)]}

Las dos primeras cepas competentes a la transformación por DNA exógeno se prepararon en el laboratorio mediante el procedimiento descrito por Inoue y colaboradores (1990), y se almacenaron congeladas a -80°C hasta su uso. La tercera cepa (adquirida en Invitrogen) se utilizó en ocasiones por su elevada eficiencia en la transformación con plásmidos comerciales orientados a la clonación de productos de PCR.

3.1.2.- Virus.

La presente tesis doctoral versa sobre el *vesivirus de conejo* (RaV), cedido por el Dr. Alvin Smith del *Laboratory for Calicivirus Studies* (Oregón, EE.UU.). El virus fue aislado en su laboratorio a partir de conejos que presentaban diarrea y posteriormente adaptado al crecimiento en células Vero.

El otro virus empleado para el desarrollo de este trabajo fue el virus de la viruela aviar recombinante rFPV/T7 (*fowlpox virus*), cedido por el Dr. Paul Britton del *Institute for Animal Health* (Compton, Reino Unido). Este poxvirus modificado expresa la RNA polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control de un promotor de expresión

temprana/tardía y se ha utilizado como virus auxiliar en los experimentos de rescate del RaV a partir de los clones de cDNA generados en este trabajo.

3.1.3.- Cultivos celulares eucariotas.

En los experimentos descritos en esta tesis doctoral se han utilizado cultivos primarios y líneas celulares inmortales.

Los cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (CEF⁷) se obtuvieron a partir de huevos de gallina libre de patógenos específicos (SPF⁸) facilitados por la empresa Intervet S.A. (ver 3.2.4). Su uso se limitó a la replicación y titulación del virus recombinante rFPV/T7.

La línea estable empleada para la propagación del *vesivirus de conejo* fue **Vero**, células de riñón de mono verde africano, adquirida en *European Collection of Cell Cultures* (número de catálogo 84113001). Esta línea celular permite la replicación eficaz del RaV, el cual produce efectos citopáticos característicos que pueden ser utilizados como indicador de la infección viral.

Para el estudio de la traducción de RNAs sintéticos se emplearon las células de riñón embrionario humano **HEK293-T** cedidas por el Dr. Juan Ortín (Centro Nacional de Biotecnología – CSIC). Esta línea celular es susceptible a la infección con RaV, por lo que se utilizó en diversos estudios de transfección de RNAs sintéticos de longitud genómica.

Por último, la línea **CRFK** (de riñón de gato) fue cedida por el Dr. Juan María Torres (Centro de Investigación en Sanidad Animal - INIA). Estas células también permiten el cultivo del RaV y se utilizaron en los ensayos de transfección de ácidos nucleicos.

3.1.4.- Vectores plasmídicos.

El uso de los diferentes vectores de clonación se debe a las distintas estrategias utilizadas para la obtención de RNA sintético o la expresión de cDNA en cultivos celulares.

⁷ del inglés *Chicken Embryo Fibroblasts*

⁸ del inglés *Specific Pathogen-Free*

- El vector *pGEM[®]-T Easy* fue adquirido en Promega. Se utilizó como vector de clonación para los productos de PCR amplificados con DNA polimerasas que añaden un nucleótido de Adenina en los extremos 3' de la molécula. Este vector comercial presenta un nucleótido de Timina en ambos extremos 5', lo que facilita la clonación por complementariedad de bases T/A. Además de aportar resistencia al antibiótico ampicilina, este plásmido permite discriminar las colonias que incorporan el inserto (blancas), de aquellas que incorporan el plásmido no recombinante o re-ligado (azules), ya que el sitio de clonación interrumpe la secuencia codificadora del péptido α de la β -galactosidasa.
- *pCR[®]8/GW/TOPO[®]* es comercializado por Invitrogen y se empleó en la clonación de productos de PCR optimizada por el uso de enzimas topoisomerasa que facilitan la inserción del producto en el vector lineal. Confiere resistencia a ampicilina.
- *pJET1.2/blunt* pertenece al sistema de clonación CloneJET[™] de la compañía Fermentas. Este sistema es novedoso porque, además de la selección por ampicilina, el sitio de clonación interrumpe un gel letal, permitiendo sólo el crecimiento de aquellos clones positivos.
- *pFastBac1* es comercializado por Invitrogen en sus sistemas de expresión con baculovirus. Se utilizó en este trabajo para la construcción de vectores de transcripción por carecer de la secuencia promotora de la RNA polimerasa de T7. Contiene un gen de resistencia a ampicilina.
- *pEGFP-C1* (Clontech) es utilizado para generar fusiones con la proteína fluorescente verde (GFP) y contiene un gen de resistencia a kanamicina. En este trabajo se usó como control de transfección de DNA y como molde para la obtención de la secuencia del gen de la GFP.
- *pT7-luc* pertenece al sistema de transcripción – traducción *in vitro* acopladas (*TnT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System*) de Promega. Confiere resistencia a ampicilina y contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga. Se ha utilizado para generar los transcritos de luciferasa empleados como control de la transfección de RNAs en líneas eucariotas y como base para la construcción del vector pT7-GFP.
- *pT7-GFP* es un vector construido en el laboratorio, utilizando como base el plásmido pT7-luc para sustituir la secuencia codificadora de la luciferasa por el gen de la proteína fluorescente verde (GFP).

- *pTriExTM-1.1* de Novagen, es un plásmido que contiene tres promotores diferentes para la expresión de una misma proteína en tres sistemas distintos: bacterias (promotor de T7), células de mamífero (promotor de citomegalovirus) y células de insecto infectadas con baculovirus (promotor de la polihedrina). Se utilizó para la clonación de la secuencia codificadora de la proteína viral VP1 madura con el fin de complementar los experimentos de rescate de RaV mediante el aporte en *trans* de la proteína estructural mayoritaria del virus.
- *pBS-RT* fue construido en el laboratorio a partir del vector p2.0, cedido por el Dr. Andrew Ball de la Universidad de Alabama (Birmingham, EE.UU.). Contiene las secuencias de la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) y del terminador de la transcripción del fago T7 clonadas en pBlueScript (Stratagene), las cuales fueron utilizadas para la construcción de vectores de transcripción.
- *pCAGGS-GFP* fue cedido por el Dr. Juan Ortín del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Este vector expresa la proteína fluorescente verde GFP bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). Se empleó en el análisis de la eficiencia de transfección de las distintas líneas celulares ensayadas.
- *pCiNeoluc Δ A* fue cedido por el Dr. David O. Matson del *Center for Pediatric Research* (Norfolk, EE.UU.). Procede del vector comercial pCiNeo (Promega), en el que se insertó el gen de la luciferasa de luciérnaga y posteriormente se realizó una mutagénesis dirigida que elimina el nucleótido de adenina del codón de inicio de la traducción. Este vector se utilizó para la construcción de las fusiones del gen de la luciferasa con las secuencias 5'-NT del RNA genómico y subgenómico de RaV.
- *pT-RaVg* fue construido en el laboratorio mediante la clonación de una copia del genoma de RaV en el vector *pGEM[®]-T Easy* (Martin-Alonso *et al.*, 2005). El cDNA de RaV fue amplificado mediante RT-PCR con los cebadores RaV1 y T7RaV14 (tabla 5). Esta construcción se utilizó para la subclonación de la secuencia completa de RaV en vectores de transcripción.

3.2.- Métodos de cultivo.

3.2.1.- Cultivo de bacterias y transformación de células competentes.

Para el cultivo de *E. coli* se empleó medio Luria-Bertani (LB) modificado, cuya composición es triptona 20 g/L (Pronadisa), extracto de levadura 10 g/L (Pronadisa) y NaCl 10 g/L (Sigma) ajustado a pH 7,5 con NaOH (Sambrook *et al.*, 1989).

En la propagación de los plásmidos recombinantes se emplearon las cepas de *E. coli* competentes indicadas con anterioridad (3.1.1). La transformación con plásmidos se llevó a cabo por choque térmico (Hanahan, 1985). La mezcla de DNA y células competentes se mantiene 30 minutos en hielo para, a continuación, someterla a un choque térmico a 42°C durante dos minutos y devolverla al hielo. Tras añadir medio LB, la mezcla se incuba a 37°C en agitación durante una hora y se extiende la suspensión sobre placas de Petri con medio sólido que contiene los antibióticos de selección apropiados. Las placas se incuban a 37°C de 16 a 24 horas, hasta que aparecen colonias.

La selección de los transformantes se realizó mediante adición de ampicilina a una concentración de 100 mg/L o kanamicina a 50 mg/L en función de la resistencia aportada por el vector plasmídico. El medio sólido se obtuvo añadiendo 15 g/L de agar a la mezcla de LB.

La selección por color de las bacterias transformadas con el vector *pGEM[®]-T Easy* se llevó a cabo en placas de LB-agar con 0,5 mM del inductor IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido, GE-Healthcare) y 80 μg/mL del sustrato cromogénico X-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido, Fermentas).

Las colonias de bacterias transformadas se cultivaron en medio LB con el antibiótico de selección correspondiente, durante 16-20 horas a 37°C en agitación (250 rpm).

3.2.2.- Cultivo de células eucariotas.

El mantenimiento de las líneas celulares Vero y CRFK se lleva a cabo en medio DMEM 1X (Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal (Biochrom AG) al 10% y en ausencia de antibióticos. En el caso de la línea HEK293T, es necesario suministrar aminoácidos no esenciales (Invitrogen) al medio de mantenimiento.

Estas células se siembran en frascos de plástico para cultivos celulares (Falcon y/o Costar) que se incuban a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Cuando completan una monocapa confluyente se lleva a cabo un pase a nuevos recipientes. Esto implica el lavado de la monocapa con PBS y su posterior tratamiento con un preparado comercial de tripsina - EDTA (0,05% - 0,02%; Biochrom AG) para disociar las células. Una vez disgregadas, se diluyen de 4 a 10 veces con medio suplementado con suero para inactivar la tripsina y poder sembrar nuevos frascos estériles. En determinados experimentos se calculó el número de células sembradas con ayuda de una cámara de Neubauer.

Las líneas celulares se sub-cultivan un máximo de 30 pases, siendo necesario el almacenamiento de las líneas en congeladores a -150°C o en nitrógeno líquido. Para la congelación se disgregan las células, se centrifugan a baja velocidad y se resuspenden a una densidad de 3 x 10⁶ células por mililitro en medio DMEM suplementado con SBF al 20% y el crioprotector dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) al 10%. La congelación debe ser de manera lenta y progresiva con ayuda de un recipiente con isopropanol (*Cryo 1°C Freezing Container*, Nalgene) a -80°C por un mínimo de 4 horas antes de introducir las alícuotas en congeladores de -150°C.

La descongelación se lleva a cabo a 37°C y es necesario eliminar el crioprotector por dilución y posterior centrifugación de las células. Una vez resuspendidas en el volumen adecuado de medio completo, se siembran en frascos.

3.2.3.- Establecimiento de cultivos primarios de Fibroblastos de Embrión de Pollo.

Los huevos embrionados (fecundados) libres de patógenos específicos (SPF) fueron suministrados por los Laboratorios Intervet S.A. En el día 11 del desarrollo, se observaron los embriones al trasluz para constatar su pervivencia y localizar y marcar sobre la cáscara la cámara de aire.

Tras desinfectar la cáscara con etanol, en condiciones de esterilidad, se corta con tijeras la cáscara del huevo por la zona marcada dejando a la vista la membrana interna. Con unas pinzas estériles se retira la membrana y se extrae el embrión sin romper la yema. Se coloca en una placa de Petri con PBS, se eliminan las extremidades, la cabeza y las vísceras y se desmenuza el resto del embrión con PBS - tripsina (0,25%).

Este homogeneizado se lava con abundante solución de PBS - tripsina en un matraz Erlenmeyer estéril con agitación magnética. Pasados 5 minutos, se dejan sedimentar las

células y se desecha el líquido por decantación. El lavado se repite de nuevo con PBS - tripsina.

Decantado el sobrenadante del segundo lavado, se añade un volumen de la solución PBS - tripsina 0,25% precalentada a 37°C y se mantiene 15 minutos en agitación. Se dejan sedimentar los restos celulares y se filtra el sobrenadante por un embudo utilizando una gasa estéril. El filtrado de células se recoge en un tubo de centrifuga con medio 199 (Sigma-Aldrich) con suero bovino fetal al 10% y se almacena a 4°C. Se repite 3 veces más el tratamiento con la solución de tripsina precalentada para obtener el máximo número de células disgregadas.

Para sedimentar las células, se centrifuga el volumen filtrado a 300 x g durante 10 minutos. El precipitado se resuspende en abundante medio de cultivo 199 y se prepara una dilución de 5×10^5 células por mililitro para la siembra en frascos.

El mantenimiento de los fibroblastos de embrión de pollo se realiza en un incubador a 37°C y 5% CO₂ en medio de cultivo 199 (Sigma-Aldrich) suplementado con 1% TPB (*Tryptose Phosphate Broth*, Sigma-Aldrich), 2,5% bicarbonato sódico (PAA Laboratories), 1% L-glutamina (Invitrogen) y 2% de suero bovino fetal en presencia de 50 µg/mL del antibiótico gentamicina (PAA Laboratories).

Los cultivos primarios tienen una capacidad de multiplicación limitada. Los fibroblastos de embrión de pollo se consiguieron cultivar durante dos o tres pases con una proporción de células 1:2.

3.2.4.- Propagación de virus.

3.2.4.a.- Infección de cultivos celulares con el vesivirus de conejo.

Pese a ser capaz de infectar diferentes líneas celulares, la obtención de preparaciones o *stocks* del RaV se ha realizado en células Vero por su mayor rendimiento en la multiplicación viral.

La infección de monocapas confluentes se ha llevado a cabo a una multiplicidad de infección entre 0,1 y 0,01; es decir, en una relación de 1 partícula viral por cada 10 o 100 células, respectivamente. El inóculo viral se administra en un pequeño volumen durante la fase de adsorción del virus a las células, que se realiza a 37°C durante una hora. A continuación, se aspira el inóculo y se añade medio DMEM sin suero y con 50 µg/mL del antibiótico gentamicina. La incubación del cultivo infectado a 37°C da lugar a un efecto

citopático severo. Transcurridas 24 horas post-infección, se someten los cultivos a tres ciclos de congelación/descongelación y se separa el sobrenadante de infección de los restos celulares mediante centrifugación a 2.500 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se distribuye en alícuotas y se conserva en un congelador a - 80°C hasta su uso.

3.2.4.b.- Amplificación del poxvirus recombinante rFPV/T7.

Para la generación de *stocks* virales del poxvirus recombinante que expresa la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (rFPV/T7) se infectaron un mínimo de 10 frascos de 150 cm² de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) con una multiplicidad de infección de 0,1.

Antes de realizar la infección se lavan las células con PBS estéril. Aspirado el PBS, se añaden 3 mL del inóculo viral a cada frasco de 150 cm² y se incuba a 37°C durante una hora inclinando los frascos cada 10 minutos para que el inóculo se reparta por toda la superficie de CEF. Transcurrida esta fase de adsorción, se adicionan 20 mL de medio 199 con suero bovino fetal al 2%, manteniendo el inóculo para asegurar un máximo rendimiento en la amplificación viral.

El efecto citopático del rFPV/T7 se demora 4 o 5 días, apareciendo células redondeadas y sin núcleo (*balloons*) o despegadas de la monocapa. En este momento, se someten los frascos a tres pasos de congelación/descongelación, que permiten la recuperación de virus extracelular e intracelular. Por último, se centrifuga el medio recuperado a bajas revoluciones para eliminar los restos celulares (10 minutos a 800 x g) y se conserva el sobrenadante en un congelador de - 80°C.

3.3.- Métodos de manipulación de ácidos nucleicos.

Los métodos habituales en la manipulación de ácidos nucleicos, tales como la digestión con endonucleasas de restricción (Fermentas y TaKaRa), la desfosforilación de extremos 5' en vectores lineales con fosfatasa alcalina (Roche) y la ligación de fragmentos de DNA con T4 DNA ligasa (Promega, TaKaRa y Fermentas), se realizaron siguiendo las indicaciones de las casas suministradoras, así como los procedimientos descritos por Sambrook y colaboradores (1989). En determinados casos, fue necesario modificar los productos generados por las endonucleasas de restricción para crear extremos romos. Para ello, se utilizaron la T4 DNA polimerasa (Fermentas) o la nucleasa *Mung Bean* (TaKaRa), una endonucleasa que degrada las extensiones de DNA o RNA de cadena simple.

3.3.1.- Purificación de ácidos nucleicos.

3.3.1.a.- Extracción y manipulación de RNA.

Tanto para la extracción de RNA total de cultivos celulares como en la purificación del RNA de RaV a partir de viriones o del sobrenadante de infección se ha utilizado el reactivo comercial RNeasy (QIAGEN) según los protocolos aconsejados por el fabricante para cada tipo de muestra. En ocasiones se utilizó el reactivo TRI (Sigma-Aldrich), que permite la purificación de RNA y de la fracción proteica a partir de la misma muestra de células infectadas.

La extracción de RNA y su manipulación posterior se realizaron extremando las precauciones para evitar la contaminación con ribonucleasas (RNAsas). Para ello, se limpiaron las superficies y material de trabajo con la solución RNaseZAP® (Ambion).

3.3.1.b.- Purificación de DNA plasmídico.

Las preparaciones de DNA plasmídico se obtuvieron por el método de lisis alcalina de bacterias transformadas (Sambrook *et al.*, 1989). Cuando se requirió DNA de mayor pureza se utilizaron los sistemas *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) o *QIAGEN® Plasmid Mini/Midi/Maxi Kits* (QIAGEN), en ambos casos siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Las preparaciones se analizaron generalmente mediante observación de los fragmentos generados por la digestión con nucleasas de restricción. Además, se determinó la secuencia de nucleótidos de las construcciones de nueva generación para comprobar las modificaciones.

3.3.1.c.- Recuperación de DNA modificado.

El tratamiento del DNA con determinados enzimas pudo requerir su purificación para posteriores aplicaciones. La obtención de moldes lineales para la transcripción *in vitro* de RNA con nucleasas de restricción o la modificación de los extremos del DNA, así como los productos de las reacciones de PCR, se purificaron con el sistema de columnas cromatográficas *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este mismo sistema fue utilizado para la extracción de DNA a partir de bloques de agarosa, tarea que en ocasiones se llevó a cabo con el producto *GeneClean[®] III* (Q-Biogene).

3.3.2.- Análisis de ácidos nucleicos.

3.3.2.a.- Electroforesis en gel de agarosa.

Los análisis de los fragmentos de DNA generados por digestión con endonucleasas de restricción, así como los productos de las reacciones de PCR, se llevaron a cabo por electroforesis en gel de agarosa tipo II (Sigma-Aldrich) de porcentaje variable entre 0,7% y 2% en tampón TAE 1X (0,04 M Tris-acetato, 2 mM EDTA pH 8,0). El DNA se visualizó por tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA analizados se utilizaron los marcadores *O'GeneRuler[™] 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas) y *Lambda DNA EcoRI/HindIII Markers* (Promega).

El análisis de las preparaciones de RNA se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en condiciones desnaturalizantes (formaldehído al 6,3%) en tampón MOPS 1X, compuesto por acetato sódico 5 mM, EDTA 1 mM y 0,02 M de ácido 3-[N-morfolino]-propanosulfónico (Roche) (Lehrach *et al.*, 1977). Para una mayor resolución de la técnica, las muestras de RNA se calentaron 10 minutos a 65°C en un tampón de carga que contiene MOPS 1X, formamida al 50%, formaldehído al 6,1%, glicerol al 10% y 0,5% de azul de bromofenol. Tras desnaturalizar las estructuras secundarias, se enfriaron las muestras en hielo y se añadió bromuro de etidio (0,05%) para su posterior visualización en un transiluminador con luz ultravioleta. La determinación de los tamaños se realizó por comparación con los marcadores moleculares *0,5-10 Kb RNA Ladder* (Invitrogen).

3.3.2.b.- Cuantificación de DNA.

La concentración de DNA o RNA de las muestras fue determinada con un espectrofotómetro *BioPhotometer* (Eppendorf).

En ocasiones se estimó la cantidad de DNA por comparación de la intensidad de fluorescencia emitida por los fragmentos analizados por electroforesis en gel con la fluorescencia que emite un patrón conocido.

3.3.2.c.- Secuenciación de DNA.

Para comprobar la fusión de secuencias y las modificaciones introducidas en las construcciones generadas en este trabajo se determinó la secuencia de nucleótidos de los plásmidos recombinantes. En ocasiones, se determinó la secuencia de los amplicones derivados de las reacciones de PCR. Los cebadores utilizados se detallan en las tablas 4 y 5.

La secuenciación de DNA se realizó en la *Unidad de Secuenciación de ADN* de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo, mediante secuenciación automática capilar en un aparato *ABI Prism® 3130XL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se analizaron con los programas *Chromas* (Technelysium) y *Vector NTI Advance™* (Invitrogen).

Nombre	Secuencia (5' - 3')
Lucr	TACGTGATGTTACCTCG
pJET1.2 fwd	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2 rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAG

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en la secuenciación de DNA que no reconocen secuencias de RaV.

3.3.3.- Obtención de cDNA: transcripción reversa.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo con la transcriptasa reversa *SuperScript™II* en presencia del inhibidor de ribonucleasas *RNAse OUT™*, ambos comercializados por Invitrogen. La cantidad de molde osciló entre los 0,3 µg para RNA viral purificado y los 2 µg para RNA total. Las reacciones se desarrollaron según las recomendaciones del fabricante salvo en la obtención del cDNA completo de RaV, que se aumentó el tiempo de síntesis a 90 minutos y se aplicó un tratamiento final con RNasa H (Fermentas) para la eliminación del molde. Como cebadores se utilizaron diferentes oligonucleótidos cuya secuencia se encuentra en la tabla 5.

Nombre	Sentido	Región RaV (posición)	Secuencia (5' - 3')	Uso
RaV1	-	3'-NT (8280 - 8310)	T ₁₅ CCTAATGCAACCTACC	RT - PCR - sec
RaV1A	-	3'-NT (8280 - 8320)	aacgtt(T ₂₃)CCTAATGCAACCTACC	RT - PCR - sec
RaV2	-	VP2 (8095 - 8116)	AACTAGTCCGTTTTGTAGAAGC	RT - PCR
RaV4	-	LC (5728 - 5748)	AGGCATCTCTAGCCAGTCTAG	sec
RaV5		NS6/7 (4699 - 4720)	ATGGCAAACCACGCTCTCGGC	sec
RaV6	+	NS5 (3287 - 3307)	GATGATGAGTACGATGAGTGG	RT - sec - RACE
RaV7	+	LC (5980 - 5996)	TTCGTCATCGAGGGAAC	sec
RaV8	-	LC (7495 - 7511)	TGTCTGTGGAAGTACCC	sec
RaV10	-	NS6/7 (5043 - 5059)	AGCCTTGACAACAGCTG	sec
RaV11	-	NS5 (3383 - 3404)	CAGCATCGGTGTCATCGGCGCC	sec - RACE
RaV12	+	NS4 (2517 - 2539)	AACTGCACACGAGAACAGTGGG	sec
RaV15	-	NS4 (2652 - 2672)	ATTGTTGTGGCTCCCTAGTGG	sec
RaV16	-	NS3 (1822 - 1842)	CTGTTAGCGAAACGTTCCCGC	sec
RaV17	+	NS3 (1717 - 1737)	GATATCATGCTGCACACGGCG	sec
RaV18	-	NS1/2 (432 - 452)	ATTCCGGGTTTCGTTCCGGTGG	RACE
RaV19	+	VP2 (8049 - 8069)	ATTTACGCGGACGAAGCTGCC	sec
RaV20	+	NS1/2 (641 - 657)	TTGGCGGCTCATCTGCG	sec
RaV22	+	VP1 (6896 - 6917)	CTACAACCGTTGGTCAACCCC	RT - PCR - sec
RaV23	-	VP1 (6985 - 7001)	ACCAGTTGTTTCTCAGC	sec
RaV24	+	NS6/7 (3992 - 4012)	GGTGACAAGTGCCCATCGCGA	sec
RaV26	+	VP1 (7383 - 7401)	GAGAAACCAATTGGGAGC	sec
RaV27	+	VP1 (6685 - 6702)	TCCATCACTGTTGAGACC	sec
RaV28	-	VP1 (6334 - 6350)	AGTTCTGGGCTAAGAGC	sec
RaV29	-	NS6/7 (4501 - 4518)	CTAAGGAGATCAAGGAGG	sec
RaV30	-	NS6/7 (3873 - 3890)	CGTAGATGTTTCTGAGG	sec
RaV31	-	NS1/2 (1267 - 1286)	TGCTGTACACCTTTGATGTG	sec
RaV-RACE-1r	-	NS1/2 (699 - 719)	GAACCTCAACCAGGAATCTCA	RT - sec - RACE
RaV-RACE-2r	-	NS1/2 (603 - 623)	GTCTGTAAAGGAGCAGTCACA	sec - RACE
XhT7RaVt6a	+	5'-NT (1 - 24)	ctcgagTAATACGACTCACTATA- GTAAAAGAGAATTTGAGCTATGGC	PCR
T7RaV14	+	5'-NT (1 - 24)	ctcgagTAATACGACTCACTATA- GTAAATGAGAATTTGAGCTATGGC	PCR
T7RaVsg	+	5'-NTsg (5648 - 5672)	ctcgagTAATACGACTCACTATA- GTGTTTGAGAATTAGCCACTATGGC	PCR
TA23-fw1	+	5'-NT (1 - 24)	GTAAATGAGAATTTGAGCTATGGC	PCR
TA23-fw2	+	NS4 (2660 - 2681)	CTCGGTGTTGTTATGTCTGAT	PCR
TA23-fw3	+	NS6/7 (5343 - 5364)	GGCAATTCTACTACATCAAAGC	PCR
TA23-rev1	-	NS4 (2963 - 2943)	CGGGAGAAATGAACTGAGTGA	PCR
TA23-rev2	-	NS6/7 (5583 - 5562)	TTGAAGTAACCGTTGTAAGCTG	RT - PCR
TA23-rev3	-	3'-NT (8280 - 8310)	(T ₁₅)CCTAATGCAACCTACC	RT - PCR

Tabla 5. Oligonucleótidos específicos de RaV utilizados en este trabajo. Se indica la polaridad de cada uno: sentido (+) o antisentido (-); así como la región exacta del genoma que es reconocida por su secuencia y la finalidad para la que fueron sintetizados: reacciones de transcripción reversa (RT), PCR, RACE y/o secuenciación de DNA (sec). Los nucleótidos subrayados corresponden a la secuencia del promotor mínimo de T7 y en minúscula se representa el sitio de restricción añadido con fines de clonación.

3.3.4.- Amplificación mediante PCR.

En las distintas reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se establecieron la temperatura, tiempo y número de ciclos adecuados en función del fragmento a amplificar y la temperatura de disociación (T_m) de los oligonucleótidos empleados. Durante el desarrollo de este trabajo se hizo uso de los termocicladores *RoboCycler* (Stratagene) y *Mastercycler personal* (Eppendorf).

Para la amplificación de secuencias de DNA destinadas a la inserción en vectores de clonación o expresión, se utilizó la polimerasa con actividad exonucleasa 3' → 5' correctora de errores *LA TaqTM* (TaKaRa). En el caso de la amplificación del cDNA completo del RaV se siguieron las recomendaciones de la casa suministradora para la síntesis de fragmentos de gran tamaño, programando los siguientes ciclos de temperaturas de reacción: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos; 31 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 10 minutos a 68°C; y un ciclo final de extensión de 30 minutos a 68°C. Los oligonucleótidos utilizados se especifican en las tablas 5 y 7.

Las reacciones de PCR de carácter analítico se realizaron con el preparado comercial *GO Taq[®] Green Master Mix* (Promega) siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante.

El análisis de los productos de PCR se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa del 0,7 al 1,5%, en función de los tamaños esperados.

3.3.5.- Construcción de vectores de transcripción.

Para la construcción de los distintos vectores de transcripción utilizados en este trabajo se usaron las técnicas básicas de biología molecular que comprenden la clonación y manipulación de ácidos nucleicos. Los fragmentos de DNA, generados tras la amplificación por PCR o la digestión con endonucleasas de restricción, se insertaron en vectores de clonación (o en construcciones plasmídicas previas) por ligación de los extremos de DNA.

En la construcción de las fusiones de las secuencias 5' no traducidas del RaV con el gen de la luciferasa se desarrolló una estrategia que implicó la combinación de oligonucleótidos sintéticos complementarios (tabla 6). Para la formación de moléculas de doble cadena se prepararon mezclas equimolares (10 μ M) de las parejas de oligonucleótidos sentido y antisentido en una solución salina (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl y 10 mM MgCl₂) que fueron incubadas a 94°C durante 5 minutos y posteriormente enfriadas a

temperatura ambiente para facilitar su hibridación. Los emparejamientos se diseñaron de manera que los extremos fueran idénticos a los generados por las nucleasas de restricción *EcoRI* y *SaII*, lo que posibilitó su inserción en el vector *pFastBac1* tratado con dichos enzimas. Los plásmidos resultantes pF_g-luc, pF_t6a-luc y pF_sg-luc se trataron con *SaII* y *NoI* para habilitar la inserción de la secuencia codificadora de la luciferasa a continuación de los fragmentos sintéticos.

Fusión	Oligonucleótido	Secuencias (emparejadas)
g-luc	glucf	5' aattaatacgaactcactata GTAAATGAGAATTTGAGCTATGG g 3'
	glucr	3' ttatgctgagtgatat CATTTACTCTTAAACTCGATACC cagct 5'
t6a-luc	t6alucf	5' aattaatacgaactcactata GTAAAAGAGAATTTGAGCTATGG g 3'
	t6alucr	3' ttatgctgagtgatat CATTTTCTCTTAAACTCGATACC cagct 5'
sg-luc	sglucf	5' aattaatacgaactcactata GTGTTTGAGAATTAGCCACTATGG g 3'
	sglucr	3' ttatgctgagtgatat CACAAACTCTTAATCGGTGATACC cagct 5'

Tabla 6. Oligonucleótidos complementarios utilizados para la construcción de las fusiones de la secuencia 5'-NT de RaV con el gen de la luciferasa. Las secuencias de los oligonucleótidos se presentan emparejadas, representando el fragmento de DNA de doble cadena con extremos cohesivos con los productos de digestión con *EcoRI* y *SaII*. Los residuos en negrita corresponden a las secuencias de RaV, mientras que el promotor de T7 se muestra en cursiva. El asterisco (*) señala el residuo mutado (sombreado) en la construcción t6a-luc.

El vector de expresión de la proteína VP1, *pTriEx-VP60*, fue construido mediante clonación de la secuencia que codifica la proteína estructural mayoritaria del RaV en *pTriExTM1.1*. La secuencia viral se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir del cDNA completo clonado del RaV en *pT-RaVg*. Para ello, se diseñó el oligonucleótido cebador con sentido RaV-VP60m-Nco (tabla 7) que contiene la secuencia reconocida por *NcoI* (subrayada), incorporando un codón de iniciación de la traducción (en negrita) y 25 nucleótidos que codifican la secuencia amino terminal de la proteína VP1 madura. El oligonucleótido antisentido RaV-VP60m-STOP (tabla 7) incluye la secuencia 3' de la ORF2 con su codón de parada de la traducción (en negrita) y la secuencia reconocida por *XhoI* (subrayada) para facilitar su clonación. El fragmento amplificado, que comprende los residuos 6.126 a 7.785 del genoma viral, se insertó entre las dianas de *NcoI* y *XhoI* del sitio múltiple de clonación del *pTriExTM1.1*.

La construcción *pT7GFP* es una variante del vector comercial pT7-luc en la que se substituyó la secuencia codificadora de la luciferasa por el gen de la proteína fluorescente verde GFP. La secuencia de la GFP se amplificó por PCR utilizando como molde el

plásmido *pEGFP_C1* y los oligonucleótidos 5EGFP-Nco y 3EGFP-Sac (tabla 7), diseñados con secuencias reconocidas por *NcoI* y *SacI* respectivamente para facilitar la clonación de la región codificadora (secuencia subrayadas). El producto amplificado se insertó en el plásmido *pT7-luc*, al que previamente se le había eliminado el fragmento *NcoI* - *SacI* que escinde el gen de la luciferasa.

Nombre	Sentido	Secuencia (5' - 3')	Construcción
RaV-VP60m-Nco	+	<u>ccat</u> GGATGGTCCCAGTAACCCCGATGTC	pTriEx-VP60
RaV-VP60m-STOP	-	<u>ctcgag</u> TCATACTGTTGTTCTGTCAATTTTG	
5EGFP-Nco	+	ggatccgcccacc ATGGT GAGCAAGGGCGAGGAGC	pT7GFP
3EGFP-Sac	-	gaattcgagagctc TTACTACT TGTACAGCTCGTCCATG	
5EGFP-Nhe	+	gaattcgtagc GGT GAGCAAGGGCGAGGAGC	pF-RaVR/GFP
3EGFP-Spe	-	gtcgactagt CTACTT GTAAGCTCGTCCATGCC	

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de genes específicos con el objeto de clonar su secuencia en vectores de expresión. Se subrayan las dianas de restricción utilizadas en el proceso de construcción de los vectores de expresión y en negrita se indican los codones de inicio o parada de la traducción del gen implicado.

La construcción de los vectores con los clones de cDNA del RaV y que permiten la síntesis de transcritos que pretenden emular al genoma de RaV se especifica en los apartados 3, 4 y 5 de resultados.

3.3.6.- Mutagénesis dirigida.

Las modificaciones puntuales se realizaron por mutagénesis dirigida con el sistema *Quick Change Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene), siguiendo las instrucciones del fabricante.

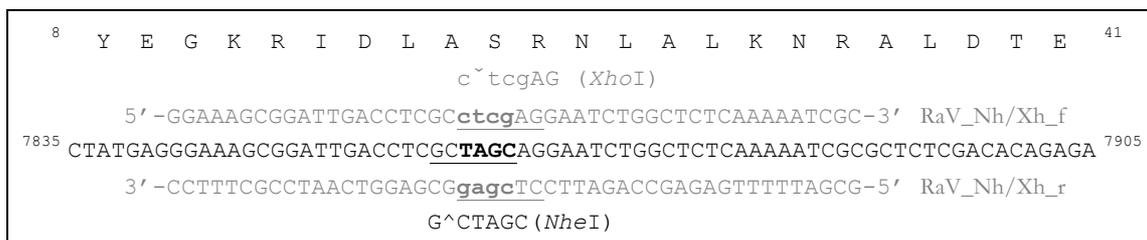


Figura 5. Fragmento de la secuencia del cDNA de RaV correspondiente a la región de la ORF3 utilizada para crear la etiqueta molecular *XhoI*. En negrita se resaltan los residuos objeto de la mutagénesis, que afectan a las secuencias diana (subrayadas) reconocidas por los enzimas de restricción indicados. La secuencia de los oligonucleótidos RaV_Nh/Xh_f y RaV_Nh/Xh_r se detalla en gris. En la parte superior se incluye la secuencia de aminoácidos de esta región de la VP2.

Este procedimiento se utilizó para la creación de una etiqueta molecular en el cDNA del RaV directamente sobre los vectores de transcripción *pF-RaVg* y *pT-A23*. Para ello se diseñaron los cebadores complementarios RaV_Nh/Xh_f y RaV_Nh/Xh_r (figura 5), con

sentido y antisentido respectivamente. Los oligonucleótidos comprenden las posiciones 7.842 a 7.889, e incorporan 4 nucleótidos mutados que modifican un sitio de restricción *NheI* convirtiéndolo en una diana para *XhoI* sin provocar cambios en la secuencia proteica.

3.3.7.- Síntesis *in vitro* de RNA.

Los vectores de transcripción se diseñaron para la síntesis de RNAs con la RNA polimerasa del bacteriófago T7, siendo necesaria la obtención de moldes lineales con la nucleasa de restricción adecuada para cada plásmido: *NotI* para las fusiones con luciferasa, *AccI* para *pF-RaVg* y sus derivados y *SaI* para *pT-A23* y *pT-A23/Xb*.

En el caso de los vectores *pT7-luc* y *pT7-GFP* se utilizó la endonucleasa *SacI*, la cual produce extremos 3' protuberantes que disminuyen la eficiencia de transcripción y producen transcritos de longitud no deseada (Schenborn y Mierendorf, 1985). Para evitar este inconveniente, se trató el producto de la digestión con la DNA polimerasa de T4 (Fermentas) que repara el molde con su actividad exonucleasa 3' → 5' y deja los extremos romos.

En todos los casos, el DNA molde fue purificado con el sistema comercial *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Las reacciones de transcripción de RNA se llevaron a cabo con dos preparados comerciales: *RiboMAX[™] Large Scale RNA Production System* (Promega) o *mMessage mMachine[®] T7 Ultra* (Ambion), ajustando las condiciones de reacción a las recomendaciones de las casas comerciales.

Para añadir el *cap* (figura 6) a los transcritos sintetizados con el preparado de Promega se utilizó en la reacción el análogo *Ribo m⁷G Cap Analog* del mismo proveedor; mientras que el análogo ARCA (*Anti-Reverse Cap Analog*) forma parte del preparado suministrado por Ambion para la transcripción *in vitro*.

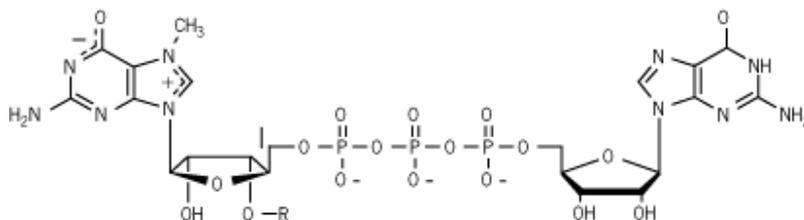


Figura 6. Esquema representativo de la estructura molecular de los análogos de *cap* utilizados; donde R=H sería el *cap* convencional [m⁷G(5')pppG], mientras que R=CH₃ corresponde al ARCA comercializado por Ambion [3'-O-Me-m⁷G(5')pppG].

En ocasiones, el producto de la transcripción se sometió a una poliadenilación adicional con la poli(A) polimerasa del preparado comercial *mMessage mMachine*[®] T7 Ultra (Ambion), que añade entre 50 y 100 bases a los transcritos.

