

UCH-FC
DOC - Microbiología
B275
C/L

**Estudio del mecanismo de iniciación de la
traducción del mRNA del virus de la hepatitis C:
Identificación de un posible blanco terapéutico.**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias Con Mención En Microbiología



Facultad de Ciencias

Por

María Inés Barría Cárcamo

Noviembre, 2008

Director de Tesis Dr: Marcelo López Lastra

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

María Inés Barriá Cárcamo

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el 25 de abril de 2008.

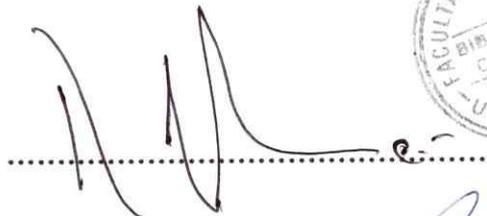
Director de Tesis:

Dr. Marcelo López-Lastra



Comisión de Evaluación de la Tesis

**Dr. Romilio Espejo
(Presidente)**



Dr. Oscar León

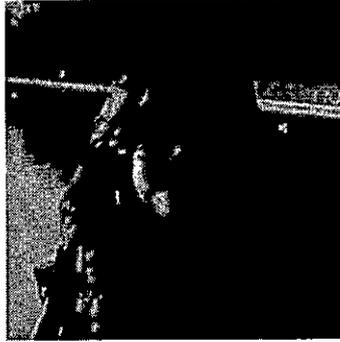


Dr. Jonás Chnaiderman





A mi familia, Nono, Sebas, Jose
y en especial a mis padres Tomás e Inés



María Inés Barría Cárcamo, nació en Puerto Montt el 22 de noviembre de 1977. Sus padres son Tomás Barría e Inés Cárcamo y sus hermanos Tomás y Sebastián. Puertomontina de corazón, vivió hasta cuarto medio en esa hermosa ciudad del Sur, junto a su gran familia. Desde pequeña fui curiosa, siempre se preguntó el porque de las cosas y sigue preguntándose, en realidad en todos los ámbitos no sólo en ciencia. Es así, que decidió ser científica e ingresó a la Universidad Católica licenciándose en Biología. En la universidad aprendió que la ciencia era muy extensa y que le gustaban muchas materias, pero como no podía vivir tantos años para aprender todo tenía que enfocarse en lo que más le gustaba, es así que varios temas le llamaron la atención y durante el transcurso de estos años ha intentado aprender un poco sobre ellos, es así que antes de ingresar al doctorado realizó investigación en neurociencia y posteriormente decidió que quería entender un poco como funcionaban los virus, tema en el cual desarrolló su tesis doctoral. Los años del doctorado en general fueron buenos, aprendió nuevas cosas, conoció a nuevas personas y varios países haciendo pasantías y cursos. Por lo tanto, está conforme con lo que ha hecho, siempre se quiere hacer más, pero no siempre resulta. Ahora, desea seguir compartiendo con su familia y amigos, poder formar su propia familia, y continuar aprendiendo, para luego poder transmitir toda esta mezcla de conocimientos y experiencias con el objetivo de tratar de hacer algún aporte a esta sociedad aunque sea con un grano de arena.

Agradecimientos



Deseo expresar mis agradecimientos a quienes estuvieron vinculados al desarrollo de esta tesis.

En primer lugar al programa de Doctorado en Ciencias mención en Microbiología de la Universidad de Chile por darme la oportunidad de realizar este doctorado, en especial al Dr. Eugenio Spencer por su patrocinio inicial y a los miembros de mi comisión. A los organismos que me otorgaron financiamiento económico, los cuales fueron fundamentales para poder realizar esta tesis; al gobierno de Chile a través de la beca CONICYT y al gobierno Francés a través de la beca IRD, que me permitió financiar mi último año de la tesis doctoral.

Agradezco a mi tutor de tesis Dr. Marcelo López Lastra por recibirme en su laboratorio, por su ayuda en guiar esta tesis y en su revisión. Al Dr. Alejandro Soza por proporcionar las muestras de los pacientes, material esencial para esta tesis. A todos mis compañeros de laboratorio, por su amistad; en especial a Ursula León y Karla Pino por su ayuda en procesar la gran cantidad de muestras durante estos años, a Jorge Vera por realizar los SSCP, a Maricarmen por su ayuda en la revisión de esta tesis. También a Angel Gonzáles del centro de bioinformática por realizar el análisis de simulación de dinámica molecular y por su apoyo en la discusión y comprensión del tema. Al Dr.

Octavio Monaterio por su ayuda en el análisis y discusión de los experimentos de dicroísmo circular y a David de su laboratorio por su ayuda cuando realicé los experimentos. En especial quiero dar las gracias a Dra. Valeska Vollrath y Dra. Pilar Carvallo por su apoyo personal y académico. Agradezco a mi actual laboratorio y a todos los anteriores en los cuales he trabajado; en cada uno de ellos aprendí y la suma de estos conocimientos me han hecho la investigadora que soy.

Agradezco con todo mi corazón a mi numerosa familia, en especial a mis padres Tomás e Inés y a mis hermanos Tomás y Sebastián por todo su apoyo durante estos años, a la Mami Tomasa que no pudo ver este momento; mi familia es la que me enseñó todos los valores que poseo, entre ellos el amor, perseverancia, perfeccionismo y entrega hacia lo que me es importante, siempre más y mejor. Gracias a ellos por aconsejarme, acompañarme y enseñarme que tanto el trabajo como el amor hacia la familia son igual de importantes para una vida feliz. Gracias a mi mamá por toda la comida deliciosa que me envió desde Puerto Montt, así tuve más tiempo para trabajar junto a una pizca del sabor y cariño del sur. Especiales gracias a José Luis por su amor, apoyo y paciencia durante el transcurso de esta tesis y por los comentarios y discusiones de este trabajo. Finalmente, gracias a todos mis amigos, especialmente a Marcelo Chacón por revisar la tesis y a todos los que me han acompañado durante estos años.



INDICE



RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Conceptos generales.....	9
1.2. Clasificación y variabilidad genética de VHC.....	13
1.3. Organización del genoma de VHC y características de las proteínas virales.....	15
1.4. Ciclo replicativo de VHC.....	19
1.5. Mecanismos que participan en la iniciación de la traducción de VHC.....	22
1.5.1. Mecanismos de iniciación de la traducción en células eucariontes.....	22
1.5.1.1. Iniciación de la traducción cap-dependiente.....	23
1.5.1.2. Iniciación de la traducción cap-independiente.....	24
1.6. IRES de VHC y su mecanismo de iniciación de la traducción.....	30
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.1. Pacientes.....	37



2.2. Recuperación del plasma y separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).....	38
2.3. Extracción del RNA total.....	39
2.4. RT-PCR.....	40
2.5. Cultivo celular.....	41
2.6. Secuenciación del producto de amplificación del 5'UTR.....	41
2.7. Análisis de las cuasiespecies de VHC mediante conformación de polimorfismo de hebra simple (SSCP).....	42
2.8. Amplificación del IRES de VHC y construcción de los vectores bicistrónicos.....	43
2.9. Transcripción <i>in vitro</i>	44
2.10. Traducción <i>in vitro</i> utilizando lisado de reticulocito de conejo (RRL).....	45
2.11. Preparación de extractos de traducción de células Huh-7.....	46
2.12. Traducción <i>in vitro</i> utilizando extractos de traducción de células Huh-7.....	47
2.13. Detección de las actividades de las luciferasas Renilla y Firefly.....	47
2.14. Generación de plasmidios bicistrónicos que contienen los IRES mutantes de VHC.....	48
2.15. Transfección en células Huh-7 de RNAs bicistrónicos que contienen los IRES mutantes de VHC en el dominio IIIId.....	51

2.16. Simulación de dinámica molecular.....	51
2.17. Dicroísmo circular.....	53
3. RESULTADOS.....	54
3.1. Detección de RNA de VHC en Plasma y PBMC de pacientes chilenos con infección crónica por VHC.....	54
3.2. Análisis de las cuasiespecies de VHC presentes en plasma y PBMC mediante conformación de polimorfismo de hebra simple (SSCP).....	57
3.3. Análisis de las secuencias del 5'UTR de VHC.....	62
3.4. Comparación de las eficiencias traduccionales <i>in vitro</i> de los IRES de VHC recuperados de plasma y PBMC de pacientes con infección crónica por VHC.....	76
3.5. Caracterización de los IRES clonados en el vector Dual Luciferasa mediante secuenciación.....	85
3.6. Eficiencia traduccional <i>in vitro</i> de las mutaciones que ocurren naturalmente en el IRES de VHC.....	90
3.7. Estudios de simulación de dinámica molecular del dominio III _d del IRES de VHC. Efecto de las mutaciones G266A, G268U y G266A-G268U.....	102



3.8. Dicroísmo circular de los RNA del dominio III _d . Comparación de la estructura nativa con los mutantes G266A, G268U y G266A-G268U.....	116
4. DISCUSIÓN.....	123
4.1. Presencia de RNA de VHC en células mononucleares de sangre periférica en pacientes crónicamente infectados con el virus....	124
4.2. Eficiencia traduccional <i>in vitro</i> de variantes naturales del IRES de VHC aislados a partir de muestras clínicas.....	131
4.3. Estructura del dominio III _d del IRES de VHC y su relación con la actividad traduccional <i>in vitro</i>	136
5. CONCLUSIONES.....	143
6. ANEXOS.....	146
7. PUBLICACIONES GENERADAS DURANTE ESTA TESIS.....	150
8. REFERENCIAS.....	151



LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Organización del genoma y procesamiento de la poliproteína de VHC.....	19
Figura 2.	Ciclo replicativo de VHC.....	22
Figura 3.	Representación esquemática del inicio de la traducción cap-dependiente en eucariontes.....	28
Figura 4.	Diagrama esquemático del inicio de la traducción mediado por un sitio de entrada interno de ribosomas o IRES.....	29
Figura 5.	Esquema de un mRNA bicistrónico.....	29
Figura 6.	Estructura secundaria del 5' UTR del genoma de VHC y el modelo de la formación del complejo de iniciación.....	33
Figura 7.	Detección de RNA de VHC en plasma y PBMC de pacientes crónicamente infectados con VHC.....	55
Figura 8.	Análisis por SSCP del 5'UTR de VHC en pacientes en los cuales se detecta RNA sólo en plasma (Grupo 1 de SSCP).....	60
Figura 9.	Análisis por SSCP del 5'UTR de VHC en pacientes en que se detecta RNA en plasma y PBMC (Grupo 2 y 3 de SSCP).....	61
Figura 10.	Análisis por SSCP del 5'UTR de VHC en pacientes en que se detecta RNA en plasma y PBMC (Grupo 2 y 3 de SSCP).....	62
Figura 11.	Alineamiento de las secuencias del 5'UTR de plasma y PBMC de pacientes pertenecientes a los distintos grupos de SSCP...	75
Figura 12.	Plasmidios bicistrónicos y la actividad traduccional <i>in vitro</i> del IRES de VHC 1b en RRL y extractos Huh-7.....	82
Figura 13.	Resumen de las eficiencias traduccionales <i>in vitro</i> en RRL de los IRESs de VHC recuperados de los virus presentes en los pacientes y las mutaciones encontradas en estos IRES.....	83
Figura 14.	Actividad de RLuc y FLuc de los RNA bicistrónicos con los IRESs de VHC recuperados de los virus presentes en las muestras clínicas de los pacientes en RRL.....	84

Figura 15.	Esquema del modelo de la estructura secundaria del 5'UTR de VHC con las mutaciones encontradas en los IRESs de los virus recuperados de los pacientes que se utilizaron en los experimentos de traducción <i>in vitro</i>	89
Figura 16.	Eficiencia traduccional <i>in vitro</i> de los IRESs con mutaciones en el dominio II identificadas en los virus presentes en los pacientes con infección crónica por VHC.....	97
Figura 17.	Eficiencia traduccional <i>in vitro</i> de los IRESs con mutaciones en el dominio III identificadas en los virus presentes en los pacientes con infección crónica por VHC.....	98
Figura 18.	Eficiencia traduccional <i>in vitro</i> de los IRESs con mutaciones en el tallo-bucle IIIId identificadas en los virus presentes en los pacientes con infección crónica por VHC.....	99
Figura 19.	Eficiencia traduccional <i>ex vivo</i> de los IRESs con mutaciones en el tallo-bucle IIIId identificadas en los virus presentes en los pacientes con infección crónica por VHC.....	100
Figura 20.	Eficiencia traduccional <i>in vitro</i> de los IRESs con mutaciones en el dominio IV identificadas en los virus presentes en los pacientes con infección crónica por VHC.....	101
Figura 21.	Modelo de la estructura de los subdominios del tallo-bucle IIIId.....	110
Figura 22.	Comparación estructural de los modelos del dominio IIIId nativo.....	111
Figura 23.	Análisis estructural comparativo de los modelos del dominio IIIId nativo y mutantes del IRES de VHC.....	112
Figura 24.	Análisis estructural comparativo de las conformaciones del bucle hexanucleótido del dominio IIIId del IRES de VHC nativo y mutantes de una estructura promedio de la simulación de DM.....	113
Figura 25.	Puente de hidrógeno adicional generado en la doble mutante G266A-G268U.....	114
Figura 26.	Apilamiento de las bases en las posiciones 265-266 y 266-267 en el bucle apical del dominio IIIId del IRES de VHC durante la simulación de DM.....	115

Figura 27.	Espectros de DC del RNA del dominio IIIId nativo del IRES de VHC en ausencia o presencia de magnesio.....	120
Figura 28.	Espectros de DC de los RNAs del dominio IIIId del IRES de VHC.....	121
Figura 29.	Espectros de DC de los RNAs del dominio IIIId nativo y G266A-G268U del IRES de VHC.....	122

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Detección de RNA del 5'UTR de VHC en muestras de plasma y PBMC de individuos crónicamente infectados con el virus.....	56
Tabla 2.	Oligonucleótidos usados en este estudio.....	146
Tabla 3.	IRES de VHC recuperados de virus circulantes en pacientes con infección crónica por VHC y clonados en el vector bicistrónico Dual Luciferasa.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS

COM: Centro de masa

CSFV: Virus de la peste porcina clásica ("classical swine fever virus")

DC: Dicroísmo circular

DC SIGN: Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin

DEPC: Dietil pirocarbonato

DM: Dinámica molecular

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminatetraacético

eIF: Factor de iniciación eucariótico

FBS: Suero fetal de bovino

FGF-2: Factor 2 de crecimiento de fibroblasto

FLuc: Luciferasa de Firefly

HEPES: Ácido N-2-hidroxietilpiperazina n-2-etanosulfónico

HN: Hexanucleótido

hnRNP-L: Ribonucleoproteína heterogéneo nuclear L

IRES: Sitio interno de entrada del ribosoma

ITAF: Factor transactivador de IRES

Kb: Kilo-bases

L SIGN: Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin

MOPS: Ácido 4-morfolinopropanosulfónico

mRNA: RNA mensajero

NCR: Región no codificante

NMR: Resonancia magnética nuclear

NS: No estructural

nt: Nucleótido

ORF: Marco de lectura abierto

pb: pares de bases

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Tampón salino fosfato

PCBP-2: Proteína de unión a poli (rC) 2

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PTB: Proteína de unión al tracto de polipirimidina

rASGP: Receptor de asialoglicoproteína

RdRp: RNA polimerasa RNA dependiente

RE: Retículo endoplasmático

LDL: Receptor de lipoproteínas de baja densidad

RLU: Unidades relativas de luminiscencia

RLuc: Luciferasa de Renilla

RMSD: Desviación de la raíz cuadrada media

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA: RNA ribosomal

RRL: Lisado de reticulocito de conejo

RT: Transcripción Reversa

RT-PCR: Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa

SR-BI: Receptor scavenger clase B tipo I

SSCP: Conformación de polimorfismo de hebra simple

TBE: Tris-acetato-EDTA

tRNAi: RNA de transferencia iniciador

UTR: Región no traducida

VDVB: Virus de la diarrea viral bovina

VGB-B: Virus GB-B

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

RESUMEN

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus de RNA de hebra positiva con envoltura, que pertenece al género Hepacivirus de la familia *Flaviviridae*. La infección por VHC frecuentemente es crónica, siendo la principal causa de carcinoma hepatocelular y de trasplante de hígado entre adultos de países occidentales. Actualmente no existe un tratamiento eficaz ni vacuna para prevenir la infección causada por el virus. Además, su estudio y la generación de nuevos tratamientos se han visto limitados por la falta de un sistema eficiente de replicación del virus. El VHC es principalmente hepatotrópico, sin embargo, hay considerable evidencia de la existencia de sitios de replicación extra-hepáticos, como por ejemplo las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

El VHC se caracteriza por poseer un alto grado de heterogeneidad genética, lo cual resulta en la existencia de diversos genotipos y subtipos. En Chile, el genotipo predominante es el 1b, el cual presenta una alta resistencia a la terapia antiviral y confiere un riesgo mayor para desarrollar carcinoma hepatocelular. Además, en nuestro país la mayoría de los pacientes han adquirido el virus a través de transfusiones de sangre, rara vez están co-infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y debido al alto costo de la terapia generalmente no han sido sometidos a tratamiento antiviral. Estos

antecedentes le otorgan a la población Chilena infectada con VHC características únicas; por tanto, consideramos importante caracterizar el virus circulante en esta población y establecer la existencia de posibles reservorios extra-hepáticos para el virus VHC. Con este objetivo, se evaluó la prevalencia de RNA de VHC en PBMC y plasma de pacientes chilenos crónicamente infectados con el virus. En los individuos analizados, en la mayoría se detectó RNA viral en PBMC (73%). Los resultados de ensayos de conformación de polimorfismo de hebra simple (SSCP) y de secuenciación de los 5'UTR, mostraron que existen diferencias entre las cuasiespecies virales presentes en plasma y en PBMC; en consecuencia, se generó nueva evidencia que apoya la hipótesis que los PBMC podrían representar un reservorio viral y que sólo ciertas cuasiespecies de VHC circulantes en plasma están presentes en PBMC.