El RNA sintetizado se precipita con una solución de cloruro de litio (LiCl 7,5 M, EDTA 50 mM) a - 20°C durante un mínimo de 2 horas. Posteriormente, se centrifuga la muestra a máxima velocidad en una centrífuga tipo Eppendorf refrigerada durante 30 minutos, se lava con etanol al 70% y se resuspende el sedimento en agua libre de RNasas. El RNA fue analizado por electroforesis en gel de agarosa - formaldehído y cuantificado en un espectrofotómetro antes de su distribución en alícuotas que se conservaron a - 80°C.

3.3.8.- Detección de RNA viral en cultivos infectados con RaV.

Con objeto de detectar la replicación del RaV en los cultivos de Vero infectados con el sobrenadante de los experimentos de rescate, se diseñó un sistema de detección de RNA viral mediante transcripción reversa seguida de PCR (RT-PCR).

El RNA purificado del sobrenadante o de las células infectadas se sometió a RT-PCR en dos pasos, utilizando la pareja de oligonucleótidos RaV2 y RaV22 (tabla 5). El producto amplificado de 1.220 pb comprende la región comprendida desde el nucleótido 6.896 al 8.116, que incluye los nucleótidos modificados en determinadas construcciones (pF-RaVg/Xh y pT-A23/Xh) para introducir la etiqueta diferencial en el cDNA del genoma de RaV. De esta manera, en caso de que el amplicón fuera procesado por la nucleasa de restricción *Xho*I revelaría la presencia de la mutación puntual introducida y, por consiguiente, permitiría corroborar que el virus rescatado procede del clon de cDNA.

Este sistema es capaz de detectar RNA viral de polaridad positiva o negativa, en función del oligonucleótido utilizado en la síntesis de la primera hebra: antisentido (RaV2) o con sentido (RaV22), respectivamente.

3.3.9.- Secuenciación del genoma de RaV.

El RNA purificado de viriones de los RaV rescatados se amplificó por RT-PCR con los oligonucleótidos TA23-fw1, TA23-rev1, TA23-fw2, TA23-rev2, TA23-fw3 y TA23-rev3 (tabla 5). Los tres fragmentos amplificados contienen, respectivamente, las secuencias comprendidas entre los nucleótidos 1 - 2.963, 2.660 - 5.583 y 5.343 - 8.310, completando el genoma del RaV. Para facilitar su secuenciación, los fragmentos de DNA se insertaron en el vector pJet1.2. Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de secuenciación se

detallan en las tablas 4 y 5. Cada nucleótido de los clones seleccionados se secuenció un mínimo de dos veces.

La reconstrucción de la secuencia completa se llevó a cabo con el programa informático *Vector NTI Advance™* (Invitrogen), que también fue utilizado para el alineamiento de los genomas.

3.3.10.- Determinación del extremo 5' del genoma de RaV.

La secuencia 5' del RNA viral se determinó mediante amplificación del extremo 5' de su cDNA con el preparado comercial *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends 2.0* (Invitrogen). El RNA viral purificado de viriones se sometió a transcripción reversa con el oligonucleótido antisentido RaV-RACE-1r (tabla 5). El molde de RNA es eliminado con una mezcla de RNasa T1 y RNasa H, específica para heterodúplex DNA:RNA. A continuación se purifica el cDNA de cadena sencilla con el sistema de columnas *S.N.A.P.* incorporado en el preparado comercial. Posteriormente, se añade una cola de policitosina al cDNA mediante una transferasa terminal de dNTPs. El producto de esta reacción se utilizó como molde de una PCR con los oligonucleótidos AAP (5'-GGCCACGCGTCGACT-AGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3', facilitado por el preparado de Invitrogen), que incorpora una región rica en guaninas e inosinas complementarias a la cola de policitosina del cDNA, y el cebador específico RaV-RACE-2r (tabla 5). El fragmento obtenido se sometió a una PCR anidada con los oligonucleótidos AUAP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3', facilitado por Invitrogen) y RaV18 (específico de RaV, tabla 5) que dio lugar a un producto de aproximadamente 500 pb que contiene la región 5' del genoma viral. Este producto de PCR se insertó en el vector de clonación pJet1.2. y se sometió a secuenciación.

En la determinación del extremo 5' del virus rescatado en los experimentos con transcritos sintéticos derivados de productos de RT-PCR se utilizó un procedimiento alternativo denominado cRACE (Maruyama *et al.*, 1995). El RNA extraído del sobrenadante de infección se utilizó en una reacción de transcripción reversa con el oligonucleótido RaV11 fosforilado (tabla 5). El producto fue tratado con RNasa H (*Fermentas*) para eliminar el molde y posteriormente se ligaron los extremos del cDNA con la T4 RNA ligasa (*Fermentas*). La posterior amplificación por PCR con los oligonucleótidos RaV6 y RaV18 (tabla 5) dio lugar a un producto de 570 residuos que se insertó en el vector de clonación *pGEM®-T Easy* para su secuenciación.

3.4.- Métodos analíticos de proteínas.

3.4.1.- Obtención de extractos proteicos.

En función de su finalidad se siguieron distintos protocolos para la generación de extractos de proteína.

Los extractos de las células transfectadas con RNAs que expresan luciferasa se realizaron a las 40 horas del tratamiento con los agentes de transfección. Para ello, se lavaron con PBS y se trataron con la solución de lisis RLB (*Luciferase Assay System*, Promega). Posteriormente, se homogeneizó el lisado con ayuda de un Vortex y se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos en una centrífuga tipo Eppendorf refrigerada. El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de la actividad luciferasa mediante un ensayo enzimático (ver 3.4.6).

Los cultivos en los que se ensayaron los RNAs sintéticos derivados de RaV, así como los utilizados en experimentos de rescate, se procesaron para la separación de proteínas mediante SDS-PAGE. Para ello, se levantaron las células con ayuda de un raspador estéril o la punta de una micropipeta y se sedimentaron a 1.500 x g durante 5 minutos en una centrífuga refrigerada. El sedimento se resuspendió en PBS y se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis.

3.4.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Los extractos proteicos de Vero o HEK293T se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), según el método descrito por Laemmli (1970). Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 95°C en un tampón de disociación que contiene Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), SDS al 2%, EDTA 2 mM, glicerol al 8,75%, β -mercaptoetanol al 0,625% y azul de bromofenol al 0,005%. Posteriormente se llevó a cabo la electroforesis durante 1 hora a 120 V con el sistema MiniProtean 3 (BioRad). Tras la separación de las proteínas, se sometió el gel a una tinción con azul de Comassie (azul brillante tipo R al 0,25%, metanol al 45% y ácido acético al 10%). Para la visualización final del patrón proteico fue necesario desteñir el gel en una solución de metanol al 7,5% y ácido acético al 10%.

Para estimar el tamaño de las proteínas se utilizaron los marcadores de peso molecular *LMW-SDS Marker Kit* de la casa comercial GE Healthcare o los marcadores preteñidos *BenchMark™ Protein Ladder* de Invitrogen.

3.4.3.- Ensayo Western Blot.

Tras la separación de las proteínas por SDS-PAGE, se llevó a cabo la electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa *HAHY00010* (Millipore) con un aparato Semi-Phor TE70 (Hoefer Scientific Instruments). La transferencia se desarrolló en unas condiciones constantes de intensidad de 160 mA durante 1 hora, en un tampón de transferencia que contiene Tris-HCl 25 mM (pH 8,8), glicina 192 mM y metanol al 20%.

La transferencia de proteínas a la membrana se comprobó mediante tinción con Rojo Ponceau (Ponceau S al 0,01% en ácido acético al 0,1%). Una vez verificada la transferencia, se señalaron los marcadores de peso molecular y se lavó la membrana con PBS.

A continuación, se incubó la membrana 1 hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo que contiene un 5% de leche en polvo descremada (Nestlé-Sveltesse) en PBS con 1% del detergente Tween 20 (polioxietileno-sorbitan monolaurato; Sigma-Aldrich). Acto seguido se añadió el antisuero de conejo generado en el laboratorio (González-Molleda, 2008) frente a las distintas proteínas virales del RaV a una dilución 1:500 en solución de bloqueo. Tras dos horas de incubación en agitación se lavó la membrana 3 veces con la solución de lavado (PBS-Tween 20 al 0,1%), y se incubó 1 hora con Proteína A conjugada con peroxidasa (Sigma-Aldrich) diluida 1:2.000 en PBS. Por último, se lavó la membrana 3 veces con la solución de lavado y se analizó la presencia de bandas inmunorreactivas con un producto para detección por quimioluminiscencia (*ECL Western Blotting Substrate*, Pierce) según las recomendaciones de la casa comercial.

3.4.4.- Inmunodetección de proteínas virales en cultivos celulares.

Para la detección de proteínas virales en cultivos celulares se sembraron células Vero en el sistema de cámaras de cultivo *Lab-Tek® II Chamber Slide Glass* (Nunc) y se infectaron con RaV a una multiplicidad de infección de 10. Entre las 4 y las 6 horas post-infección, se lavaron los cultivos con PBS y se fijaron con formaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados con PBS, se permeabilizaron las células con Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se rehidrataron y bloquearon los cultivos con solución de bloqueo (1% BSA, 0,1% Triton X-100 en PBS) durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Para la detección de la proteína VP1 se incubaron las preparaciones 1 hora a temperatura ambiente con un suero policlonal de conejo anti-VP1 (previamente inmuoadsorbido) diluido 1:100 en solución de bloqueo. A continuación, se lavaron tres

veces con PBS y se incubaron 1 hora con el anticuerpo de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína *Goat anti-rabbit IgG-FITC* (Sigma-Aldrich) diluido 1:100 en PBS con 1% BSA.

Después de tres lavados adicionales con PBS + BSA al 1%, se procedió a despegar el sistema de celdillas y montar los preparaciones con medio de montaje (*Mounting Medium*, Sigma-Aldrich). Una vez secas, se sellaron con esmalte para uñas y se examinaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61.

3.4.5.- Síntesis *in vitro* de proteínas.

Como primera aproximación a la síntesis *in vitro* de proteínas, se utilizó el sistema de transcripción - traducción acopladas comercializado por Promega: *TnT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System*. Las reacciones se realizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor, utilizando como molde 1 µg del DNA plasmídico circular de las construcciones *pF_g-luc*, *pF_{t6a}-luc* y *pF_{sg}-luc*, obtenidos al fusionar las secuencias 5' no traducidas del RaV con el gen de la luciferasa. Como control, se agregó una reacción con el plásmido pT7-luc, facilitado por la casa comercial.

En la síntesis de proteínas a partir de los RNAs sintéticos derivados de las fusiones indicadas más arriba, se utilizó el sistema *Rabbit Reticulocyte Lysate System* (Promega). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se utilizó 1 µg de RNA sintético en cada reacción (ver 3.3.7) y el inhibidor de ribonucleasas *RNase OUT[™]* (Invitrogen).

3.4.6.- Ensayo de actividad luciferasa.

El ensayo de actividad enzimática se realizó según las indicaciones del preparado comercial *Luciferase Assay System* (Promega). La luz producida en la reacción se midió en un luminómetro *TD 20/20* (Turner Designs) programando 3 segundos de retardo (para que la medición de todas las muestras comenzara al mismo tiempo) y 15 segundos de medida, tras los cuales se obtiene un valor representativo de la actividad luciferasa. La sensibilidad del aparato se estableció al 60,1% en todas las mediciones.

3.5.- Ensayos en células animales.

3.5.1.- Transfección transitoria de cultivos celulares.

La transfección de monocapas de células eucariotas con RNA se realizó en placas de 6 o de 12 pocillos utilizando alguno de los siguientes reactivos: fosfato cálcico, *Lipofectamine*[™] 2000 (Invitrogen) o *TransMessenger*[™] *Transfection Reagent* (QIAGEN).

Para la transfección con fosfato cálcico se retiró el medio de las células cuatro horas antes de la transfección, sustituyéndolo por medio con suero y sin antibiótico. La mezcla de transfección se preparó añadiendo el RNA a 0,1 mL de una solución de CaCl₂ 0,25 M. Esta mezcla se adicionó gota a gota sobre 0,1 mL de tampón HBS (50 mM HEPES; 1,5 mM Na₂HPO₄; 140 mM NaCl) y se incubó a temperatura ambiente durante un minuto. A continuación se añadió la mezcla de transfección gota a gota sobre el cultivo, el cual se incubó a 37°C y 5% CO₂ hasta su posterior uso.

La transfección con los reactivos comerciales, fundamentados en lípidos catiónicos, se desarrolló según las indicaciones de los fabricantes. La cantidad de RNA utilizado en las mezclas de transfección osciló entre 1 y 10 µg según el experimento a desarrollar.

Para el reactivo *TransMessenger*[™] se utilizó medio DMEM 1X sin suero y sin antibiótico, mientras que para la transfección con *Lipofectamine*[™] 2000 se utilizó Opti-MEM[®] (Invitrogen) sin suero y sin antibiótico. Estos procedimientos conllevan la incubación de las células con la mezcla de transfección a 37°C y 5% de CO₂ durante cuatro horas, siendo necesario retirar los complejos y añadir medio fresco con un bajo porcentaje de suero (2%).

En el caso del DNA, se utilizó exclusivamente el reactivo *Lipofectamine*[™] 2000 (Invitrogen). El protocolo de transfección se ajustó a las recomendaciones del proveedor, utilizando diversas cantidades de DNA plasmídico o fragmentos amplificados por PCR que oscilaron entre 1 y 10 µg. En ambos procedimientos, fue necesario retirar los complejos a las 4 horas para disminuir la citotoxicidad de los reactivos sobre las líneas celulares ensayadas.

3.5.2.- Rescate de virus recombinantes.

Se han denominado experimentos de rescate a los ensayos que conducen a la transcripción del cDNA completo del RaV en el citoplasma de la célula con ayuda del Poxvirus recombinante que expresa la RNA polimerasa del fago T7 (rFPV/T7), para

diferenciarlos de los experimentos de transfección de transcritos sintéticos de longitud genómica.

Se sembraron células Vero en placas de 6 pocillos hasta alcanzar el 70% de confluencia. En primer lugar se infectaron con rFPV/T7 a una multiplicidad de infección de 10. Transcurridos 60 minutos de incubación a 37°C, se retiró el virus y se lavaron las células con medio *Opti-MEM*. Acto seguido, se adicionó la mezcla de transfección, que se preparó durante el transcurso de la infección. La mezcla incluye entre 1 y 10 µg del vector que contiene el cDNA completo de RaV y 10 µL de *Lipofectamine™ 2000* por pocillo. En los experimentos en los que se aportó la proteína VP1 en *trans* se añadieron de 0,5 a 2 µg del plásmido pTriEx-VP60 a la mezcla de transfección de cada pocillo.

Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas y se cambió el medio de transfección por medio DMEM 1X sin suero para minimizar la toxicidad de los lípidos catiónicos. A este cultivo, infectado y transfectado, se le denominó pase 0 (P0). Tres días después de la infección el efecto del poxvirus era evidente y se recuperó el sobrenadante de cultivo para analizar la posible presencia de RaV recombinantes sobre nuevas monocapas de células Vero. Este sobrenadante del P0 se filtró a través de una membrana de 0,22 µm de tamaño de poro con el objeto de retener el rFPV/T7 (Evans *et al.*, 2000). Con la intención de analizar la presencia de virus RaV, se utilizó 1 mL de este medio filtrado para inocular nuevos cultivos de células Vero que se denominaron pase 1 (P1). Tras una fase de adsorción de una hora a 37°C, se añadió medio fresco (sin retirar el inóculo) y se incubaron los cultivos durante un mínimo de 72 horas, tiempo suficiente para observar evidencias de replicación del RaV en el caso de que el rescate fuera exitoso. El sobrenadante del P1 se utilizó para inocular nuevos cultivos, en lo que se denominó pase 2 (P2). En caso de ser necesario, se repitió el proceso de manera sucesiva dando lugar a los pases subsiguientes (P3, P4... Pn). El filtrado de sobrenadantes no fue necesario a partir del P1. Todos los experimentos de rescate se extendieron como mínimo hasta un pase 2 (P2) en placas de 6 pocillos, considerando que en estas condiciones de cultivo el RaV es capaz de sufrir suficientes rondas de replicación para que sus efectos citopáticos sean evidentes.

En caso de que los virus rescatados no produzcan efectos citopáticos se comprobó la presencia de RNA viral en los cultivos de P1 y P2 mediante RT-PCR (ver 3.3.8). Este análisis no se desarrolló en cultivos de P0, ya que contienen cantidades importantes de DNA plasmídico y cabe la posibilidad de obtener resultados falsos positivos, por lo que no permiten asegurar que existe replicación viral.

3.5.3.- Titulación de suspensiones virales.

Para cuantificar el título de una suspensión viral se llevaron a cabo ensayos en placa. Se sembraron placas de 6 pocillos de células Vero o CEF que fueron infectadas con diluciones seriadas de la suspensión del virus RaV o rFPV/T7, respectivamente. Tras una hora de adsorción a 37°C se retiró el inóculo y se cubrieron las monocapas con medio DMEM semisólido.

El medio DMEM semisólido está compuesto de un volumen de DMEM 2X con un volumen de agarosa de bajo punto de fusión (Seaplaque[®], Fisher Scientific) al 3%. El medio DMEM 2X se prepara a partir de DMEM 10X (Biochrom AG); y debe ser suplementado con 1% de L-glutamina (Invitrogen), 2,5% de bicarbonato sódico (PAA Laboratories) y 2% de suero bovino fetal (Biochrom AG) en presencia de 50 µg/mL del antibiótico gentamicina (PAA Laboratories).

Cada partícula viral genera un foco de infección que, al no poder difundir en un medio semisólido, se concentra en esa región de la monocapa de células formando una calva o placa de lisis. Por tanto, se asume que cada calva representa una partícula viral o unidad formadora de placa (ufp).

El *vesivirus de conejo* genera calvas de lisis visibles a las 36 horas, momento en el que se fijan las células con una solución de formalina (formaldehído al 10%) durante un mínimo de 2 horas a 4°C. Una vez aspirada la solución fijadora y retirados los bloques de agarosa, se añade una solución colorante de cristal violeta al 0,5% en metanol al 20%. Transcurridos 20 minutos se desecha el colorante, se lavan las placas con abundante agua y se contabilizan las calvas. El título de la suspensión viral se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Título (ufp/mL)} = \frac{1}{\text{dilución}} \times \frac{P_1 + P_2 + \dots P_n}{n} \times \frac{1}{v}$$

donde la dilución se expresa en forma de potencia, P_n son las placas registradas en cada pocillo ensayado, n el número de pocillos de la dilución ensayada y v el volumen del inóculo viral en mililitros.

En el caso de los ensayos en placa con el poxvirus recombinante, los focos de infección aparecen a partir de los cuatro días. El rFPV/T7 incluye en su genoma el gen marcador *LacZ*, que codifica el enzima β-galactosidasa y permite detectar colorimétricamente las placas virales generadas por la infección del virus recombinante. Para ello, se añade un nuevo recubrimiento de medio DMEM semisólido conteniendo 33 mg/mL del reactivo X-Gal. Este producto es modificado por la β-galactosidasa expresada

por el rFPV/T7, dando lugar a un subproducto de color azul. La incubación de los cultivos a 37°C dará lugar a la aparición de color en las placas asociadas a la replicación de Poxvirus, facilitando la cuantificación de los focos de infección.

En la cuantificación de partículas virales para la curva de replicación de RaV el título se calculó mediante la valoración de la dosis infectiva media necesaria para provocar efecto citopático en la mitad de los cultivos ensayados, CCID₅₀⁹ (Reed y Muench, 1938). Para ello, se siembran placas de 96 pocillos con células Vero y se infectan con diluciones seriadas en base 10 (utilizando DMEM sin suero) de las suspensiones virales a analizar. Se inoculan 100 µL por pocillo y un mínimo de 6 pocillos para cada dilución. Tras una incubación de 48 horas a 37°C, se registran los pocillos en los que se observa efecto citopático y se calcula el título viral en CCID₅₀ según el cálculo matemático desarrollado por Reed-Muench (Payment y Trudel, 1993).

3.5.4.- Aislamiento de placas virales.

El aislamiento de placas virales de RaV se llevó a cabo mediante ensayos en placa similares a la titulación. En este caso, se adiciona el colorante rojo neutro (Sigma-Aldrich) al medio semisólido para visualizar la formación de focos virales. A las 36 horas de incubación a 37°C se seleccionan placas aisladas de cada virus y, utilizando una pipeta estéril y con filtro, se aspiran junto con la capa de agarosa que las recubre y se resuspenden en 500 µL de medio de cultivo sin suero. De esta manera, se obtiene una suspensión de virus que proceden de un foco de infección generado por una única partícula viral.

3.5.5.- Purificación de viriones de RaV.

El procedimiento de purificación de viriones implica la infección de un mínimo de dos frascos de 150 cm² con el *vesivirus de conejo* a una multiplicidad de infección de 0,01. Tras una fase de adsorción de una hora a 37°C, se retira el inóculo viral y se añaden a cada frasco 20 mL de medio DMEM sin suero y con gentamicina. Se incuban los frascos a 37°C durante 24 horas para permitir la replicación del virus. A pesar de observar un efecto citopático severo, se someten los cultivos infectados a tres ciclos de congelación/descongelación para completar la rotura de las células, liberando los viriones al medio de cultivo.

⁹ acrónimo del inglés *Cell Culture Infectious Dose, 50% endpoint*, sistema de cuantificación en Virología que utiliza como unidad la cantidad de virus capaz de infectar al 50% de las células en cultivo.

Seguidamente, se lleva a cabo una sedimentación de los restos celulares en una centrífuga refrigerada a 2.500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se centrifuga a 120.000 x g durante 150 minutos utilizando un rotor Beckman SW28 para ultracentrífuga refrigerada. Descartado el sobrenadante, el sedimento se resuspende en PBS y se realiza una extracción con freón (1,1,2-triclorotrifluoroetano, Sigma-Aldrich). Por último, la solución viral se centrifuga sobre un colchón de sacarosa al 30% en PBS con un rotor Beckman SW40Ti a 160.000 x g durante 180 minutos. El nuevo sedimento se resuspende en un volumen adecuado de PBS y se almacena a -80°C hasta su utilización.

3.5.6.- Curva de replicación viral.

Para la generación de las curvas de multiplicación de RaV se sembraron células Vero en placas de 12 pocillos que crecieron hasta alcanzar la confluencia (aproximadamente 5 x 10⁵ células/pocillo).

Con objeto de comparar la multiplicación de los virus rescatados RaV/A23 y RaV/Xh con el RaV silvestre, se utilizaron placas independientes para cada tiempo analizado en la curva, infectando 4 pocillos con cada virus a una multiplicidad de infección de 1. Las células se incubaron 1 hora a 37°C con 500 µL del inóculo viral, que se retiró para lavar los cultivos con PBS. Acto seguido se añadió 1 mL de medio DMEM con antibiótico y sin suero a cada pocillo y se devolvieron las placas al incubador. La primera placa (t = 0h) se selló con Parafilm[®] y se almacenó a - 80°C para la posterior cuantificación de partículas virales. De la misma manera, se congelaron placas a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 y 48 horas post-infección.

Las placas se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación, se tomó el sobrenadante de cada pocillo y se centrifugó para eliminar los restos celulares. El título viral de cada tiempo post-infección se calculó como la dosis media infecciosa o CCID₅₀ (ver 3.5.3), con un mínimo de tres valores para cada tiempo analizado y cada virus.

4. Resultados

4.1.- Análisis de la eficiencia de transfección de RNA sintético en distintos tipos celulares.

La obtención de un sistema de genética reversa para el *vesivirus de conejo* (RaV) puede requerir la transfección de transcritos sintéticos en cultivos de células *in vitro*. Con objeto de conocer las limitaciones de las líneas celulares en las que se puede replicar el RaV y optimizar en lo posible los métodos de transfección, se sintetizaron RNAs modelo que expresan la luciferasa. Estos transcritos permiten realizar una estimación indirecta de la eficiencia de transfección mediante un ensayo enzimático.

En esta aproximación experimental se utilizó el preparado *Lipofectamine™ 2000* para introducir distintas cantidades del transcrito derivado del vector comercial pT7-luc en tres líneas celulares que permiten la replicación del RaV: Vero, CRFK y HEK293T. La actividad luciferasa registrada a las 40 horas post-transfección (figura 7) reveló una baja eficiencia de transfección de RNA en todas las líneas celulares; si bien, los extractos derivados de células HEK293T mostraron una mayor actividad.

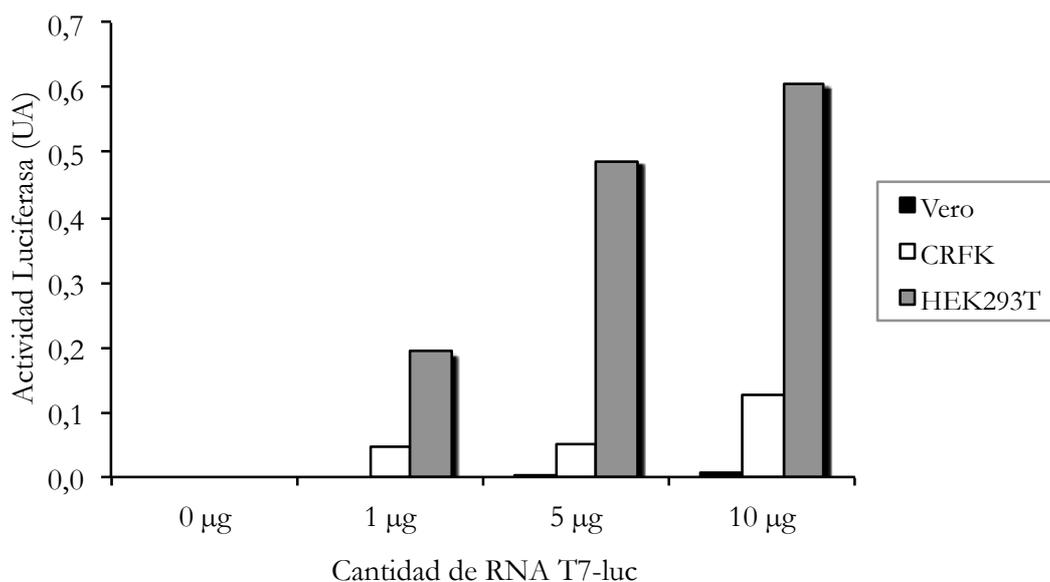


Figura 7. Eficiencia de la transfección de RNA en tres líneas celulares evaluada en función de la actividad luciferasa a las 40 horas post-transfección de transcritos sintéticos derivados del plásmido pT7-luc. UA: unidades arbitrarias

Resultados

Para comprobar si la baja actividad luciferasa recuperada se debe a algún impedimento intrínseco de los cultivos en la incorporación de ácidos nucleicos se transfectaron, utilizando *Lipofectamine*[™] 2000, estas mismas líneas celulares con el plásmido pCAGGS-GFP, el cual expresa la proteína fluorescente verde GFP. La estimación de la eficiencia de transfección se determinó en este caso como el porcentaje de células fluorescentes (figura 8). Las diferencias entre líneas celulares se corresponden aproximadamente con la transfección estimada para los RNAs de luciferasa, siendo la línea HEK293T la más susceptible a la transfección de ácidos nucleicos.

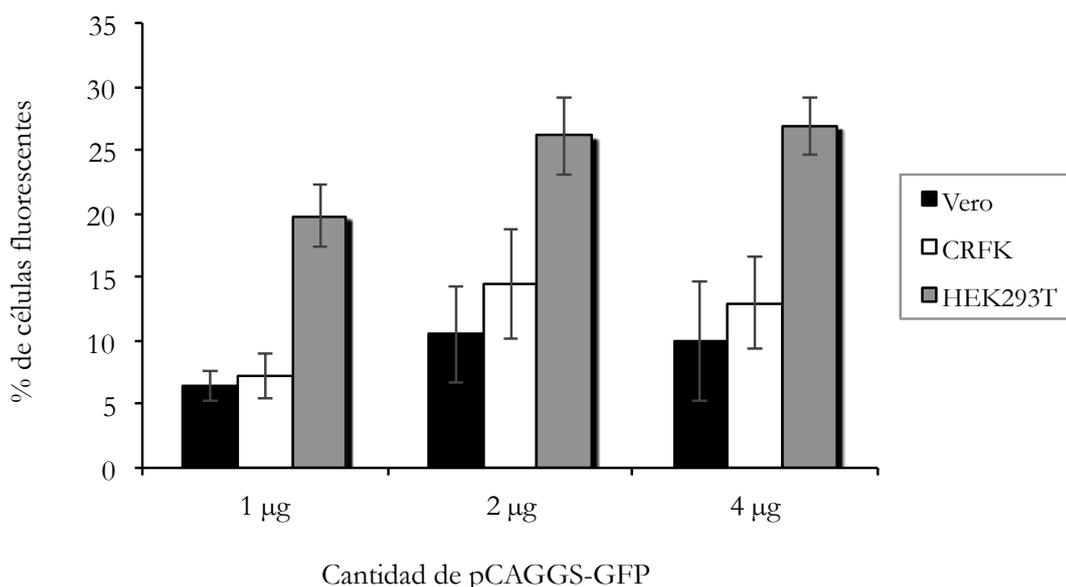


Figura 8. Eficiencia de transfección en distintas líneas celulares evaluada en función del porcentaje de células fluorescentes 48 horas post-transfección de un plásmido que expresa el gen de la GFP. Se contaron las células de cinco campos de visión en cada cultivo transfectado, registrando un mínimo de 600 células por cada concentración de plásmido ensayada.

Estos datos reflejan bajos niveles de transfección, lo que sugiere la necesidad de una puesta a punto para la introducción de RNA en las células HEK293T. Con este fin, se ensayó la transfección de RNAs sintéticos de luciferasa con distintos reactivos: fosfato cálcico, *Lipofectamine*[™] 2000 y *Transmessenger*[™] (ver 3.5.1). En un intento de potenciar la funcionalidad de los transcritos de luciferasa, se ensayaron RNAs sintéticos sin *cap*, con *cap* (7-metil-guanosina) y con el análogo de *cap* anti-reverso *ARCA* (ver 3.3.7).

En un primer análisis se descartó el procedimiento que utiliza fosfato cálcico, pues los valores obtenidos eran prácticamente indetectables en comparación con los correspondientes a los preparados comerciales. Los cultivos tratados con el reactivo

TransMessenger[™] registraron una mayor actividad luciferasa, lo que se interpreta como una mayor eficacia en la transfección de RNA (figura 9).

Por otro lado, se observó que el uso de *cap* en la síntesis de los transcritos aumenta considerablemente su actividad traduccional, siendo mucho más elevada en aquellos RNAs que incorporan el análogo *ARCA*.

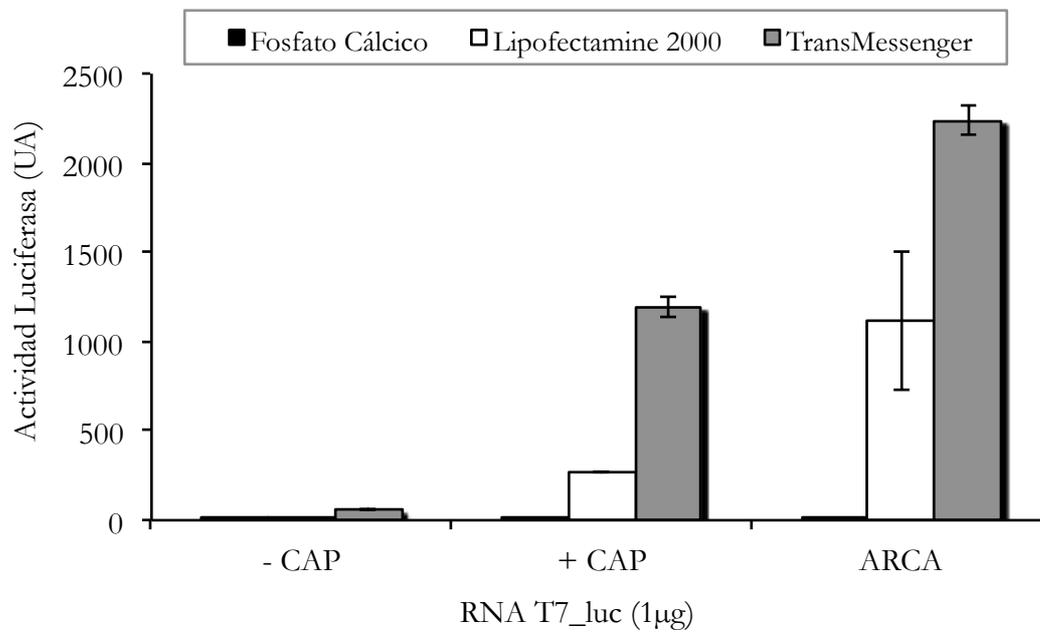


Figura 9. Eficiencia de los reactivos fosfato cálcico, *Lipofectamine*[™] 2000 y *TransMessenger*[™] en la transfección de células HEK293T con RNAs de luciferasa sintetizados en ausencia o presencia de *cap* o el análogo *ARCA*. La eficiencia de transfección se evalúa en función de la actividad luciferasa detectada en los extractos de los cultivos de tres experimentos independientes, 48 horas post-transfección. UA: unidades arbitrarias.

4.2.- Estudio del papel de la secuencia 5' no traducida (5'-NT) en la traducción de RNAs sintéticos derivados del genoma del RaV.

El proceso de traducción de los transcritos de longitud genómica puede ser considerado una etapa crucial en la consecución de un clon de cDNA infeccioso. Es de esperar que, al ser introducidos en una célula, los RNAs sintéticos que tratan de mimetizar al genoma del virus sean tratados como mensajeros y den lugar a las proteínas virales, indispensables para la replicación del RNA transfectado.

La mayoría de autores que han establecido sistemas de genética reversa en calicivirus subrayan la necesidad de proteger el extremo 5' de los transcritos de longitud genómica con *cap* (Sosnovtsev y Green, 1995; Thumfart y Meyers, 2002; Chang *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2008; Yunus *et al.*, 2010). Además del *cap*, es posible que las regiones no traducidas de los

Resultados

calicivirus incluyan secuencias que afecten a la estabilidad del RNA o a la eficiencia con la que éste es utilizado por la maquinaria de síntesis proteica.

La secuencia 5' no traducida (5'-NT) del genoma del RaV presenta en la posición +5 un codón AUG que constituye un posible inicio de la traducción alternativo al descrito por Martín-Alonso y colaboradores (2005) para la ORF1, localizado en la posición +20 (figura 10). Pese a estar en la misma pauta de lectura, el uso de este inicio alternativo daría lugar a síntesis abortivas, puesto que existe un codón de parada en la posición +14. Esto podría constituir un importante hándicap para el establecimiento de un sistema de genética reversa basado en la transfección de RNA, ya que la producción de proteínas virales a partir de los transcritos sintéticos derivados del cDNA del genoma podría verse mermada.

En este punto, consideramos relevante estudiar la influencia de la secuencia 5'-NT viral en la capacidad traduccional de RNAs sintéticos modelo. Para ello, se construyeron vectores de transcripción que fusionan las regiones 5'-NT de los RNAs genómico (g) o subgenómico (sg) con la secuencia codificadora de la luciferasa, que actuará como indicador de la traducción. De la misma manera, se estudió una fusión que incluye una modificación del 5'-NT del genoma que contiene la mutación puntual T-A en la posición +6 del genoma viral (t6a) y que supone la desaparición del posible codón de inicio de traducción alternativo.

4.2.1.- Construcción de vectores reporteros.

La construcción de los vectores que contienen las secuencias 5'-NT de RaV fusionadas al gen de la luciferasa se diseñó de manera que fuera el AUG de la ORF1 viral el encargado de iniciar la síntesis del transcrito-fusión. Para ello, se sintetizaron parejas de oligonucleótidos complementarios (tabla 6) que contienen las secuencias virales correspondientes a las regiones 5'-NT precedidas por el promotor de la RNA polimerasa de T7, de modo que la síntesis *in vitro* de transcritos comience en el nucleótido de guanina que ocupa la posición +1 del genoma o del RNA subgenómico del RaV (figura 10). El emparejamiento de los oligonucleótidos forma un DNA de doble cadena con extremos cohesivos que facilitan su inserción en el vector pFastBac1 digerido con *EcoRI* y *NotI*, dando lugar a las construcciones pFast_g, pFast_t6a y pFast_sg, que contienen las variantes de las regiones 5'-NT de RaV indicadas más arriba.

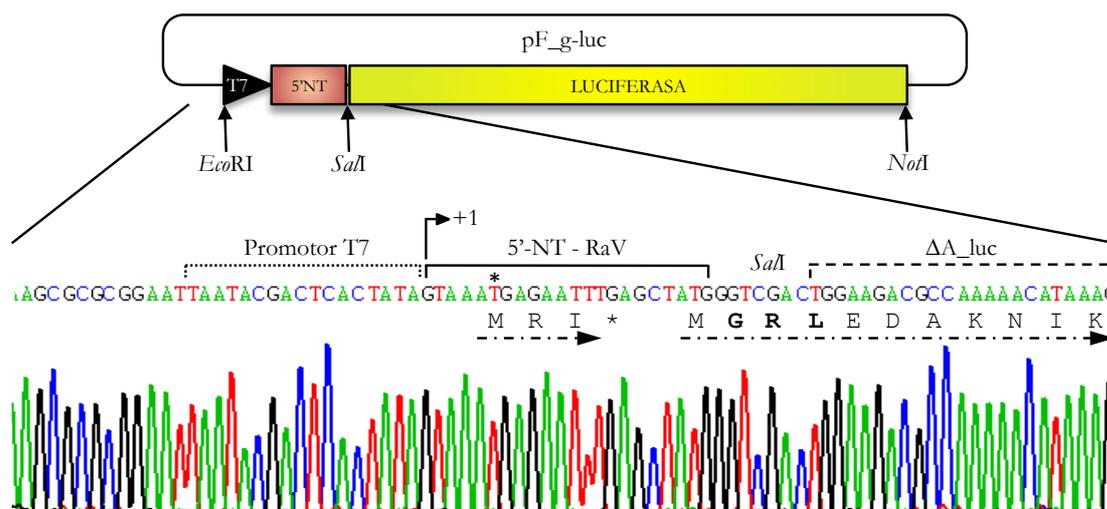


Figura 10. Esquema del vector reportero pF_g-luc en el que se muestra un fragmento del electroferograma resultante de la secuenciación parcial del plásmido, indicando la fusión de la secuencia promotora de T7 (corchete punteado), el 5'-NT del genoma del RaV (corchete liso) y el inicio del gen de la luciferasa (ΔA_luc). Adicionalmente se detalla el inicio de transcripción (+1), el nucleótido utilizado para mutar el AUG alternativo (*) y el comienzo de la pauta de lectura expresada (flecha discontinua) en la que se resaltan los aminoácidos insertados en el proceso de clonación.