Con el propósito de determinar si las cuasiespecies virales recuperadas desde plasma y PBMC presentan capacidades similares de replicación, se procedió a estudiar el inicio de la síntesis de proteínas del mRNA de VHC, debido a que es uno de los pasos limitantes en el ciclo replicativo del virus. El inicio de la traducción de VHC es mediado por un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES), el cual recluta la subunidad 40S ribosomal sin utilizar los factores de iniciación canónicos; esta característica del mRNA de VHC lo hace único entre los mRNA

eucarióticos e incluso entre los mRNA de origen viral que contienen IRES. Por lo tanto, con el objetivo de establecer las eficiencias traduccionales de IRES de VHC aislados desde virus presentes en plasma y PBMC de pacientes chilenos con infección crónica por este virus; los IRES se clonaron en un vector bicistrónico dual luciferasa, se transcribieron *in vitro* y los RNA bicistrónicos se utilizaron en experimentos de traducción *in vitro*. Nuestros resultados indican que la mayoría de los IRESs aislados desde las muestras clínicas corresponden al genotipo 1b y presentan actividad traduccional semejante al control positivo, el IRES 1b nativo. Sin embargo, algunos aislados presentaron diversas mutaciones y una actividad traduccional reducida al compararlas con el IRES 1b. Con el fin de establecer si las mutaciones identificadas afectan la actividad traduccional del IRES de VHC, se procedió a realizar experimentos de mutagénesis sitio dirigida introduciendo cada una de ellas o en combinación en el IRES nativo 1b. Utilizando esta aproximación, se identificaron diversas mutaciones puntuales capaces de inhibir la actividad traduccional del IRES de VHC. Las mutaciones que inhibieron más drásticamente la eficiencia traduccional del IRES se localizaron en el dominio IIIId, región que está involucrada en la unión de la subunidad 40S ribosomal, por lo cual se procedió a estudiar con mayor detalle las mutaciones G266A, G268U y la doble mutación G266A/G268U. Con el propósito de determinar si estas mutantes producen una inhibición de la

actividad traduccional del IRES debido a un cambio estructural de esta región, se realizaron estudios bioinformáticos de simulación de dinámica molecular y se estudió la estructura del RNA del dominio III_d mediante difracción circular. En conjunto; los resultados generados en este trabajo de tesis permiten concluir que a diferencia de lo propuesto para la mayoría de los IRES virales cuya actividad es dependiente sólo de su estructura, la actividad traduccional del IRES de VHC es dependiente tanto de la estructura como de la secuencia primaria del dominio III_d. Además, los resultados permiten sugerir que la secuencia primaria de la región del dominio III_d participa en la interacción específica con elementos requeridos para la iniciación de la traducción del mRNA viral de VHC, y por lo tanto, puede ser considerado como un blanco terapéutico para el desarrollo de nuevos antivirales que inhiban esta interacción. Adicionalmente, nuestros resultados indican que en la mayoría de los pacientes analizados (69%) se encuentran diferencias en las eficiencias traduccionales entre los IRES aislados desde el plasma y los obtenidos desde PBMC. Esta observación sugiere que en gran parte de los individuos infectados VHC es capaz de infectar diferentes compartimentos biológicos.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) is an enveloped; positive single-stranded RNA virus of the *Flaviviridae* family, classified within the Hepacivirus genus. HCV is a significant etiologic agent of chronic liver disease and is the most frequent indication for liver transplantation in adults in western countries. To date, there is no effective treatment or vaccine against HCV. The search for and validation of novel HCV drugs is severely hampered by the lack of a robust cellular system that supports virus replication. These facts qualify HCV as a human pathogen of extreme medical significance. HCV is primarily hepatotropic, but there is mounting evidence suggesting the possibility of extrahepatic virus replication such as in peripheral blood mononuclear cell (PBMCs).

HCV is characterized by a high degree of genetic heterogeneity resulting in the existence of various genotypes and subtypes. In Chile, the HCV genotype 1b is predominant among the infected population, the implication of these observations may be important as genotype 1b infections shows higher resistance to antiviral therapy and confers greater risk for development of hepatocellular carcinoma. Given this scenario, we were intrigued by the possibility of an extrahepatic reservoir for HCV since no study had been conducted to address this issue among the infected Chilean population who have mostly acquired the virus through blood transfusions, are rarely co-infected with human

immunodeficiency virus (HIV), and due to the high cost of antiviral therapy are generally naive to treatment. With this purpose, we evaluated the prevalence of HCV RNA in plasma and PBMC of Chilean patients chronically infected with the virus. The bulk of patients harbored detectable amounts of viral RNA in PBMCs (73%) suggesting that infection of these cells is a frequent event among chronically infected HCV patients. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and 5'UTR sequencing revealed the existence of clear HCV *quasispecies* differences between plasma and PBMC. In consequence, this work generated new evidence to support the notion that only certain HCV quasispecies are capable to be present in PBMC and the possibility that PBMC is a viral reservoir.

In order to determine whether the viral quasispecies recovered from plasma and PBMC of patients presents similar capacity of replication, the study focused on mRNA translation, because this process is considered one of the limiting steps in the HCV replicative cycle. Translation initiation of the viral mRNA is mediated by an internal ribosome entry site (IRES), which recruits the 40S ribosomal subunit in a cap-independent fashion without the need of any canonical initiation factor; this feature exhibited by the HCV IRES makes it unique among eukaryotic mRNA and mRNAs from viral origin that harbor IRES elements. Therefore, in order to study the translational efficiencies of

HCV IRES isolated from plasma and PBMC of Chilean patients with chronic infection by this virus; IRES isolated were cloned in a dual luciferase bicistronic vector; *in vitro* transcribed and the bicistronic RNAs generated from these constructs were used in *in vitro* translation experiments. Results show that the majority of the IRES isolated from clinical samples corresponds to the genotype 1b and present translational activity similar to the positive control, the wild type 1b IRES. However, IRESs which exhibited a translational activity lower than the wild-type 1b IRES were also isolated. We next sought to establish the relation between nucleotide substitution and IRES activity. Thus, we introduced the identified mutations in the 1b wild type background by site-directed mutagenesis. Using this approach, we successfully identified a number of nucleotide substitutions that correlated with a reduced IRES activity. Mutations that inhibited most dramatically the IRES translational efficiency were located in the stem-loop IIIId that is involved in the binding of 40S ribosomal subunit, therefore we proceeded to study in greater detail the mutations G266A, G268U and the double mutation G266A/G268U. To determine whether these mutants produce an inhibition of IRES translational activity due to a structural change in this region, bioinformatics studies of molecular dynamics simulation and RNA structure of domain IIIId by circular dichroism were conducted. Bioinformatics studies strongly suggested that indeed stem-loop IIIId

harbouring the double mutation was similar to stem-loop IIIId from the wild type 1b HCV-IRES. Encouraged by these findings we conducted a series of circular dichroism analysis of stem-loop IIIId. We concluded that stem-loop IIIId from both the double mutant and the wild type 1b IRES are similar under all tested experimental settings. Thus, our results support the notion that HCV-IRES activity is not only dependent on the overall RNA structure of stem-loop IIIId but also the primary sequence of this domain plays an important role in HCV IRES-mediated translation initiation. Therefore, we propose that stem loop IIIId meets the needed standards to be considered as a therapeutic target for the development of new antiviral molecules. In addition, our results indicate differences between the IRES translational efficiencies isolated from plasma and PBMC in the majority of individuals tested (69%). This observation suggests that HCV is capable of infecting different biological compartments.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Conceptos generales.

Desde su descubrimiento y caracterización en 1989, el virus de la hepatitis C (VHC) ha generado un alto impacto en la salud pública a nivel mundial. Principalmente, porque VHC persiste en la mayoría de los pacientes infectados siendo una de las principales causas de hepatitis crónica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (Choo y col., 1989; Hoofnagle, 1997). La Organización Mundial de la Salud ha estimado que actualmente el 3% de la población mundial (170 millones de personas) está infectada con este virus. Además, es importante señalar que la infección crónica por VHC es uno de los principales indicadores para trasplante hepático en Estados Unidos (Rakela y Vargas, 2002) y en Chile (Hepp y col., 2002; Soza y Lopez-Lastra, 2006). Actualmente no existe una vacuna contra VHC y el tratamiento más efectivo consiste en la administración de peginterferón en combinación con el nucleósido sintético ribavirina; no obstante, a menudo el tratamiento es difícil de tolerar y sólo el 50% de los pacientes presentan una respuesta virológica sostenida (Schalm y col., 1999; Fried y col., 2002). Frente a esta notoria limitación en el tratamiento se suma el hecho de que los mecanismos de replicación y de persistencia de VHC se encuentran pobremente caracterizados, principalmente debido a la falta de un sistema de cultivo

celular eficiente, esto ha impedido esclarecer el ciclo replicativo del virus y el desarrollo de agentes antivirales y vacunas (Bartenschlager, 2002). Esta limitación está siendo superada, ya que recientemente dos grupos, de manera independiente, han desarrollado métodos para estudiar en cultivo todas las etapas del ciclo replicativo de VHC (Lindenbach y col., 2005; Wakita y col., 2005).

VHC replica principalmente en hepatocitos, sin embargo, hay evidencias que sugieren la posibilidad de replicación extrahepática. Esto está apoyado por estudios de pacientes infectados con VHC transplantados de hígado, en los cuales se observa una re-infección de este órgano con VHC (Féray y col., 1994; Laskus y col., 2002a). Además, el RNA genómico de VHC se ha detectado no sólo en hígado de pacientes crónicamente infectados, sino también en médula ósea (Gabrielli y col., 1994; Galli y col., 1995), líquido cefalorraquídeo (Laskus y col., 2002b; Bagaglio y col., 2005;), tejido cerebral (Radkowski y col., 2002), células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (Lerat y col., 1996; Laskus y col., 1998b; Bagaglio y col., 2005; Di Liberto y col., 2006), entre otros tejidos (Blackard y col., 2006). En PBMC, algunos estudios han detectado replicación particularmente entre pacientes inmunodeprimidos, como por ejemplo pacientes co-infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y pacientes sometidos a trasplantes hepáticos (Laskus y col., 1998b; Radkowski y col., 1998;

Blackard y col., 2006; Blackard y col., 2007). La replicación extrahepática de VHC además está apoyada por estudios que muestran que diferentes tipos de células linfoides son susceptibles a la infección por VHC y que el virus derivado de estos cultivos es infeccioso (Cribier y col., 1995; MacParland y col., 2006). Otra evidencia es que células hematopoyéticas aisladas a partir de sangre de pacientes infectados con VHC mantienen niveles detectables de RNA viral de hebra positiva y negativa (intermediario de replicación) semanas después de ser inyectadas en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (Bronowicki y col., 1998). Estudios recientes también indican que VHC persiste, aunque en niveles muy bajos, en células linfoides después de la aparente resolución clínica y virológica de la enfermedad, lo cual ha permitido sugerir que los PBMC podrían ser un reservorio natural del virus (Pham y col., 2004; Radkowski y col., 2005). Este concepto ha sido apoyado por estudios en los cuales se ha demostrado compartimentalización de VHC, encontrándose diferencias en las secuencias virales aisladas desde compartimentos hepáticos y extrahepáticos (Laskus y col., 1998a; Bagaglio y col., 2005).

La importancia de la infección de PBMC por VHC, así como la posible implicancia de la replicación extrahepática en la patogénesis asociada a la infección por VHC es un tema de debate (Zignego y Brechot, 1999; Blackard y col., 2006). Sin embargo, la existencia de distintos

compartimentos biológicos como los PBMC que puedan generar virus infeccioso, puede tener profundas consecuencias patológicas aún no determinadas en la historia natural de VHC.

En Chile, como en el resto del mundo, la hepatitis crónica asociada a VHC es una de las causas más importantes de mortalidad y morbilidad relacionadas con el hígado, con una prevalencia estimada de la infección de 1,15% en la población general (Gonzales y col, 2005; Soza y Lopez-Lastra, 2006). En la población chilena el genotipo 1b de VHC es el predominante (Soza y col., 2004; Soza y Lopez-Lastra, 2006). La importancia de esta observación es que este genotipo presenta una alta resistencia a la terapia antiviral y confiere un mayor riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular (Farci y Purcell, 2000). Debido a que no se ha realizado ningún estudio detallado de esta población, es interesante investigar la diversidad de virus circulantes en las muestras clínicas de pacientes con infección crónica de VHC y estudiar la posibilidad de que exista un reservorio extrahepático viral. Además, la población chilena infectada crónicamente por VHC presenta características únicas: la mayoría de los pacientes han adquirido el virus a través de transfusiones de sangre y rara vez están co-infectados con VIH (Soza y Lopez-Lastra, 2006). Sumado a esto, los pacientes generalmente no han recibido tratamiento antiviral debido al alto costo de la terapia.

1.2 Clasificación y variabilidad genética de VHC.

VHC pertenece al género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae* la cual, además incluye los flavivirus clásicos (por ejemplo los virus causantes de dengue y de la fiebre amarilla), pestivirus (por ejemplo el virus de la diarrea viral bovina) y los virus GB (A y C) (Robertson y col., 1998).

Como la mayoría de los virus de RNA, VHC se caracteriza por poseer un alto grado de heterogeneidad genética. La diversidad de secuencia es generada continuamente durante la replicación viral debido a que la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) viral no posee actividad correctora 3'-5' exonucleasa (Domingo y col., 1985). La heterogeneidad de VHC se describe bajo los conceptos de genotipos y cuasiespecies. La comparación de las secuencias nucleotídicas de variantes de VHC recuperadas de diferentes individuos y regiones geográficas ha revelado la existencia de al menos seis genotipos (1 al 6), los que difieren en un 30-35% de su secuencia nucleotídica. Cada uno de los genotipos de VHC contiene subtipos (designados como a, b, c, etc.) que difieren a nivel nucleotídico en un 20-25%. Algunos de ellos son los subtipos 1a, 1b, 2a, 2b y 2c que presentan una amplia distribución geográfica y en la actualidad son los responsables de la mayoría de las infecciones en países occidentales (Simmonds y col., 2005). Las regiones del genoma que presentan mayor variabilidad son las que codifican para las

glicoproteínas de envoltura E1 y E2, en cambio las regiones más conservadas son la región 5' no traducida (UTR) y las últimas 99 bases del 3'UTR (Simmonds y col., 1993; Simmonds, 2004; Simmonds y col., 2005). No se ha demostrado una relación directa entre el genotipo y el curso clínico de la infección, sin embargo, los pacientes con genotipos 2 y 3 presentan una mejor respuesta al tratamiento antiviral que los pacientes infectados con el genotipo 1 (Manns y col., 2001; Fried y col., 2002).

VHC se caracteriza por circular *in vivo* como una mezcla heterogénea de variantes virales diferentes pero relacionadas, conocidas como cuasiespecies (Martell y col., 1992). La existencia de esta mezcla de especies virales implica una importante ventaja adaptativa para el virus, ya que la presencia simultánea de múltiples genomas y la alta tasa de generación de nuevas variantes, permitirá una rápida selección de los mutantes mejor adaptados en respuesta a cambios en el ambiente replicativo intracelular o a una variación en la presión inmunológica del hospedero (Simmonds, 2004). La región más heterogénea de VHC es un dominio de 27 aminoácidos localizado en la región amino terminal de la glicoproteína E2 (denominada región hipervariable 1 (RHV1)). RHV1 está involucrada en la unión del virus con el receptor celular putativo para VHC (Pileri y col., 1998). Por lo tanto, mutaciones en esta región son potencialmente importantes para la persistencia viral, ya que afectarían

el tropismo celular y la capacidad del virus de escapar al sistema inmune (Manzin y col., 1998). La variabilidad de cuasiespecies también tiene implicancias terapéuticas, ya que la generación y selección de variantes resistentes puede permitir que el virus escape del efecto de drogas antivirales (Pawlotsky, 2006). La infección por VHC frecuentemente es crónica, y probablemente la naturaleza de las cuasiespecies desempeñe un importante rol en la persistencia viral (Honda y col., 1994; Farci y col., 2000).

1.3 Organización del genoma de VHC y características de las proteínas virales.

VHC es un virus con envoltura que posee un genoma de RNA de cadena única de polaridad positiva de aproximadamente 9,6 kb que se caracteriza por carecer de las estructuras 5' cap y 3' poli (A). El genoma está compuesto por un marco de lectura abierto (ORF) flanqueado en sus extremos por regiones 5' y 3'UTR altamente estructuradas (figura 1). El 5'UTR está compuesto de cuatro dominios estructurales numerados del I al IV y contiene un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) que dirige la traducción cap-independiente del RNA viral (Moradpour y col., 2007). El dominio I no es necesario para la actividad IRES, sin embargo, junto al dominio II es esencial para la replicación de VHC. Los dominios

II al IV conforman el IRES de VHC (Friebe y col., 2001; Fraser y Doudna, 2007). El 3'UTR está compuesto de tres dominios estructurales: una región variable de aproximadamente 40 nucleótidos (nt) de longitud río abajo de la secuencia codificante, un tracto de poli (U/UC) de longitud heterogénea y una secuencia de 98nt altamente conservada llamada cola X ("X-tail") (Kolykhalov y col., 1996). Estudios han demostrado que un tracto de poli (U/UC) mínimo de 25nt y una cola X completa son indispensables para la replicación eficiente de VHC en cultivo celular y para la infectividad del genoma de VHC *in vivo* (Yanagi y col., 1999; Friebe y Bartenschlager, 2002; Yi y Lemon, 2003).

La traducción del ORF del mRNA de VHC resulta en la producción de una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos, la cual es procesada por proteasas celulares y virales para generar las proteínas estructurales: Core (C), las glicoproteínas de envoltura 1 y 2 (E1 y E2), p7 y las proteínas no estructurales (NS): NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Las proteínas estructurales y el polipéptido p7 son procesados por peptidasas del retículo endoplasmático (RE).

Las proteínas Core, E1 y E2 son los principales componentes de la partícula viral. Core forma la nucleocápside (Yasui y col., 1998), en tanto E1 y E2 son las glicoproteínas de la envoltura viral que forman un complejo no covalente necesario para interactuar con el receptor celular (Moradpour y col., 2007). Datos recientes indican que p7 forma

oligómeros y posee actividad tipo canal de calcio, sugiriendo que pertenece a la familia de las viroporinas. Se ha postulado que la proteína p7 podría participar en las etapas de la maduración y liberación de la partícula viral (Griffin y col., 2003; Pavlovic y col., 2003). El procesamiento de las proteínas NS es realizado por dos proteasas virales: NS2-3 y NS3-4A. La primera es una cisteína proteasa homodimérica que media el procesamiento entre NS2 y NS3; la actividad catalítica reside en el dominio carboxilo terminal de NS2 y amino terminal de NS3 (Grakoui y col., 1993; Hijikata y col., 1993). La segunda es una serino proteasa que forma un heterodímero compuesto por el dominio amino terminal de NS3 y por NS4A. Además, NS3 en su dominio carboxilo terminal posee actividad RNA helicasa dependiente de ATP (Bartenschlager, 2004; Moradpour y col., 2007). NS4A es cofactor para la actividad de la proteasa y permite la asociación del complejo NS3-4A a membranas intracelulares (Wolk y col., 2000). NS4B es una proteína poco caracterizada, una de sus funciones es inducir la formación de un compartimento especializado llamado red membranosa ("membranous web"), que es una alteración específica de membranas que sirve de andamiaje para el complejo de replicación de VHC (Egger y col., 2002). NS5A es una proteína altamente fosforilada que ha sido implicada en la regulación de la replicación viral y en la resistencia de VHC a interferón (Gale y col., 1998; Evans y col., 2004; Appel y col.,

2005). Finalmente, NS5B es la RdRp que cataliza la replicación del RNA genómico. Se asume que la replicación de VHC comienza con la síntesis de una hebra negativa de RNA complementaria al genoma, la cual es posteriormente utilizada como molde para la síntesis de las nuevas moléculas de RNA de polaridad positiva; ambos procesos son catalizados por NS5B. El RNA de hebra positiva sintetizado puede ser utilizado para producir más copias de la poliproteína, servir de molde para la síntesis de nuevas copias de RNA de hebra negativa o ser incorporada en la nucleocápside (Suzuki y col., 2007).