El gen de la luciferasa se obtuvo del vector pCiNeo-luc ΔA (ver 3.1.4) por escisión de la secuencia codificadora con las enzimas de restricción *SalI* y *NotI*, que posteriormente se insertó en las construcciones que contienen las distintas regiones 5'-NT del RaV dando lugar a los vectores pF_g-luc, pF_t6a-luc y pF_sg-luc. Los plásmidos recombinantes se verificaron mediante secuenciación de la zona que comprende la fusión génica (figura 10), la cual presenta tres codones adicionales introducidos en el proceso de clonación. Presumiblemente, la adición de estos tres aminoácidos al extremo amino de la proteína no altera la estructura o la función de la luciferasa (Neuman *et al.*, 2004).

4.2.2.- Análisis funcional de la secuencia 5'-NT del RaV.

En un principio se comprobó la funcionalidad de las construcciones *in vitro*, mediante reacciones de transcripción-traducción acoplada en un sistema libre de células (ver 3.4.5). La eficiencia de traducción se cuantificó mediante ensayos de actividad luciferasa y se comparó con la obtenida a partir del vector comercial pT7-luc, que presenta una secuencia 5'-NT de 50 residuos. Las fusiones que contienen las secuencias 5'-NT del RaV dieron lugar a valores de actividad luciferasa considerablemente más bajos que los obtenidos con el vector control (figura 11). En estas circunstancias no se consideraron las diferencias apreciadas entre las fusiones, y el sistema acoplado se desestimó como método de comparación de la eficacia de las distintas secuencias de RaV en la traducción.

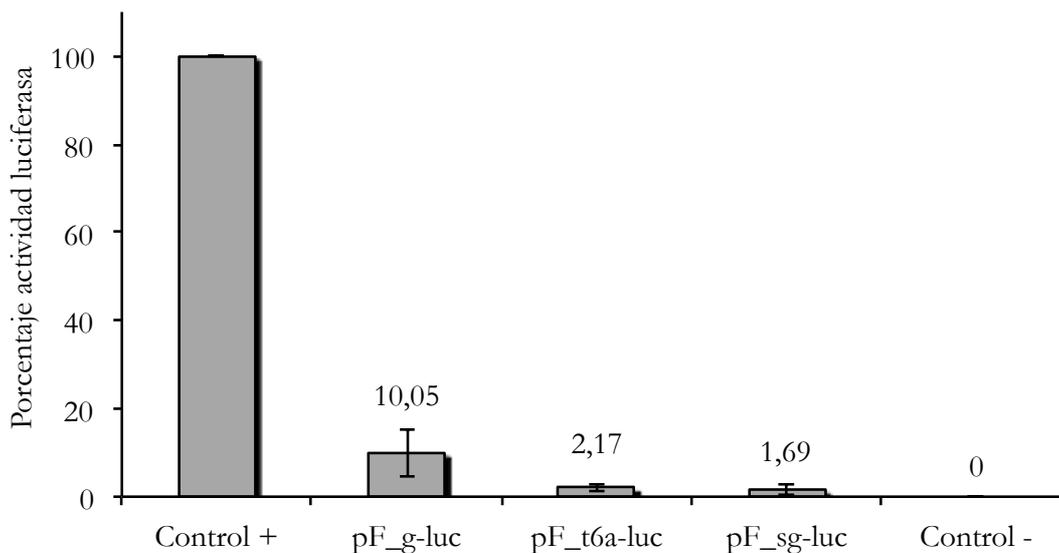


Figura 11. Actividad luciferasa de las reacciones de transcripción-traducción acopladas. Se representa el porcentaje de actividad enzimática obtenido en las reacciones acopladas de las fusiones respecto al plásmido control pT7-luc (Control +). En el control negativo (Control -) no se añadió DNA a la reacción. En todos los casos se utilizó una cantidad equivalente de DNA (1 µg).

Con la intención de discernir cuál es el proceso que resta eficacia a estos vectores reporteros, se llevaron a cabo las reacciones de transcripción y traducción por separado.

La transcripción *in vitro* a partir de los vectores pF_g-luc, pF_t6a-luc y pF_sg-luc generó productos de la longitud esperada, aproximadamente 1.700 nts (figura 12). Sin embargo, en las mismas condiciones de reacción (concentración de reactivos, cantidad de molde y tiempo de reacción), se detectó un rendimiento mucho más bajo para los transcritos con secuencias de RaV que el observado para el plásmido control pT7-luc. Además de comprometer el nivel de traducción, la baja producción de RNA puede ser un inconveniente a la hora de abordar la síntesis de transcritos de longitud mayor, como los derivados del cDNA de RaV, de 8,3 kb.

Para comparar la funcionalidad de los transcritos generados, se llevaron a cabo reacciones de traducción *in vitro* con cantidades equivalentes de estos RNAs. Los ensayos de actividad luciferasa mostraron una eficiencia en la traducción de los transcritos *g-luc*, *t6a-luc* y *sg-luc* más próxima a los valores obtenidos con el RNA control de luciferasa (figura 13), en claro contraste con lo observado en las reacciones de transcripción-traducción acopladas.

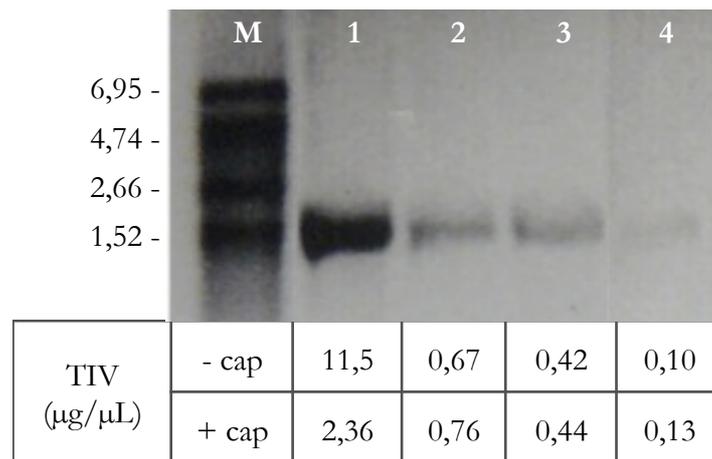


Figura 12. Análisis electroforético en gel de agarosa-formaldehído de los productos de la transcripción *in vitro* (TIV) de los vectores reporteros pF_g-luc (2), pF_t6a-luc (3) y pF_sg-luc (4) y el plásmido control pT7-luc (1). La tabla inferior indica la concentración de RNA (expresada en µg/µL) obtenida en reacciones de TIV llevadas a cabo en ausencia (- cap) y presencia (+ cap) del análogo *cap* con idéntica cantidad de DNA molde.

Respecto a la eficiencia relativa de las distintas fusiones, se observa que, *in vitro*, los transcritos con la secuencia 5'-NT del RNA subgenómico de RaV producen una actividad luciferasa ligeramente menor que las fusiones con la región 5'-NT del genoma. La incorporación del *cap* en las reacciones de transcripción incrementa sensiblemente la traducción de todos los RNAs ensayados.

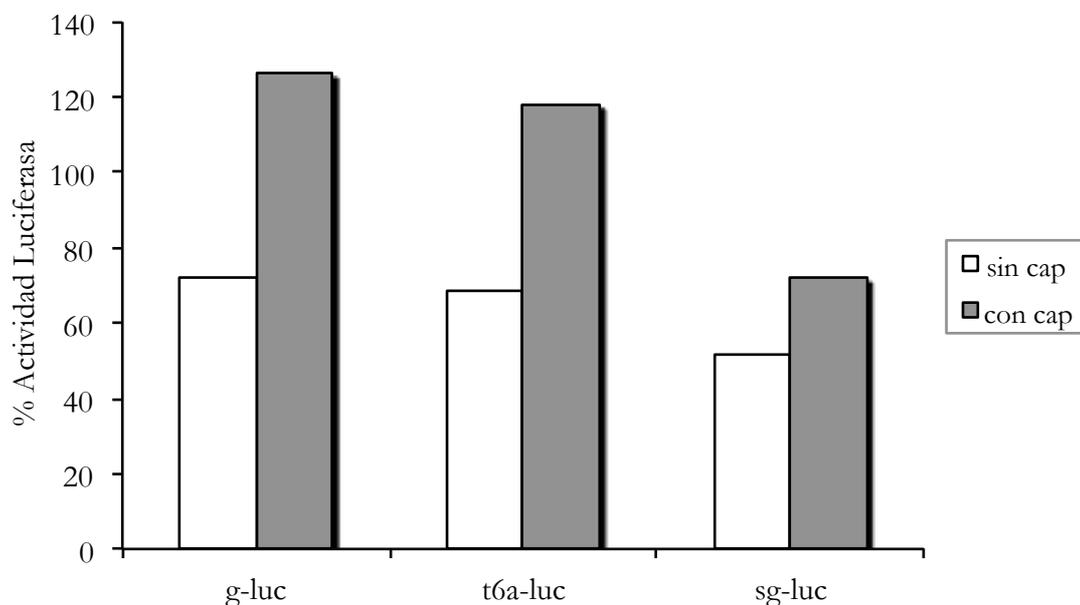


Figura 13. Actividad luciferasa de los productos de traducción *in vitro* de transcritos sintetizados en ausencia o presencia de *cap*. Se representa el porcentaje de actividad luciferasa obtenida en cada reacción, utilizando como referencia control (100%) un RNA de luciferasa facilitado en el preparado comercial. En todos los casos se utilizó una cantidad equivalente de RNA (1 µg).

Resultados

Para evaluar los efectos de la estructura *cap* y de la secuencia 5'-NT sobre los niveles de traducción de RNA sintético en cultivos celulares se llevó a cabo la transfección de los transcritos fusión en células HEK293T utilizando el reactivo *TransMessenger*[™]. Al igual que en los ensayos *in vitro*, los valores de actividad luciferasa registrados en los extractos celulares ponen de manifiesto la importancia del *cap* en la traducción de RNAs sintéticos, siendo el análogo ARCA considerablemente más eficaz (figura 14).

Por otro lado, las sutiles diferencias en la secuencia 5'-NT de los distintos transcritos parecen tener cierta influencia sobre los niveles de traducción de RNAs sintéticos. Las células transfectadas con el transcrito *T7-luc*, utilizado como referencia, registraron los valores de actividad luciferasa más altos. En contraste con los resultados de la traducción *in vitro*, el transcrito con la secuencia 5'-NT del RNA subgenómico del RaV alcanzó un nivel de actividad más elevado que el RNA con el 5'-NT del genoma.

El transcrito que incorpora la mutación T-A en el nucleótido +6 del RaV (que elimina el codón AUG previo al inicio de la traducción de la ORF1) no muestra diferencias importantes con respecto al RNA que contiene la secuencia original del 5'-NT viral. Esto parece indicar que este AUG no es determinante para la capacidad traduccional de los RNAs sintéticos.

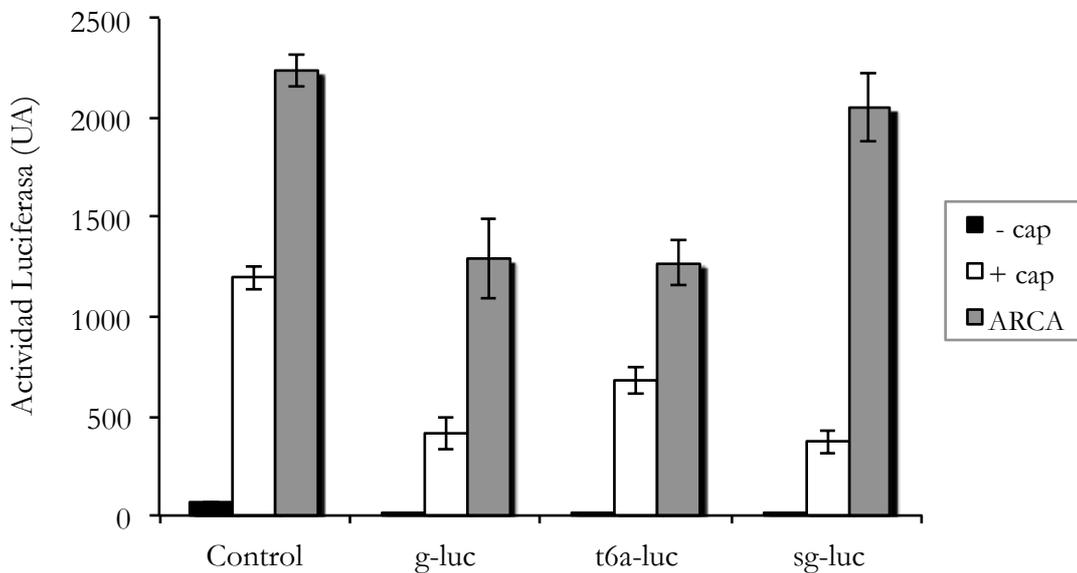


Figura 14. Eficiencia de transfección de RNA en células HEK293T evaluada en función de la actividad luciferasa a las 40 horas post-transfección. La transfección se llevó a cabo con el reactivo *TransMessenger*[™] utilizando 1 μ g de cada transcrito sintético. Se representan los valores de actividad luciferasa de 3 experimentos independientes, utilizando como control un RNA derivado del plásmido pT7-luc. UA: unidades arbitrarias

4.3.- Construcción de vectores de transcripción para los RNAs genómico y subgenómico del RaV.

Como primera aproximación para generar un sistema de genética reversa del *vesivirus de conejo*, se diseñaron vectores de transcripción que permiten obtener copias del RNA genómico o del mensajero subgenómico del RaV.

Para este fin, se utilizó un cDNA de longitud genómica previamente clonado en el laboratorio (Martin-Alonso *et al.*, 2005). Esta copia del genoma de RaV fue utilizada para determinar su secuencia nucleotídica, que se depositó en la base de datos del EMBL¹⁰ con el número AJ866991. El vector de partida, denominado pT-RaVg (ver 3.1.4), fue empleado como molde para amplificar por PCR el genoma de RaV con los oligonucleótidos cebadores RaV1A y T7RaV14 (tabla 5). El producto de la amplificación, de 8,3 kpb, estaba flanqueado por las dianas de restricción *XhoI* y *AcI* y contenía el cDNA completo de RaV precedido del promotor del bacteriófago T7 (figura 15).

La clonación del fragmento amplificado en el vector pFastBac1 dio lugar a la construcción denominada *pF-RaVg*, que contiene el cDNA del RaV bajo el control del promotor de T7; de manera que el comienzo de la síntesis *in vitro* de RNA, dirigida por la RNA polimerasa de T7, coincide con el residuo +1 del genoma de RaV (figura 15). La introducción del sitio *AcI* en el extremo 3' del cDNA facilita la obtención de un molde lineal para la transcripción *in vitro*. La síntesis de RNA dará lugar a una copia sintética del genoma de RaV que sólo se diferencia por la presencia de dos residuos nucleotídicos adicionales (CG) y de origen no viral a continuación de la cola de poliA.

De manera similar, utilizando los oligonucleótidos RaV1A y T7RaVsg (tabla 5), se llevó a cabo la construcción del vector *pF-RaVsg* (figura 15), que contiene el cDNA completo del mensajero subgenómico de RaV bajo el control del promotor de T7. En este caso, el inicio de la transcripción coincide con el primer nucleótido del RNA subgenómico, localizado en el residuo 5.648 del genoma viral (Martin-Alonso *et al.*, 2005).

¹⁰ acrónimo de *European Molecular Biology Laboratory*

Resultados

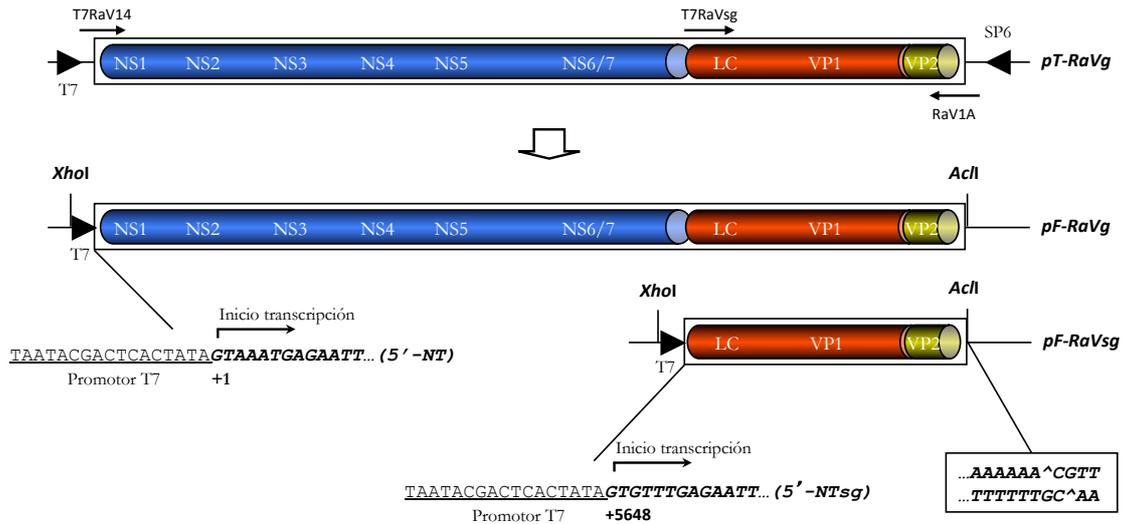


Figura 15. Representación del vector pT-RaVg que incluye el cDNA del genoma completo del RaV (Martin-Alonso *et al.*, 2005) utilizado como molde para la generación de los vectores de transcripción pF-RaVg y pF-RaVsg. En el esquema se indica la posición de las secuencias complementarias a los oligonucleótidos utilizados para amplificar el cDNA del genoma y del transcrito subgenómico de RaV (flechas negras), así como la de los promotores de T7 y SP6 (cabezas de flecha). En detalle se muestran las secuencias de los extremos de los insertos, indicando el punto en el que se inicia la transcripción con la RNA polimerasa de T7 y el sitio de corte de *AclI* (^) que permite la obtención de moldes lineales para la síntesis *in vitro* de RNA. En los esquemas de las construcciones se señalan los dominios del péptido *leader* de la cápsida (LC) y de las proteínas estructurales (VP) y no estructurales (NS) codificadas en las distintas pautas abiertas de lectura del genoma del RaV: ORF1 (azul), ORF2 (rojo) y ORF3 (amarillo).

4.3.1.- Creación de una etiqueta en el cDNA genómico.

Con la finalidad de identificar los virus recombinantes que podrían obtenerse a partir de los transcritos sintéticos se introdujo una etiqueta diferencial en el cDNA del RaV. La modificación consiste en la sustitución de cuatro residuos de nucleótidos (7.862 a 7.865) situados dentro de la región codificadora de la ORF3, y conlleva la transformación de una diana de restricción *NheI* en la secuencia reconocida por *XhoI* (figura 5). Esta nueva diana de restricción será única en el genoma del RaV recombinante y permitirá excluir la posibilidad de que el rescate de virus sea atribuible a una contaminación con RaV silvestre.

La sustitución de estos cuatro nucleótidos se llevó a cabo por mutagénesis dirigida (ver 3.3.6) sobre el vector pF-RaVg. La secuencia del nuevo clon pF-RaVg/Xh se analizó mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación de la región afectada para comprobar la presencia de las mutaciones introducidas (figura 16).

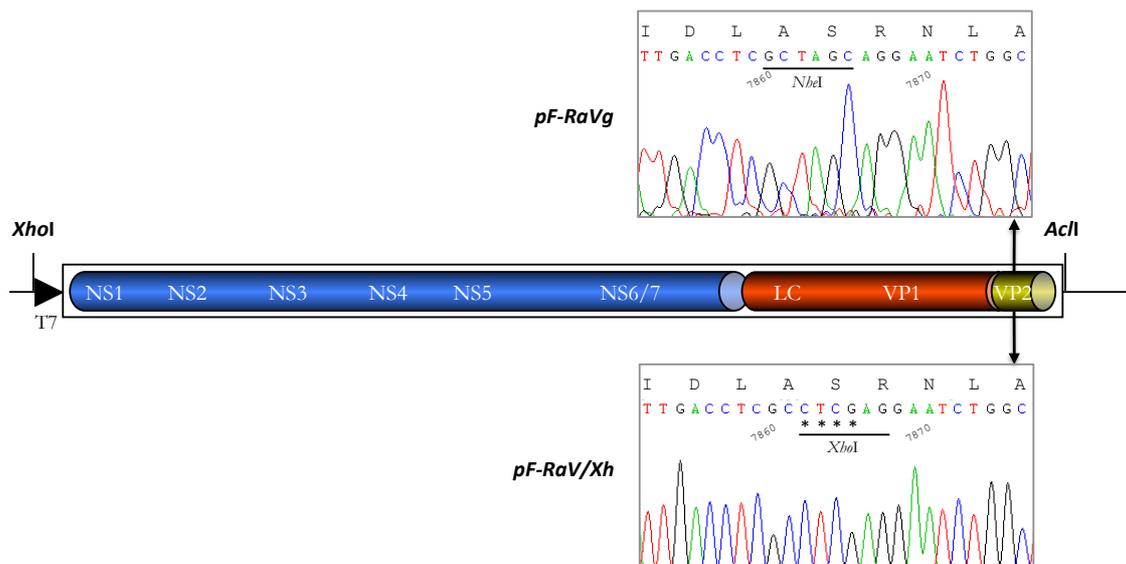


Figura 16. Esquema de la construcción pF-RaV/Xh, obtenida por mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos RaV_Nh/Xh_f y RaV_Nh/Xh_r (figura 5). En detalle se muestran los electroferogramas generados en la secuenciación de la región afectada, tanto en el plásmido original pF-RaVg como en el pF-RaV/Xh. Se subrayan los sitios de restricción afectados por la mutagénesis de los cuatro residuos señalados con asteriscos.

4.3.2.- Modificación del extremo 3' del cDNA clonado en los vectores de transcripción.

Para procurar conseguir la mayor similitud posible entre los transcritos sintéticos y el RNA viral, se diseñó una estrategia para introducir en el vector pF-RaVg la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta (H δ V) a continuación de la cola de poli-adenosina presente en el cDNA de RaV. De esta forma, el auto-procesamiento del transcrito generado dará lugar a una cola de poliA sin residuos añadidos. Junto a la ribozima, se insertó la señal de terminación de la transcripción del fago T7 para delimitar la acción de la RNA polimerasa y, por consiguiente, evitar la necesidad de utilizar endonucleasas de restricción para obtener un molde lineal del vector.

Las secuencias codificadoras de la ribozima del H δ V y del terminador de T7 se obtuvieron del plásmido pBS-RT (ver 3.1.4) por digestión con las endonucleasas *SmaI* y *NoI*. El vector pF-RaVg fue digerido con *AclI*, tratado con la nucleasa *Mung Bean* para crear un extremo romo, y posteriormente digerido con *NoI* para facilitar la inserción del fragmento que contenía la ribozima y el terminador de T7.

La secuenciación del vector resultante, denominado pF-RaVR, confirmó la fusión de la cola de poli-adenosina del cDNA del RaV, de 24 residuos, con el extremo 5' de la ribozima del H δ V (figura 17).

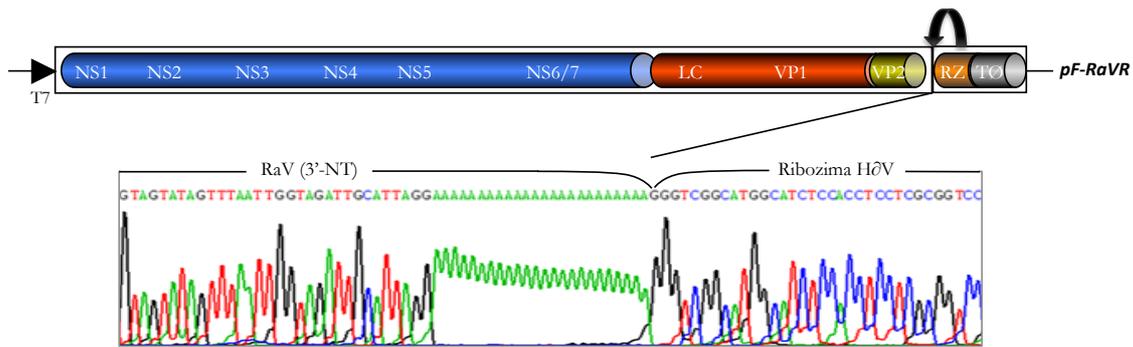


Figura 17. Esquema de la construcción pF-RaVR en el que se indica la posición de las secuencias del cDNA de la ribozima del HØV (RZ), coloreada en naranja, y del terminador de la transcripción del fago T7 (TØ), en gris. En detalle se muestra parte del electroferograma obtenido de la secuenciación de la región en la que se produce la fusión de la cola poliadenilada del cDNA de RaV con la secuencia de la ribozima.

4.3.3.- Sustitución de parte de la región 3' del genoma de RaV por el gen que codifica la proteína fluorescente verde GFP.

En el ciclo de replicación de los vesivirus, las proteínas estructurales VP1 y VP2 se producen solamente por la traducción del mensajero subgenómico (RNAsg). A la luz de los conocimientos actuales sobre la replicación de los genomas de los calicivirus (Abrantes *et al.*, 2012; Thorne y Goodfellow, 2014), la producción del RNAsg implica la síntesis previa de hebras de polaridad negativa (-), producidas a partir del RNA genómico (+), que servirán como molde para la síntesis de nuevas copias tanto del RNAsg como del RNAsg.

La construcción de un cDNA infeccioso de un virus con genoma RNA(+) es un proceso complejo que en ocasiones no resulta plenamente funcional, lo que da lugar a la imposibilidad de rescatar viriones debido a defectos en alguna secuencia relevante o a impedimentos relacionados con las células hospedadoras. Averiguar las etapas o secuencias defectuosas no resulta sencillo. Por esto, para comprobar si el ciclo viral se desarrolla con normalidad a partir de las construcciones recombinantes de RNA de longitud genómica, al menos hasta la síntesis del RNAsg, se diseñó un vector de transcripción en el que se sustituyó una parte de la región 3' del genoma de RaV por el gen de la proteína fluorescente verde (GFP). El RNA expresado a partir de esta construcción facilita la investigación de su funcionalidad a través de estudios de fluorescencia.

La secuencia codificadora de la GFP se amplificó por PCR a partir del vector pEGFP-C1 (ver 3.1.4) utilizando los oligonucleótidos 5EGFP-Nhe y 3EGFP-Spe (tabla 7). Debido a las dificultades encontradas en el proceso de clonación fue necesario insertar el producto de PCR en el vector pGEM[®]-T Easy como paso intermedio. A continuación, se

obtuvo el gen de la GFP mediante digestión con los enzimas de restricción *NheI* y *SpeI* y se insertó en el vector pF-RaVR. Con este fin se emplearon las dianas de restricción *NheI* localizadas en las posiciones 6.450 y 7.925 del genoma de RaV. Esto supone la delección de una parte importante de la ORF2, que codifica la región carboxilo terminal de la VP1, y del inicio de la ORF3, que pierde su capacidad de expresión. Teóricamente, el RNA derivado de esta construcción, denominada pF-RaVR/GFP, podría dar lugar a un replicón que generaría un mensajero subgenómico que codifica un polipéptido recombinante que contiene los primeros 260 residuos del precursor de la VP1 fusionados con los 240 de la GFP (figura 18).

El análisis de la secuencia insertada reveló la presencia de nucleótidos adicionales procedentes del vector *pGEM[®]-T Easy*, resultantes de una digestión incompleta por parte del enzima *NheI*. La existencia de otra diana *SpeI* en el vector generó un fragmento de tamaño similar al esperado y con extremos compatibles para la ligación. Esto ocasionó la adición de varios nucleótidos que alteran la pauta de lectura en la secuencia fusionada. No obstante, la presencia de otra diana *NheI* permite el uso de este enzima para abrir el vector y eliminar 4 nucleótidos con la nucleasa Mung Bean que restablecen la pauta de lectura de manera que la GFP quede fusionada con la ORF2 (figura 18). El resultado final es la inserción de 5 codones adicionales que no deberían ocasionar inconvenientes en la expresión de GFP.

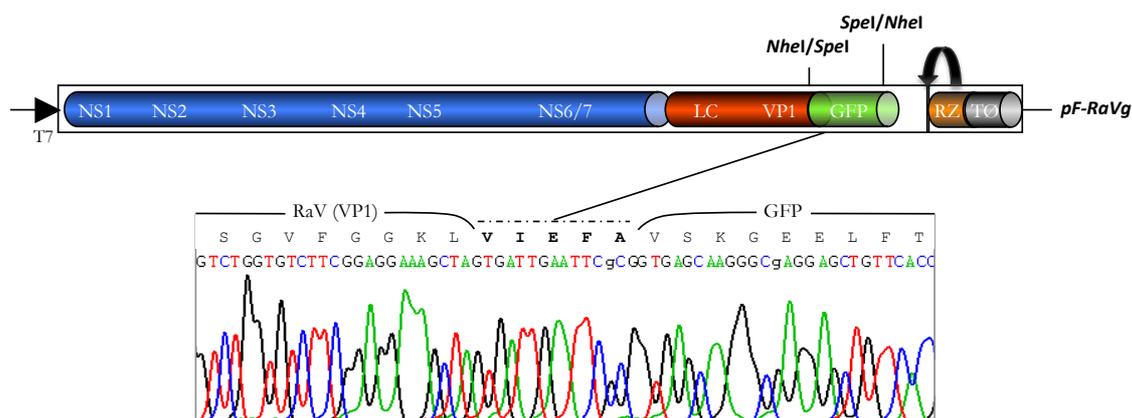


Figura 18. Esquema de la construcción *pF-RaVR/GFP* en el que se insertó la secuencia codificadora de la proteína fluorescente verde, que sustituye al fragmento de restricción *NheI-NheI* como fusión con el producto de la ORF2. En detalle se muestra parte del electroferograma obtenido de la secuenciación de la región en la que se produce la fusión de la región codificadora de la VP1 de RaV con el gen de la GFP. En la secuencia deducida de aminoácidos se resaltan (en negrita) los residuos aminoácidos incluidos en el proceso de clonación.

4.3.4.- Análisis funcional de los transcritos derivados del genoma del RaV en cultivos celulares.

Las construcciones pF-RaVg, pF-RaVsg, pF-RaV/Xh, pF-RaVR y pF-RaVR/GFP sirvieron como moldes para la síntesis *in vitro* de transcritos utilizando la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Estas reacciones de transcripción, en ausencia y en presencia de *cap* o del análogo *ARCA* (ver 3.3.7), rindieron en cada caso los productos del tamaño esperado: aproximadamente 8,3 kb para los transcritos *RaVg*, *RaV/Xh* y *RaVR*, 7,6 kb para *RaVR/GFP* y 2,6 kb en el caso de *RaVsg* (figura 19).

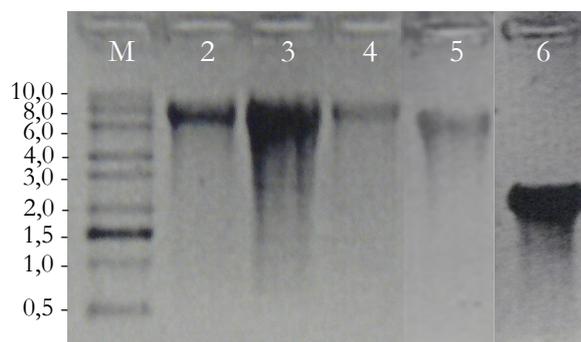


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído de los productos de la transcripción *in vitro* en presencia del análogo de *cap* antireverso *ARCA* a partir de las construcciones pF-RaVg (2), pF-RaV/Xh (3), pF-RaVR (4), pF-RaVR/GFP (5) y pF-RaVsg (6). M - Marcadores moleculares.

El análisis funcional de estos transcritos sintéticos consistió en el estudio de su capacidad infectiva mediante transfección (3.5.1) en cultivos de las líneas celulares capaces de permitir la replicación del RaV. En primer lugar, se transfectaron células Vero utilizando el reactivo *TransMessenger*[™] con cantidades entre 1 y 10 µg de transcritos con y sin *cap* derivados de las construcciones pF-RaVg y pF-RaV/Xh (figura 20). Los cultivos transfectados, o pase 0 (P0), se observaron diariamente en busca de muestras de efectos citopáticos (CPE¹¹). A pesar de no visualizar signos de replicación viral, se tomó el sobrenadante de cultivo en el día siete post-transfección y se utilizó como inóculo sobre nuevos cultivos de células Vero (P1¹² y P2) con objeto de amplificar los posibles virus RaV recombinantes. La evolución de los pases 1 y 2 se siguió durante 72 horas, pero no se observó el CPE característico de RaV.

¹¹ acrónimo del inglés *cytopathic effect*

¹² P1 = pase 1, células infectadas con el sobrenadante de cultivo del P0

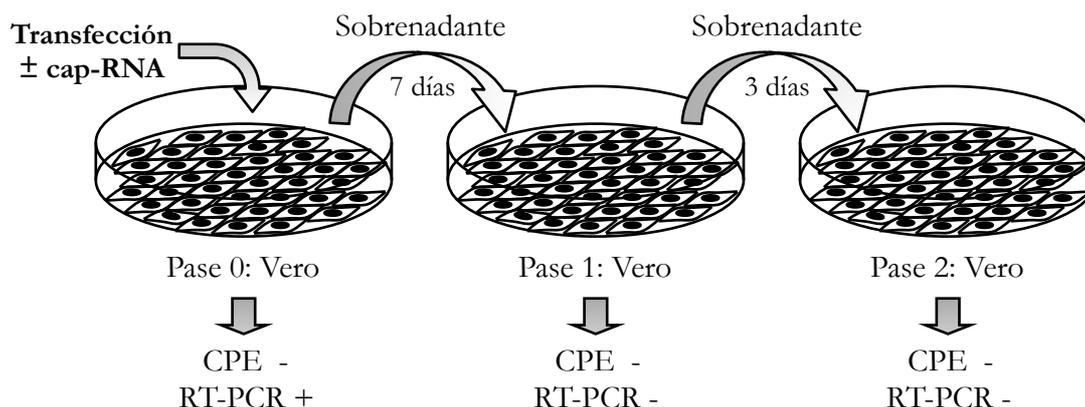


Figura 20. Esquema del experimento para el análisis de la capacidad infectiva de transcritos sintéticos *RaVg* y *RaV/Xb*.

La ausencia de efectos citopáticos no descarta que el RNA sintético haya sido capaz de dirigir la síntesis de proteínas virales o incluso haber desencadenado un ciclo de replicación que haya sido abortado en algún punto. Por ello, las células del pase 0 se procesaron para analizar la presencia de RNA viral mediante RT-PCR (ver 3.3.8). La amplificación dio lugar a un producto de 1.220 pb en los cultivos transfectados con la mayor cantidad de transcrito *RaVg* y *RaV/Xb* con y sin *cap* (figura 21). Este fragmento fue digerido con *XhoI* para corroborar la presencia de la etiqueta introducida en los RNAs derivados de la construcción pF-RaV/Xh. La escisión del fragmento fue específica en los productos de RT-PCR de los cultivos transfectados con el RNA *RaV/Xb* con y sin *cap*.

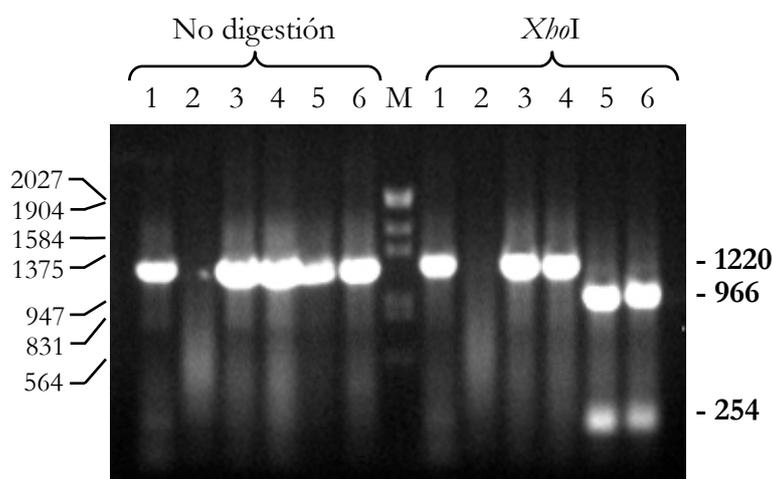


Figura 21. Análisis electroforético del producto de amplificación por RT-PCR del RNA extraído de los cultivos transfectados (Pase 0) con los transcritos sintéticos *RaVg* (calles 3 y 4) y *RaV/Xb* (calles 5 y 6) en ausencia (3 y 5) o presencia (4 y 6) de *cap*. Los productos de la amplificación se analizaron antes y después de la digestión con la enzima de restricción *XhoI*. Se incluyeron controles para la RT-PCR con RNA viral (1) y sin molde de reacción (2).

Resultados

Es difícil explicar la presencia del RNA sintético 7 días después de la transfección de los cultivos sin que exista un proceso de replicación. Por ello, se repitió el experimento en tres ocasiones más, en las que no fue posible detectar RNA del RaV en el P0. También se utilizaron cultivos de células HEK293T y CRFK, pero en ninguna ocasión se observaron efectos citopáticos, ni en las células transfectadas ni en los pases 1 y 2 (siempre en cultivos de Vero). En estos experimentos, se realizaron análisis *Western Blot* adicionales para la inmunodetección de la proteína estructural VP1 en los extractos celulares del pase 0, los cuales no mostraron la presencia de la proteína viral.

Posteriormente, se ensayó la co-transfección de los RNAs *RaVg* o *RaV/Xb* con el transcrito subgenómico derivado de pF-RaVsg (entre 1 y 5 µg de RNA con *cap* por pocillo), sin que pudieran observarse efectos citopáticos ni en los cultivos tratados ni en los pases 1 y 2. En este caso, no fue posible detectar RNA viral en las células de P0 mediante RT-PCR.

Considerando la baja eficiencia de transfección de las células Vero, se utilizaron otras líneas susceptibles a la infección por RaV (CRFK y HEK293T) y otros reactivos de transfección (*Lipofectamine*[™] 2000 y *TransMessenger*[™]) para ensayar los RNAs sintéticos derivados de pF-RaVg y pF-RaV/Xh suplementados con el transcrito subgenómico *RaVsg*. El resultado fue similar en todas las líneas celulares dado que en ningún caso se observó efecto citopático ni se pudo detectar la presencia de RNA viral, tanto en los cultivos tratados como en los pases sucesivos (P1 y P2).

En este punto, se consideró razonable co-transfectar células Vero y HEK293T con el RNA sintético *RaV/Xb* y distintas cantidades (entre 0,02 y 0,1 µg) de RNA viral purificado de viriones; con la intención de aportar toda la maquinaria del virus al transcrito *RaV/Xb* y analizar si es capaz de ser replicado y/o encapsidado en partículas virales. Las células sometidas a co-transfección con RNA viral mostraron el efecto citopático característico de RaV, así como los pases 1 y 2. Esto no fue así en los controles de transfección sin RNA ni en los cultivos tratados sólo con el transcrito *RaV/Xb*.

El RNA purificado de las células de todos los pases se amplificó por RT-PCR en búsqueda del RNA viral recombinante. Todos los cultivos que mostraron efecto citopático dieron lugar al producto de amplificación esperado; no obstante, ninguno de los fragmentos amplificados contenía la etiqueta *XhoI* (figura 22).

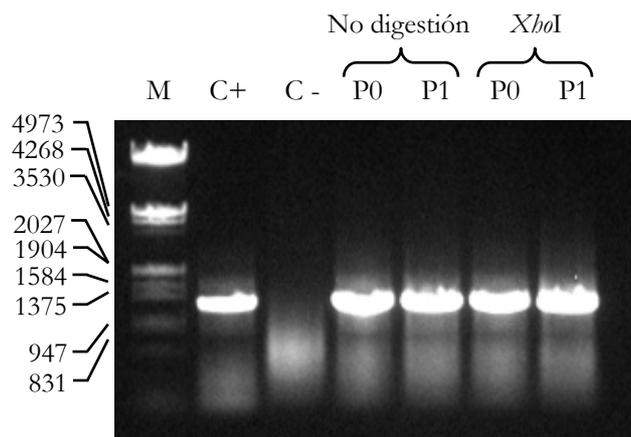


Figura 22. Análisis electroforético de los productos de amplificación por RT-PCR y su digestión con la enzima de restricción *XhoI* a partir del RNA extraído de los pases 0 (P0) y 1 (P1) del experimento de co-transfección de RNA viral de RaV con el transcrito sintético *RaV/Xb*. C+ corresponde a un control positivo de RT-PCR realizado con RNA viral purificado, mientras que C - es un control negativo de reacción en el que no se adiciona RNA molde.

Existe la posibilidad de que los transcritos de longitud genómica dirijan correctamente la síntesis de la poliproteína viral contenida en la ORF1 pero no sean utilizados como molde en la replicación del genoma dependiente de la polimerasa viral. La presencia de dos nucleótidos añadidos a continuación de la cola poliadenilada del transcrito podría ser uno de los elementos que impidan o dificulten el proceso de replicación. Para comprobar esta posibilidad, se realizaron experimentos de transfección de las líneas Vero y HEK293T con los transcritos derivados de la construcción pF-RaVR (de 1 a 5 µg por pocillo). El auto-procesamiento de la ribozima genera un transcrito de longitud genómica sin nucleótidos añadidos (figura 19). Ninguna de las líneas celulares ensayadas en estos experimentos mostró efecto citopático en el P0. Tampoco los pases 1 y 2, siempre sobre células Vero, manifestaron la presencia de virus recombinantes. En este caso tampoco se detectó la presencia de RNA viral en los cultivos de P0 y P1 (datos no mostrados).

De la misma manera, se realizó el análisis funcional del transcrito derivado de pF-RaVR/GFP mediante la transfección de células HEK293T y Vero con los reactivos comerciales *Lipofectamine*[™] 2000 y *TransMessenger*[™]. En este caso, el transcrito contiene, *a priori*, la información necesaria para su replicación, dándose además la circunstancia de que el gen de la proteína fluorescente verde fusionado con la VP1 sólo se expresará en el caso de que se produzca el correspondiente RNA mensajero subgenómico. La emisión de fluorescencia en cultivos transfectados con este RNA demostraría la replicación del genoma y la transcripción del RNAsg. Los cultivos transfectados con cantidades entre 1 y 10 µg del transcrito sintético *RaVR/GFP* se observaron cada 24 horas en un microscopio

Resultados

de fluorescencia. Transcurridas 96 horas no se observó fluorescencia, si bien la eficiencia de transfección no fue muy elevada, ya que los cultivos tratados con 3 μg de un RNA control generado a partir del plásmido pT7-GFP no superaron el 5% de células fluorescentes (figura 23).

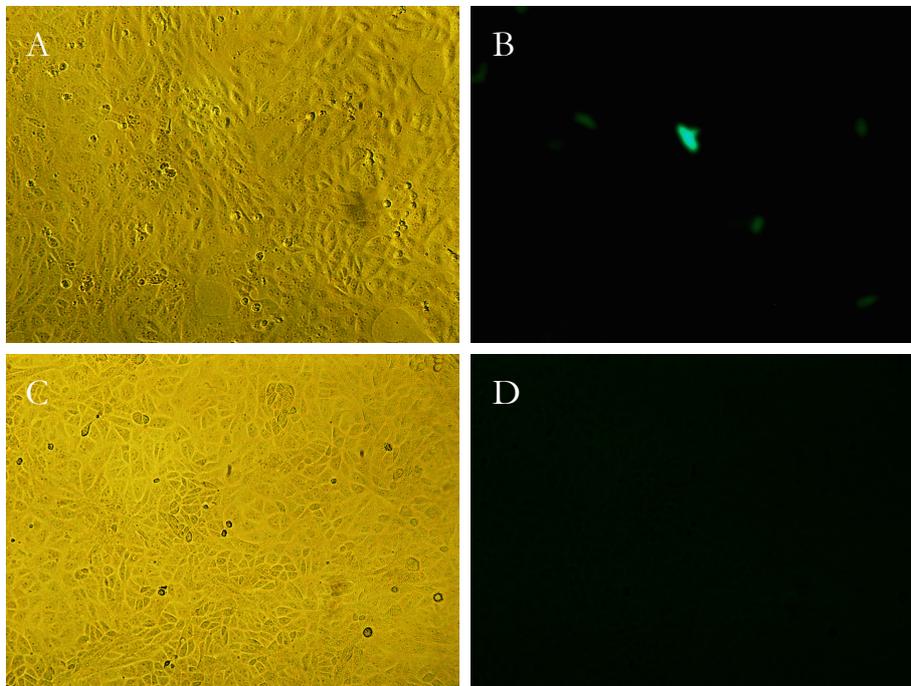


Figura 23. Micrografías a 100 aumentos en contraste de fases (A y C) o de fluorescencia (B y D) de cultivos de células Vero 24 horas después de ser transfectadas con RNA sintético derivado del vector pT7-GFP (A y B) o pF-RaVR/GFP (C y D).

4.4.- Producción y análisis funcional de transcritos sintéticos derivados del cDNA de RaV obtenidos mediante amplificación por RT-PCR de longitud genómica en un solo paso a partir del RNA de los viriones.

Para excluir la posibilidad de que un clon único de cDNA tuviese defectos de construcción que impidiesen su funcionalidad y, al mismo tiempo, asegurar una microheterogeneidad genética en los transcritos sintéticos similar a la que pudiera existir en el RNA purificado de los viriones, se diseñó un procedimiento para la amplificación directa del genoma completo del RaV mediante RT-PCR que permita su posterior transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa del fago T7 sin un paso de clonación previo.

Como material de partida, se utilizó el RNA extraído del sobrenadante de cultivo de células Vero infectadas con RaV (ver 3.3.1.a). La amplificación del genoma se realizó mediante RT-PCR con los oligonucleótidos RaV1 y XhT7RaVt6a (tabla 5), que fueron

diseñados para que el cDNA incluyera una cola de poli-A de 15 residuos y para que el promotor de T7 guiara la síntesis de RNAs comenzando en el primer nucleótido (+1) de la secuencia viral. De esta forma, los transcritos sintéticos generados a partir de este molde no incluirán residuos adicionales de origen no viral. Tan sólo se introdujo de manera deliberada una mutación puntual T-A en la posición +6, que elimina el posible inicio de traducción estudiado con anterioridad con los transcritos fusión de luciferasa (ver 4.2).

El producto amplificado por RT-PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa, observándose un producto mayoritario de unas 8,3 kpb (figura 24A). Este amplicón fue utilizado como molde en sendas reacciones de transcripción *in vitro* en presencia del análogo de *cap* ARCA, que dieron lugar a RNAs del tamaño esperado. En una de las reacciones de transcripción se realizó una poliadenilación adicional, obteniendo RNAs con una cola de poli-A más larga (figura 24B).

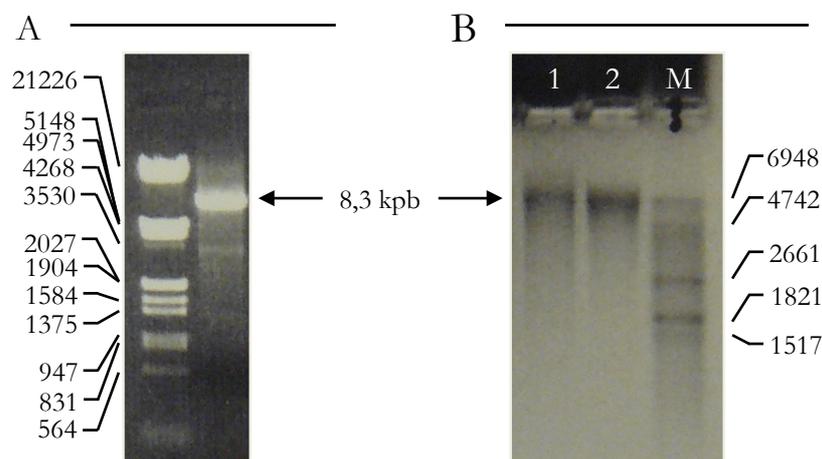


Figura 24. (A) Análisis electroforético del producto de la amplificación del genoma completo por RT-PCR con los oligonucleótidos RaV1 y XhT7RaVt6a. (B) Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído de los RNAs obtenidos mediante transcripción *in vitro* del cDNA completo de RaV con (1) o sin (2) poliadenilación adicional.

Los experimentos de transfección se llevaron a cabo con el reactivo *TransMessenger*[™] en placas de 6 pocillos que contenían células Vero semiconfluentes. Los transcritos con o sin poliadenilación adicional se analizaron por duplicado y de manera independiente, transfectando 5 μ g de RNA en cada pocillo. Los cultivos transfectados (pase 0) se observaron periódicamente, tomando muestras de 100 μ L del sobrenadante de cultivo a las 24, 48 y 72 horas post-transfección (hpt). Cada muestra se utilizó para inocular nuevos cultivos de células Vero (P1) con objeto de poner de manifiesto la presencia de viriones infectivos. Ninguna de las muestras tomadas del P0 a diferentes tiempos provocó efectos citopáticos en los cultivos de los pases 1 y 2.

Resultados

Este tipo de análisis se realizó de manera paralela utilizando células HEK293T para la transfección de los mismos RNAs y células Vero para analizar la infectividad de las muestras recogidas a las 24, 48 y 72 hpt (ver esquema experimental en la figura 25A). Mientras que los cultivos de HEK293T (P0) no mostraron evidencias de replicación viral, las muestras recogidas a las 48 y 72 hpt de los pocillos tratados con el transcrito no poliadenilado ocasionaron en los pases 1 y 2 efectos citopáticos característicos del RaV. Sin embargo, las muestras de P0 tomadas a las 24 hpt, así como aquellas derivadas del transcrito sometido a poliadenilación adicional, no dieron lugar a CPE en ninguno de los cultivos analizados.

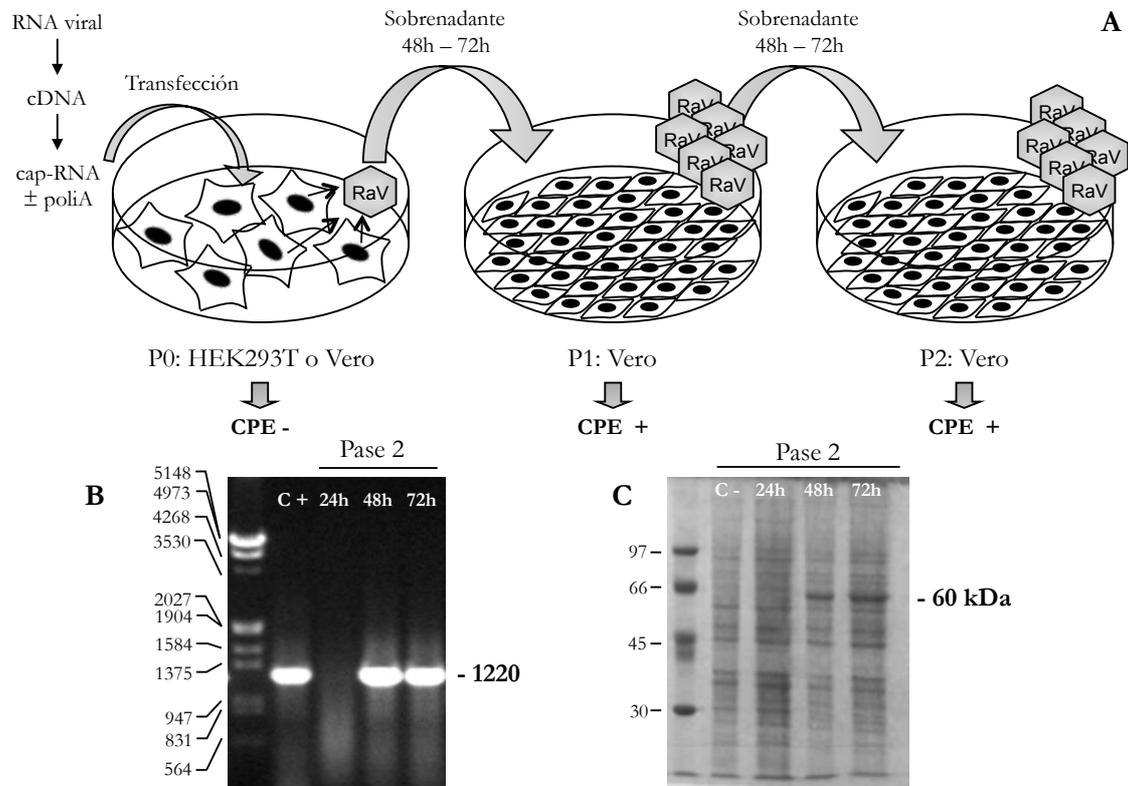


Figura 25. (A) Esquema del análisis de la capacidad infectiva de los transcritos derivados del cDNA completo de RaV amplificado por RT-PCR. La transfección se llevó a cabo en ensayos independientes en cultivos de Vero o HEK293T (representadas en el esquema), de los que se tomaron muestras a las 24, 48 y 72h para analizar la presencia de viriones en pases sucesivos. (B) Electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado por RT-PCR a partir del sobrenadante del Pase 2 del cultivo de HEK293T que presentó efectos citopáticos. (C) Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos de proteínas de los cultivos de Pase 2 que fueron tratados con las muestras de sobrenadante recogidas a distintas horas del cultivo de HEK293T que presentó efectos citopáticos. C+ es un control positivo en el que se utilizó RNA del RaV; C- representa al control de células no transfectadas

El sobrenadante del pase 2 se utilizó para analizar la presencia de RNA viral mediante RT-PCR (ver 3.3.8), que dio lugar al fragmento específico de 1.220 pb en aquellas muestras que presentaban CPE (figura 25B). Además, se preparó un extracto proteico de

los restos celulares del pase 2 que fue analizado por SDS-PAGE, en el que se observó gran cantidad de una proteína de unos 60 kDa que podría corresponder a la VP1 (figura 25C).

La limitación de este sistema es la ausencia de etiquetas de fácil detección en los virus rescatados. Ante la falta de otro tipo de marcadores se analizó la presencia de la mutación T-A en el nucleótido +6 del genoma, y que fue introducida con el cebador de la reacción de PCR. La secuenciación del extremo 5' del RNA de los virus rescatados se llevó a cabo mediante la técnica cRACE (ver 3.3.10). El producto de la amplificación se insertó en un vector de clonación para facilitar su secuenciación. Tan sólo uno de los clones permitió la lectura de la secuencia 5' del virus rescatado, que reveló la ausencia de la mutación en el sexto nucleótido (figura 26).

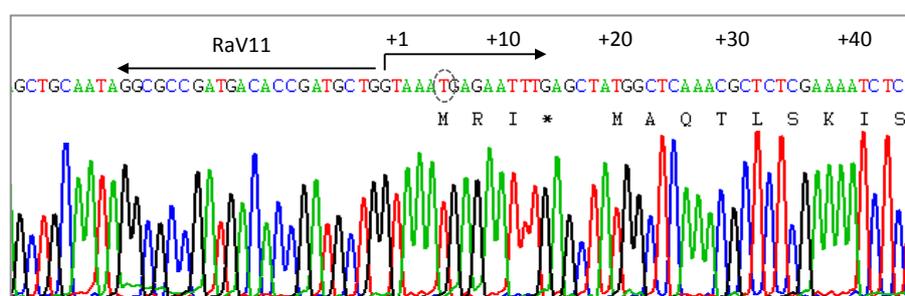


Figura 26. Fragmento del electroferograma que muestra la secuencia del extremo 5' del genoma del virus RaV recombinante obtenido por transfección de RNAs sintéticos derivados del cDNA del RaV amplificado por RT-PCR. Se detalla la secuencia complementaria al cebador RaV11 utilizado en la técnica de cRACE y el nucleótido +6 (círculo de puntos) que debería incluir la mutación (A) introducida con el cebador *Xbt7RaVt6a* de la PCR que amplificó el cDNA completo de RaV.

4.4.1.- Clonación del amplicón de longitud genómica y análisis funcional.

Las dificultades encontradas para demostrar el rescate de virus recombinantes planteó la necesidad de clonar el cDNA completo de RaV en vectores de transcripción. Esto permitiría realizar modificaciones en el cDNA que se vieran reflejadas en los transcritos sintéticos y, eventualmente, en los virus rescatados.

El amplicón de longitud genómica utilizado como molde del RNA infeccioso (figura 24A) se insertó en el vector pGEM[®]-T Easy, dando lugar a 30 clones con la secuencia completa de RaV que se comprobaron mediante análisis del patrón de fragmentos generados por la digestión con varias endonucleasas de restricción. La presencia de dos promotores de T7 en el vector hace esperar que la transcripción *in vitro* de estas construcciones de lugar a productos complejos y no funcionales (Chang *et al.*, 2005). Para facilitar el análisis de la infectividad de los cDNAs amplificados, en lugar de insertar los fragmentos en otro vector plasmídico, se decidió utilizar como moldes de transcripción el

Resultados

producto de PCR de longitud genómica de cada clon individual amplificado con los oligonucleótidos XhT7RaVt6a y RaV1.

El análisis de la infectividad de los RNAs sintéticos se llevó a cabo en cultivos de células HEK293T de la misma manera que para los transcritos que resultaron infectivos (figura 27). Ninguna de las transfecciones de RNA desencadenó efectos citopáticos en los cultivos tratados (P0) ni en los pases sucesivos sobre monocapas de células Vero. Tampoco se detectó RNA viral en los pases 1 y 2 de los distintos rescates.

Para intentar reproducir la variedad de genomas presente en el transcrito sintético infectivo descrito anteriormente (figura 24), se prepararon mezclas de RNAs procedentes de los 30 clones. La transfección de células HEK293T con 5 µg de RNA por pocillo no dio lugar a efectos citopáticos, ni en los cultivos transfectados ni en los pases 1 y 2 sobre células Vero. Tampoco se detectó RNA viral por RT-PCR en P1 ni en P2.

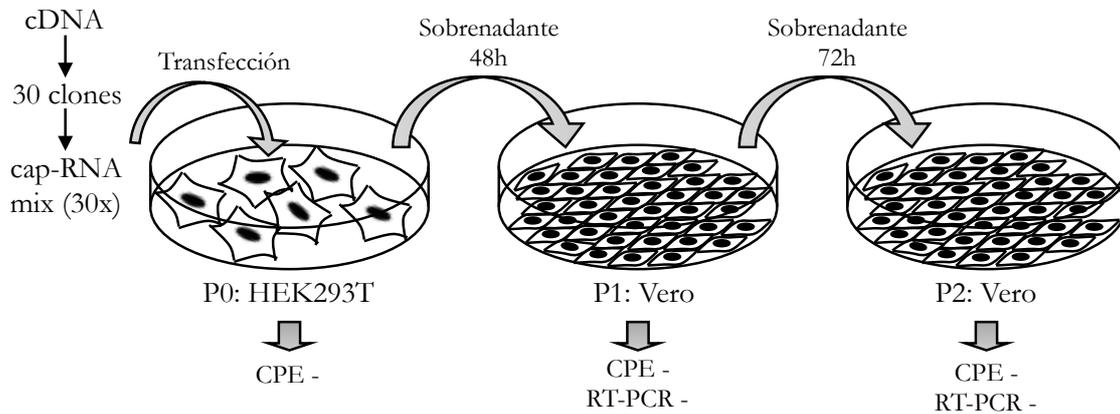


Figura 27. Esquema representativo del procedimiento utilizado para el análisis de la capacidad infectiva de los RNAs derivados de 30 clones de cDNA con el genoma completo de RaV. Los transcritos se analizaron de manera individual y en grupos de cuatro clones de cDNA. En paralelo, se llevó a cabo la transfección de una mezcla equimolar de RNAs procedentes de todos los clones.

Como alternativa para obtener una preparación de RNA con una heterogeneidad que representara a todos los clones derivados del cDNA que resultó infectivo, se llevó a cabo una transcripción *in vitro* en la que se utilizó como molde una mezcla equimolar de los 30 clones. El transcrito generado se analizó mediante transfección en células HEK293T, utilizando 10 µg por pocillo. Los cultivos transfectados se observaron durante 3 días, tomando muestras del sobrenadante cada 24 horas, sin mostrar evidencias de replicación viral. En esta ocasión, las muestras de sobrenadante no resultaron infectivas sobre los cultivos de P1 y P2. Adicionalmente, los análisis de RT-PCR no detectaron la presencia de RNA del RaV en los pases 1 y 2.

4.5.- Construcción de un vector de transcripción del genoma de RaV a partir de varios fragmentos de cDNA y análisis de su funcionalidad.

Otra estrategia para obtener un cDNA completo del RaV, alternativa a la RT-PCR de longitud genómica, consistió en la amplificación del genoma en cuatro fragmentos y su posterior ensamblaje en un vector de clonación.

La síntesis del cDNA se realizó a partir de RNA purificado de viriones utilizando como cebador el oligonucleótido RaV1 (tabla 5). El producto de la transcripción reversa se sometió a amplificación por PCR con cuatro parejas de oligonucleótidos específicos (figura 28, tabla 5) que dieron lugar a cuatro fragmentos, los cuales se insertaron en el vector pGEM[®]-T Easy (figura 28). Las construcciones generadas se denominaron pT-A2, pT-A16, pT-72 y pT-56; y contienen las secuencias del genoma de RaV comprendidas entre los residuos 1-1.842, 1.717-3.404, 3.287-5.748 y 5.343-8.310, respectivamente.

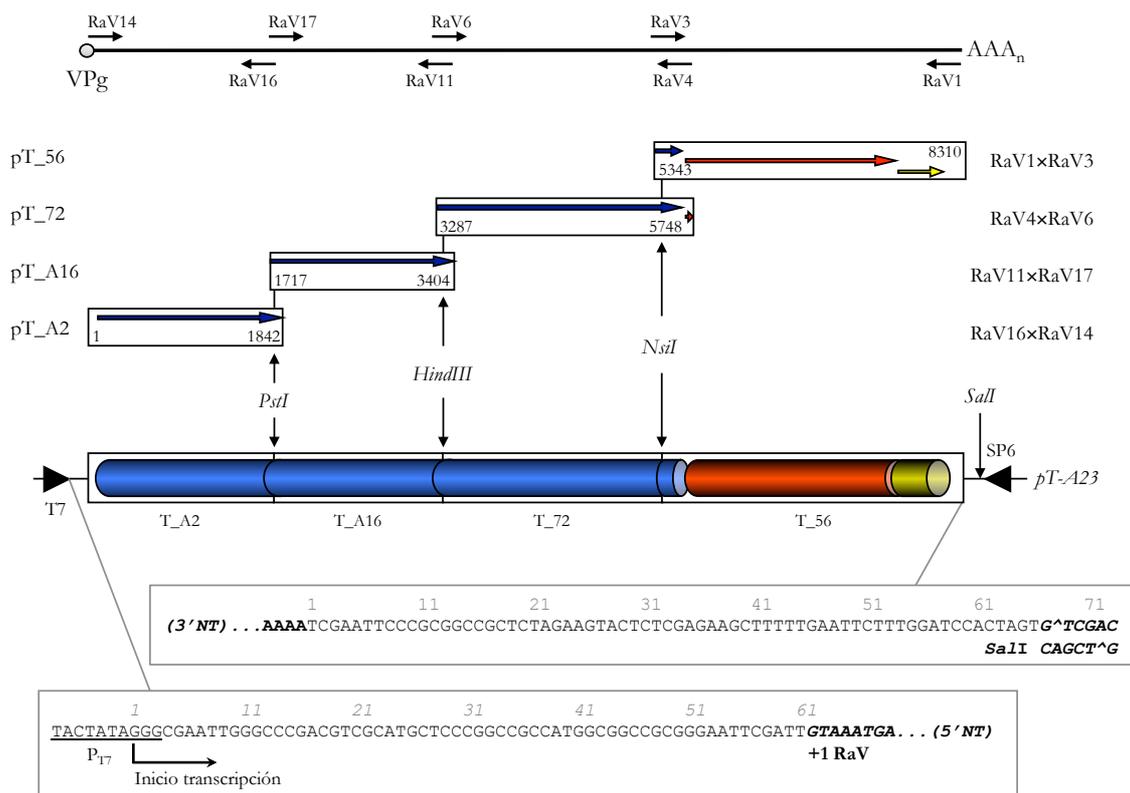


Figura 28. Esquema del genoma de RaV y los cebadores utilizados para su amplificación en cuatro fragmentos. Las flechas verticales indican la posición de las dianas de restricción utilizadas para la clonación direccional del cDNA completo del virus en el vector pT-A23 y para la obtención de un molde lineal (*SalI*). En color se representan las diferentes pautas de lectura del genoma de RaV: ORF1 (azul), ORF2 (rojo) y ORF3 (amarillo). En la parte inferior se detallan las secuencias no virales que flanquean al cDNA del RaV, señalando el inicio de transcripción mediado por la RNA polimerasa de T7 y la secuencia reconocida por *SalI* (^).

Resultados

Las regiones compartidas por dos fragmentos consecutivos contienen secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción únicas en el genoma que se emplearon para el ensamblaje direccional de los fragmentos de manera secuencial. La construcción final pT-A23 se secuenció en su totalidad, mostrando los 8.310 residuos que comprenden el cDNA del *vesivirus de conejo* (ver anexo). La secuencia completa del clon A23 se comparó con la del genoma clonado en el vector pT-RaVg, depositada en las bases de datos con el código AJ866991, revelando una homología del 99,7% con tan sólo 25 diferencias puntuales (tabla 8). Ocho de estas diferencias no producen cambios en la secuencia aminoacídica y una de ellas se encuentra en la región 3'-NT.

El vector pT-A23 es capaz de dirigir la síntesis de RNA derivado del cDNA de RaV gracias al promotor de T7 presente en el plásmido comercial. A diferencia de las construcciones ensayadas hasta el momento, la transcripción no comienza en el primer nucleótido del genoma viral, sino que presenta una región espaciadora de 61 nucleótidos correspondientes al sitio múltiple de clonación del vector pGEM[®]-T Easy (figura 28). Para obtener un molde lineal, se emplea una diana de restricción *SaI* única en el vector y que supone la adición de 71 nucleótidos en el extremo 3' del transcrito sintético (figura 28).

4.5.1.- Creación de una etiqueta diferencial en el genoma del clon A23.

Como quiera que las diferencias puntuales encontradas en los dos clones de cDNA insertados en los vectores de transcripción pT-RaVg y pT-A23 pueden ser debidas a la variabilidad genética de la población de *vesivirus de conejo*, se decidió crear una construcción derivada de pT-A23 que presente una etiqueta diferencial introducida por mutagénesis dirigida.

Con la misma estrategia que se utilizó en la construcción de pF-RaV/Xh (ver 4.3.1), se sustituyeron los nucleótidos 7.862 a 7.865, ambos incluidos, para modificar un sitio restricción *NheI* y convertirlo en la secuencia reconocida por *XhoI* (figura 5). Esta diana de restricción será única en el genoma de RaV y permitirá excluir la posibilidad de que el rescate de virus recombinantes sea el resultado de una contaminación con RaV presente en el laboratorio.

La mutagénesis dirigida se llevó a cabo sobre el vector pT-A23 de la misma manera que se ha descrito en 3.3.6. La secuencia del clon pT-A23/Xh se analizó por restricción y secuenciación de la región afectada, encontrando las mutaciones introducidas (no se muestran los datos).

RaVg	Posición	A23	Cambio aminoácido	Región
G	238	A	No (A73)	NS1/2
T	1211	G	S398A	
T	1230	C	V404A	
G	1456	A	No (V479)	NS3
T	2148	C	V710A	
C	2411	T	L798F	NS4
T	2725	C	No (I902)	
C	2801	T	R928W	
G	3190	A	No (A1057)	
T	3955	C	No (D1311)	NS6/7
G	4024	A	No (V1335)	
T	4232	G	C1405G	
T	4851	C	I1611T	
A	5400	G	K1794R	
G	5807	A	G47D	LC
A	6092	G	D142G	
G	6158	A	G164E	VP1
G	6518	A	R284H	
A	7111	G	K482E	
A	7263	T	E532D	
C	7363	T	L566F	
A	7412	T	K582I	
T	7587	C	No (P640)	
T	7991	C	No (R70)	
T	8145	C	-	3'-NT

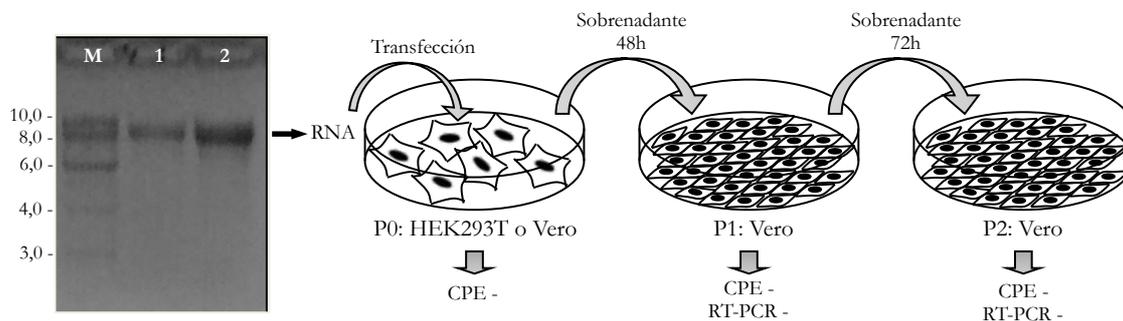
Tabla 8. Diferencias encontradas en la secuencia del clon A23 de RaV (anexo), ensamblado a partir de 4 fragmentos de cDNA, con respecto a la secuencia del clon RaVg depositada en las bases de datos (AJ866991) y que se obtuvo mediante RT-PCR de longitud genómica.

4.5.2.- Análisis de la infectividad de los transcritos derivados del clon A23.

Inicialmente, las construcciones derivadas del clon A23 se ensayaron en experimentos de rescate de partículas virales utilizando transcritos sintéticos. Los RNAs, obtenidos mediante transcripción *in vitro* (en presencia del análogo ARCA) de los plásmidos pT-A23 y pT-A23/Xh, presentaron el tamaño esperado de aproximadamente 8.300 nucleótidos (figura 29). Para analizar su capacidad infectiva se transfectaron, tanto en células Vero como en HEK293T, distintas cantidades (entre 0,5 y 10 µg) de los transcritos sintéticos utilizando los reactivos de transfección comerciales *Lipofectamine*[™] 2000 y *TransMessenger*[™] (3.5.1). Ninguna de las líneas celulares ensayadas mostró efectos citopáticos en los cultivos transfectados ni en los pases sucesivos del sobrenadante sobre nuevas

Resultados

monocapas de células Vero. Tampoco se detectó RNA en los intentos de amplificación por RT-PCR específica de RaV en los pases 1 y 2 de los experimentos de rescate (figura 29).



4.6.- Rescate del vesivirus de conejo con el virus auxiliar rFPV/T7.

La baja eficiencia de transfección de RNA sintético en cultivos celulares sugirieron la búsqueda de alternativas para rescatar el RaV a partir de un cDNA de longitud genómica. Existen varios sistemas de genética reversa que utilizan virus auxiliares que expresan la RNA polimerasa del fago T7 en el citoplasma celular (Casais *et al.*, 2001; Thumfart y Meyers, 2002; Chaudhry *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2012). La transfección del cDNA molde en células previamente infectadas con estos virus recombinantes permite la transcripción del RNA en el interior de la célula. En el caso de las construcciones que contienen el cDNA completo de RaV, su transcripción intracelular podría resultar en la recuperación de virus infecciosos.

Los experimentos de rescate con virus auxiliares se llevaron a cabo con un poxvirus de aves recombinante que expresa la RNA polimerasa de T7 (rFPV/T7), cedido por el Dr. Paul Britton del *Institute for Animal Health* (Compton, Reino Unido).

4.6.1.- Análisis de la funcionalidad del virus auxiliar rFPV/T7.

Para demostrar la funcionalidad de la RNA polimerasa expresada por el virus auxiliar, se realizó la transfección del vector pT7-GFP en cultivos de células Vero infectadas con rFPV/T7. Los cultivos infectados con el poxvirus presentaron un efecto citopático que se caracteriza por modificar la morfología de las células, las cuales se estiran en forma de huso y terminan por despegarse de la superficie en la que estaban adheridas (figura 30C). La fluorescencia verde sólo fue observada en las células transfectadas con la construcción

reportera pT7-GFP y que previamente habían sido infectadas con el virus rFPV/T7 (figura 30D), indicando que el virus auxiliar expresa la RNA polimerasa de T7 y ésta es funcional en los cultivos de células Vero.

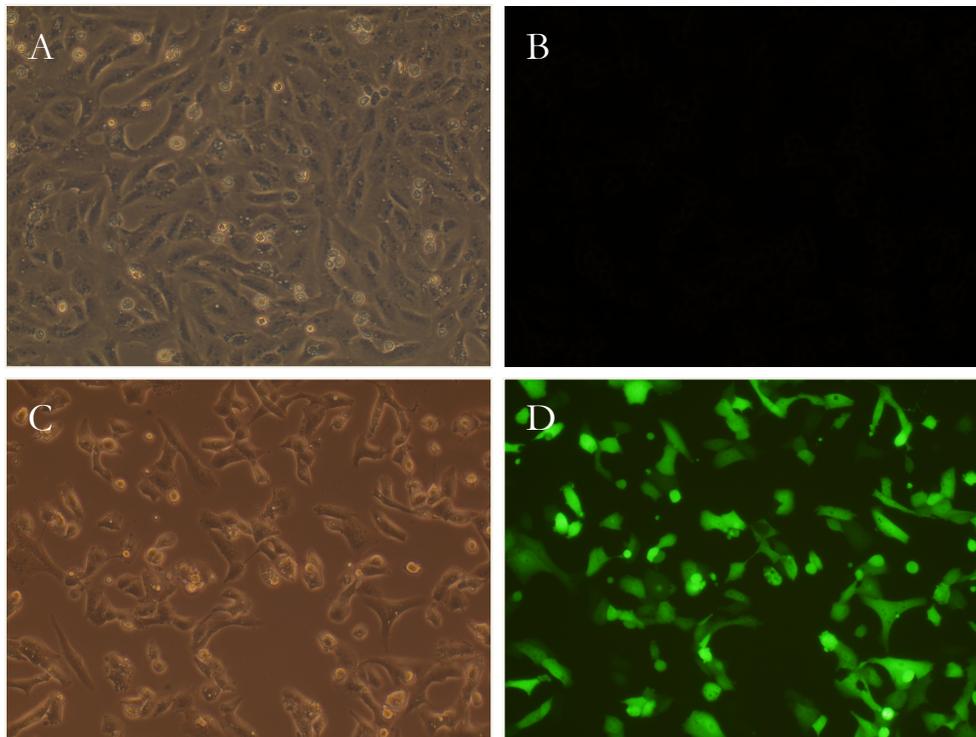


Figura 30. Micrografías a 100 aumentos en contraste de fases (A y C) o de fluorescencia (B y D) de cultivos de células Vero 24 horas después de ser transfectadas con el vector pT7-GFP en ausencia (A y B) o presencia (C y D) del virus rFPV/T7.

4.6.2.- Análisis de las construcciones pF-RaVg y derivadas.