Se ha identificado un ORF alternativo en la región codificante de la proteína Core que codifica para una proteína llamada F ("frameshift") que resulta de un cambio de marco de lectura del ribosoma ("ribosomal frameshift") -2/+1 durante el inicio de la síntesis de la poliproteína. En pacientes infectados, se ha detectado anticuerpos y estimulación de la respuesta inmune específicos contra esta proteína, lo cual sugiere que se expresa *in vivo*. La proteína F no es requerida para la replicación de VHC *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, su función en el ciclo replicativo y patogenicidad aún se desconoce (Branch y col., 2005; McMullan y col., 2007).

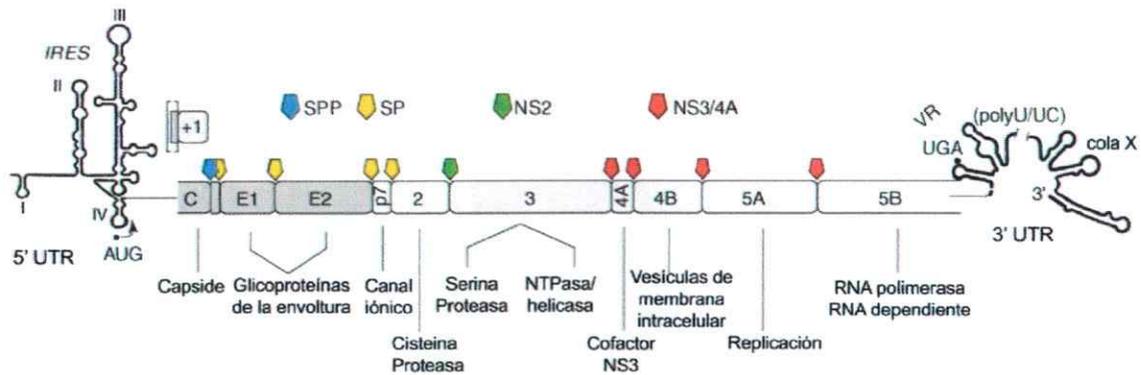


Figura 1. Organización del genoma y procesamiento de la poliproteína de VHC. Diagrama del genoma viral y de las estructuras secundarias de las regiones 5' y 3'UTR (Blight y Rice, 1997, Honda y col., 1999). VHC posee un genoma de RNA de polaridad positiva, el que se traduce directamente generando una poliproteína y también se utiliza como templado durante la replicación viral. Se indican los codones de inicio y de término de la poliproteína así como las proteasas involucradas en su procesamiento (pentágonos de colores). Se indican las proteínas estructurales: Core (C), E1 y E2, p7 y las proteínas no estructurales: 2, 3, 4A, 4B, 5A y 5B. La función de las distintas proteínas se especifica en el panel inferior. La traducción del mRNA viral se inicia mediante un IRES localizado en la región 5'UTR. SPP indica el procesamiento de Core por la peptidasa del péptido de señal. SP: indica los sitios de procesamiento por la peptidasa de señal del RE. +1: proteína F; VR: región variable (Bartenschlager, 2006).

1.4 Ciclo replicativo de VHC.

El primer paso en el ciclo replicativo, es la unión de VHC a receptores de la superficie celular a través de interacciones específicas entre las glicoproteínas del virus y receptores celulares. Se han identificado varios receptores “putativos”, incluyendo CD81 que es una proteína tetraspanin que se encuentra en la superficie de diferentes tipos celulares, incluyendo hepatocitos (Pileri y col., 1998); el receptor de

lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Agnello y col., 1999); el receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI) (Scarselli y col., 2002); las lectinas tipo C (dependientes de calcio): DC SIGN ("dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin"), L SIGN ("liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin") (Gardner y col., 2003; Pohlmann y col., 2003) y el receptor de asialoglicoproteína (rASGP) (Saunier y col., 2003), así como al menos dos potenciales coreceptores virales: glicosaminoglicanos (Germi y col., 2002) y claudina-1 los que participarían en las últimas etapas de la entrada viral, después de la interacción del virus con CD81 (Evans y col., 2007). Sin embargo, la composición exacta de el o los complejos de receptores en la célula blanco involucrados en el reconocimiento de VHC aún no se ha determinado. En el modelo actualmente aceptado (figura 2), las partículas virales ingresan a la célula por endocitosis mediada por receptor de manera dependiente de clatrina (Blanchard y col., 2006), seguido presumiblemente por la fusión de las glicoproteínas de VHC con las membranas endosomales inducida por la acidificación de este compartimento (Koutsoudakis y col., 2006; Tscherne y col., 2006). Poco se conoce sobre el proceso de desnudamiento, el cual resulta en la liberación del genoma al citoplasma (Moradpour y col., 2007). Posteriormente, ocurre la traducción del mRNA mediado por un elemento IRES (proceso que será explicado en detalle en las siguientes

secciones) y el procesamiento de la poliproteína generada. La replicación del RNA de VHC que es catalizada por NS5B ocurre asociado a membranas e induce una alteración específica en las membranas celulares denominada red membranosa, la cual se ha observado en hepatocitos de chimpancés infectados y en células con replicones subgenómicos de VHC en las cuales el virus está replicando (Pfeifer y col., 1980; Gosert y col., 2003). Se postula que la red membranosa participa en diversas funciones durante la replicación viral; por ejemplo, serviría como soporte para la organización del complejo de replicación, así también en la compartimentalización y concentración local de los productos virales y para proteger al RNA viral de las defensas celulares (Moradpour y col., 2007). Se requieren estudios adicionales para esclarecer los procesos que intervienen en la replicación del genoma de VHC y en la formación del complejo de replicación en las células infectadas, además de caracterizar los factores celulares involucrados. Poco se conoce acerca del empaquetamiento del genoma, el ensamblaje del virión y la liberación de las partículas virales, debido a que sólo recientemente se logró en forma eficiente producir partículas de VHC en cultivo. Se presume que los viriones yeman desde el RE o compartimentos membranosos derivados de éste y son liberados de la célula a través de la vía secretora (Suzuki y col., 2007).

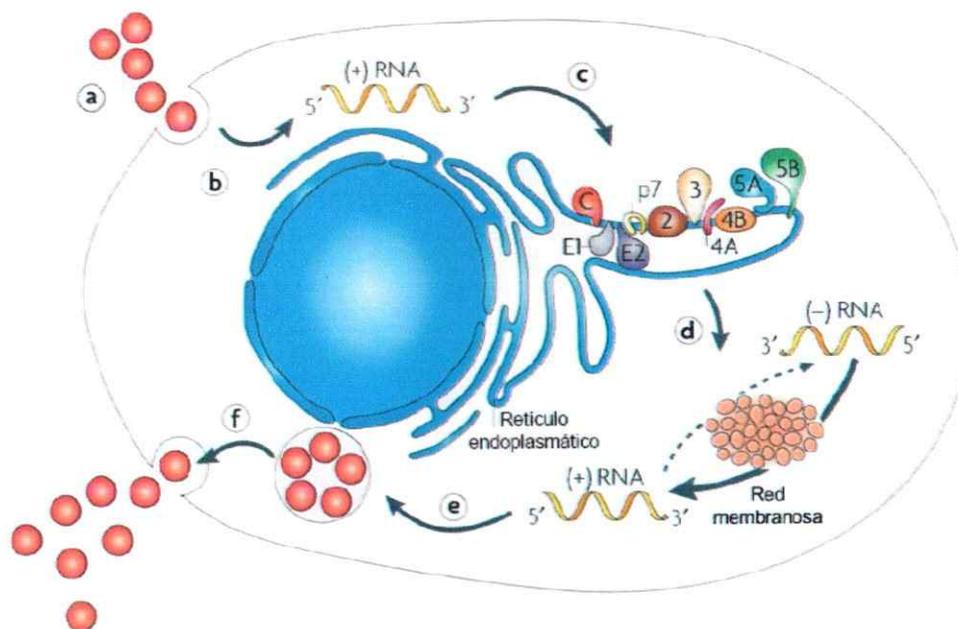


Figura 2. Ciclo replicativo de VHC. (a) Unión e internalización del virus, (b) denudamiento y liberación al citoplasma, (c) traducción mediada por un IRES y procesamiento de la poliproteína, (d) replicación del RNA, (e) empaquetamiento y ensamblaje, (f) maduración y liberación del virión. La topología de las proteínas estructurales y no-estructurales en la membrana del retículo endoplasmático se muestra esquemáticamente. La replicación del RNA viral ocurre en una alteración específica de membranas llamada red membranosa. La traducción y procesamiento de la poliproteína, así como la formación de la red membranosa y la replicación viral, son ilustrados como pasos separados, pero podrían ocurrir en forma acoplada (Figura obtenida desde Moradpour y col., 2007).

1.5 Mecanismos que participan en la iniciación de la traducción de VHC.

1.5.1 Mecanismos de iniciación de la traducción en células eucariontes.

El inicio de la síntesis de proteínas, es la etapa que comienza con el reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal al mRNA y termina

cuando el ribosoma 80S se encuentra ensamblado con el tRNA iniciador (Met-tRNA_i) localizado en su sitio peptidil (P) (Pestova y col., 2001). De acuerdo al mecanismo de reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal al mRNA, el inicio de la traducción puede dividirse en cap-dependiente o cap-independiente.