Inicialmente se ensayaron las construcciones derivadas del clon RaVg: pF-RaVg, pF-RaV/Xh y pF-RaVR, que bajo el control de la RNA polimerasa de T7 dirigen la síntesis de transcritos de longitud genómica con un 5'-NT idéntico al RNA viral. Los cultivos de células Vero fueron infectados con el rFPV/T7 a una multiplicidad de infección de 10. Pasada una hora se llevó a cabo la transfección transitoria de 10 µg de las construcciones plasmídicas indicadas más arriba en presencia o ausencia de 1 µg de pTriEx-VP60, un vector de expresión que codifica la proteína mayoritaria de la cápsida de RaV bajo el control de los promotores de T7 y de citomegalovirus. Este vector complementador se utiliza para aportar la VP1 en *trans* y comprobar su posible rol en el mecanismo de replicación del RNA viral.

Resultados

Los cultivos infectados con el virus auxiliar y transfectados con las distintas construcciones (P0) se incubaron durante 72 horas, observando la progresión de un claro efecto citopático que podría corresponder tanto al rFPV/T7 como a los posibles *vesivirus de conejo* rescatados. Para comprobar el rescate de RaV recombinantes a partir del cDNA se analizó la presencia de viriones en el sobrenadante de los cultivos transfectados. Para ello, se filtró el medio de cultivo del P0 a través de una membrana de 0,22 μm que retiene las partículas de rFPV/T7 (Evans *et al.*, 2000) y se infectaron nuevas monocapas de células Vero (figura 31).

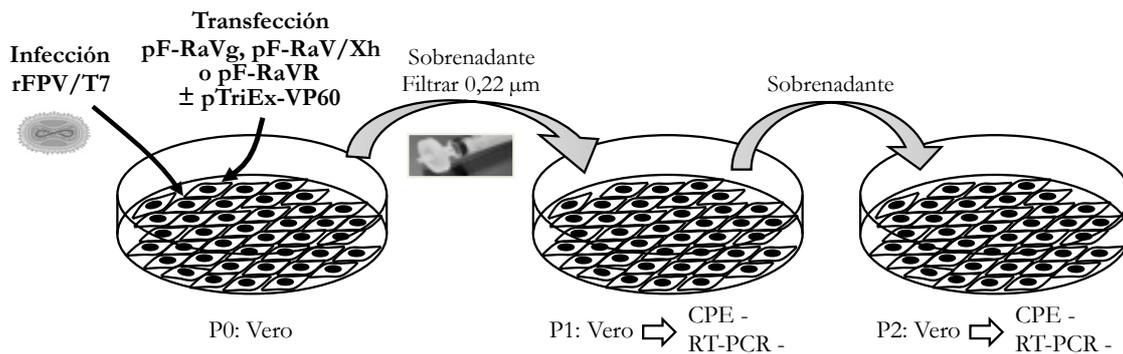


Figura 31. Esquema experimental del rescate de las construcciones pF-RaVg, pF-RaV/Xh y pF-RaVR, en presencia o ausencia del vector pTriEx-VP60.

A pesar de no observar efectos citopáticos en los cultivos de P1 y P2, se analizó la presencia de RNA viral mediante RT-PCR (ver 3.3.8) en extractos de ambos pases 1 y 2 de los cultivos transfectados con las construcciones ensayadas (pF-RaVg, pF-RaV/Xh y pF-RaVR). En ninguna de las reacciones de amplificación se detectó el producto esperado (no se muestran los datos).

4.6.3.- Análisis de la construcción pF-RaVR/GFP.

La fluorescencia detectada en los cultivos transfectados con el plásmido pT7-GFP indica que el virus rFPV/T7 expresa la RNA polimerasa de T7 y que ésta es capaz de transcribir el gen de la GFP, que se traduce eficazmente en el citoplasma celular. Con la intención de estudiar la replicación de los RNAs derivados de las construcciones que expresan el genoma de RaV, se realizaron experimentos de rescate con el vector pF-RaVR/GFP (ver 4.3.3). Este plásmido contiene una versión del cDNA del RaV en la que se substituyó parte de la región 3' del genoma por el gen marcador GFP, fusionado a la secuencia que codifica el inicio de la VP1. De esta manera, el transcrito derivado contiene teóricamente la información necesaria para replicarse; pero no para completar el ciclo viral,

ya que carece de la información para sintetizar las proteínas estructurales. La emisión de fluorescencia en cultivos que expresan este RNA demostraría la replicación del mismo y la generación de RNAsg. Sin embargo, en los experimentos de rescate utilizando el virus auxiliar rFPV/T7 no se observó la fluorescencia esperada que indicaría la producción de la proteína de fusión VP1-GFP.

Con el objeto de estudiar la influencia de la proteína estructural VP1 en la replicación de RNA se facilitó esta proteína en *trans* mediante la co-transfección del vector pTriEx-VP60. En los cultivos co-transfectados con este vector complementador tampoco se observó la aparición de fluorescencia (no se muestran los datos).

4.6.4.- Análisis funcional de las construcciones derivadas del clon A23.

En este caso, los experimentos de rescate se desarrollaron en cultivos de células Vero infectadas con rFPV/T7 que, tras una hora de adsorción, fueron transfectadas con 10 µg por pocillo del plásmido pT-A23 o su variante pT-A23/Xh en presencia o ausencia de 1 µg del vector pTriEx-VP60 que expresa el gen de la proteína estructural VP1 (figura 32).

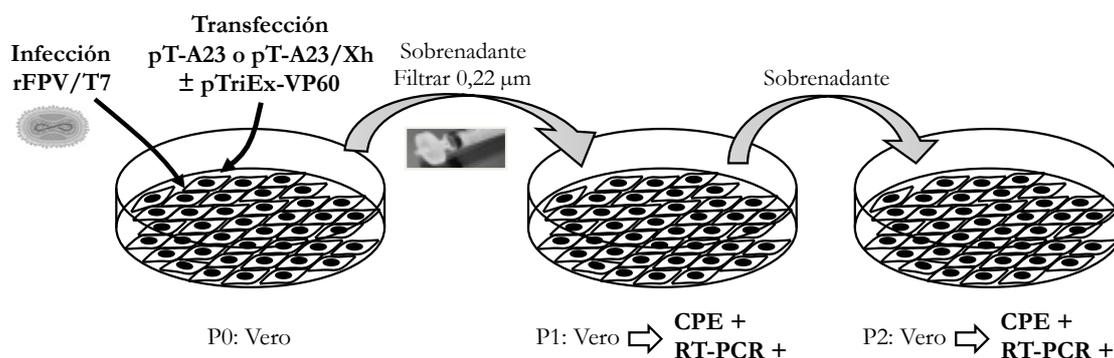


Figura 32. Esquema representativo del experimento de rescate de RaV a partir de los vectores de transcripción pT-A23 y pT-A23/Xh.

Las células transfectadas (P0) se incubaron durante 72 horas, observando un claro efecto citopático que podría corresponder tanto al rFPV/T7 como a los posibles RaV recombinantes rescatados (figura 33). A diferencia de los experimentos de rescate previos, algunos de los cultivos presentaban un efecto citopático más acusado y de aparición temprana (sobre 48 hpt).

Resultados

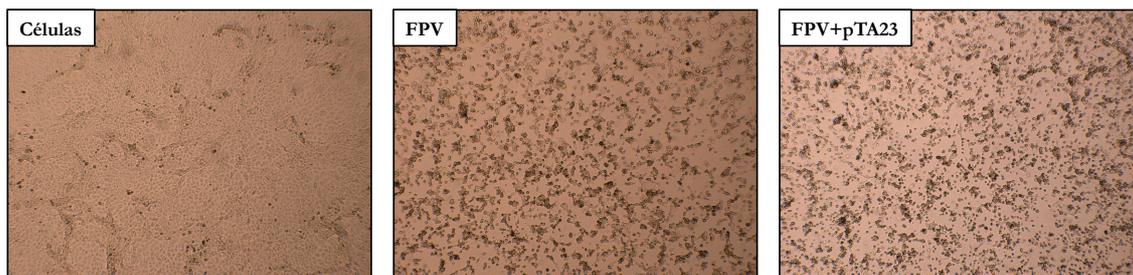


Figura 33. Micrografías en contraste de fases a 40 aumentos tomadas a las 72 hpt de los cultivos de células Vero en el pase 0 del experimento de rescate de RaV a partir de la construcción pT-A23. Cultivos no infectados con rFPV/T7 (Células); control infectado pero no transfectado (FPV); cultivos infectados con rFPV/T7 y transfectados con la construcción pT-A23 (FPV+pTA23).

El sobrenadante, filtrado a través de una membrana de $0,22\ \mu\text{m}$, se utilizó para infectar nuevas monocapas de células Vero (P1). En esta ocasión, a las 24 horas se pudo observar la aparición de focos de infección en los cultivos inoculados con medio procedente de varios de los cultivos transfectados con el vector pT-A23 o pT-A23/Xh. Los focos de infección aumentaron hasta afectar a la monocapa completa (figura 34). El efecto citopático se reprodujo en los pases sucesivos del sobrenadante sobre cultivos de células Vero. El pase 5 se realizó sobre cultivos sembrados en frascos de $25\ \text{cm}^2$ con el objeto de producir una cantidad de viriones suficiente para abordar los estudios de caracterización del virus rescatado. A las 24 horas post-infección, se recogió el medio de cultivo y, tras una breve centrifugación, se congeló el sobrenadante en alícuotas.

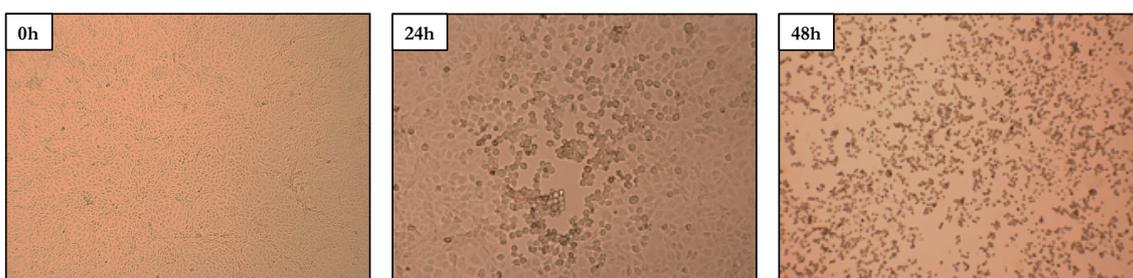


Figura 34. Micrografías en contraste de fases a 40 aumentos de los cultivos P1 de células Vero tomadas a las 0, 24 y 48 horas de ser inoculados con el sobrenadante del P0 de los experimentos de rescate de RaV con el rFPV/T7 a partir de la construcción pT-A23/Xh.

El rescate de RaV recombinantes se logró en cuatro experimentos diferentes en los que se transfectaron, independientemente y por triplicado, los vectores pT-A23 o pT-A23/Xh en presencia o ausencia de pTriEx-VP60. Si bien los primeros rescates mostraban la necesidad de complementar *in trans* la proteína estructural VP1, también fue posible rescatar RaV recombinantes en ausencia del vector pTriEx-VP60.

Para demostrar que el efecto citopático es provocado por RaV recombinantes se llevó a cabo la detección de RNA viral mediante RT-PCR (3.3.8) a partir del sobrenadante de cultivo del pase 5. Los oligonucleótidos RaV2 y RaV22 (tabla 5; 3.3.8) permitieron la amplificación del producto esperado de 1.220 pb. La digestión de los productos de RT-PCR con el enzima de restricción *XhoI* reveló la presencia de la mutación en el genoma de los virus rescatados y que fue introducida en el cDNA clonado en el vector pT-A23/Xh (figura 35). La posterior secuenciación de los fragmentos amplificados confirmó la presencia de los cambios introducidos por mutagénesis dirigida. Los virus rescatados a partir de los vectores pT-A23 y pT-A23/Xh se denominaron *RaV/A23* y *RaV/Xh* respectivamente.

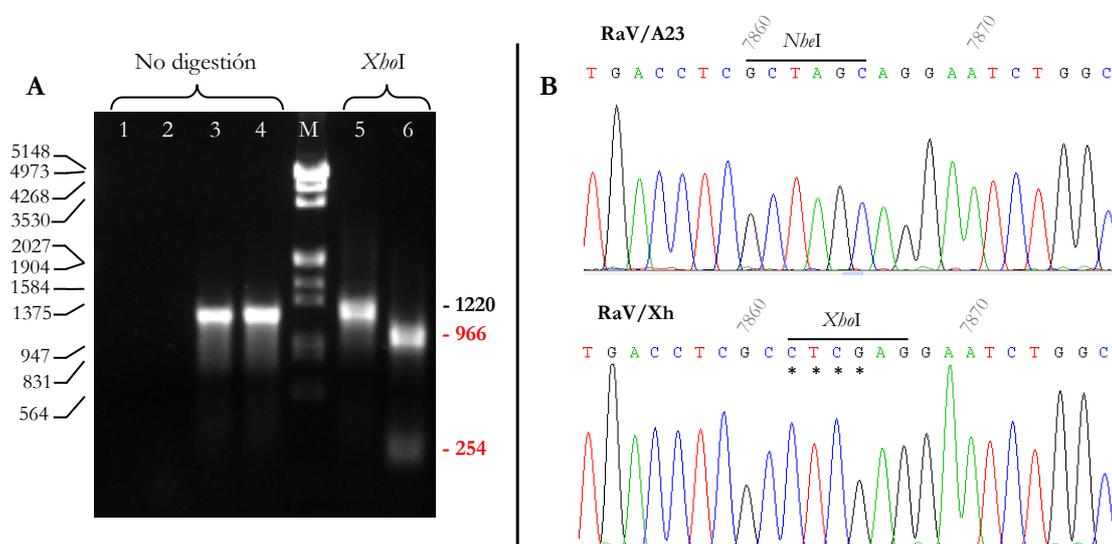


Figura 35. Detección de RNA viral en sobrenadante de cultivo del pase 5 de experimentos de rescate de RaV. (A) Electroforesis de los productos amplificados por RT-PCR para la detección de RNA viral de RaV a partir del sobrenadante de los cultivos infectados con los virus rescatados *RaV/A23* (3 y 5) y *RaV/Xh* (4 y 6). El DNA amplificado se sometió a digestión con el enzima de restricción *XhoI* (5 y 6), revelando la presencia de la mutación introducida en el clon pT-A23/Xh. Como controles se incorporaron una reacción sin molde (1) y el RNA extraído del sobrenadante del P5 correspondiente al cultivo infectado con rFPV/T7 pero no sometido a transfección (2). En rojo se señala el tamaño esperado de los productos de la digestión enzimática. (B) Fragmento del electroferograma de la secuencia de los productos amplificados por RT-PCR de los cultivos infectados con *RaV/A23* (arriba) y *RaV/Xh* (abajo). Los asteriscos señalan los nucleótidos responsables de la etiqueta molecular introducida por mutagénesis dirigida (ver 4.5.1).

Posteriormente, se llevó a cabo la inmunodetección de proteínas virales en cultivos infectados con los virus rescatados utilizando anticuerpos específicos para la proteína estructural mayoritaria (3.4.4). La proteína VP1 se detectó en el citoplasma de las células infectadas con el sobrenadante del P5 de los virus rescatados *RaV/A23* y *RaV/Xh* (figura 36), mientras que las muestras de células Vero no infectadas no mostraron fluorescencia.

Resultados

Como control, y para comprobar la idéntica distribución de la VP1 en la célula infectada, se utilizó un cultivo de Vero infectado con el RaV parental (RaV/WT).

Para investigar la presencia de otras proteínas de origen viral se prepararon extractos de células Vero infectadas con los virus rescatados y se sometieron a un análisis *Western Blot* con distintos antisueros policlonales de conejo que reconocen las proteínas NS3 (2C-Hel) y NS5 (3B-VPg) del *vesivirus de conejo*. La inmunodetección con el suero anti-2C identificó un polipéptido con el tamaño esperado para el producto maduro de 39 kDa (figura 37), mientras que el suero anti-VPg reveló la presencia de varios productos del procesamiento de la poliproteína codificada en la ORF1: el precursor de la proteína genómica de 45 kDa (p45) y otro precursor mayor de unos 71 kDa (p71) que no se detecta en las células infectadas con RaV/A23 (figura 37).

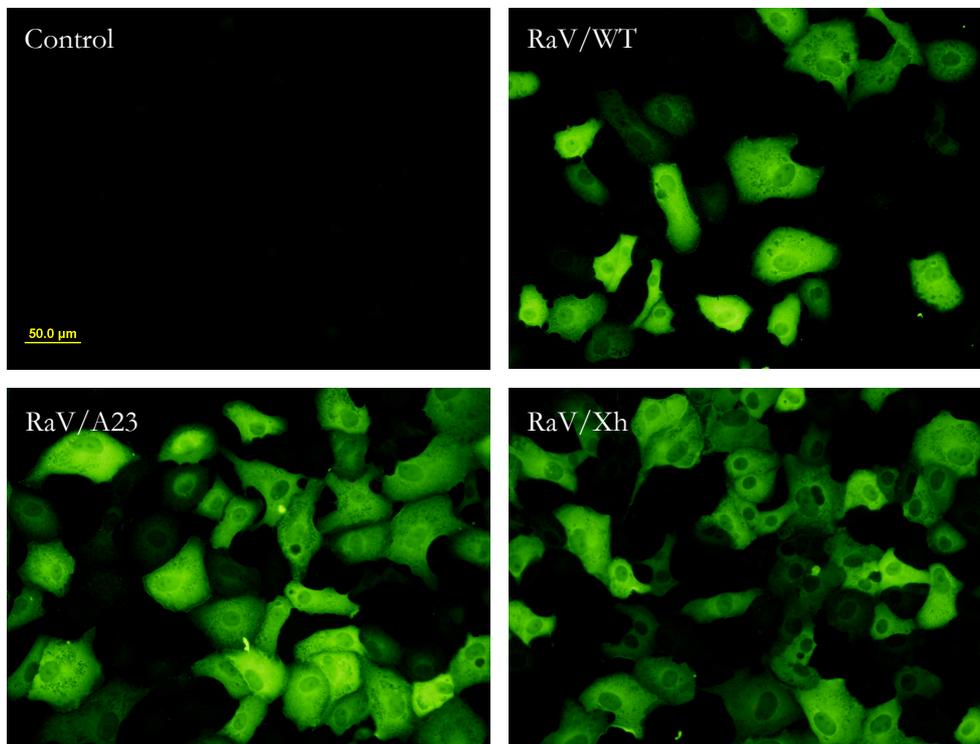


Figura 36. Detección de la proteína estructural VP1 del RaV mediante inmunofluorescencia indirecta en cultivos de células Vero no infectadas (Control) o a las 6 horas post-infección con el RaV parental (RaV/WT), el RaV/A23 o el mutante RaV/Xh.

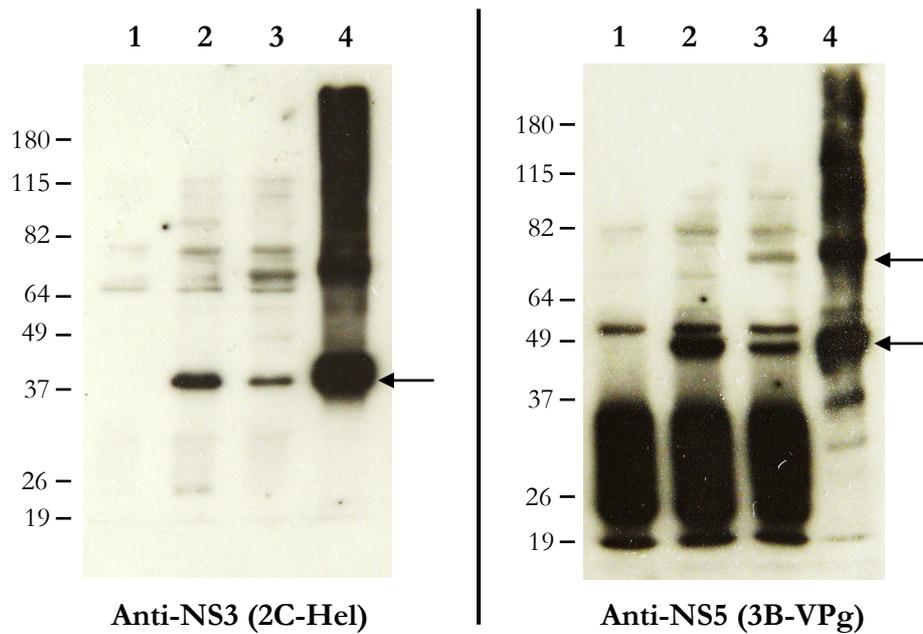


Figura 37. Inmunodetección de las proteínas virales NS3 (2C-Hel) y NS5 (3B-VPg) en extractos de células Vero no infectadas (1) e infectadas con el virus parental (2) o los virus rescatados RaV/A23 (3) y RaV/Xh (4). Las flechas indican el tamaño esperado de los productos maduros o los precursores reconocidos por los sueros policlonales utilizados.

4.6.5.- Caracterización de los virus rescatados.

En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo en placa que permitió titular las preparaciones obtenidas en el P5 de los virus rescatados. Para ello, se infectaron monocapas de células Vero con diluciones seriadas y se recubrieron con medio semisólido. A las 36 horas post-infección se fijaron las células con formalina y se realizó una tinción con cristal violeta para observar los focos de infección y hacer recuento de placas. Las preparaciones de RaV/A23 y RaV/Xh presentaron respectivamente unos títulos virales de $1,5$ y 4×10^6 unidades formadoras de placa (ufp).

Paralelamente, se realizó un ensayo en placa con el virus RaV parental (RaV/WT) para comparar la morfología de las placas. A pesar de la heterogeneidad en el tamaño de los focos de infección, se observó que el RaV/WT da lugar a placas de mayor tamaño que las generadas por los virus rescatados RaV/A23 y RaV/Xh (figura 38).

Resultados

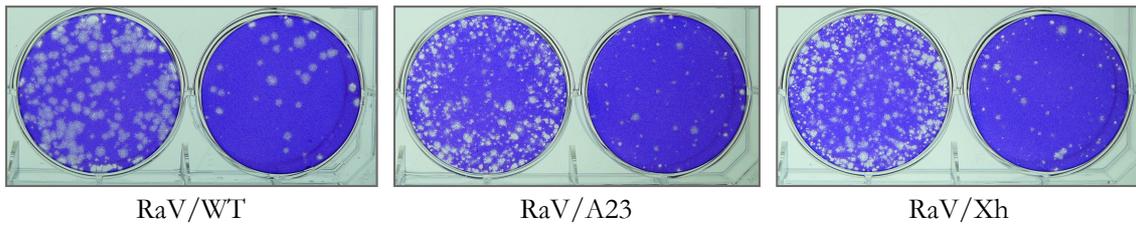


Figura 38. Ensayo en placa con tinción cristal violeta que refleja las monocapas de células Vero infectadas con el *vesivirus de conejo* parental (RaV/WT) y con los virus rescatados RaV/A23 y RaV/Xh.

Como consecuencia de las diferencias observadas en el diámetro de las placas se llevó a cabo una valoración de la capacidad de multiplicación de los virus recombinantes comparándola con la del RaV parental. Para ello, se realizaron dos rondas de aislamiento de placas (P6 y P7) con las tres variantes del RaV. El aislamiento se llevó a cabo mediante ensayos en placa a los que se les adicionó el colorante rojo neutro para visualizar los focos virales. A las 36 horas, se seleccionaron placas aisladas de cada virus, se aspiraron junto con la capa de agarosa que las recubre y se resuspendieron en 500 μ L de medio de cultivo sin suero. De esta manera, la preparación de virus obtenida tendrá una menor heterogeneidad puesto que cada muestra procede de una placa originada por una única partícula viral. Las suspensiones virales procedentes de 6 placas individuales fueron tituladas por separado mediante ensayo en placa (figura 39). Las placas de los virus rescatados dieron lugar a títulos similares, pero un orden de magnitud inferior a la producción del RaV parental.

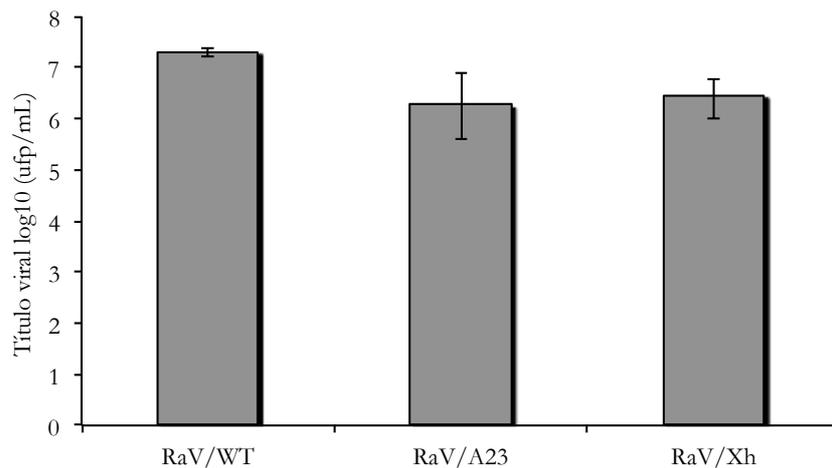


Figura 39. Cuantificación de las partículas virales infectivas recuperadas de placas aisladas de RaV parental (RaV/WT) y de los virus rescatados RaV/A23 y RaV/Xh. Se titularon 6 placas de lisis por cada virus mediante ensayo en placa. Los valores indican el logaritmo en base 10 de las unidades formadoras de placa por mL de muestra (cada placa fue resuspendida en 0,5 mL).

Tras las dos rondas de aislamiento de placas, se generó una preparación de virus que ha permitido la purificación de viriones (correspondiente al pase 8). Para ello, se infectaron con cada variante de virus dos frascos de 150 cm² sembrados con células Vero a una multiplicidad de infección de 0,01. En concordancia con los estudios realizados a partir de placas individuales (figura 39), los títulos de las preparaciones de RaV/A23 y RaV/Xh resultaron similares, del orden de 10⁸ ufp/mL; un orden de magnitud por debajo del virus parental RaV/WT, que alcanzó valores de 10⁹ partículas infecciosas por mililitro.

Con objeto de estudiar la cinética de multiplicación de los virus rescatados se realizaron curvas de replicación en un solo paso con las preparaciones generadas en el P8. Con este fin, se infectaron monocapas confluentes de células Vero a una multiplicidad de infección de 1 y se cuantificó la producción viral de los cultivos a distintos tiempos post-infección (3.5.6). Los resultados obtenidos muestran una gran similitud entre los virus rescatados RaV/A23 y RaV/Xh, que siguen una evolución paralela con una fase de latencia de 4 horas en las que teóricamente, el virus entra en la célula y libera el RNAg para que comience la traducción de proteínas virales y la multiplicación de los genomas. Es a partir de la cuarta hora cuando aparecen viriones de nueva generación, ya ensamblados y con poder infectivo. Esta fase de proliferación se demora otras cuatro horas y alcanza un pico de producción viral a las 8 horas post-infección. Pasadas estas 8 horas, el título no aumenta significativamente (figura 40).

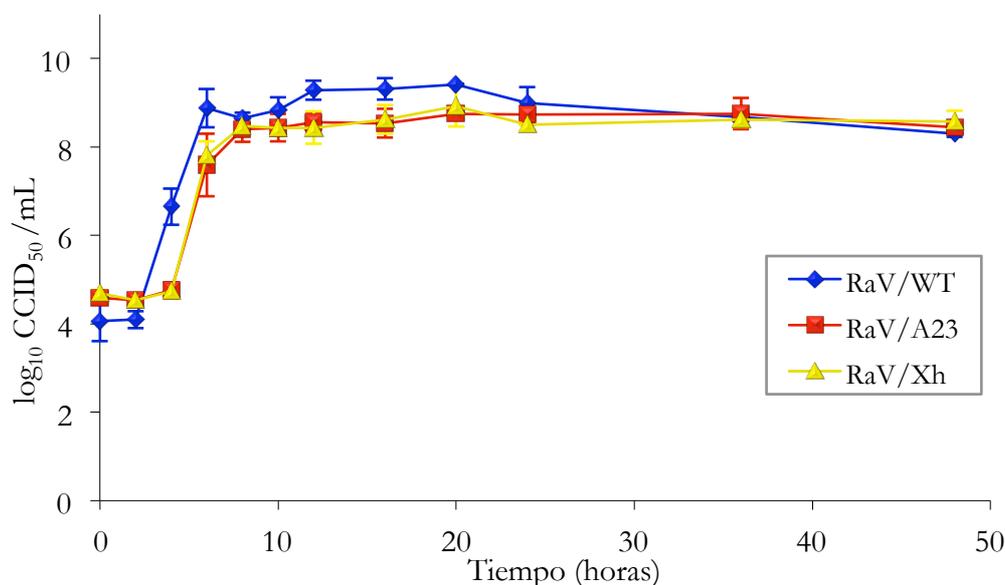


Figura 40. Curvas de crecimiento del RaV parental (RaV/WT) y de los virus recombinantes rescatados RaV/A23 y RaV/Xh. Los cultivos de células Vero infectados con 1 moi de RaV se congelaron a distintos tiempos post-infección (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36 y 48 horas). El título viral se calculó por el método de Reed y Muench (1938), indicado en las unidades log₁₀CCID₅₀ por mL.

Resultados

Al comparar la cinética de multiplicación de los virus rescatados con el RaV/WT, adaptado al crecimiento en células Vero, se observan diferencias considerables. La fase de latencia comprende tan sólo 2 horas para el RaV/WT, lo que provoca un adelanto de la fase exponencial que finaliza en un máximo de producción a las 6 horas post-infección. Los títulos de los virus recombinantes se mantienen por debajo del virus parental durante la fase estacionaria, aunque terminan equiparándose a partir de las 24 horas post-infección.

Para la caracterización estructural de los virus rescatados y el estudio de su genoma, se utilizó un método de purificación de viriones de calicivirus desarrollado en el laboratorio (3.5.5). En resumen, el procedimiento comprende la rotura de las células infectadas por congelación y descongelación, una centrifugación a baja velocidad para eliminar los restos celulares y la ultracentrifugación del medio de cultivo para sedimentar los viriones. Para aumentar la pureza de la preparación se realizó una extracción con freón del precipitado y una nueva ultracentrifugación sobre un colchón de sacarosa al 30% que sedimenta las partículas virales.

Los viriones se purificaron a partir de las preparaciones obtenidas en el Pase 8 de los virus rescatados y del RaV parental. En la figura 41A se observa el patrón proteico de las preparaciones, con la presencia de una única banda de aproximadamente 60 kDa, correspondiente a la proteína estructural mayoritaria de la cápsida viral (VP1). El análisis *Western-Blot* de estas preparaciones corrobora la identidad de la proteína VP1 (figura 41B) observada por SDS-PAGE (figura 41A).

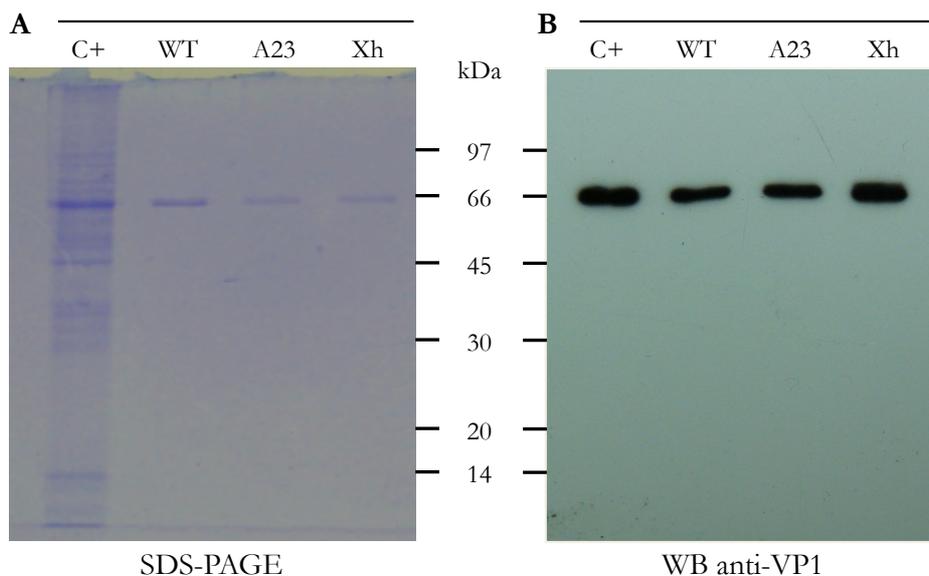


Figura 41. Análisis del patrón proteico de los viriones del RaV mediante SDS-PAGE y tinción con azul Comassie (A) e inmunodetección de la proteína estructural VP1 mediante Western Blot (B). C+, extracto de células Vero infectadas; WT, virus RaV parental purificado; A23, viriones del recombinante RaV/A23; Xh, viriones purificados del RaV/Xh rescatado.

4.6.5.a.- Caracterización de las secuencias genómicas de los virus rescatados.

En primer lugar se determinó la secuencia de nucleótidos del genoma de los virus rescatados para analizar su similitud con la secuencia del clon A23 del que proceden. Utilizando como molde el RNA purificado de los viriones obtenidos del P8 se amplificaron mediante RT-PCR tres fragmentos de cDNA que comprenden el genoma completo (ver 3.3.9). Los amplicones, de aproximadamente 3 kpb cada uno, se insertaron en vectores de clonación que fueron utilizados para determinar la secuencia completa de RaV/A23 y RaV/Xh. La comparación de estas secuencias con la original del clon A23 (tabla 9) reveló la presencia de 3 cambios nucleotídicos que afectan a ambos virus rescatados, 11 mutaciones exclusivas de RaV/A23 y 16 propias del RaV/Xh (además de la etiqueta diferencial). Aunque las mutaciones se distribuyen prácticamente por toda la longitud del genoma, cabe destacar que una parte importante se concentra en una sección de aproximadamente 500 nucleótidos situada en la región que codifica la proteína estructural VP1 (tabla 9).

Las mutaciones detectadas en los virus recombinantes pueden haberse generado durante el proceso de rescate o en los ciclos de multiplicación posteriores. Para confirmar la estabilidad del sistema de rescate se determinó la secuencia del virus RaV/A23 en un pase previo (P3), encontrando tan sólo 3 diferencias puntuales con el cDNA incluido en el vector pT-A23. Dos de ellas se mantienen en la secuencia obtenida del virus en pase 8 (posiciones 7.363 y 7.412) y la tercera, G-A en la posición 7.731, no produce cambio en la secuencia de aminoácidos.

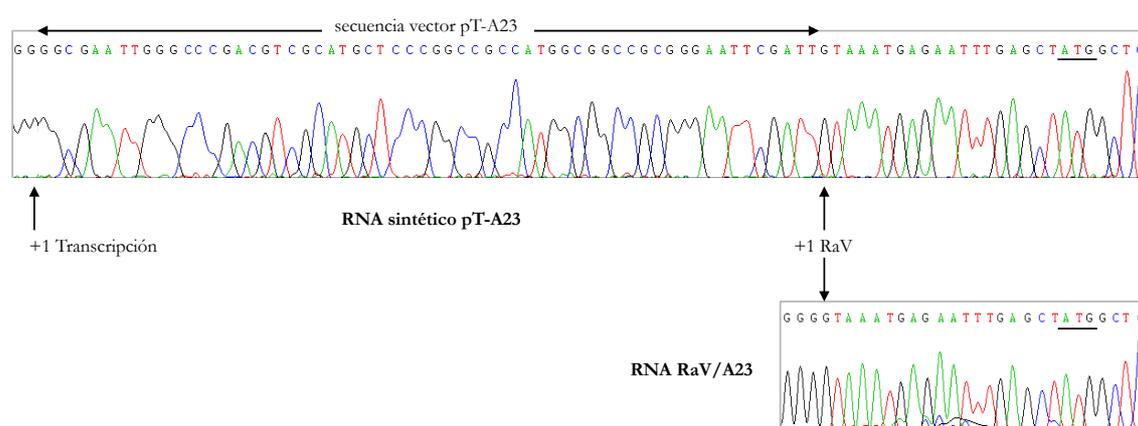


Figura 42. Fragmento de los electroferogramas de la determinación de las secuencias del extremo 5' obtenidas mediante RACE del transcrito sintético derivado del vector pT-A23 y del virus RaV/A23 rescatado a partir de este vector. Se subraya el codón de inicio de la traducción y se señalan con flechas el primer nucleótido del transcrito sintético (+1 Transcripción), la secuencia espaciadora derivada del vector (ver figura 28) y el primer nucleótido del genoma de RaV (+1 RaV).

Posición	Clon A23	RaV/A23		RaV/Xh	Cambio aminoácido	Región
		P3	P8			
547	C		T		-	NS1/2
2.341	T			C	-	NS3
2.691	C			T	T891I	NS4
2.933	G			T	D972Y	
2.935	T		C		-	
3.530	A			G	N1171D	NS5
3.762	G		T		R1248M	NS6/7
3.771	G			A	S1251N	
3.887	T			C	Y1290H	
3.928	T			C	-	
4.811	G		A		D1598N	
4.866	A			G	D1616G	
4.890	A		G		K1624R	
5.042	T			A	S1675T	
5.379	A		G		N1767S	
5.698	G			A	D11N	
5.701	G			C	D12H	
6.092	G			A	G142D	
7.036	A			G	I457V	VP1
7.111	G		A	A	E482K	
7.214	T			C	V516A	
7.246	T		C		S526P	
7.263	T		A		D532E	
7.285	A			G	N540D	
7.363	T	C	C	C	F566L	
7.411	A		G		I582E	
7.412	T	A	A	A	I582K	
7.587	C		T		-	
7.731	G	A			-	
8.121	T		C		-	3'-NT'
8.145	C			T	-	

Tabla 9. Análisis comparativo de las secuencias del clon parental A23 y las de los virus RaV/A23 y RaV/Xh rescatados en distintos países (P3 o P8). Se indican los cambios en la secuencia de aminoácidos y la región del genoma afectada.

Por último, se investigó mediante RACE la secuencia 5' de los virus rescatados y se comparó con la del RNA obtenido por transcripción *in vitro* del vector pT-A23. El transcrito sintético presenta un 5'-NT' de 80 nucleótidos, mientras que los virus rescatados contienen los mismos 19 nucleótidos que el virus parental (figura 42). Esto indica que la

extensión de 61 nucleótidos de la región 5' se elimina durante el proceso de rescate del virus o en los ciclos de replicación subsiguientes.

Los trabajos posteriores realizados sobre el clon A23, que no se han incluido en esta tesis, indican que es necesario optimizar el procedimiento de rescate de RaV recombinantes para constituir un sistema de genética reversa eficaz que permita explotar la posibilidades que ofrece un clon de cDNA infeccioso para el estudio de la biología molecular de los calicivirus.

5. Discusión

Desde la descripción de los primeros clones de cDNA infeccioso, la genética reversa ha probado ser una valiosa herramienta para el estudio de muchos virus RNA. Esta metodología ofrece una capacidad sin precedentes para generar mutaciones a la carta en el genoma de un virus y examinar los efectos sobre su replicación o patogénesis.

Disponer de un calicivirus capaz de multiplicarse en cultivos de células animales facilita en gran medida la aplicación de estrategias de genética reversa, ya que la mayor parte de los integrantes de esta familia no pueden ser propagados en el laboratorio sin la necesidad de infectar a sus hospedadores naturales.

El estudio presentado en esta memoria se ha dirigido a la obtención de un clon infeccioso para el RaV, un vesivirus cultivable de conejo caracterizado en nuestro laboratorio (Martín-Alonso *et al.*, 2005), que pueda ser utilizado como modelo en el estudio de la replicación de los calicivirus. Con este fin, se desarrollaron distintas estrategias para la clonación y posterior expresión de su cDNA que serán discutidos a continuación.

5.1.- Estudios previos sobre la transfección y la traducción de RNA sintético en cultivos celulares.

La aproximación utilizada por la mayoría de sistemas de genética reversa de calicivirus descritos hasta la fecha consiste en la transfección de RNA sintético en cultivos de células animales (tabla 3). Es por esto que nuestro planteamiento inicial para establecer un sistema de genética reversa para el *vesivirus de conejo* ha contemplado la transfección de transcritos sintéticos que emulen al genoma del RaV en alguna de las líneas celulares que permiten su replicación. En el presente estudio se han empleado Vero, HEK293T y CRFK.

Antes de abordar este objetivo, se consideró oportuno realizar un estudio previo para determinar cuál de estas líneas es más susceptible a la incorporación de RNA sintético y optimizar en la medida de lo posible los métodos de transfección. Para ello, se utilizaron transcritos modelo de luciferasa, de aproximadamente 1,7 kb, que evitan la complejidad de trabajar con RNA de longitud genómica (mayor de 8,3 kb) a la vez que permiten realizar

Discusión

una estimación cuantitativa de la eficiencia de transfección mediante un simple ensayo enzimático.

En la búsqueda de la línea celular más susceptible a la transfección se ensayaron cantidades crecientes del RNA de luciferasa con el reactivo *Lipofectamine*[™] 2000, el cual ha sido utilizado con éxito en varios sistemas de genética reversa de calicivirus (Chang *et al.*, 2005 y 2006; Yunus *et al.*, 2010). Los bajos niveles de actividad enzimática detectados en los extractos celulares (figura 7) sugieren que estas líneas en cultivo podrían tener una capacidad limitada para la transfección de ácidos nucleicos. Estas limitaciones también se observaron en la transfección de DNA plasmídico, que es incorporado solamente por un 10 - 15% de las células Vero y CRFK y por un máximo del 25% de las células HEK293T (figura 8). Sin embargo, las diferencias encontradas en la transfección de RNAs de luciferasa con y sin *cap* parecen indicar que la escasa actividad enzimática recuperada en los extractos celulares podría estar ocasionada por una traducción ineficiente de los transcritos sintetizados sin *cap*, más que por la transfección en sí misma (figura 9).

Con todo, y aunque no pueda deducirse que HEK293T vaya a ser la línea con mayor capacidad para incorporar RNA exógeno con otros reactivos o sistemas de transfección, se estimó oportuno continuar los estudios sobre la eficiencia en la transfección de RNA sintético exclusivamente en esta línea celular.

De los reactivos de transfección ensayados se descartó en primer lugar el método del fosfato cálcico por su bajo rendimiento. Es posible que este método sea inadecuado para experimentar con RNA, puesto que se emplearon reactivos que no aseguran la ausencia de ribonucleasas. Los sistemas comerciales fundamentados en lípidos catiónicos permitieron una mayor eficiencia, siendo el reactivo *TransMessenger*[™] el que dio lugar a los valores de actividad luciferasa más altos (figura 9). Existen otros procedimientos para introducir RNA en células eucariotas como la electroporación, aunque esta técnica tiene los inconvenientes de provocar una alta tasa de muerte celular y necesitar gran cantidad de células y RNA (González *et al.*, 2007).

Una vez exploradas algunas de las condiciones experimentales que influyen sobre la eficiencia en la transfección de RNA, nuestra atención se dirigió hacia la traducción de los transcritos sintéticos en cultivos celulares, un proceso crucial para el funcionamiento de la estrategia de genética reversa elegida. A la luz de los resultados sobre la transfección de RNA, se decidió utilizar el reactivo *TransMessenger*[™] en células HEK293T para llevar a cabo los estudios sobre la traducción de transcritos de luciferasa, así como el análisis de la capacidad infectiva de los RNAs sintéticos derivados del cDNA del RaV. No obstante,

aunque la transfección sea menos eficiente, se consideró oportuno utilizar también la línea Vero para el análisis de la infectividad de los genomas sintéticos, puesto que en estas células el virus alcanza títulos más elevados y produce efectos citopáticos de fácil identificación (González-Molleda, 2008).

Existen evidencias de que la traducción del genoma de los calicivirus se lleva a cabo mediante un mecanismo poco común en el que la proteína VPg ejerce un papel análogo al de la estructura *cap* de otros virus o de los RNA mensajeros de eucariotas (Herbert *et al.*, 1997). Su rol en el inicio de la traducción convierte a la VPg en un elemento imprescindible para la capacidad infectiva del RNA viral de los calicivirus (Burroughs y Brown, 1978; Dunham *et al.*, 1998; Guix *et al.*, 2007; González-Molleda, 2008). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito un procedimiento que permita obtener RNA sintético que incorpore esta proteína en su extremo 5' (Goodfellow, 2013). En su lugar, es posible utilizar análogos sintéticos del *cap* para lograr transcritos infecciosos derivados de los clones de cDNA del FCV (Sosnovtsev y Green, 1995; Thumfart y Meyers, 2002), del PEC (Chang *et al.*, 2005), del *calicivirus Tulane* (Wei *et al.*, 2008) y del MNV (Yunus *et al.*, 2010). Tan solo se han descrito transcritos infecciosos que no requieren *cap* para un clon de RHDV (Liu *et al.*, 2006a).

Es razonable pensar que la traducción de los transcritos virales sintéticos se lleve a cabo mediante un proceso dependiente de *cap*. Nuestros resultados con el RNA de luciferasa confirman que, tanto *in vitro* (figura 13) como en cultivos celulares (figuras 9 y 14), la traducción es más eficaz cuando el RNA se ha sintetizado en presencia de un análogo de *cap*. La mayor actividad de los transcritos que presentan el análogo ARCA se debe a las modificaciones que confieren su naturaleza anti-reversa. Entre un tercio y la mitad de los transcritos sintetizados en presencia del *cap* clásico [m⁷G(5')pppG] son ineficientes porque incorporan el dinucleótido en la orientación opuesta (o reversa), dejando la guanosina no metilada en el extremo 5' (Pasquinelli *et al.*, 1995). En cambio, la estructura del análogo ARCA [3'-O-Me-m⁷G(5')pppG] hace que la extensión del dinucleótido sólo sea posible en la orientación correcta (Stepinski *et al.*, 2001), maximizando la producción de transcritos con *cap* y su capacidad para ser traducidos (figura 14). No obstante, es previsible que una porción de los transcritos no incorporen el análogo de *cap*. Para mejorar el rendimiento podría ser recomendable utilizar un procedimiento de *capping* post-transcripcional *in vitro* que asegura tener la mayor eficiencia. Este método utiliza el enzima guanilil transferasa del *virus Vaccinia* y ha resultado exitoso en experimentos de genética reversa con el MNV (Yunus *et al.*, 2010).

Los virus RNA tienen genomas muy compactos y su secuencia está sometida a una fuerte presión selectiva para optimizar el uso del espacio disponible. Debido a ello suelen emplear estrategias alternativas al mecanismo convencional de traducción en las células hospedadoras, dependiente de *cap* (Firth y Brierley, 2012). No se puede descartar que los calicivirus presenten, además de la VPg, otros elementos virales con un papel relevante en la síntesis de proteínas o en otras etapas tempranas del ciclo de multiplicación. Los poliovirus, entre otros, poseen secuencias IRES en su extensa región 5'-NT que incluyen estructuras secundarias complejas con capacidad de unión a los ribosomas y que facilitan la entrada de éstos en una posición próxima al codón AUG iniciador de la traducción. En algunos flavivirus, cuyo genoma está liderado por *cap*, se han descrito estructuras secundarias en el 5'-NT formadas por menos de 100 nucleótidos conservados que pueden tener efectos positivos en los niveles de traducción de RNAs sintéticos (Mishin *et al.*, 2001). Entre los virus RNA de plantas también es común encontrar, en ambos extremos del genoma, elementos de traducción independiente de *cap* (CITE¹³) que son capaces de modificar los niveles de expresión de genes heterólogos (Carrington y Freed, 1990; Kneller *et al.*, 2006; Shatsky *et al.*, 2010).

A excepción del género Nebovirus, la región no traducida del extremo 5' de los calicivirus no supera los 20 nucleótidos. Aunque se ha descartado la presencia de estructuras tipo IRES (Salim *et al.*, 2008), la región 5'-NT podría albergar otros mecanismos de control de la traducción basados en secuencias cortas o formando parte de estructuras secundarias complejas en combinación con secuencias codificantes o con la región 3' (Jiang *et al.*, 1993; Simmonds *et al.*, 2008). En el caso del *vesivirus de conejo*, es llamativo que el extremo 5' del genoma presente una alta homología con otros vesivirus y con su correspondiente mensajero subgenómico (figura 43).

Con el fin de determinar si la región 5' no traducida del RaV constituye por si misma un elemento regulador de la traducción decisivo, con efectos sobre la funcionalidad de los transcritos virales sintéticos, se construyeron sendos vectores de expresión que fusionan la 5'-NT del genoma o del RNAsg con el gen de la luciferasa. Como referencia control se utilizó un vector comercial (pT7-luc) que también expresa la luciferasa y contiene una secuencia 5'-NT no viral de 50 nucleótidos (figura 44).

¹³ del inglés *cap-Independent Translation Element*

RaV	(AJ866991)	¹	GUAAAUGAGAAUU <u>UGA</u> -GCU AUGGC UCAAAACGCUCUC	³⁶
SMSV	(AF181081)	¹	GUAAAUGAGAAUU <u>UGA</u> -GCU AUGGC UCAAAACGCUCUC	³⁶
VESV	(U76874)	¹	GUAAAUGAGAAUU <u>UGA</u> -GCU AUGGC UCAAAACGCUCUC	³⁶
PCV-Pan1	(AF091736)	¹	GUAAAUGAGAAUU <u>UGA</u> -GCU AUGGC UCAAAACGCUCUC	³⁶
WCV	(AF321298)	¹	GCU AUGGC UCAAAACGCUCUC	²⁰
FCV	(AF182760)	¹	GUAAAAGA-AAUUUGAGACA AUGUC UCAAAACUCUGAG	³⁶
			+++ ** *** * *** ++++++ ++	
RaV	(AJ866991)	⁵⁶⁴⁸	GUGUUUGAGAAUUAGCCACU AUGGC UACUACUCACAC	⁵⁶⁴⁸
SMSV	(AF181081)	⁵⁶⁴⁵	GUGUUUGAGAAUUAGCCACU AUGGC UACUACUCACAC	⁵⁶⁸¹
VESV	(U76874)	⁵⁶⁵¹	GUGUUUGAAAAUUAACCACCA AUGGC UACUACUCAUAC	⁵⁶⁸⁷
PCV-Pan1	(AF091736)	⁵⁶⁴⁸	GUGUUUGAGAAUUAGCCACU AUGGC UACUACUCACAC	⁵⁶⁸⁴
WCV	(AF321298)	⁵⁶³²	GUGUUUGAGAAUUAGCCACU AUGGC UACUACUCAUAC	⁵⁶⁶⁸
FCV	(AF182760)	⁵²⁹⁷	GUGUUCGA-AGUUUGAG-C- AUG UGCUCACCUGCGC	⁵³³⁰
			+++ ** * ** * * + ++ +	

Figura 43. Homología de la región 5' del genoma y del RNA subgenómico de distintos vesivirus (código de acceso a la secuencia entre paréntesis). Los números que flanquean las secuencias representan la posición de los nucleótidos en el genoma. El signo (+) indica que el residuo se encuentra conservado en los distintos virus, mientras que los asteriscos señalan que existe homología adicional entre la secuencia del genoma y el mensajero subgenómico. En negrita se representa el codón de inicio de la traducción. Se indican los codones de inicio (subrayado) y parada (doble subrayado) de una posible uORF¹⁴ en el RNA genómico. Adaptación de Martín Alonso *et al.* (2005).

En contraste con los estudios realizados con el extremo 5' de norovirus (Salim *et al.*, 2008), el sistema acoplado de transcripción-traducción (figura 11) no es adecuado para el planteamiento utilizado en este trabajo. Esto se debe a que el plásmido comercial pT7-luc contiene la secuencia completa del promotor de la RNA polimerasa de T7 (desde -22 hasta +6 de la transcripción), que le confiere un mayor rendimiento en la transcripción de RNA (figura 12), mientras que el diseño de los vectores recombinantes requiere utilizar una versión truncada del promotor con la secuencia mínima reconocida por la polimerasa (17 residuos previos al +1, figura 10) para que el extremo 5' de los transcritos sea idéntico al del RNA viral.

Los estudios de traducción *in vitro* en el sistema libre de células demuestran la plena funcionalidad de los transcritos fusión (figura 13), pues en condiciones equimolares generan valores de actividad luciferasa comparables a las del RNA control de luciferasa. Estos resultados corroboran que la adición de tres aminoácidos en el extremo N-terminal de la luciferasa no afecta a la estructura ni a la función del enzima (Neuman *et al.*, 2004).

¹⁴ abreviatura de *upstream-ORF*, término inglés que se refiere a una pauta de lectura previa a la ORF del producto principal de un RNA mensajero

Discusión

Por el contrario, la actividad luciferasa recuperada en los extractos de células transfectadas con el RNA control *T7-luc* prácticamente duplica a la de los cultivos tratados con el transcrito fusión *g-luc* (figura 14). Esta amplia diferencia podría deberse a la longitud de la región no traducida, pues se asume que un RNA con la región 5'-NT demasiado corta puede ser poco eficiente para la síntesis de proteínas (Kozak, 1991). No obstante, los transcritos con la secuencia 5'-NT del RNAsg del RaV, con tan solo un nucleótido más que la del genoma, alcanzaron valores comparables al RNA control.

El modelo de traducción de eucariotas establece que, una vez unido al *cap*, el complejo de pre-iniciación, que incluye a la subunidad pequeña del ribosoma, escanea la secuencia del RNA mensajero hacia 3' en busca de un codón AUG funcional que inicie la síntesis de proteínas (Kozak, 1989). Es común encontrar en los mensajeros celulares codones AUG proximales (uAUG¹⁵) que pueden dar lugar a las denominadas uORF y cuya función se ha relacionado con el control de la producción de determinadas proteínas, generalmente reduciendo la frecuencia con la que el ribosoma inicia la traducción en el AUG de la ORF principal (Kozak, 2002). La eficiencia con la que los ribosomas reconocen un codón AUG depende de varios factores, como la distancia con respecto al extremo 5', la presencia de estructuras secundarias cercanas o el contexto en el que se encuentra el AUG (es decir, la secuencia que lo rodea) (Morris y Geballe, 2000; Wethmar *et al.*, 2010). En función de estos parámetros, el codón AUG puede ser utilizado o sufrir *leaky scanning*, un proceso en el que los AUG subóptimos son ignorados o desestimados por el ribosoma, principalmente debido a un contexto poco favorable para el inicio de la traducción. En mamíferos, se ha establecido la secuencia consenso de Kozak **GCCRCCAAUGG** como el contexto más favorable para el inicio de la traducción (Kozak, 1987), siendo los nucleótidos resaltados en negrita, incluyendo el codón de inicio (subrayado), los de mayor importancia. En la posición -3, **R** representa una purina, siendo un nucleótido de adenosina más eficaz que una guanósina.

El análisis detallado de la secuencia 5'-NT del genoma de RaV revela la presencia de un codón uAUG previo al inicio de la ORF1 que, en el caso de ser funcional, daría lugar a una pequeña uORF que codifica un tripéptido (figura 44). Como norma general, la eliminación de un uAUG incrementa la traducción del producto distal, ya que los ribosomas no sufren interferencias en el reconocimiento del inicio de la traducción (Kozak,

¹⁵ abreviatura de *upstream-AUG*, codón de iniciación de la traducción situado con antelación al origen del producto principal de un RNA mensajero.

Ambos procesos, *leaky scanning* y reiniciación, hacen posible la traducción de ORFs distales tanto en mensajeros eucariotas como en RNA virales. De hecho, son de gran utilidad para virus con RNA policistrónicos, como el *virus del SIDA*. El VIH-1¹⁶ controla la expresión de las proteínas Env y Vpu en el momento y la cantidad adecuada mediante mecanismos de *leaky scanning* y reiniciación asociados a una uORF minúscula, formada tan sólo por el uAUG y un codón de parada (Krummheuer *et al.*, 2007). En el *virus del Sarcoma de Rous* existen varias uORF con diferentes efectos que modulan la traducción de las proteínas estructurales (Donze y Spahr, 1992). Si bien, también hay casos en los que la modificación de una uORF no interfiere en la capacidad de replicación del virus, como ocurre con el *virus de la rubeola* (Pugachev y Frey, 1998).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la eliminación del uAUG no incrementa los niveles de traducción de los transcritos fusión de luciferasa. Sin embargo, el hecho de que esta uORF se encuentre conservada en el genoma de varios vesivirus sugiere que puede desarrollar algún papel en el ciclo de multiplicación de estos virus. Por su naturaleza, no se puede descartar que en el contexto de una infección viral intervenga en algún mecanismo regulador en el que estén involucrados los fenómenos de *leaky scanning* y/o reiniciación de la traducción. El contexto en el que se encuentra el uAUG no es muy favorable para el inicio de la traducción, por lo que puede ser ignorado por la mayoría de los ribosomas. Además, en el caso de que no existiera *leaky scanning*, se dan las condiciones para que se produzca la reiniciación de la traducción, puesto que el AUG distal tiene un contexto favorable de Kozak y se encuentra a tan solo tres residuos del final de la uORF. En cualquier caso, sin un sistema de genética reversa que incorpore el resto de la secuencia del genoma viral es muy difícil valorar su relevancia en la replicación del virus.

En el caso del transcrito *sg-luc* no encontramos codones uAUG y el inicio de la transcripción presenta un contexto muy próximo al consenso de Kozak (figura 44), lo que podría explicar su mayor capacidad para producir luciferasa respecto al RNA *g-luc*. Esto deja abierta la discusión sobre las causas moleculares de la mayor producción de la proteína estructural VP1 de calicivirus, necesaria para el empaquetamiento de la progenie viral. Por un lado, los resultados aquí presentados indican que la secuencia 5'-NT podría contribuir a una mayor actividad traduccional del RNAsg, pero también hemos comprobado en el laboratorio que las células infectadas contienen 3 veces más copias del mensajero subgenómico que del RNAsg (Casais *et al.*, 2008). No se puede descartar que ambos

¹⁶ acrónimo del *virus de la inmunodeficiencia humana*

mecanismos tengan un efecto aditivo para cubrir las exigencias de VP1, ni tampoco que existan otras regiones del genoma o del mensajero subgenómico que establezcan estructuras secundarias involucradas en estos procesos (Morales *et al.*, 2004; Simmonds *et al.*, 2008; Abente *et al.*, 2013).

Aunque estas investigaciones han planteado cuestiones interesantes sobre la traducción de los calicivirus, este trabajo no tiene como objetivo comprender los detalles del mecanismo de traducción, sino comprobar que la región 5'-NT del RaV no interfiere en la capacidad de traducción de los RNA sintéticos. Con la ayuda de las fusiones de luciferasa, podemos avanzar que las secuencias 5'-NT del genoma y del mensajero subgenómico del RaV son funcionales y permiten la traducción de transcritos sintéticos, sin que la uORF contenida en el 5'-NT del RNAg de RaV ejerza interferencias notables. El establecimiento de un sistema de genética reversa permitirá realizar estudios adicionales para desgranar el mecanismo y la regulación de la traducción de los calicivirus.

Aunque no hemos comprendido el efecto de la uORF, decidimos no alterar la región 5'-NT y adoptar el mismo diseño en las construcciones que expresan el RNA de longitud genómica. Esta secuencia puede ser de gran importancia para otros procesos del ciclo de multiplicación del virus, formando parte de regiones promotoras o reguladoras de la replicación, o de secuencias de reconocimiento para la encapsidación, o en la estabilización del RNA de polaridad negativa.

5.2.- Estrategias de genética reversa con RNA sintéticos de RaV.

Como ya se ha señalado con anterioridad, la transfección de RNA sintético es la estrategia más utilizada por los sistemas de genética reversa de calicivirus (ver tabla 3). La predilección por este procedimiento se debe a que, al contrario que en la transfección de cultivos celulares con DNA, el RNA no requiere entrar en el núcleo celular y la expresión se produce directamente en el citoplasma, de la misma manera que ocurre en la infección viral (Rabinovich *et al.*, 2006). Inicialmente, esta fue la estrategia elegida para analizar la capacidad infectiva de los diferentes clones de cDNA de RaV.

En primer lugar se ensayó el clon denominado RaVg, el cual fue obtenido mediante RT-PCR de longitud genómica y utilizado para determinar la secuencia nucleotídica del RaV que se encuentra depositada en las bases de datos (Martín-Alonso *et al.*, 2005). El plásmido original pT-RaVg, que contiene una copia de este clon, no fue utilizado para sintetizar RNA porque presenta dos copias del promotor de T7 en tándem. Se ha descrito

Discusión

que la transcripción *in vitro* a partir de una construcción de este tipo rinde una mezcla compleja de transcritos que en el caso del clon infeccioso del *calicivirus entérico porcino* compromete seriamente su capacidad para reproducir la infección (Chang *et al.*, 2005).

Todos los vectores de transcripción basados en este clon de cDNA se diseñaron con la intención de minimizar la presencia de nucleótidos de origen no viral, por lo que se prestó especial atención a la secuencia en ambos extremos de los genomas sintéticos. Como norma general, se asume que la adición de secuencias no virales en el extremo 5' de los transcritos sintéticos disminuye o incluso anula su capacidad infectiva, mientras que existe mayor tolerancia para las extensiones de la región 3' (Boyer y Haenni, 1994). Por esto, al igual que en los vectores que expresan las fusiones con el gen de luciferasa, se colocó la secuencia mínima promotora de la RNA polimerasa de T7 de manera que el inicio de la transcripción coincidiera con el primer nucleótido del genoma del virus. Para el extremo 3' se utilizó un diseño similar al de los clones infecciosos del FCV (Sosnovtsev *et al.*, 1995) o del *calicivirus Tulane* (Wei *et al.*, 2008), que consiste en agregar la secuencia diana de un enzima de restricción (*Acl*) a continuación del cDNA del genoma viral con el objetivo de obtener moldes lineales para la transcripción de RNA. De esta forma, los transcritos sintetizados a partir de este vector son idénticos en secuencia al RNA viral, salvo por la adición de dos residuos de nucleótidos (CG) derivados de la diana de restricción situada a continuación de la cola de poliA.

La etiqueta molecular introducida en la región de la ORF3 por mutagénesis dirigida de los residuos 7.862 a 7.865 permite la diferenciación del RNA derivado del clon RaVg de un RNA procedente del virus parental. Los cuatro nucleótidos mutados en pF-RaV/Xh no suponen cambios en la secuencia de aminoácidos de la VP2 y, como se pudo comprobar posteriormente, no interfieren en la capacidad replicativa del RNA.

Pese a que la transfección del RNA sintético derivado de estas construcciones no desencadenó procesos infecciosos en las líneas celulares ensayadas, se detectó en cultivos de Vero la presencia de RNA de polaridad positiva en el día 7 post-transfección (figura 21). La detección de RNA con la etiqueta molecular *XhoI* en los cultivos transfectados con los transcritos *RaV/Xh* indica que es posible que se diera un proceso de replicación; no obstante, esto fue detectado en un único experimento y no se encontraron otras evidencias de replicación del RNA sintético, como efectos citopáticos o la presencia de proteínas virales en los cultivos.

La transfección de 50 pg de RNA viral de RaV es suficiente para observar efectos citopáticos en células Vero (González-Molleda, 2008). Dada la alta sensibilidad de estas

células al virus, la aparición de efectos citopáticos es considerado un excelente indicador de la presencia del virus en el cultivo. No obstante, la ausencia de efectos citopáticos podría indicar que el RNA sintético tiene capacidad para replicarse pero no es capaz de completar el ciclo infeccioso. Una posibilidad es que los transcritos derivados del clon RaVg tengan dificultades para expresar las ORFs 2 y 3, que codifican las proteínas estructurales y el péptido LC. Este último, es considerado responsable de originar los efectos citopáticos en los cultivos infectados con FCV (Abente *et al.*, 2013). Es por esto que, con una estrategia similar a la de los virus con genoma de RNA segmentado o el *virus Norwalk* (Asanaka *et al.*, 2005; Katayama *et al.*, 2006), se intentó realizar el rescate del RaV mediante la co-transfección de transcritos sintéticos de longitud genómica y subgenómica. Sin embargo, el aporte del mensajero subgenómico no tuvo como resultado un proceso infeccioso.

Considerando que los datos de traducción de RNA sintético de luciferasa en los cultivos celulares ensayados indican una baja eficiencia en la producción de proteínas y que no se detectaron proteínas virales en los cultivos transfectados con los genomas sintéticos, es posible que los niveles de expresión de la ORF1 de los transcritos derivados del clon RaVg sean insuficientes para el desarrollo de la infección. La co-transfección de RNA purificado de viriones con el RNA sintético *RaV/Xb* aporta los niveles óptimos de proteínas virales para completar la infección. Sin embargo, pese a utilizar una cantidad 100 veces mayor del transcrito sintético que del RNA viral purificado, los viriones resultantes de estos experimentos no contenían genomas con la etiqueta *XhoI* (figura 22). Este procedimiento no fue utilizado con otros transcritos sintéticos, puesto que se ha demostrado mediante experimentos *in vitro* que los complejos de replicación purificados de cultivos infectados con RaV son inaccesibles a RNA exógeno (Casais *et al.*, 2008).

Los nucleótidos adicionales en el extremo 3' de los genomas sintéticos pueden constituir un inconveniente en la síntesis de la hebra negativa o en el empaquetamiento del RNA, aunque extensiones similares del extremo 3' no hayan impedido el rescate de otros calicivirus (Sosnovtsev *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2008). Para descartar esta posibilidad se construyó el vector pF-RaVR, en el que fueron insertadas la secuencia de la ribozima del H δ V y una señal de terminación de la transcripción para la RNA polimerasa del fago T7 a continuación de la cola de poliA del cDNA de RaV. Esta aproximación ha servido para optimizar el sistema de genética reversa del MNV-1, incrementando la eficiencia de rescate del virus (Chaudhry *et al.*, 2007). No obstante, aunque la ribozima se mostró funcional (figura 19), la transfección de los transcritos *RaVR* no supuso la aparición de procesos infecciosos en los cultivos ensayados.

Por último, se diseñó el vector pF-RaVR/GFP para sintetizar un RNA que permitiera observar y comprobar la replicación de un transcrito sintético basado en el genoma de RaV. La sustitución de parte de la región codificadora de las proteínas estructurales no debería afectar a la replicación del RNA, teóricamente llevada a cabo por las proteínas no estructurales codificadas en la ORF1. Existen estudios en otros calicivirus con transcritos similares que funcionan como replicones que expresan genes reporteros (Thumfart y Meyers, 2002; Chang *et al.*, 2006 y 2008; Wang *et al.*, 2013). La ausencia de fluorescencia en los cultivos transfectados con el transcrito *RaVR/GFP* junto con los resultados de las otras construcciones del clon RaVg sugieren que existe alguna mutación perjudicial en la secuencia de este clon que afecta a los estadios iniciales de la replicación del RNA que impide la producción del mensajero subgenómico. Independientemente de la capacidad replicativa de la secuencia viral, no se puede descartar que la región del genoma de RaV reemplazada sea esencial para su replicación, como en el FCV (Sosnovtsev *et al.*, 2005); o que existan sitios potenciales de corte para la proteasa viral NS6 que procesen el polipéptido resultante de la fusión impidiendo la emisión de fluorescencia por la GFP.

La posibilidad de obtener un clon con una mutación defectiva constituye un riesgo inherente a la estrategia utilizada en la clonación de la copia RaVg. La amplificación del genoma mediante una sola reacción de PCR de longitud completa conlleva que el cDNA clonado representa a una única copia de la población de genomas que alberga un cultivo infectado. No tenemos la certeza de que éste sea el caso del clon RaVg, pero dados los resultados obtenidos en la transfección de RNA se decidió sintetizar otro cDNA a partir del sobrenadante de cultivos infectados con el virus.

En esta segunda aproximación se utilizó el propio cDNA amplificado por RT-PCR directamente como molde para la transcripción *in vitro*, sin un paso de clonación previo. De esta manera, el transcrito derivado de este amplicón de PCR conserva la posible heterogeneidad de genomas distintos, aunque muy relacionados, que suelen mantener las cuasiespecies virales (Radford *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2004). El diseño de los cebadores para la amplificación por PCR asegura la ausencia de nucleótidos ajenos a la secuencia del virus, fusionando el promotor de T7 al extremo 5' e incluyendo una cola de poliA de 15 residuos. Además, con el cebador 5' se introdujo la mutación puntual *t6a* que elimina el uAUG estudiado con anterioridad. Esta mutación supone una etiqueta molecular que no afecta a la traducción de los RNAs sintéticos en los cultivos ensayados (ver figura 14), aunque desconocemos los efectos que podría ejercer sobre la replicación de los posibles virus recombinantes.

Los resultados indican que el RNA derivado de este amplicón fue capaz de completar un ciclo infeccioso en células HEK293T, puesto que el sobrenadante de cultivo produjo claros efectos citopáticos en las células Vero utilizadas en los pases sucesivos. La aparición de partículas infecciosas en el sobrenadante se demoró entre 24 y 48 horas y no fue necesario extender la cola de poli-A de 15 nucleótidos presente en el molde de cDNA. No obstante, la etiqueta molecular *t6a* introducida en el extremo 5' no pudo ser detectada en los virus recombinantes, por lo que no podemos diferenciar el virus rescatado del RaV original.

En busca de aislar el clon o clones infecciosos, se insertó el amplicón en un vector de clonación para perpetuar la secuencia y poder introducir otras etiquetas moleculares. De los 30 clones obtenidos, ninguno fue capaz de reproducir la infección. Desconocemos las causas de la falta de infectividad del cDNA una vez introducido en vectores plasmídicos, aunque la aparente reparación de la mutación *t6a* en el virus recombinante sugiere que el extremo 5' es en efecto una región cuya secuencia no debe ser alterada para el éxito en la replicación de RNA.

Puesto que los clones de cDNA de RaV ensayados hasta el momento no demostraron una clara y reproducible capacidad infectiva, se empleó una estrategia diferente para obtener la copia del genoma del virus. En esta ocasión, el cDNA completo del genoma se reconstruyó en un vector plasmídico mediante la clonación direccional de cuatro fragmentos amplificados por RT-PCR. Las reacciones de PCR se desarrollaron de manera independiente, abriendo la posibilidad de que el cDNA del clon reconstruido proceda de diferentes genomas. La secuencia de este clon, denominado A23, contiene 25 diferencias puntuales respecto a la del clon RaVg (ver tabla 8). Algunas de estas diferencias conllevan cambios de aminoácidos con distintas propiedades, como son los casos de S398A en la región de la NS2, R928W en la VPg, y C1405G e I1611T en el región codificadora del dominio polimerasa de la N6/7 (3CD-ProPol). No obstante, desconocemos la relevancia que estos cambios puedan tener sobre la capacidad infectiva, ya que ninguna de las regiones afectadas forma parte de estructuras conservadas descritas en otros calicivirus.

El vector pT-A23 no tiene un diseño refinado para la expresión de RNA, ya que los transcritos sintéticos obtenidos con la RNA polimerasa de T7 poseen secuencias no virales tanto en su extremo 5' como en el 3', a continuación de la cola de poliA. Estas extensiones son resultado del proceso de clonación, que deja una secuencia espaciadora de 61 residuos entre el promotor de T7 y el primer nucleótido del genoma de RaV. En el extremo 3' nos

encontramos con 71 nucleótidos adicionales, que corresponden a la secuencia del sitio múltiple de clonación del vector.

Los transcritos derivados de este vector no resultaron infecciosos en cultivos celulares, ya que no se observaron efectos citopáticos ni evidencias de replicación del RNA. Sin embargo, y aunque el diseño del vector parece ser inadecuado, el uso de la estrategia de expresión con el virus auxiliar rFPV/T7 reveló que la secuencia del clon A23 es funcional y permite el rescate de virus recombinantes.

Es posible que haya un conjunto de factores que influyen de manera directa en la capacidad infectiva de transcritos infecciosos, como la eficiencia de transfección de RNAs de longitud genómica, la eficiencia de incorporación de la estructura *cap* (incluso en las reacciones con el análogo ARCA) o la presencia de nucleótidos de origen no viral en el transcrito. Adicionalmente, la experiencia acumulada en la transfección de distintos RNAs sintéticos indica que el procedimiento es poco eficaz para la expresión de genes marcadores en las líneas celulares ensayadas. El hecho de no haber conseguido detectar proteínas virales en los extractos de células transfectadas con RNA derivado de los distintos clones sugiere que los niveles de traducción son insuficientes para desarrollar el ciclo infeccioso. Como alternativa, decidimos abordar la transcripción intracelular de los RNA de longitud genómica, transfectando los vectores que contienen los distintos clones presentados en células infectadas con el poxvirus rFPV/T7.

5.3.- Estrategias de rescate con rFPV/T7.

Son varios los sistemas de genética reversa que han reportado problemas relacionados con la transfección de RNA sintético y necesitan que la transcripción del genoma se produzca en el interior de la célula para tener éxito en el rescate de virus. Aunque se han descrito clones infecciosos de calicivirus que utilizan promotores eucariotas (Ward *et al.* 2007; Liu *et al.* 2008b), es preferible que la transcripción del genoma viral se lleve a cabo en el citoplasma, donde se desarrolla el ciclo infeccioso de un calicivirus. De esta manera, se evitan posibles problemas de procesamiento post-transcripcional o modificaciones asociadas al proceso de exportación del RNA desde el núcleo (Thumfart y Meyers, 2002).

En esta investigación se ha utilizado el rFPV/T7, un poxvirus aviar recombinante que expresa la RNA polimerasa del fago T7 y permite utilizar los vectores obtenidos en este trabajo sin necesidad de realizar modificaciones. El sistema es capaz de expresar de

manera eficaz la proteína GFP en las líneas celulares infectadas con rFPV/T7 (figura 30), consiguiendo además un incremento considerable del número de células transfectadas respecto a la transfección con transcritos sintéticos (figura 23).

Una vez confirmada la funcionalidad del sistema, se realizaron varios experimentos de rescate utilizando los plásmidos que contienen el genoma de los distintos clones de RaV. Al igual que sus transcritos sintéticos, los vectores que expresan las variantes del clon RaVg no permitieron el rescate de virus. En cambio, el clon A23 sí provocó la aparición de un agente infeccioso que ocasiona un claro efecto citopático similar al originado por RaV y que se mantiene en los pases sucesivos (figuras 33 y 34). La detección de proteínas y RNA virales confirma que el agente infeccioso se trata del *vesivirus de conejo*. Además, la presencia de la etiqueta molecular *XhoI*, que conlleva la mutación de 4 nucleótidos en la ORF3 del genoma, constituye la certificación definitiva de que el virus procede inequívocamente del cDNA insertado en el vector plasmídico.

Los virus recombinantes obtenidos a partir de la expresión del clon A23 causan en células Vero efectos citopáticos similares al virus original. Sin embargo, todo apunta a que poseen ligeras diferencias en cuanto a su capacidad proliferativa (ver figuras 38 a 40). La morfología de las placas generadas durante la infección es aparentemente menor en los virus recombinantes, lo que se corresponde con una menor producción viral de cada placa aislada. El análisis cinético de la proliferación de la población viral muestra una mayor rapidez del virus original, que necesita dos horas menos para completar su ciclo y comenzar a liberar su progenie.

Es muy probable que esta disparidad en la capacidad de proliferación pueda estar asociada a diferencias en la secuencia del genoma de los virus recombinantes. El clon A23 es una reconstrucción del genoma a partir de cuatro fragmentos amplificados por PCR y que pueden representar a distintas secuencias virales dentro de una misma población de virus. Adicionalmente, hay que considerar las mutaciones generadas durante el rescate y los pases sucesivos del virus (tabla 9). El análisis de la secuencia del virus recombinante RaV/A23 en el pase 3 muestra solamente 3 cambios nucleotídicos con respecto al clon A23, lo que puede dar una idea de la estabilidad de la secuencia de este virus. Sin embargo, en el pase 8 acumula 14 mutaciones debidas a los ciclos de replicación y a la selección de placas virales.

Es notable que muchas de las mutaciones de los virus recombinantes se acumulan en la región que codifica la proteína estructural VP1. Aunque no se conoce la estructura tridimensional de la proteína de la cápsida de RaV, es muy probable que estos cambios se

concentren en el dominio P2 (protuberancia), que constituye la parte más externa de la envoltura proteica y se ha relacionado con el proceso de unión del virus a la célula (Prasad *et al.*, 1999). La mayor frecuencia de mutación de esta región en otros calicivirus se ha asociado con una estrategia evolutiva para eludir la presión del sistema inmune (Nilsson *et al.*, 2003).