1.5.1.1. Iniciación de la traducción cap-dependiente.

En la mayoría de los mRNA eucarióticos, el mecanismo de reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal es cap-dependiente. En éste la estructura cap (7-metilguanosina) es reconocida por el factor de iniciación eucariótico (eIF) 4F, el cual es un complejo formado por eIF4E, eIF4A y eIF4G (Gingras y col., 1999). eIF4E es la proteína que reconoce la estructura cap. eIF4A es una RNA helicasa dependiente de ATP. eIF4G une eIF3, eIF4A y eIF4E (Hentze, 1997) y actúa como una proteína puente entre la subunidad 40S ribosomal (a través de eIF3) y el mRNA (a través de eIF4E). La subunidad 40S ribosomal es reclutada al mRNA como parte del complejo de pre-iniciación 43S, que está compuesto por la subunidad 40S unida a eIF2-GTP-Met-tRNA_i (complejo ternario), eIF1A y eIF3 (Hershey y Merrick, 2000; Pestova y col., 2001). La migración del complejo 43S en dirección 5' a 3' hacia el codón de inicio ("scanning") es un proceso que consume energía en la forma de ATP. eIF1A mejora la unión del complejo 43S al mRNA mediada por eIF4F y eIF1 promueve la formación del complejo 48S en el cual ocurre

el apareamiento de bases entre el codón de inicio y el anticodón del tRNA_i (Pestova y col., 1998). El codón de inicio es usualmente el primer triplete AUG en contexto adecuado (G/AXXAUGG, donde X representa cualquier nucleótido) (Kozak, 1989). Una vez que ocurre el posicionamiento en el codón de inicio, los eIFs unidos a la subunidad 40S ribosomal son liberados (Hershey y Merrick, 2000; Pestova y col., 2001). Así, el primer paso en la unión de las subunidades ribosomales es la hidrólisis del GTP unido a eIF2 y la liberación de eIF2-GDP del complejo 48S (Das y Maitra, 2001). eIF5 induce la hidrólisis de eIF2-GTP produciendo el desplazamiento de eIF2-GDP; posteriormente, eIF2-GDP es reciclado a su forma activa eIF2-GTP por eIF2B, el cual es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (Hershey y Merrick, 2000). La hidrólisis de eIF2-GTP y la liberación de eIF2 produce la liberación de eIF3 del complejo 48S (Unbehaun y col., 2004). Finalmente, eIF5B promueve la unión de la subunidad 60S a la 40S ribosomal, resultando en la formación del ribosoma 80S el cual es competente para la síntesis de proteínas y en el cual el tRNA_i es posicionado en el sitio P del ribosoma (Pestova y col., 2000) (figura 3).

1.5.1.2. Iniciación de la traducción cap-independiente.

El mecanismo de inicio de la traducción cap-independiente fue descubierto en mRNA de picornavirus (Jang y col., 1988; Pelletier y Sonenberg, 1988), los cuales no poseen estructura cap pero presentan

en su extremo 5'UTR regiones altamente estructuradas que son capaces de reclutar la subunidad 40S ribosomal; estas regiones fueron llamadas IRES (figura 4). Este tipo de iniciación fue demostrada funcionalmente al insertar la región 5'UTR de picornavirus en la región intercistrónica de un vector bicistrónico, en la cual la expresión del segundo cistron sólo ocurre si la región 5'UTR contiene un IRES que pueda reclutar al complejo de iniciación de manera independiente del extremo 5' del mRNA (figura 5).

El uso de ensayos de traducción utilizando mRNA bicistrónicos ha permitido identificar IRES en otros virus, así como en varios mRNA celulares. Es así como se ha identificado el IRES de VHC (Tsukiyama-Kohara y col., 1992), de VIH-1 (Brasey y col., 2003) y del virus de leucemia murino (Berlioz y Darlix, 1995), y en mRNA celulares como FGF-2 y c-Myc, entre otros (Hellen y Sarnow, 2001). Una lista extensa de IRESs virales y celulares se puede encontrar en diversas bases de datos dedicadas a IRESs como por ejemplo: <http://ifr31w3.toulouse.inserm.fr/IRESdatabase/>, http://iresite.org/IRESite_web.php

Una característica importante de los IRESs es que su actividad depende de la integridad de su estructura y que pequeñas deleciones o inserciones e incluso sustitución de un solo nucleótido pueden aumentar o reducir su actividad traduccional (Martinez-Salas y col.,

1993; Zhang y col., 1999; Pestova y col., 2001; Fernandez-Miragall y Martinez-Salas, 2003; Lopez-Lastra y col., 2005). La estructura terciaria del IRES está determinada por interacciones RNA-proteína y RNA-RNA entre sus dominios funcionales (Lafuente y col., 2002; Martinez-Salas y Fernandez-Miragall, 2004). Se ha reportado que las interacciones RNA-RNA ocurren *in vitro* y que dependen de la concentración de RNA, de las condiciones iónicas y de la temperatura, lo que sugiere que el plegamiento del IRES es un proceso dinámico. Es probable que el dinamismo estructural del IRES desempeñe un papel en su función biológica; es decir, que los IRESs puedan adoptar estructuras específicas con diferentes actividades traduccionales en función de las condiciones ambientales (Martinez-Salas y col., 2001; Martinez-Salas y col., 2002; Martinez-Salas y Fernandez-Miragall, 2004).

El mecanismo molecular preciso por el cual el aparato traduccional del hospedero reconoce los diferentes IRESs virales y celulares es desconocido. Sin embargo, los datos sugieren que tanto los eIFs, así como proteínas celulares específicas conocidas como factores transactivadores del IRES (ITAF), que normalmente no participan en la traducción cap-dependiente, son importantes en el proceso de reclutamiento del complejo de iniciación de la traducción (figura 4) (Belsham y Sonenberg, 2000). Además, no existe un mecanismo general para el reclutamiento del complejo de iniciación para todos los IRESs;

así mismo, todavía no están definidos todos los factores requeridos para este proceso. A pesar de las diferencias en el mecanismo de iniciación de la traducción utilizada por los diferentes IRES virales y celulares, muchos de los ITAFs identificados hasta ahora interactúan con ambos tipos de IRESs. Existe una extensa lista de ITAFs conocidos (Stoneley y Willis, 2004), sin embargo, entre los más estudiados se encuentran el autoantígeno humano La, la proteína de unión a poli(rC) 2 (PCBP-2) y la proteína de unión al tracto de polipirimidina (PTB). Por ejemplo, La, PTB y PCBP-2 son importantes para la actividad del IRES de algunos picornavirus (Hellen y Sarnow, 2001; Lopez-Lastra y col., 2005), La es requerido por el IRES de VHC (Ali y col., 2000), mientras que PTB es requerido por la mayoría de los IRESs celulares (Mitchell y col., 2005). El mecanismo por el cual los ITAFs facilitan el reclutamiento de las subunidades ribosomales es desconocido; sin embargo se ha postulado que los ITAFs funcionarían como chaperonas de RNA ayudando a que el IRES adopte la conformación necesaria para su actividad traduccional (Hellen y Sarnow, 2001). Esta hipótesis se basa principalmente en las propiedades estructurales de estas proteínas, las cuales poseen múltiples dominios de unión a RNA y la mayoría dimeriza en solución (Craig y col., 1997; Perez y col., 1997). Por lo tanto, los ITAFs podrían establecer múltiples contactos con el IRES y modular la conformación de éste mediante la interacción concertada entre sus distintos sitios de

unión (Mitchell y col., 2003).

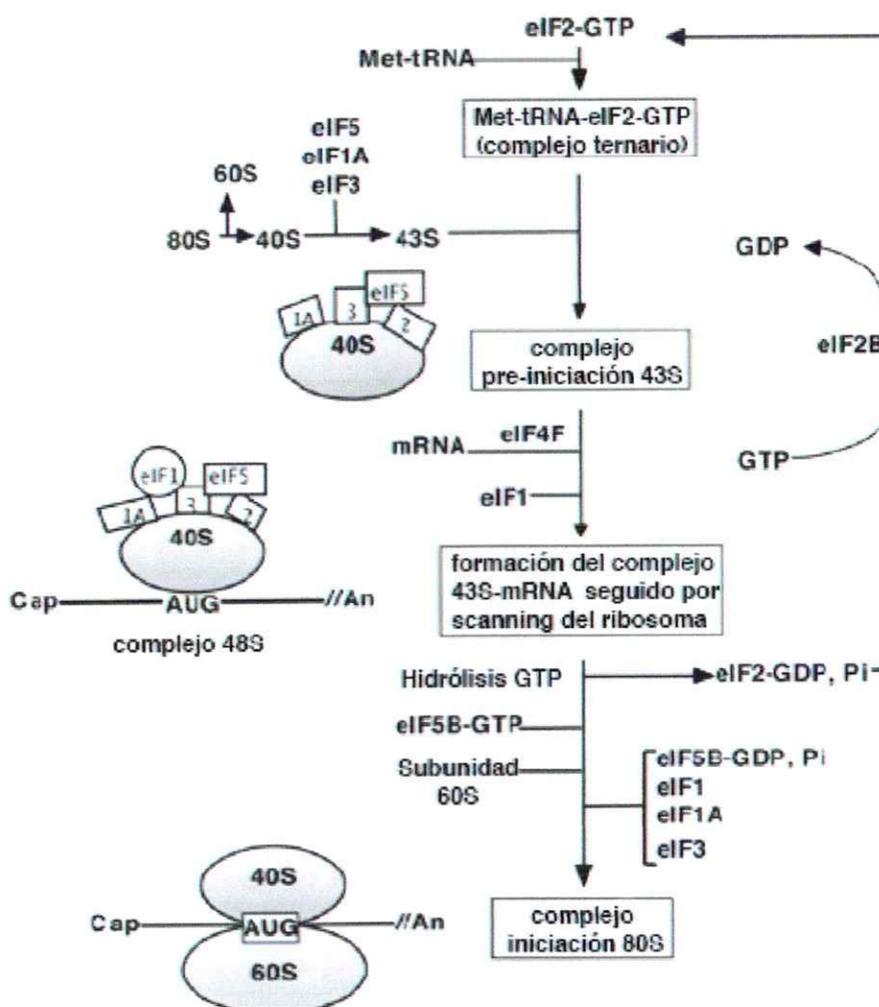


Figura 3. Representación esquemática del inicio de la traducción cap-dependiente en eucariotes. La traducción del mRNA comienza con el ensamblaje del tRNA de inicio, mRNA y las subunidades ribosomales. El complejo proceso del inicio de la traducción que conduce a la formación del ribosoma 80S consiste en varias etapas que están mediadas por eIFs. Ver texto para más detalles. La subunidad 40S ribosomal es reclutada para el inicio de la traducción mediante complejas interacciones entre proteína-RNA y proteína-proteína. En el mecanismo cap-dependiente, el complejo de pre-iniciación se une al mRNA a través de la estructura cap con la ayuda del complejo de proteínas eIF4F y luego migra a través del mRNA hasta encontrar el codón de inicio donde el ribosoma 80S es reconstituído. Los eIFs son reciclados luego de su liberación (Lopez-Lastra y col., 2005).

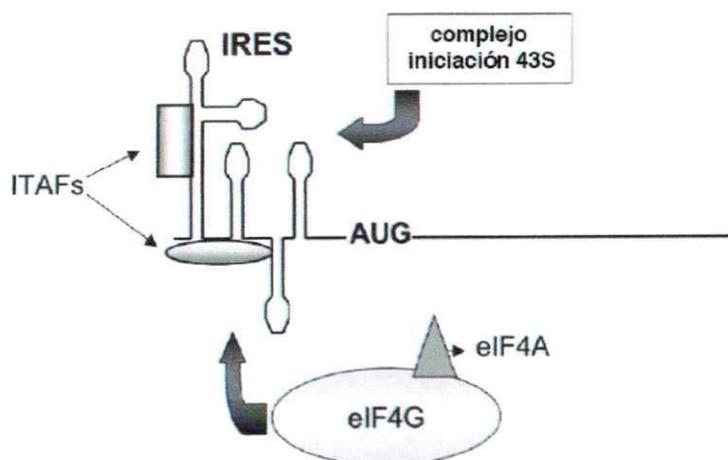


Figura 4. Diagrama esquemático del inicio de la traducción mediado por un sitio interno de entrada de ribosomas o IRES. La traducción IRES dependiente es un mecanismo alternativo a la iniciación cap-dependiente, en la cual la subunidad 40S ribosomal es reclutada al mRNA en una manera independiente del extremo 5' y de la estructura cap. Entre los diferentes IRESs el requerimiento de los eIFs es variable. Sin embargo, la mayoría requiere de proteínas celulares específicas denominadas ITAF para ser funcionales. Para simplificar el esquema, han sido omitidas otras proteínas que participan en este proceso (Lopez-Lastra y col., 2005).

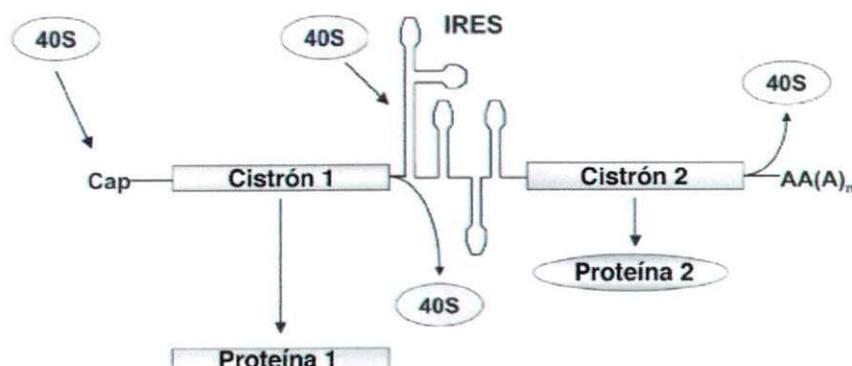


Figura 5. Esquema de un mRNA bicistrónico. En las construcciones bicistrónicas, el primer cistrón se traduce de manera cap-dependiente, mientras que el segundo cistrón sólo será traducido si la secuencia intercistrónica puede funcionar como un IRES, es decir, que pueda reclutar la subunidad 40S ribosomal de manera independiente de la estructura cap. Para simplificar el esquema, los eIF y otras proteínas que participan en este proceso han sido omitidos (Lopez-Lastra y col., 2005).

1.6 IRES de VHC y su mecanismo de iniciación de la traducción.

El IRES de VHC posee aproximadamente 340nt, está situado en la región 5'UTR del genoma de VHC y abarca los primeros 24-40nt de la región codificante de Core. Aunque aún se desconocen los detalles moleculares del mecanismo de inicio de la traducción mediada por el IRES de VHC, se ha establecido que este elemento es capaz de reclutar la subunidad 40S ribosomal sin requerir de eIF, posicionándola directamente sobre el codón de inicio de la poliproteína (Reynolds y col., 1996; Rijnbrand y col., 1996). Posteriormente, eIF3 interactúa con el complejo IRES-40S, seguido por el reclutamiento del complejo ternario eIF2-GTP-Met-tRNA_i formando un complejo 48S no-canónico (Hellen y Pestova, 1999; Otto y Puglisi, 2004). Luego de la hidrólisis de GTP, los factores de inicio son liberados y la subunidad 60S se une para formar el complejo 80S dejando el codón de inicio directamente en el sitio P del ribosoma (Ji y col., 2004; Otto y Puglisi, 2004) (figura 6B). Otra característica del IRES de VHC es que puede ensamblar complejos 80S e iniciar la síntesis de proteínas sin factores de inicio a altas concentraciones de cationes, mecanismo que podría ser utilizado si los factores de inicio son limitantes o son modificados por la respuesta celular antiviral (Lancaster y col., 2006).

La secuencia y estructura del IRES de VHC son altamente conservadas entre los virus aislados. El modelo de la estructura

secundaria del IRES se basa en la comparación filogenética de virus relacionados (pestivirus y virus GB-B) (Honda y col., 1999; Rijnbrand y col., 2000), estudios químicos y enzimáticos (Brown y col., 1992; Wang y col., 1995) y mutagénesis (Wang y col., 1994; Zhao y Wimmer, 2001) (figura 6A). El IRES de VHC está constituido por dos dominios helicoidales (designados II y III) unidos por un pseudo-nudo ("pseudoknot") a un corto dominio tallo-bucle ("stem-loop") (designado IV) que contiene el codón de inicio y una parte del ORF. El dominio III además se divide en los subdominios a, b, c, d, e y f. Estructuras tridimensionales de alta resolución de los dominios II, IIIb, IIIc, IIIe y la unión de los dominios IIIabc del IRES han confirmado esta estructura secundaria y han permitido conocer con mayor detalle su arquitectura (Lukavsky y col., 2000; Collier y col., 2002; Kieft y col., 2002; Lukavsky y col., 2003). Sin embargo, aún no existe una estructura de alta resolución del IRES completo. Se han reportado diferentes funciones para los dominios del IRES de VHC. El dominio III media el reclutamiento inicial del complejo de inicio de la traducción. La parte basal de este dominio (la unión de los dominios IIIabc, IIIef y IIIc) forma el núcleo de interacción de alta afinidad con la subunidad 40S ribosomal y contacta las proteínas ribosomales que están involucradas en la unión y posicionamiento del mRNA y tRNA (Otto y col., 2002). La región apical del dominio III, específicamente el cruce de los dominios

IIIabc junto con los bucles IIIa y IIIb son esenciales para la interacción con eIF3 (Buratti y col., 1998; Sizova y col., 1998; Kieft y col., 2001). El dominio IIIb regula el reclutamiento del complejo ternario Met-tRNAi-eIF2 (Ji y col., 2004). Los dominios II, IIIa y la unión de los dominios IIIabc influyen en la formación del complejo 80S dependiente de GTP (Ji y col., 2004; Otto y Puglisi, 2004); específicamente el dominio II controla la hidrólisis de GTP y liberación de eIF2 y por lo tanto está involucrado directamente en la formación del ribosoma 80S (Locker y col., 2007).