Al contrario de nuestro planteamiento inicial y la creencia general de que la identidad de los extremos del genoma es fundamental para la funcionalidad de un clon infeccioso (Boyer y Haenni, 1994), nos encontramos que el vector pT-A23 expresa un RNA con 61 nucleótidos de origen no viral en el extremo 5' (figura 42). Los nucleótidos adicionales son eliminados durante el rescate del virus y la replicación subsiguiente, restableciendo la secuencia original del extremo 5' de RaV. Esto sugiere que existe alguna señal o región promotora implicada en el mecanismo de replicación del virus que determina la secuencia del extremo 5' de los calicivirus, lo que explicaría que no fuera posible detectar la mutación *t6a* en los virus recuperados en los experimentos con transcritos sintéticos derivados del amplicón de RT-PCR (figura 26).

Llama la atención que el diseño poco refinado del vector pT-A23 sea capaz de producir un RNA infeccioso cuando todos los intentos para obtener transcritos que mimeticen el genoma viral no dieron lugar al rescate de virus. Si bien, los vectores que expresan RNAs con los extremos idénticos al genoma viral contienen la secuencia del clon RaVg. Existen varios factores que pueden relacionarse con el éxito de la construcción pT-A23 y la imposibilidad de rescatar virus a partir del clon RaVg. En primer lugar, y como se comenta anteriormente, cabe la posibilidad de que el clon RaVg sea una copia no funcional, es decir, que la secuencia genómica contenga alguna mutación clave para la capacidad infectiva de los transcritos. Considerando que existen 25 diferencias puntuales entre las secuencias de ambos clones no es descabellado hacer esta suposición. Hay que señalar que la mutación del nucleótido previo a la cola de poliA del MNV es crítica para la infectividad del clon de cDNA (Chaudhry *et al.*, 2007); y la sustitución de un único aminoácido en la proteína de la cápsida también provoca la atenuación del MNV (Bailey *et al.*, 2008).

Otra diferencia entre los vectores utilizados consiste en la secuencia promotora de la RNA polimerasa del fago T7. Las construcciones que expresan el clon RaVg contienen un promotor truncado, que presenta la secuencia mínima promotora para evitar la adición de nucleótidos adicionales en el extremo 5' de los transcritos. En cambio, el vector pT-A23 posee la secuencia promotora completa, que podría ser capaz de aumentar la producción de RNA como ya comprobamos *in vitro* con los transcritos de luciferasa derivados del vector

pT7-luc (figura 12). No obstante, no disponemos de datos sobre el rendimiento de la RNA polimerasa del rFPV/T7 con las distintas secuencias promotoras.

Por otro lado, teniendo en cuenta los datos de traducción de RNA sintéticos de luciferasa en cultivos celulares cabe la posibilidad de que la extensión de la secuencia 5'-NT de los transcritos derivados de pT-A23 tenga un efecto positivo en la traducción. Aparte de su mayor longitud, la secuencia adicional procedente del vector aporta dos codones uAUG que originan sendas uORFs de 39 y 24 residuos nucleotídicos que comparten codón de parada (figura 45). Es razonable pensar que alguna de estas uORF tenga efectos sobre la traducción de este RNA, en los que de nuevo pueden intervenir los fenómenos de *leaky scanning* o reiniciación de la traducción. El segundo uAUG se encuentra en un contexto muy favorable para ser reconocido por los ribosomas y los codones de terminación de la traducción se encuentran muy próximos a los subsiguientes AUG. Además, el alto contenido en citosinas y guanosinas indica que hay una alta probabilidad de que se formen estructuras secundarias. Estas características de la secuencia adicional no deben ser pasadas por alto, puesto que podrían tener relevancia en la eficiencia de rescate de RaV a partir del clon A23, tanto con RNAs sintéticos como en el sistema de expresión con rFPV/T7.



Figura 45. Secuencia de la región 5' de los transcritos derivados de las construcciones pF-RaVg y pT-A23. Se destaca el inicio de la traducción de la ORF1 del genoma de RaV (en negrita), así como la situación de los distintos codones uAUG (subrayados) y sus respectivos codones de parada (doble subrayado) que dan lugar a las posibles uORFs cuya longitud se indica en la parte inferior. La numeración de nucleótidos toma como referencia (+1) la posición del primer nucleótido del genoma de RaV. La secuencia sombreada señala el contexto en el que se encuentra el segundo uAUG del RNA derivado del vector pT-A23.

A pesar de que no existe ninguna duda sobre la capacidad infectiva del clon A23, el sistema de rescate de virus no presenta la eficiencia requerida para realizar estudios de genética reversa. Es imprescindible aumentar la eficiencia del rescate para poder valorar de forma precisa futuras modificaciones en el genoma que afecten a su capacidad replicativa (Boot *et al.*, 2001). Es por esto que se considera necesario optimizar el sistema de genética reversa antes de desarrollar las potenciales aplicaciones que presenta el clon infeccioso.

En primer lugar se pueden incorporar algunas modificaciones sobre el vector que contiene el clon infeccioso. Es posible que la eliminación o modificación de las secuencias

adicionales de los extremos aumente la eficiencia del RNA derivado del vector. Aunque el virus sea capaz de eliminar la extensión en el extremo 5' no se ha estudiado la trascendencia de la secuencia adicional sobre la capacidad de traducción o de replicación del RNA. También sería interesante determinar la secuencia del extremo 3' del transcrito que se genera en las células infectadas con rFPV/T7, ya que el plásmido es transfectado en su forma circular y se desconoce en qué punto deja de transcribir la polimerasa. La incorporación de la secuencia de la ribozima del H δ V permitiría obtener un extremo 3' definido, como en las construcciones del clon RaVg.

Tampoco se puede descartar el uso de transcritos sintéticos, ya que los estudios con MNV de Yunus y colaboradores (2010) aseguran que el sistema de transfección de RNAs sometidos a *capping in vitro* es más eficaz que el rescate con rFPV/T7. Además, se debe considerar la oferta de nuevos reactivos y métodos de transfección para células eucariotas que podrían aumentar la eficiencia de esta estrategia.

Otra posibilidad consiste en establecer un transformante estable de células Vero que expresen la RNA polimerasa de T7 para evitar la infección con el poxvirus, el cual compite con el RNA derivado del clon infeccioso por los recursos celulares necesarios para su propia replicación. Esta estrategia ya ha sido desarrollada para el rescate del *virus de la fiebre aftosa* (Zheng *et al.*, 2009).

También se debe considerar que el rescate de RaV observado en este trabajo se produce sin necesidad de co-expresar otros elementos virales. Pese a que los primeros rescates se dieron tras la co-expresión del cDNA del clon A23 y la proteína estructural VP1, la aportación de esta última no parece ser esencial para la producción de virus a partir del plásmido pT-A23. Sin embargo, en los sistemas de genética reversa del *virus Norwalk* es necesario aportar otro vector que exprese el RNAsg (Asanaka *et al.*, 2005; Katayama *et al.*, 2006) para obtener virus infecciosos, aunque posiblemente esté relacionado con la imposibilidad de propagar el NV en cultivos celulares. Asimismo, se ha descrito que el péptido LC del FCV es capaz de promover la replicación del *virus Norwalk* en cultivos celulares (Chang *et al.*, 2008), por lo que el aporte de otros elementos virales, como las proteínas no estructurales, no debe ser descartado como estrategia para aumentar la efectividad del rescate de RaV.

Aunque se ha logrado el rescate de RaV por varios sistemas y construcciones distintas, la baja reproducibilidad de los procedimientos sugiere que deben existir factores que desconocemos y que juegan un papel decisivo en la eficiencia del rescate. Exceptuando la etiqueta *XhoI*, otros intentos de modificación del genoma del clon A23 no incluidos en

este trabajo no permitieron el rescate de virus. Esta es una de las principales razones por las que se considera necesario obtener un sistema de rescate óptimo para evaluar si la modificación, eliminación o acomodación de material genético exógeno altera la capacidad de producción viral. Adicionalmente, es un requisito imprescindible afrontar la construcción de replicones o minigenomas, que pueden ser de gran utilidad para valorar el potencial uso de este calicivirus como vectores de expresión de secuencias exógenas. Los calicivirus tienen un genoma relativamente pequeño, pero se han obtenido replicones basados en calicivirus capaces de expresar GFP (Thumfart y Meyers, 2002), neomicina (Chang *et al.*, 2006) o luciferasa (Wang *et al.*, 2013).

Es importante señalar que, salvo el caso del MNV, los sistemas de genética reversa de calicivirus descritos hasta la fecha deben presentar dificultades relacionadas con la reproducibilidad del procedimiento, puesto que no se han producido grandes avances en la investigación de esta familia de virus que incluye patógenos importantes para el hombre así como para varias especies de animales.

6. Conclusiones

1. La actividad traduccional de los transcritos sintéticos que contienen la región 5'-NT del mensajero subgenómico del *vesivirus de conejo* es mayor que la de aquellos que contienen la secuencia 5'-NT del genoma.
2. La eliminación del uAUG presente en la región 5'-NT del genoma de RaV mediante la mutación t6a no afecta a los niveles de traducción de los transcritos que contienen esta secuencia en fusión con el gen reportero luciferasa.
3. Los transcritos derivados del clon de cDNA RaVg y sus variantes (RaVg/Xh y RaV/R) no permiten el rescate del *vesivirus de conejo* en cultivos celulares cuando son transfectados o producidos intracelularmente empleando el sistema de expresión basado en el virus auxiliar rFPV/T7.
4. Los transcritos sintéticos derivados del amplicón que contiene el cDNA completo de RaV y porta la mutación t6a en la región 5'-NT permitieron el rescate de virus en los que se corrige la etiqueta molecular introducida. Los transcritos derivados de varios clones individuales de cDNA contenidos en este amplicón, o una mezcla de los mismos, no permitieron el rescate de virus infectivos.
5. La transfección de RNA sintético derivado del clon A23 de RaV no desencadena un proceso infeccioso. Por el contrario, se ha conseguido rescatar virus infecciosos a partir de un vector plasmídico que contiene la secuencia de dicho clon mediante el sistema de expresión intracelular que utiliza el virus auxiliar rFPV/T7. Este sistema no necesita la complementación adicional con otros factores virales.
6. Se ha modificado la secuencia del genoma de RaV mediante mutagénesis dirigida para introducir una diana de restricción para *XhoI*. Esta etiqueta molecular se mantiene en el virus rescatado tras varios ciclos de replicación.

Conclusiones

7. La presencia de nucleótidos adicionales de origen no viral en los extremos del transcrito derivado del vector de expresión pT-A23 no impide el rescate de virus mediante el sistema de expresión con el virus rFPV/T7. La secuencia adicional en el extremo 5' es eliminada en los procesos de replicación del RNA.

8. La secuencia de nucleótidos de los virus rescatados RaV/A23 y RaV/Xh se corresponde con la del clon de cDNA del que proceden. Los sucesivos ciclos replicativos del virus provocan la acumulación de mutaciones puntuales en el genoma que pueden ser responsables de las diferencias observadas en su capacidad proliferativa respecto al virus silvestre. Estas diferencias se traducen en la reducción del tamaño de las placas virales y en la disminución de la producción de viriones.

7. Bibliografía

- Abente, E. J., Sosnovtsev, S. V., Bok, K. & Green, K. Y. (2010). Visualization of feline calicivirus replication in real-time with recombinant viruses engineered to express fluorescent reporter proteins. *Virology* **400**, 18-31.
- Abente, E. J., Sosnovtsev, S. V., Sandoval-Jaime, C., Parra, G. I., Bok, K. & Green, K. Y. (2013). The feline calicivirus leader of the capsid protein is associated with cytopathic effect. *J Virol* **87**, 3003-3017.
- Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J. & Esteves, P. J. (2012). Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res* **43**, 12.
- Almazan, F., Gonzalez, J. M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J. & Enjuanes, L. (2000). Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5516-5521.
- Andino, R., Silvera, D., Suggett, S. D., Achacoso, P. L., Miller, C. J., Baltimore, D. & Feinberg, M. B. (1994). Engineering poliovirus as a vaccine vector for the expression of diverse antigens. *Science* **265**, 1448-1451.
- Arias, A., Bailey, D., Chaudhry, Y. & Goodfellow, I. (2012). Development of a reverse-genetics system for murine norovirus 3: long-term persistence occurs in the caecum and colon. *J Gen Virol* **93**, 1432-1441.
- Asanaka, M., Atmar, R. L., Ruvolo, V., Crawford, S. E., Neill, F. H. & Estes, M. K. (2005). Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10327-10332.
- Bailey, D., Thackray, L. B. & Goodfellow, I. G. (2008). A single amino acid substitution in the murine norovirus capsid protein is sufficient for attenuation *in vivo*. *J Virol* **82**, 7725-7728.
- Bailey, D., Kaiser, W. J., Hollinshead, M., Moffat, K., Chaudhry, Y., Wileman, T., Sosnovtsev, S. V. & Goodfellow, I. G. (2010a). Feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation. *J Gen Virol* **91**, 739-749.
- Bailey, D., Karakasiliotis, I., Vashist, S., Chung, L. M., Rees, J., McFadden, N., Benson, A., Yarovinsky, F., Simmonds, P. & Goodfellow, I. (2010b). Functional analysis of RNA structures present at the 3' extremity of the murine norovirus genome: the variable polypyrimidine tract plays a role in viral virulence. *J Virol* **84**, 2859-2870.
- Belliot, G., Sosnovtsev, S. V., Chang, K. O., McPhie, P. & Green, K. Y. (2008). Nucleotidylation of the VPg protein of a human norovirus by its proteinase-polymerase precursor protein. *Virology* **374**, 33-49.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S. E., Hutson, A. M. & Estes, M. K. (2003). The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* **77**, 11603-11615.
- Blakeney, S. J., Cahill, A. & Reilly, P. A. (2003). Processing of Norwalk virus nonstructural proteins by a 3C-like cysteine proteinase. *Virology* **308**, 216-224.
- Boga, J. A., Martin Alonso, J. M., Casais, R. & Parra, F. (1997). A single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection. *J Gen Virol* **78** (Pt 9), 2315-2318.

- Bok, K., Prikhodko, V. G., Green, K. Y. & Sosnovtsev, S. V. (2009).** Apoptosis in murine norovirus-infected RAW264.7 cells is associated with downregulation of survivin. *J Virol* **83**, 3647-3656.
- Boniotti, B., Wirblich, C., Sibia, M., Meyers, G., Thiel, H. J. & Rossi, C. (1994).** Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol* **68**, 6487-6495.
- Boot, H. J., Dokic, K. & Peeters, B. P. (2001).** Comparison of RNA and cDNA transfection methods for rescue of infectious bursal disease virus. *J Virol Methods* **97**, 67-76.
- Boyer, J. C. & Haenni, A. L. (1994).** Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* **198**, 415-426.
- Burroughs, J. N. & Brown, F. (1978).** Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *J Gen Virol* **41**, 443-446.
- Carrington, J. C. & Freed, D. D. (1990).** Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J Virol* **64**, 1590-1597.
- Casais, R., Thiel, V., Siddell, S. G., Cavanagh, D. & Britton, P. (2001).** Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol* **75**, 12359-12369.
- Casais, R., Molleda, L. G., Machin, A., del Barrio, G., Manso, A. G., Dalton, K. P., Coto, A., Alonso, J. M., Prieto, M. & Parra, F. (2008).** Structural and functional analysis of virus factories purified from Rabbit vesivirus-infected Vero cells. *Virus Res* **137**, 112-121.
- Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Kim, Y., Saif, L. J. & Green, K. Y. (2004).** Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8733-8738.
- Chang, K. O., Sosnovtsev, S. S., Belliot, G., Wang, Q., Saif, L. J. & Green, K. Y. (2005).** Reverse genetics system for porcine enteric calicivirus, a prototype sapovirus in the Caliciviridae. *J Virol* **79**, 1409-1416.
- Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., King, A. D. & Green, K. Y. (2006).** Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. *Virology* **353**, 463-473.
- Chang, K. O. & George, D. W. (2007).** Interferons and ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replicon-bearing cells. *J Virol* **81**, 12111-12118.
- Chang, K. O., George, D. W., Patton, J. B., Green, K. Y. & Sosnovtsev, S. V. (2008).** Leader of the capsid protein in feline calicivirus promotes replication of Norwalk virus in cell culture. *J Virol* **82**, 9306-9317.
- Chang, K. O. (2009).** Role of cholesterol pathways in norovirus replication. *J Virol* **83**, 8587-8595.
- Chaudhry, Y., Skinner, M. A. & Goodfellow, I. G. (2007).** Recovery of genetically defined murine norovirus in tissue culture by using a fowlpox virus expressing T7 RNA polymerase. *J Gen Virol* **88**, 2091-2100.
- Chen, R., Neill, J. D., Estes, M. K. & Prasad, B. V. (2006).** X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8048-8053.
- Clark, B. & McKendrick, M. (2004).** A review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis* **17**, 461-469.
- Clarke, I. N. & Lambden, P. R. (2000).** Organization and expression of calicivirus genes. *J Infect Dis* **181 Suppl 2**, S309-316.

- Clarke, I. N., Estes, M.K., Green, K.Y., Hansman, G.S, Knowles, N.J., Koopmans, M.K., Matson, D.O., Meyers, G. Neill, J.D., Radford, A., Smith, A.W., Studdert, M.J., Thiel, H.-J. and Vinjé, J. (2011). Caliciviridae. In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 977-986. Edited by A. M. Q. King, Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: Elsevier.
- Daughenbaugh, K. F., Fraser, C. S., Hershey, J. W. & Hardy, M. E. (2003). The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *Embo J* **22**, 2852-2859.
- Daughenbaugh, K. F., Wobus, C. E. & Hardy, M. E. (2006). VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virology* **33**, 33.
- Davis, N. L., Willis, L. V., Smith, J. F. & Johnston, R. E. (1989). *In vitro* synthesis of infectious venezuelan equine encephalitis virus RNA from a cDNA clone: analysis of a viable deletion mutant. *Virology* **171**, 189-204.
- Day, J. M., Ballard, L. L., Duke, M. V., Scheffler, B. E. & Zsak, L. (2010). Metagenomic analysis of the turkey gut RNA virus community. *Virology* **7**, 313.
- Di Martino, B. & Marsilio, F. (2010). Feline calicivirus VP2 is involved in the self-assembly of the capsid protein into virus-like particles. *Res Vet Sci* **89**, 279-281.
- Donze, O. & Spahr, P. F. (1992). Role of the open reading frames of Rous sarcoma virus leader RNA in translation and genome packaging. *Embo J* **11**, 3747-3757.
- Dunham, D. M., Jiang, X., Berke, T., Smith, A. W. & Matson, D. O. (1998). Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch Virol* **143**, 2421-2430.
- Ebihara, H., Groseth, A., Neumann, G., Kawaoka, Y. & Feldmann, H. (2005). The role of reverse genetics systems in studying viral hemorrhagic fevers. *Thromb Haemost* **94**, 240-253.
- Elfakess, R., Sinvani, H., Haimov, O., Svitkin, Y., Sonenberg, N. & Dikstein, R. (2011). Unique translation initiation of mRNAs-containing TISU element. *Nucleic Acids Res* **39**, 7598-7609.
- Enjuanes, L., Sola, I., Almazan, F., Izeta, A., Gonzalez, J. M. & Alonso, S. (2001). Coronavirus derived expression systems. Progress and problems. *Adv Exp Med Biol* **494**, 309-321.
- Ettayebi, K. & Hardy, M. E. (2003). Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol* **77**, 11790-11797.
- Evans, S., Cavanagh, D. & Britton, P. (2000). Utilizing fowlpox virus recombinants to generate defective RNAs of the coronavirus infectious bronchitis virus. *J Gen Virol* **81**, 2855-2865.
- Farkas, T., Sestak, K., Wei, C. & Jiang, X. (2008). Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol* **82**, 5408-5416.
- Fernandez-Vega, V., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., King, A. D., Mitra, T., Gorbalenya, A. & Green, K. Y. (2004). Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol* **78**, 4827-4837.
- Firth, A. E. & Brierley, I. (2012). Non-canonical translation in RNA viruses. *J Gen Virol* **93**, 1385-1409.
- Flavell, R. A., Sabo, D. L., Bandle, E. F. & Weissmann, C. (1974). Site-directed mutagenesis: generation of an extracistronic mutation in bacteriophage Q beta RNA. *J Mol Biol* **89**, 255-272.
- Fullerton, S. W., Blaschke, M., Coutard, B., Gebhardt, J., Gorbalenya, A., Canard, B., Tucker, P. A. & Rohayem, J. (2007). Structural and functional characterization of sapovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **81**, 1858-1871.

- Gerondopoulos, A., Jackson, T., Monaghan, P., Doyle, N. & Roberts, L. O. (2010). Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- and cholesterol-dependent pathway. *J Gen Virol* **91**, 1428-1438.
- Gonzalez, G., Pfannes, L., Brazas, R. & Striker, R. (2007). Selection of an optimal RNA transfection reagent and comparison to electroporation for the delivery of viral RNA. *J Virol Methods* **145**, 14-21.
- González-Molleda, L. (2008). Tesis Doctoral: Caracterización molecular de un nuevo calicivirus de conejo. En *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*: Universidad de Oviedo.
- Gonzalez-Reyes, S., Garcia-Manso, A., del Barrio, G., Dalton, K. P., Gonzalez-Molleda, L., Arrojo-Fernandez, J., Nicieza, I. & Parra, F. (2009). Role of annexin A2 in cellular entry of rabbit vesivirus. *J Gen Virol* **90**, 2724-2730.
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberte, J. F. & Roberts, L. (2005). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep* **6**, 968-972.
- Goodfellow, I. (2013). Calicivirus reverse genetics. En *Reverse genetics of RNA viruses*, pp. 91-107. Editado por A. Bridgen: Wiley-Blackwell.
- Green, K. Y., Ando, T., Balayan, M. S., Berke, T., Clarke, I. N., Estes, M. K., Matson, D. O., Nakata, S., Neill, J. D., Studdert, M. J. & Thiel, H. J. (2000). Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* **181 Suppl 2**, S322-330.
- Green, K. Y., Mory, A., Fogg, M. H., Weisberg, A., Belliot, G., Wagner, M., Mitra, T., Ehrenfeld, E., Cameron, C. E. & Sosnovtsev, S. V. (2002). Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells. *J Virol* **76**, 8582-8595.
- Guix, S., Asanaka, M., Katayama, K., Crawford, S. E., Neill, F. H., Atmar, R. L. & Estes, M. K. (2007). Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J Virol* **81**, 12238-12248.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of Escherichia coli. En D.M. Glover, DNA cloning: a practical approach. **Vol. 1**, 1109-1122.
- Hardy, M. E. & Estes, M. K. (1996). Completion of the Norwalk virus genome sequence. *Virus Genes* **12**, 287-290.
- Herbert, T. P., Brierley, I. & Brown, T. D. (1997). Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol* **78 (Pt 5)**, 1033-1040.
- Hutson, A. M., Atmar, R. L., Graham, D. Y. & Estes, M. K. (2002). Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* **185**, 1335-1337.
- Hyde, J. L. & Mackenzie, J. M. (2010). Subcellular localization of the MNV-1 ORF1 proteins and their potential roles in the formation of the MNV-1 replication complex. *Virology* **406**, 138-148.
- Hyde, J. L., Gillespie, L. K. & Mackenzie, J. M. (2012). Mouse norovirus 1 utilizes the cytoskeleton network to establish localization of the replication complex proximal to the microtubule organizing center. *J Virol* **86**, 4110-4122.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Jiang, X., Wang, M., Graham, D. Y. & Estes, M. K. (1992). Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* **66**, 6527-6532.
- Jiang, X., Wang, M., Wang, K. & Estes, M. K. (1993). Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* **195**, 51-61.

- Karakasiliotis, I., Vashist, S., Bailey, D., Abente, E. J., Green, K. Y., Roberts, L. O., Sosnovtsev, S. V. & Goodfellow, I. G. (2010). Polypyrimidine tract binding protein functions as a negative regulator of feline calicivirus translation. *PLoS One* **5**, e9562.
- Katayama, K., Hansman, G. S., Oka, T., Ogawa, S. & Takeda, N. (2006). Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol* **151**, 1291-1308.
- Khromykh, A. A. & Westaway, E. G. (1997). Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol* **71**, 1497-1505.
- Kneller, E. L., Rakotondrafara, A. M. & Miller, W. A. (2006). Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Res* **119**, 63-75.
- Kobayashi, T., Antar, A. A., Boehme, K. W., Danthi, P., Eby, E. A., Guglielmi, K. M., Holm, G. H., Johnson, E. M., Maginnis, M. S., Naik, S., Skelton, W. B., Wetzell, J. D., Wilson, G. J., Chappell, J. D. & Dermody, T. S. (2007). A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* **1**, 147-157.
- Kochetov, A. V., Ahmad, S., Ivanisenko, V., Volkova, O. A., Kolchanov, N. A. & Sarai, A. (2008). uORFs, reinitiation and alternative translation start sites in human mRNAs. *FEBS Lett* **582**, 1293-1297.
- Kozak, M. (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* **196**, 947-950.
- Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* **108**, 229-241.
- Kozak, M. (1991). A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expr* **1**, 111-115.
- Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* **299**, 1-34.
- Kreutz, L. C. & Seal, B. S. (1995). The pathway of feline calicivirus entry. *Virus Res* **35**, 63-70.
- Krummheuer, J., Johnson, A. T., Hauber, I., Kammler, S., Anderson, J. L., Hauber, J., Purcell, D. F. & Schaal, H. (2007). A minimal uORF within the HIV-1 vpu leader allows efficient translation initiation at the downstream env AUG. *Virology* **363**, 261-271.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, C. J., Zhao, B. T., Hori, H. & Bray, M. (1991). Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5139-5143.
- Lai, M. M. (2000). The making of infectious viral RNA: No size limit in sight. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5025-5027.
- Lambden, P. R., Liu, B. & Clarke, I. N. (1995). A conserved sequence motif at the 5' terminus of the Southampton virus genome is characteristic of the Caliciviridae. *Virus Genes* **10**, 149-152.
- Laurent, S., Vautherot, J. F., Madelaine, M. F., Le Gall, G. & Rasschaert, D. (1994). Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J Virol* **68**, 6794-6798.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. & Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751.
- Le Pendu, J., Ruvoen-Clouet, N., Kindberg, E. & Svensson, L. (2006). Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin Immunol* **18**, 375-386.
- L'Homme, Y., Sansregret, R., Plante-Fortier, E., Lamontagne, A. M., Ouardani, M., Lacroix, G. & Simard, C. (2009). Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes* **39**, 66-75.

- Liljestrom, P., Lusa, S., Huylebroeck, D. & Garoff, H. (1991). *In vitro* mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. *J Virol* **65**, 4107-4113.
- Liljestrom, P. (1994). Alphavirus expression systems. *Curr Opin Biotechnol* **5**, 495-500.
- Liu, B. L., Lambden, P. R., Gunther, H., Otto, P., Elschner, M. & Clarke, I. N. (1999). Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* **73**, 819-825.
- Liu, G., Zhang, Y., Ni, Z., Yun, T., Sheng, Z., Liang, H., Hua, J., Li, S., Du, Q. & Chen, J. (2006a). Recovery of infectious rabbit hemorrhagic disease virus from rabbits after direct inoculation with *in vitro*-transcribed RNA. *J Virol* **80**, 6597-6602.
- Liu, G. Q., Ni, Z., Yun, T., Zhang, Y., Du, Q., Sheng, Z., Liang, H., Hua, J., Li, S. & Chen, J. (2006b). Rescued virus from infectious cDNA clone of rabbit hemorrhagic disease virus is adapted to RK13 cells line. *Chinese Sci Bull* **51**, 1698-1702.
- Liu, G., Ni, Z., Yun, T., Yu, B., Chen, L., Zhao, W., Hua, J. & Chen, J. (2008a). A DNA-launched reverse genetics system for rabbit hemorrhagic disease virus reveals that the VP2 protein is not essential for virus infectivity. *J Gen Virol* **89**, 3080-3085.
- Liu, G. Q., Ni, Z., Yun, T., Yu, B., Zhu, J. M., Hua, J. G. & Chen, J. P. (2008b). Rabbit hemorrhagic disease virus poly(A) tail is not essential for the infectivity of the virus and can be restored *in vivo*. *Arch Virol* **153**, 939-944.
- Liu, Z., Netski, D. M., Mao, Q., Laeyendecker, O., Ticehurst, J. R., Wang, X. H., Thomas, D. L. & Ray, S. C. (2004). Accurate representation of the hepatitis C virus quasispecies in 5.2-kilobase amplicons. *J Clin Microbiol* **42**, 4223-4229.
- Lochridge, V. P., Jutila, K. L., Graff, J. W. & Hardy, M. E. (2005). Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *J Gen Virol* **86**, 2799-2806.
- Lopez-Manriquez, E., Vashist, S., Urena, L., Goodfellow, I., Chavez, P., Mora-Heredia, J. E., Cancio-Lonches, C., Garrido, E. & Gutierrez-Escolano, A. L. (2013). Norovirus genome circularization and efficient replication are facilitated by binding of PCBP2 and hnRNP A1. *J Virol* **87**, 11371-11387.
- Luttermann, C. & Meyers, G. (2007). A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA. *J Biol Chem* **282**, 7056-7065.
- Machin, A., Martin Alonso, J. M. & Parra, F. (2001). Identification of the amino acid residue involved in rabbit hemorrhagic disease virus VPg uridylylation. *J Biol Chem* **276**, 27787-27792.
- Machin, A., Martin Alonso, J. M., Dalton, K. P. & Parra, F. (2009). Functional differences between precursor and mature forms of the RNA-dependent RNA polymerase from rabbit hemorrhagic disease virus. *J Gen Virol* **90**, 2114-2118.
- Makino, A., Shimojima, M., Miyazawa, T., Kato, K., Tohya, Y. & Akashi, H. (2006). Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J Virol* **80**, 4482-4490.
- Mandl, C. W., Ecker, M., Holzmann, H., Kunz, C. & Heinz, F. X. (1997). Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. *J Gen Virol* **78** (Pt 5), 1049-1057.
- Marin, M. S., Casais, R., Alonso, J. M. & Parra, F. (2000). ATP binding and ATPase activities associated with recombinant rabbit hemorrhagic disease virus 2C-like polypeptide. *J Virol* **74**, 10846-10851.
- Martin Alonso, J. M., Casais, R., Boga, J. A. & Parra, F. (1996). Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polyprotein. *J Virol* **70**, 1261-1265.

- Martin-Alonso, J. M., Skilling, D. E., Gonzalez-Molleda, L., del Barrio, G., Machin, A., Keefer, N. K., Matson, D. O., Iversen, P. L., Smith, A. W. & Parra, F. (2005). Isolation and characterization of a new Vesivirus from rabbits. *Virology* **337**, 373-383.
- Maruyama, I. N., Rakow, T. L. & Maruyama, H. I. (1995). cRACE: a simple method for identification of the 5' end of mRNAs. *Nucleic Acids Res* **23**, 3796-3797.
- Matsuura, Y., Tohya, Y., Onuma, M., Roerink, F., Mochizuki, M. & Sugimura, T. (2000). Expression and processing of the canine calicivirus capsid precursor. *J Gen Virol* **81**, 195-199.
- McFadden, N., Bailey, D., Carrara, G., Benson, A., Chaudhry, Y., Shortland, A., Heeney, J., Yarovinsky, F., Simmonds, P., Macdonald, A. & Goodfellow, I. (2011). Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS Pathog* **7**, e1002413.
- McFadden, N., Arias, A., Dry, I., Bailey, D., Witteveldt, J., Evans, D. J., Goodfellow, I. & Simmonds, P. (2013). Influence of genome-scale RNA structure disruption on the replication of murine norovirus—similar replication kinetics in cell culture but attenuation of viral fitness *in vivo*. *Nucleic Acids Res* **41**, 6316-6331.
- Meyers, G., Wirblich, C. & Thiel, H. J. (1991). Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* **184**, 677-686.
- Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H. J. & Thumfart, J. O. (2000). Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* **276**, 349-363.
- Meyers, G. (2003). Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *J Biol Chem* **278**, 34051-34060.
- Meyers, G. (2007). Characterization of the sequence element directing translation reinitiation in RNA of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* **81**, 9623-9632.
- Mishin, V. P., Cominelli, F. & Yamshchikov, V. F. (2001). A 'minimal' approach in design of flavivirus infectious DNA. *Virus Res* **81**, 113-123.
- Mitra, T., Sosnovtsev, S. V. & Green, K. Y. (2004). Mutagenesis of tyrosine 24 in the VPg protein is lethal for feline calicivirus. *J Virol* **78**, 4931-4935.
- Morales, M., Barcena, J., Ramirez, M. A., Boga, J. A., Parra, F. & Torres, J. M. (2004). Synthesis *in vitro* of rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by internal initiation on (-)sense genomic RNA: mapping of a subgenomic promoter. *J Biol Chem* **279**, 17013-17018.
- Morris, D. R. & Geballe, A. P. (2000). Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol* **20**, 8635-8642.
- Naphtine, S., Lever, R. A., Powell, M. L., Jackson, R. J., Brown, T. D. & Brierley, I. (2009). Expression of the VP2 protein of murine norovirus by a translation termination-reinitiation strategy. *PLoS One* **4**, e8390.
- Neill, J. D., Sosnovtsev, S. V. & Green, K. Y. (2000). Recovery and altered neutralization specificities of chimeric viruses containing capsid protein domain exchanges from antigenically distinct strains of feline calicivirus. *J Virol* **74**, 1079-1084.
- Neill, J. D. (2002). The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res* **87**, 89-93.
- Neuman, B. W., Stein, D. A., Kroeker, A. D., Paulino, A. D., Moulton, H. M., Iversen, P. L. & Buchmeier, M. J. (2004). Antisense morpholino-oligomers directed against the 5' end of the genome inhibit coronavirus proliferation and growth. *J Virol* **78**, 5891-5899.

- Neumann, G., Whitt, M. A. & Kawaoka, Y. (2002). A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? *J Gen Virol* **83**, 2635-2662.
- Ng, T. F., Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky, B., Bodhidatta, L., Oderinde, B. S., Wommack, K. E. & Delwart, E. (2012). High variety of known and new RNA and DNA viruses of diverse origins in untreated sewage. *J Virol* **86**, 12161-12175.
- Nilsson, M., Hedlund, K. O., Thorhagen, M., Larson, G., Johansen, K., Ekspong, A. & Svensson, L. (2003). Evolution of human calicivirus RNA *in vivo*: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol* **77**, 13117-13124.
- Ohlinger, V. F., Haas, B. & Thiel, H. J. (1993). Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus. *Vet Res* **24**, 103-116.
- Oka, T., Yamamoto, M., Katayama, K., Hansman, G. S., Ogawa, S., Miyamura, T. & Takeda, N. (2006). Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein. *J Gen Virol* **87**, 3329-3338.
- Oliver, S. L., Asobayire, E., Dastjerdi, A. M. & Bridger, J. C. (2006). Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology* **350**, 240-250.
- Ossiboff, R. J. & Parker, J. S. (2007). Identification of regions and residues in feline junctional adhesion molecule required for feline calicivirus binding and infection. *J Virol* **81**, 13608-13621.
- Parra, F., Boga, J. A., Marin, M. S. & Casais, R. (1993). The amino terminal sequence of VP60 from rabbit hemorrhagic disease virus supports its putative subgenomic origin. *Virus Res* **27**, 219-228.
- Pasquinelli, A. E., Dahlberg, J. E. & Lund, E. (1995). Reverse 5' caps in RNAs made *in vitro* by phage RNA polymerases. *RNA* **1**, 957-967.
- Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. & Wimmer, E. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* **393**, 280-284.
- Payment, P. & Trudel, M. (1993). *Methods and Techniques in Virology*. Marcel Dekker, Nueva York. 19-38.
- Perry, J. W., Taube, S. & Wobus, C. E. (2009). Murine norovirus-1 entry into permissive macrophages and dendritic cells is pH-independent. *Virus Res* **143**, 125-129.
- Pfister, T. & Wimmer, E. (2001). Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol* **75**, 1611-1619.
- Poyry, T. A., Kaminski, A., Connell, E. J., Fraser, C. S. & Jackson, R. J. (2007). The mechanism of an exceptional case of reinitiation after translation of a long ORF reveals why such events do not generally occur in mammalian mRNA translation. *Genes Dev* **21**, 3149-3162.
- Prasad, B. V., Rothnagel, R., Jiang, X. & Estes, M. K. (1994). Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol* **68**, 5117-5125.
- Prasad, B. V., Hardy, M. E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M. G. & Estes, M. K. (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* **286**, 287-290.
- Pugachev, K. V. & Frey, T. K. (1998). Effects of defined mutations in the 5' nontranslated region of rubella virus genomic RNA on virus viability and macromolecule synthesis. *J Virol* **72**, 641-650.
- Rabinovich, P. M., Komarovskaya, M. E., Ye, Z. J., Imai, C., Campana, D., Bahceci, E. & Weissman, S. M. (2006). Synthetic messenger RNA as a tool for gene therapy. *Hum Gene Ther* **17**, 1027-1035.

- Racaniello, V. R. & Baltimore, D. (1981). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* **214**, 916-919.
- Radford, A. D., Turner, P. C., Bennett, M., McArdle, F., Dawson, S., Glenn, M. A., Williams, R. A. & Gaskell, R. M. (1998). Quasispecies evolution of a hypervariable region of the feline calicivirus capsid gene in cell culture and in persistently infected cats. *J Gen Virol* **79** (Pt 1), 1-10.
- Radford, A. D., Coyne, K. P., Dawson, S., Porter, C. J. & Gaskell, R. M. (2007). Feline calicivirus. *Vet Res* **38**, 319-335.
- Reed, L. J. & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The Am J of Hyg* **27**, 493-497.
- Rice, C. M., Levis, R., Strauss, J. H. & Huang, H. V. (1987). Production of infectious RNA transcripts from Sindbis virus cDNA clones: mapping of lethal mutations, rescue of a temperature-sensitive marker, and *in vitro* mutagenesis to generate defined mutants. *J Virol* **61**, 3809-3819.
- Rice, C. M., Grakoui, A., Galler, R. & Chambers, T. J. (1989). Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by *in vitro* ligation. *New Biol* **1**, 285-296.
- Rohayem, J., Robel, I., Jager, K., Scheffler, U. & Rudolph, W. (2006). Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *J Virol* **80**, 7060-7069.
- Rohayem, J., Bergmann, M., Gebhardt, J., Gould, E., Tucker, P., Mattevi, A., Unge, T., Hilgenfeld, R. & Neyts, J. (2010). Antiviral strategies to control calicivirus infections. *Antiviral Res* **87**, 162-178.
- Rueckert, R. R. & Wimmer, E. (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J Virol* **50**, 957-959.
- Sadowy, E., Milner, M. & Haenni, A. L. (2001). Proteins attached to viral genomes are multifunctional. *Adv Virus Res* **57**, 185-262.
- Salim, O., Clarke, I. N. & Lambden, P. R. (2008). Functional analysis of the 5' genomic sequence of a bovine norovirus. *PLoS One* **3**, e2169.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Sandoval-Jaime, C. & Gutierrez-Escolano, A. L. (2009). Cellular proteins mediate 5'-3' end contacts of Norwalk virus genomic RNA. *Virology* **387**, 322-330.
- Schenborn, E. T. & Mierendorf, R. C., Jr. (1985). A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res* **13**, 6223-6236.
- Schnell, M. J., Mebatsion, T. & Conzelmann, K. K. (1994). Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *Embo J* **13**, 4195-4203.
- Schuffenecker, I., Ando, T., Thouvenot, D., Lina, B. & Aymard, M. (2001). Genetic classification of "Sapporo-like viruses". *Arch Virol* **146**, 2115-2132.
- Shatsky, I. N., Dmitriev, S. E., Terenin, I. M. & Andreev, D. E. (2010). Cap- and IRES-independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs. *Mol Cells* **30**, 285-293.
- Simmonds, P., Karakasiliotis, I., Bailey, D., Chaudhry, Y., Evans, D. J. & Goodfellow, I. G. (2008). Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res* **36**, 2530-2546.
- Smiley, J. R., Chang, K. O., Hayes, J., Vinje, J. & Saif, L. J. (2002). Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *J Virol* **76**, 10089-10098.

- Sosnovtsev, S. V. & Green, K. Y. (1995). RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VPg for infectivity. *Virology* **210**, 383-390.
- Sosnovtsev, S. V., Sosnovtseva, O. V. & Green, K. Y. (1996). Recovery of feline calicivirus from plasmid DNA containing a full-length copy of the genome, p. 125-130. En D Chasey, R M Gaskell, and I N Clarke (ed), *The 1st International Symposium on Calicivirus European Society for Veterinary Virology and Central Veterinary Laboratory*. Reading, United Kingdom.
- Sosnovtsev, S. V., Sosnovtseva, S. A. & Green, K. Y. (1998). Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J Virol* **72**, 3051-3059.
- Sosnovtsev, S. V. & Green, K. Y. (2000). Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology* **277**, 193-203.
- Sosnovtsev, S. V., Garfield, M. & Green, K. Y. (2002). Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J Virol* **76**, 7060-7072.
- Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K. O., Onwudiwe, O. & Green, K. Y. (2005). Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol* **79**, 4012-4024.
- Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K. O., Prikhodko, V. G., Thackray, L. B., Wobus, C. E., Karst, S. M., Virgin, H. W. & Green, K. Y. (2006). Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* **80**, 7816-7831.
- Sosnovtseva, S. A., Sosnovtsev, S. V. & Green, K. Y. (1999). Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J Virol* **73**, 6626-6633.
- Stepinski, J., Waddell, C., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E. & Rhoads, R. E. (2001). Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG. *RNA* **7**, 1486-1495.
- Stuart, A. D. & Brown, T. D. (2006). Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *J Virol* **80**, 7500-7509.
- Stuart, A. D. & Brown, T. D. (2007). Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *J Gen Virol* **88**, 177-186.
- Subba-Reddy, C. V., Goodfellow, I. & Kao, C. C. (2011). VPg-primed RNA synthesis of norovirus RNA-dependent RNA polymerases by using a novel cell-based assay. *J Virol* **85**, 13027-13037.
- Subba-Reddy, C. V., Yunus, M. A., Goodfellow, I. G. & Kao, C. C. (2012). Norovirus RNA synthesis is modulated by an interaction between the viral RNA-dependent RNA polymerase and the major capsid protein, VP1. *J Virol* **86**, 10138-10149.
- Taniguchi, T., Palmieri, M. & Weissmann, C. (1978). QB DNA-containing hybrid plasmids giving rise to QB phage formation in the bacterial host. *Nature* **274**, 223-228.
- Taube, S., Perry, J. W., Yetming, K., Patel, S. P., Auble, H., Shu, L., Nawar, H. F., Lee, C. H., Connell, T. D., Shayman, J. A. & Wobus, C. E. (2009). Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. *J Virol* **83**, 4092-4101.
- Thiel, H. J. & Konig, M. (1999). Caliciviruses: an overview. *Vet Microbiol* **69**, 55-62.
- Thorne, L., Bailey, D. & Goodfellow, I. (2012). High-resolution functional profiling of the norovirus genome. *J Virol* **86**, 11441-11456.
- Thorne, L. G. & Goodfellow, I. G. (2014). Norovirus gene expression and replication. *J Gen Virol* **95**, 278-291.

- Thumfart, J. O. & Meyers, G. (2002). Feline calicivirus: recovery of wild-type and recombinant viruses after transfection of cRNA or cDNA constructs. *J Virol* **76**, 6398-6407.
- Tiew, K. C., He, G., Aravapalli, S., Mandadapu, S. R., Gunnam, M. R., Alliston, K. R., Lushington, G. H., Kim, Y., Chang, K. O. & Groutas, W. C. (2011). Design, synthesis, and evaluation of inhibitors of Norwalk virus 3C protease. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 5315-5319.
- Vashist, S., Urena, L., Chaudhry, Y. & Goodfellow, I. (2012). Identification of RNA-protein interaction networks involved in the norovirus life cycle. *J Virol* **86**, 11977-11990.
- Vazquez, A. L., Martin Alonso, J. M., Casais, R., Boga, J. A. & Parra, F. (1998). Expression of enzymatically active rabbit hemorrhagic disease virus RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Virol* **72**, 2999-3004.
- Vongpunsawad, S., Venkataram Prasad, B. V. & Estes, M. K. (2013). Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *J Virol* **87**, 4818-4825.
- Wang, B., Zhe, M., Chen, Z., Li, C., Meng, C., Zhang, M. & Liu, G. (2013). Construction and applications of rabbit hemorrhagic disease virus replicon. *PLoS One* **8**, e60316.
- Ward, V. K., McCormick, C. J., Clarke, I. N., Salim, O., Wobus, C. E., Thackray, L. B., Virgin, H. W. t. & Lambden, P. R. (2007). Recovery of infectious murine norovirus using pol II-driven expression of full-length cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11050-11055.
- Wei, C., Farkas, T., Sestak, K. & Jiang, X. (2008). Recovery of infectious virus by transfection of *in vitro*-generated RNA from tulane calicivirus cDNA. *J Virol* **82**, 11429-11436.
- Wethmar, K., Smink, J. J. & Leutz, A. (2010). Upstream open reading frames: molecular switches in (patho)physiology. *Bioessays* **32**, 885-893.
- Wirblich, C., Sibilia, M., Boniotti, M. B., Rossi, C., Thiel, H. J. & Meyers, G. (1995). 3C-like protease of rabbit hemorrhagic disease virus: identification of cleavage sites in the ORF1 polyprotein and analysis of cleavage specificity. *J Virol* **69**, 7159-7168.
- Wirblich, C., Thiel, H. J. & Meyers, G. (1996). Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from *in vitro* translation studies. *J Virol* **70**, 7974-7983.
- Wobus, C. E., Karst, S. M., Thackray, L. B., Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J. M., Green, K. Y. & Virgin, H. W. (2004). Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* **2**, e432.
- Wolf, S., Reetz, J. & Otto, P. (2011). Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. *Arch Virol* **156**, 1143-1150.
- Wolf, S., Reetz, J., Hoffmann, K., Grundel, A., Schwarz, B. A., Hanel, I. & Otto, P. H. (2012). Discovery and genetic characterization of novel caliciviruses in German and Dutch poultry. *Arch Virol* **157**, 1499-1507.
- Yanagi, M., Purcell, R. H., Emerson, S. U. & Bukh, J. (1997). Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8738-8743.
- Yu, G., Zhang, D., Guo, F., Tan, M., Jiang, X. & Jiang, W. (2013). Cryo-EM structure of a novel calicivirus, Tulane virus. *PLoS One* **8**, e59817.
- Yunus, M. A., Chung, L. M., Chaudhry, Y., Bailey, D. & Goodfellow, I. (2010). Development of an optimized RNA-based murine norovirus reverse genetics system. *J Virol Methods* **169**, 112-118.

Bibliografia

- Zheng, H., Tian, H., Jin, Y., Wu, J., Shang, Y., Yin, S., Liu, X. & Xie, Q. (2009).** Development of a hamster kidney cell line expressing stably T7 RNA polymerase using retroviral gene transfer technology for efficient rescue of infectious foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods* **156**, 129-137.
- Zibert, A., Maass, G., Strebel, K., Falk, M. M. & Beck, E. (1990).** Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J Virol* **64**, 2467-2473.

Anexo: Secuencia de nucleótidos del plásmido pT-A23 que contiene el clon infeccioso de RaV. Se indican los inicios de la transcripción y los promotores de las RNA polimerasas de los fagos T7 y SP6. En la parte superior de cada línea de secuencia nucleotídica se encuentra su traducción y se señalan las diferentes proteínas virales.

→ Inicio transcripción T7

GGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGAT 60

ORF1 → NS1/2

M A Q T L S K I S N K E N A 14

TGTAATGAGAATTTGAGCT**ATG**GCTCAAACGCTCTCGAAAATCTCTAACAAAGAAAACG 120

S S G L W P K R F K P H Q P I P T W M V 34

CCTCTTCAGGCCTTTGGCCTAAGAGGTTCAAACCCACCAACCCATCCCAACGTGGATGG 180

R C G L L N H D S C R G R E P V R A P P 54

TGCGGTGTGGGCTTCTCAACCACGACTCATGTCTGGGCGAGAACCTGTTCGTGCTCCGC 240

Q A K R V R T P T P Y P R H L K P T A P 74

CACAAGCGAAGCGGTCAGGACACCTACCCCTACCCCGCCATCTCAAACCTACAGCAC 300

V V V R S S N N P P H L K P A S T D V V 94

CTGTTGTAGTTAGGAGTAGCAACAATCCCCCATCTCAAACCTGCATCAACAGATGTAG 360

R S G P E T L C C E A K D G G V V R S C 114

TTAGGAGTGGACCCGAAACCCCTCTGCTGCGAAGCTAAGGATGGAGGTGTAGTTAGGAGTT 420

K T C N L K P A H D S K A V S F S L P Q 134

GCAAGACCTGCAATCTCAAACCTGCACACGATTCCAAGGCTGTCAGCTTCTCACTTCCCC 480

T D G S T G N E P E F I A E A C P S C A 154

AAACGGACGGATCCACCGAAACGAACCCGAATTCATCGCTGAGGCTTGCCCTAGTTGCG 540

L Y D T C P N C T S K V I N D D G S T D 174

CACTCTACGACACGTGTCCAAACTGCACATCTAAGGTTATCAACGATGATGGCTCGACTG 600

G T I P S W D Q I E T T P A F L S L L S 194

ACGGAACCATCCCATCCTGGGACCAGATTGAAACAACCCCTGCTTTTCTGTCTTTGCTCT 660

N T D E E M S A D E L T N L A A H L R K 214

CCAACACTGACGAGGAAATGTCTGCGGACGAGCTCACCAATTTGGCGGCTCATCTGCGAA 720

A F E T G S H P A N T D Y S K D Q L Q G 234

AGGCCTTCGAAACTGGATCACACCCGGCAAACACAGACTACTCTAAGGACCAACTCCAAG 780

L L E M A E A A L P P A R R Q T L P F Y 254

GATTGCTCGAAATGGCTGAGGCTGCACTACCACCCGCAAGAAGGCAAACCCCTACCATTCT 840

Anexo

Q Q R L E A R R T W R E K I F N A P L D 274
 ACCAACAAAAGGCTTGAAGCTCGTAGGACTTGGCGCGAGAAAATCTTTAACGCACCATTGG 900

 E I N K V L T T S K D R F Q R C A A W K 294
 ATGAGATCAACAAAGTCCTCACAACATCAAAGGATCGATTCCAACGCTGCGCCGCTGGA 960

 V I L E K A V L A K E Y G G E A F T Y A 314
 AAGTCATACTTGAAAAGGCAGTGCTCGCGAAGGAATATGGCGGAGAAGCCTTCACCTACG 1020

 Q Q A L K N V N S F D V N L V L K M A V 334
 CACAACAGGCCCTCAAGAATGTTAACTCATTGTGATGTCAACCTGGTTCTTAAAATGGCCG 1080

 A S L I D H L R M M T I D N P D L V S Y 354
 TAGCATCGCTCATTGACCACTTGAGAATGATGACCATTGATAACCCCGATTTGGTATCTT 1140

 I P K L V V K L K P L T L K M I I D N H 374
 ACATCCCAAAATTTGGTTCGTCAAACTAAAACCACCTCACACTAAAAATGATAATTGACAACC 1200

 E N T K E G W L V T L T S L A E L Y G L 394
 ATGAAAACACCAAGGAAGGCTGGTTGGTCACACTTACTAGCCTTGCAGAACTCTACGGAC 1260

 V E V A I D F V P A V V G N L F D L L M 414
 TGGTCGAGGTTGCAATTGACTTCGTCCCAGCCGTAGTTGGGAATTTGTTTCGATCTGCTCA 1320

 K T T S K V Y S M F K S V I L A T F T S 434
 TGAAGACCACATCAAAGGTGTACAGCATGTTCAAATCAGTGATACTTGCAACATTTACAT 1380

 → NS3 (2C-Hel)
 E S L D F T N P F W Y A I A A I L C F L 454
 CTGAGTCACTTGACTTCACCAACCCATTCTGGTACGCCATTGCTGCGATACTCTGCTTCT 1440

 I T G A I P H N G K M K V I K N I L S N 474
 TGATCACAGGAGCGATACCACACAATGGCAAGATGAAAGTGATTAAGAACATCCTCTCAA 1500

 A T S I V A G V K A I Q T L A A M F S T 494
 ACGCCACTAGTATAGTAGCTGGCGTCAAGGCCATTCAAACCTTTGCCGCCATGTTCTCAA 1560

 W S N E R L V N D L S S R T I A L T E L 514
 CATGGTCAAACGAAAGATTGGTCAATGACTTATCATCAAGAACAATTGCACTCACTGAAT 1620

 N N P T I T A D I D A V I N L Q R L A E 534
 TGAACAACCCCAATCACAGCCGACATTGATGCAGTCATTAATCTACAAAGATTGGCAG 1680

 I L R D E V K S H T L N P L M Q P Y T P 554
 AAATCCTTCGGGATGAGGTAAAATCTCACACCCTCAACCCACTCATGCAACCATAACAC 1740

 I L R N L M S A L D N V I S C C T R R K 574
 CAATCCTAAGAAATCTGATGTCTGCACCTTGACAACGTGATATCATGCTGCACACGGCGCA 1800

A I A T K R T A P V A V I L T G P P G C 594
 AGGCTATTGCCACAAAGAGGACAGCCCCTGTGGCGGTCATCCTGACCGGGCCTCCTGGGT 1860

G K T T A A F A L A K R L S Q Q K P S I 614
 GCGGAAAGACAACCTGCAGCCTTCGCCCTTGCAAAGCGATTGTCACAGCAGAAACCATCGA 1920

I S L D V D H H D T Y T G N E V C I I D 634
 TCATATCCCCTTGATGTAGACCACCATGACACATACTGGGAACGAGGTGTGTATCATCG 1980

E F D S S D K I D Y A N F V V N M V N T 654
 ATGAGTTCGACTCGTCTGATAAGATTGATTATGCCAACTTTGTGGTCAATATGGTCAACA 2040

N P M V L N C D L I E N K G K T F T S K 674
 CCAATCCCATGGTCCTAAATTGTGACTTGATTGAGAATAAGGGAAAGACATTCACCTCAA 2100

Y V I M T S N T E T P V K P T S R R A G 694
 AATATGTTATCATGACGTCCAATACTGAAACACCTGTGAAACCAACATCCAGACGTGCAG 2160

A F Y R R V M I V D V T N N A A E K W K 714
 GCGCATTCTACCGGCGCGTGATGATTGTGGACGTCACAAACAATGCTGCGGAAAAGTGGA 2220

S D N P G K A V P K W C F S K D F S H L 734
 AAAGTGATAACCCAGGAAAAGCTGTCCC GAAATGGTGCTTCAGCAAAGACTTCTCCCACC 2280

S L S L R G T E A Y S K E Y V L D P S G 754
 TTAGTCTGTCCCTGAGAGGAACTGAGGCGTACTCTAAGGAGTACGTTTTGGACCCCTCCG 2340

R N H Q S R R A P P A Q Q I T L E Q L A 774
 GTAGGAACCATCAGTCCCGGAGAGCTCCTCCTGCCCAACAAATCACACTCGAACAATTGG 2400

→ NS4 (3A)

Q K M V V Q H T T N A S E F V T Q A D E 794
 CTCAAAAGATGGTTGTGCAACACACAACCAATGCTAGTGAATTTGTTACACAAGCCGACG 2460

V P V F G F V C Q N N E I D T V Y N L L 814
 AAGTCCCAGTTTTCGGATTTGTCTGCCAAAACAATGAAATTGACACGGTCTATAACCTAC 2520

A A V K A R Y G A N F N L H K G M V R T 834
 TTGCTGCCGTC AAGGCCAGGTACGGTGCAAATTTCAATTTGCACAAGGGCATGGTTCCGA 2580

V H E N S G C G A H V H V V S R E D D F 854
 CTGTACACGAGAACAGTGGGTGTGGGGCCCATGTTACG TAGTCTCTAGGGAAGATGACT 2640

K G K A F T V N R S R L E S I P H L E G 874
 TCAAAGGAAAGGCATTCACGGTCAACAGATCTAGACTCGAATCAATTCCCCATCTTGAGG 2700

D S F R R S L G V V M S D K D V T T M F 894
 GAGATTCTTTCAGGAGATCCCTCGGTGTTGTTATGTCTGATAAGGACGTGACAACAATGT 2760

Anexo

Y Y I K G K V I N D Q V N L T E L P A N 914
TTTACTACATCAAGGGGAAAGTGATCAACGATCAGGTGAACTTGACTGAACTACCCGCCA 2820

Q H I V T V H T V Y D M A W A L R R H L 934
ATCAGCACATCGTGACTGTTCATACTGTGTATGATATGGCCTGGGCTCTTCGAAGGCACC 2880

K W S G Q W Q L I K A A Y E I M C Y P D 954
TGAAGTGGTCTGGACAGTGGCAACTCATCAAAGCTGCTTATGAAATCATGTGTTACCCAG 2940

T A A C A L R N W M D S T N F S E D H V 974
ACACCGCAGCTTGTGCATTACGGAATTGGATGGATTCAACAACTTTTCCGAAGATCATG 3000

V T Q F I S P G G T I I L E S C Y G A R 994
TTGTCACTCAGTTCATTTCTCCCGGGGAACCATCATCCTTGAGTCCTGCTATGGCGCAC 3060

M W A T G Q R L I R A G G L T E A G G P 1014
GAATGTGGGCCACAGGCCAGCGTCTCATCCGCGCTGGTGGACTCACTGAGGCTGGTGGGC 3120

Q G G V R F A G L G A R N V P W S E I L 1034
CTCAAGGGGGGGTCAAGTTTGTGGCCTTGGCGCCCGGAATGTACCTTGGAGTGAAATCC 3180

R E F M T L I S H I W S Q I K G A T V V 1054
TTAGAGAATTCATGACCTTAATTTACACATTTGGTCCCAAATTAAGGTGCAACTGTTG 3240

→ NS5 (3B-VPg)

L T A L T F Y L K R F K P R T E A K G K 1074
TCCTAACAGCACTAACCTTCTATCTCAAAGATTCAAACCCAGAACTGAAGCCAAGGGCA 3300

N K N K G A R K N T G V A L T D D E Y D 1094
AGAATAAGAACAAGGGTGCACGGAAAAATACCGGAGTCGCTTTGACAGATGATGAGTATG 3360

E W R Q Y K T E K K L D L T V E D F L Q 1114
ATGAGTGGAGACAGTACAAAACCTGAGAAGAAGCTTGACCTCACGGTCGAAGACTTCCTCC 3420

L R H R A A I G A D D T D A V K F R Y W 1134
AGCTCAGACACCGAGCTGCAATAGGCGCCGATGACACCGATGCTGTCAAATTCAGGTATT 3480

Y S E R Q R N Y H E L D D V T I I G R G 1154
GGTACTCAGAAAGGCAAAGAAATTACCATGAATTGGATGATGTCACCATTATTGGCCGTG 3540

G V R R E L I R K G P L R P R G N D F Y 1174
GTGGCGTGAGACGTGAACTCATCCGAAAGGACCTCTCCGTCCTCGCGGGAATGACTTCT 3600

→ NS6/7 (3CD-ProPol)

D E P D D W Y S E G V I D G V A H K N A 1194
ATGACGAACCGGATGACTGGTACTCTGAGGGAGTCATTGATGGTGTGCCCCACAAGAATG 3660

I V S V D D V D G M H K G Y A I H I G H 1214
CCATTGTCAGCGTGGACGACGTGGATGGCATGCACAAAGGCTATGCGATTACATCGGTC 3720

G V Y I S L K H V M A G N A R I L S E E 1234
 ACGGAGTTTACATCTCACTCAAACATGTTATGGCTGGGAATGCCAGAATCCTGTCCGGAAG 3780

P K N L T I N G E L A T F R L N S V L P 1254
 AACCCAAAAACCTCACCATCAACGGTGAACCTGGCAACATTCAGGCTAAACAGTGTCTTAC 3840

T A V P V G T S K P I K D P W G N P V S 1274
 CAACAGCAGTCCCAGTTGGAACATCCAAACCCATCAAAGACCCGTGGGGTAACCCAGTGT 3900

T D W Q F K N Y N T T S G N I Y G A C G 1294
 CAACCGATTGGCAGTTCAAAAATTACAACACCACCTCAGGAAACATCTACGGGGCCTGCG 3960

S S C S L T R Q G D C G L P Y V D D H G 1314
 GCTCATCGTGCTCGTTGACGAGACAGGGTACTGCGGTCTCCCTTATGTTCGATGACCACG 4020

V V V G L H A G S G G D K C P S R K L I 1334
 GTGTTGTTGTTGGGCTCCATGCTGGGTCTGGCGGTGACAAGTGCCCATCGCGAAAACCTCA 4080

V P Y V K V D M R I R D T S T K E Y F K 1354
 TCGTACCCTATGTCAAGGTGGACATGAGAATTCGCGACACGAGCACAAAGGAGTACTTTA 4140

D N K P T I S Y K G L L V K E T G E P R 1374
 AAGACAACAAACCAACAATCTCCTACAAAGGACTCCTTGTGAAAGAACTGGGGAACCAA 4200

T I M K G T I L H V S P A H V D D Y E E 1394
 GGACGATCATGAAAGGTACCATACTCCACGTGTGCGCCGCACACGTTGACGATTACGAGG 4260

C T H Q P A S L G A G D P R C P I S L T 1414
 AGTGCACACATCAGCCCGCTTCGCTTGGAGCAGGCGACCCAAGGTGCCCCATATCCCTCA 4320

G I M V N N L Q P Y T E A S P G P D T A 1434
 CCGGGATCATGGTCAACAACCTCCAACCCTACACTGAGGCCTCCCCAGGACCCGACACAG 4380

T L N R V S K M L T S H M E G Y V P K A 1454
 CAACACTGAATCGGGTGTCAAAAATGTTGACATCACACATGGAGGGGTATGTCCCGAAAG 4440

H K T E E D M I S A F Y M L N H D T S C 1474
 CACACAAAACCTGAGGAAGACATGATCTCTGCATTCTATATGCTCAACCACGACACATCGT 4500

G P Y I G G R K K D H V K D G V L D K N 1494
 GTGGCCCGTACATCGGTGGCCGTAAGAAAGATCATGTCAAGGATGGAGTTCTGGATAAGA 4560

L L D L L S S K W N R A K L G L A L P H 1514
 ACCTCCTTGATCTCCTTAGTTCAAAATGGAATCGTGCAAAGCTCGGGCTTGCTCTCCAC 4620

E Y A L G L K D E L R P K D K V A I G K 1534
 ACGAGTATGCCCTTGGCCTCAAAGATGAACTTCGACCAAAGACAAGGTTCGCAATCGGGA 4680

Anexo

R R L I W G C D V G V S T V C A A A F K 1554
AGCGTAGGCTTATCTGGGGATGCGATGTTGGCGTTAGCACGGTTTGTGCCGCCGCTTCA 4740

R V S E S I M A N H A L G F I Q V G I N 1574
AACGCGTTTCAGAATCAATCATGGCCAATCACGCTCTCGGATTCATCCAAGTTGGCATCA 4800

M D G P A V E D L F K R L E R P K H D R 1594
ACATGGATGGACCTGCTGTGCGAAGATCTCTTCAAAAGGCTTGAACGACCAAAGCACGATC 4860

Y C V D Y S K W D S T Q P P K V T S Q S 1614
GGTATTGTGTTGACTACTCGAAGTGGGACTCTACCCAACCACCAAAGGTAACATCTCAAT 4920

I D I L R H F T D K S P I V D S A C A T 1634
CGATTGACATCCTCAGACATTTCACTGACAAATCCCCAATTGTTGATTTCGGCCTGCGCAA 4980

L K S N P I G I F N G V A F K V A G G L 1654
CACTAAAATCAAACCAATTGGCATCTTCAACGGTGTTCATTCAAGGTGGCTGGAGGGC 5040

P S G M P L T S I I N S L N H C L M V G 1674
TACCGTCAGGTATGCCACTTACATCCATCATCAATTCATAAACCCTGCCTCATGGTGG 5100

S A V V K A L E D S G V Q V T W N I F D 1694
GCTCAGCTGTTGTCAAGGCTCTTGAGGATTCTGGCGTGCAAGTGACGTGGAACATCTTCG 5160

S M D L F T Y G D D G V Y I V P P L I S 1714
ACTCGATGGATCTGTTCACGTACGGTGATGACGGTGTCTACATCGTCCCACCGCTCATCT 5220

S V M P K V F A N L K Q F G L K P T R T 1734
CATCTGTATGCCGAAAGTCTTTGCAAACCTAAAACAGTTTGGCCTGAAACCGACCCGGA 5280

D K T D A E I T P I P T D E P V E F L K 1754
CCGACAAAACGGACGCTGAGATAACGCCTATCCCCACAGATGAACCAGTTGAGTTTCTCA 5340

R T I V R T E N G I R A L L D R S S I I 1774
AGCGGACAATAGTCCGCACCGAGAATGGCATACTGCATTGCTTGATAGATCATCCATAA 5400

R Q F Y Y I K A E N T E N W T T P P K R 1794
TTCGGCAATTCTACTACATCAAAGCAGAAAACACTGAAAATTGGACCACACCACCAAGA 5460

I D T S S R G Q Q L Y N A C L Y A S Q H 1814
GAATTGACACCTCGTCCAGGGGCCAACAACTCTACAATGCATGTCTTTATGCCAGTCAAC 5520

G E E F Y T N K I I P L I E R A I E F E 1834
ATGGAGAGGAATTCTATACCAACAAGATCATCCCCTCATCGAACGGGCGATTGAATTTG 5580

G L H I E V P E F H Q A V A A Y N G Y F 1854
AAGGTCTACACATTGAGGTCCCAGGAATTCATCAAGCTGTTGCAGCTTACAACGGTTACT 5640

N G T E G Q P N Q I A F A S G G I G L S 1874
 TCAATGGTACTGAGGGCCAACCAAACCAGATCGCTTTTGGCGAGTGGTGAATTGGGCTCA 5700

ORF2 → LC

M A T T H T L L S F D 11
 G E V F E N Z 1880
 GTGGTGAGGTGTTTGAGAATTAGCCACTATGGCTACTACTCACACGCTCCTGTCGTTTGA 5760

D L E F L L H K K D L T D L Y G E R C G 31
 CGACCTCGAATTTCTCTTACACAAGAAAGATCTGACCGATCTCTACGGAGAGAGGTGTGG 5820

T L N L V I D P Y D L F L P D D L E D E 51
 CACCCCTAACCTGGTCATCGATCCCTATGATCTCTTTCTCCCAGATGATTTAGAAGATGA 5880
 F C D D P F N C C Y C D V Y N S I G T E 71
 GTTCTGTGATGATCCTTTCAACTGCTGCTATTGTGATGTTTATAACTCTATAGGAACTGA 5940

Y S Y I D P P E F I H E E H C A T N G S 91
 ATATAGCTATATTGACCCCCCAGAGTTCATTCATGAAGAGCACTGTGCGACAAACGGGAG 6000

W P D G T P C E P I L P P F V I E G T H 111
 TTGGCCAGACGGCACTCCTTGTGAACCCATCCTGCCTCCATTCGTCATCGAGGGAACCCA 6060

H Y Y A T K P G K V V S G I L S K L G S 131
 CCACTACTACGCCACAAAACCAGGCAAGGTGGTGGTGGGATCCTGTCAAAACTCGGATC 6120

A W D P D L Q S K V G T S V N F V F R A 151
 TGCTTGGGATCCAGACCTCAGTCCAAGGTGGGCACGAGCGTGAACCTCGTGTTCCGGGC 6180

→ VP1

E S D G P S N P D V V T E E Q G T V V Q 171
 TGAATCGGATGGTCCCAGTAACCCCGATGTCGTGACGGAGGAACAAGGCACAGTGGTGCA 6240

Q Q P A P A Q T A L T T L A A A S T G K 191
 ACAACAACCAGCACCGGCACAAACAGCTCTGACGACCCTAGCAGCGGCATCAACTGGTAA 6300

T V D C E W T T F F S Y H T A V N W S T 211
 AACAGTTGACTGCGAATGGACAACATTCCTTTTCATACCATAACCGCTGTTAATTGGTCAAC 6360

T E A Q G K I L F S Q A L S P E L N P Y 231
 AACTGAAGCTCAAGGGAAAATCCTCTTCTCCCAAGCTCTTAGCCCAGAACTGAACCCCTA 6420

L K H I S S L Y S T W S G G V D V R F T 251
 CCTCAAGCACATCTCTCCCTCTACTCTACGTGGTCCGGTGGGGTGGATGTCAGGTTTAC 6480

V S G S G V F G G K L A A L I V P P G I 271
 TGTGTGGGGTCTGGTGTCTTCGGAGGAAAGCTAGCCGCGTTAATAGTACCGCCCGGGAT 6540

E P V E S P S M L Q Y P H V L F D A R Q 291
 TGAGCCTGTGAATCACCATCCATGCTACAATACCCACACGTGCTATTTGATGCTCGCCA 6600

Anexo

T E P V I F T I P D I R K T L Y H S M D 311
AACTGAACCCGTGATCTTCACCATTCCAGACATAAGGAAGACCCTCTACCACTCAATGGA 6660

D T D T T K L V I M V Y N E L I N P Y E 331
TGACACTGATACAACAAAACCTTGTCATCATGGTTTATAACGAGCTTATAAACCCATACGA 6720

Q A D I K S S C S I T V E T R P S T D F 351
GCAAGCTGACATCAAATCAAGTTGCTCCATCACTGTTGAGACCAGACCATCTACTGACTT 6780

T F S L L K P P G S L L K H G S V P S D 371
CACCTTTTCCTTACTTAAACCCCCGGTTCTCTCTTGAAACATGGTTCCGTACCATCTGA 6840

L I P V N S R H W M G N R W W T T I D G 391
TTTGATCCCAGTAAACTCAAGGCACTGGATGGGAAACCGTTGGTGGACAACCATCGACGG 6900

F V V Q P R V F Q S N R H F D F D S T T 411
TTTTGTTGTCCAGCCCAGGTGTTCCAGTCAAACAGGCACTTTGACTTTGATTTCGACTAC 6960

T G W S T P Y F T P I E V T V K P I S G 431
AACCGGTTGGTCAACCCCTTACTTCACTCCCATCGAGGTAACGGTTAAACCAATCTCCGG 7020

S Q Y L Q V T D A E K Q L V P G I P D G 451
CAGTCAGTACCTCCAGGTAACCTGATGCTGAGAAACAACCTGGTGCCTGGGATCCCTGATGG 7080

W P D T T I P E N T I M S N G K Y A Y T 471
TTGGCCTGACACAACCATCCCTGAGAACACCATAATGTCCAATGGTAAGTATGCTTACAC 7140

M D Q D K E N P K I E Q N D T H F K G F 491
TATGGATCAGGACAAGGAAAACCCCAAATGAAACAAAACGACACCCATTTCAAAGGGTT 7200

Y I M G N L M T R A D N K S T N Q E E M 511
TTACATAATGGGCAACCTCATGACAAGGGCTGATAATAAATCCACAAACCAAGAAGAAAT 7260

Q R T S V T L F A T N A K M N S N N K L 531
GCAACGCACTTCGGTGACGCTATTCGCAACAAACGCAAAGATGAATTCTAACAACAAATT 7320

D P S H K I S S N S L L L Y N A D N R E 551
GGATCCAAGTCACAAAATTAGCTCCAACCTCACTTCTCCTCTACAATGCTGACAACAGAGA 7380

V M T K T E V A H S T M S Q F G Y V L V 571
AGTCATGACAAAAACTGAAGTGGCTCATTCAACCATGTCTCAGTTTGGTTATGTGCTCGT 7440

D E K P I G S E S S I V V R I A T L P E 591
CGATGAGAAACCAATTGGGAGCGAATCCTCGATAGTTGTGAGGATCGCAACGCTACCAGA 7500

A F A N G G N F P V F F R N K I Q I G Y 611
GGCATTGCTAATGGTGGCAACTTCCCAGTCTTCTTTAGGAACAAAATCCAAATTGGGTA 7560

F D R Q H T E C W N S Q I L M T S R R L 631
 CTTCGACAGACAACACACCGAATGCTGGAACAGCCAAATCCTGATGACATCACGGAGATT 7620

A E N H Y S L P P D S L A I Y R I T D S 651
 GGCAGAGAACCCTACTCCCTGCCCCCGACTCCCTTGCTATATACAGGATCACCGATT 7680

S S S W F D L G I D H D G F S Y V G A S 671
 TAGCTCCAGCTGGTTTGATCTCGGTATCGACCATGATGGGTTTCAGCTACGTTCGGTTCGCT 7740

T L P E F N F P L T A T F M G V Q L A K 691
 CACTCTCCCTGAATTTAACTTTCTCTTACTGCGACCTTCATGGGAGTGCAGCTGGCTAA 7800

ORF3 → VP2

M N Y A N F 7

I K L A S K V K I D R T T V Z 705
 GATAAAGCTGGCGTCTAAGGTCAAAATTGACAGAACAACAGTATGAAATTATGCGAATTTT 7860

G L D L F K S I T D A A Y E G K R I D L 27
 GGATTAGACCTATTCAAGTCAATCACAGACGCTGCCTATGAGGGAAAGCGGATTGACCTC 7920

A S R N L A L K N R A L D T E R D Y N Y 47
 GCTAGCAGGAATCTGGCTCTCAAAAATCGCGCTCTCGACACAGAGAGGGATTACAATTAC 7980

A R L A F E K Q K F E T N A D L R V H G 67
 GCCAGGCTAGCGTTTGAGAAACAAAATTTGAAACCAATGCCGATTTGCGAGTTCACGGT 8040

D L Y R M Q A L R A A G Y R F N P Y S N 87
 GACCTGTATCGCATGCAGGCCCTGCGCGCTGCTGGGTACAGGTTTAACCCTTACTCCAAC 8100

G N Q I Y A D E A A A A N L H S F Y S F 107
 GGTAACCAAATTTACGCGGACGAAGCTGCCGCTGCAAATCTGCACTCTTTCTATAGCTTC 8160

Y K T D Z 110
 TACAAAACGGACTAGTTCCAATCTGCTTAACAATTTCTCTATCCTCTAGTACATGATTTA 8220

CTTCCTTTTATCAGTTAATAGTTAGTTAATATAAGTGTTTTTAGGTTTTACCTCTTTAC 8280

TAATCAACTACTTAATGGGATACTTGTTCCTTAGTACTTTAGACTGTAGTATAGTTTAATT 8340

RaV-3' → → Vector *pGEM[®]-T Easy*

GGTAGGTTGCATTAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAATCGAATTCCCGCGGCCGCTCTAGAAGT 8400

ACTCTCGAGAAGCTTTTTGAATTCTTTGGATCCACTAGTGTTCGACCTGCATAGCTTGAGT 8460
 ^*Sa*II

←Inicio transcripción SP6

ATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGA 8520
 Promotor SP6

AATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCC 8580
 TGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTC 8640

CAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGC 8700
 GGTTCGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTT 8760
 CGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA 8820
 GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAA 8880
 AAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAAT 8940
 CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCC 9000
 CCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC 9060
 GCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGT 9120
 TCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGAC 9180
 CGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCG 9240
 CCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA 9300
 GAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACCTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGC 9360
 GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAA 9420
 ACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAA 9480
 GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAAAC 9540
 TCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTA 9600
 AATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGT 9660
 TACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATA 9720
 GTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC 9780
 AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAC 9840
 CAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAG 9900
 TCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAAC 9960
 GTTGTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTC 10020
 AGTCCGGTTC CCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCG 10080
 GTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTC 10140
 ATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGT CATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT 10200
 GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGC 10260
 TCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTC 10320
 ATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC TCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCC 10380
 AGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGC 10440
 GTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACA 10500
 CGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGT 10560
 TATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTT 10620
 CCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGT 10680
 AAGGAGAAAATACCGCATCAGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTA 10740

AATTTTGTAAATCAGCTCATTFTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTAT 10800
AAATCAAAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCA 10860
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGC 10920
CCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAGCACTA 10980
AATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTG 11040
GCGAGAAAGGAAGGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG 11100
GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCC 11160
ATTGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTAT 11220
TACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGT 11280
TTTCCCAGTCACGACGTTGTA AACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATA 11338

Promotor T7