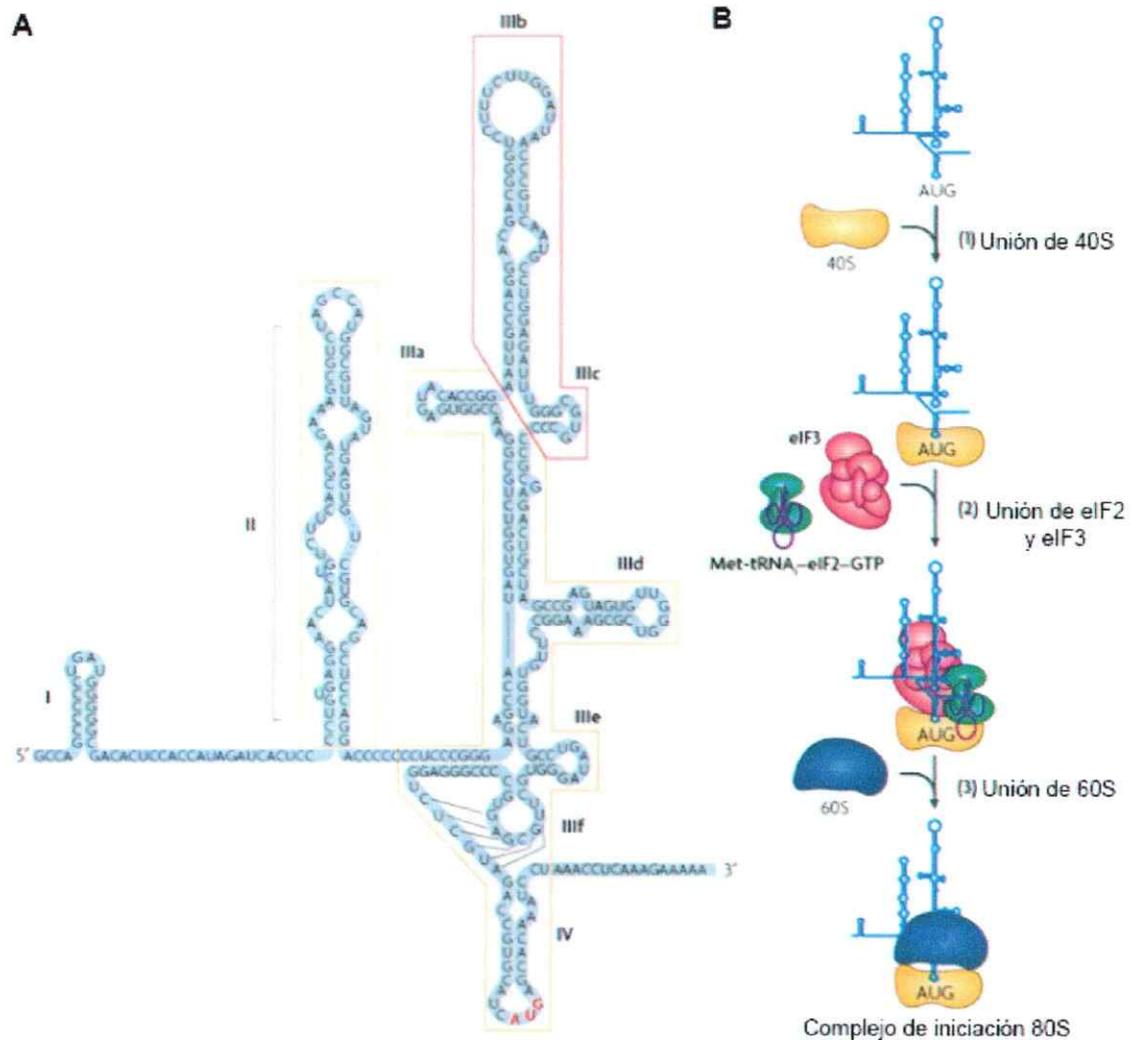


Figura 6. Estructura secundaria del 5'UTR del genoma de VHC y el modelo de la formación del complejo de iniciación. (A) La estructura del 5'UTR del mRNA de VHC consiste de cuatro dominios denominados I-IV. El IRES de VHC incluye tres dominios (II-IV), también se indican los sub-dominios (a-f) del dominio III. Los dominios que son importantes para la unión de la subunidad 40S ribosomal están enmarcados en amarillo y la ubicación del sitio de unión para el factor eIF3 en morado. El codón de inicio AUG se indica en color rojo. (B) (1) El inicio de la traducción mediado por el IRES de VHC comienza con el reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal directamente al IRES en la ausencia de factores de inicio. (2) Luego eIF2-GTP (unido a Met-tRNA_i) y eIF3 son reclutados, (3) a continuación ocurre la hidrólisis de GTP que promueve la unión de la subunidad 60S ribosomal para formar el complejo de inicio 80S (Fraser y Doudna, 2007).

Estudios de criomicroscopía electrónica a una resolución de aproximadamente 20Å, han proporcionado las estructuras del IRES de VHC unido a la subunidad 40S ribosomal, del complejo IRES con la subunidad 40S-eIF3 y el IRES unido con el ribosoma 80S (Spahn y col., 2001; Boehringer y col., 2005; Siridechadilok y col., 2005). Estas estructuras revelan los contactos entre el IRES y el ribosoma además de los cambios conformacionales que ocurren durante el ensamblaje de estos complejos (Fraser y Doudna, 2007); sin embargo son necesarias estructuras de mayor resolución para determinar los contactos específicos entre el IRES y el ribosoma. Esta línea de investigación es fundamental, ya que puede revelar las diferencias y similitudes entre la traducción celular y la mediada por el IRES de VHC, lo que puede ser utilizado para el desarrollo de antivirales dirigidos contra esta primera etapa de la replicación intracelular de VHC (Tellinghuisen y col., 2007).

Es importante destacar que el IRES adopta una estructura terciaria en condiciones fisiológicas de sales (Kieft y col., 1999; Melcher y col., 2003). Estudios de mutagénesis de los dominios del IRES han revelado que la integridad estructural es requerida para la eficiente síntesis de proteínas *in vitro* e *in vivo* (Fukushi y col., 1994; Rijnbrand y col., 1995; Honda y col., 1996b; Kamoshita y col., 1997; McCaffrey y col., 2002). El hecho que mutaciones deletéreas de la actividad traduccional en ciertos dominios del IRES puede ser restaurada por mutaciones

compensatorias puso de manifiesto que la estructura del IRES es necesaria para iniciar la traducción (Fraser y Doudna, 2007). Asimismo, experimentos de mutaciones en las regiones de los bucles del dominio III_d y III_e han sugerido que la función del IRES de VHC también podría depender en cierta medida de la secuencia primaria (Psaridi y col., 1999; Fraser y Doudna, 2007). De esta forma, la función de la secuencia primaria y el efecto de mutaciones en los distintos dominios del IRES de VHC sobre su actividad traduccional aún no se ha determinado por completo, por lo cual es interesante estudiar el efecto de mutaciones que ocurren naturalmente en el IRES de VHC recuperados de pacientes con infección crónica y evaluar su efecto sobre la eficiencia traduccional *in vitro*. Por lo tanto, tomando en consideración los antecedentes señalados nos planteamos la siguiente hipótesis.

HIPÓTESIS

La actividad traduccional del IRES de VHC es exclusivamente dependiente de la estructura secundaria.

OBJETIVO GENERAL

Identificar variaciones nucleotídicas en los dominios estructurales responsables de la actividad del IRES de VHC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar cuasiespecies del 5'UTR de VHC presentes en la población infectada crónicamente con el virus y analizar la variabilidad entre la población viral de plasma y PBMC.

2. Evaluar la actividad traduccional del 5'UTR de VHC de distintas cuasiespecies recuperadas de los pacientes.

3. Identificar las variantes nucleotídicas en los distintos dominios estructurales que conforman el IRES de VHC y estudiar su efecto en traducción.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Pacientes.

En este estudio se incluyeron cuarenta y cinco pacientes reclutados de la Unidad ambulatoria de Hepatología del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica. Los protocolos seguidos en este estudio así como el formulario de consentimiento informado escrito que completaron los pacientes antes de la donación de sangre fueron aprobados por la Junta de Revisión de Ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile (ver el anexo 3). Los criterios de inclusión de los pacientes fueron los siguientes: adultos (mayores de 18 años) con hepatitis C crónica, la cual fue definida como presencia de anticuerpos anti-VHC en suero y RNA de VHC en plasma por más de 6 meses (la mediana de la carga viral para todos los pacientes estudiados fue de 509.000 IU/mL). Los niveles de RNA de VHC en las muestras de suero fueron determinadas utilizando el sistema "COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, version 2.0" (Roche Diagnostic Systems) de acuerdo al protocolo del fabricante. En este estudio se inscribieron entre los años 2005 y 2007 individuos de ambos sexos (53% hombres) infectados crónicamente con VHC que no hubiesen recibido tratamiento. La edad media fue de 52 años (rango entre 24-76 años) y el tiempo promedio estimado de la infección fue de 33 años. Se

excluyeron de este estudio: pacientes con anemia (hematocrito menor a 20%), embarazo, co-infección con VIH o virus de la hepatitis B (VHB), que hayan recibido quimioterapia contra cáncer, extracción de sangre acumulada superior a 6mL/Kg en las 6 semanas previas o que hayan recibido tratamiento antiviral. Los controles normales fueron sometidos a las mismas pruebas para confirmar que fueran negativos para VHC, VIH y VHB.

2.2 Recuperación del plasma y separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Para la recuperación del plasma de los pacientes, se colectó sangre periférica (5mL) en tubos Vacutainer con EDTA (Becton Dickinson), se centrifugó y se recuperó el sobrenadante que fue almacenado a -80°C hasta su utilización. Para el aislamiento de PBMC se colectó sangre periférica (50 mL) en tubos Vacutainer con EDTA (Becton Dickinson). Las muestras de sangre fueron diluidas con un volumen igual de tampón salino fosfato (PBS) 1X y las células mononucleares se aislaron por centrifugación en un gradiente de densidad (Lymphocyte separation medium, Cellgro®) según lo indicado por el proveedor. Cuando fue necesario, las células se congelaron en suero fetal bovino (FBS) con 10% de DMSO y almacenadas a -80°C hasta su utilización.

2.3 Extracción del RNA total.

El RNA total fue extraído usando el protocolo descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Para la extracción de RNA total de plasma se usó 200 μ L de éste y 600 μ L de solución D (4M guanidinio tiocianato; 25mM citrato de sodio; 0,5% sarcosil y 0,1M 2- β mercaptoetanol preparado en agua libre de nucleasas). Para la extracción de RNA total de PBMC, al pellet de 5×10^6 células se le agregó 500 μ l de solución D, posteriormente se continuó con el siguiente protocolo para ambos tipos de muestras. Para lograr la lisis completa de las muestras, éstas fueron homogeneizadas con una jeringa tuberculina (aguja 25G 5/8). Luego de la lisis, se agregó en forma secuencial 0,1 volumen de 2M acetato de sodio pH 4, 1 volumen de fenol pH 8 y 0,2 volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1) mezclando en vortex después de la adición de cada reactivo. La suspensión final se mezcló vigorosamente por vortex y se incubó en hielo por 15 min. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 12,000 xg por 15 min a 4°C. Posteriormente, el RNA fue precipitado de la fase acuosa con 1 volumen de isopropanol e incubado al menos por 1 hora a -20°C, posteriormente se centrifugó a 12,000 xg por 30 min a 4°C. El pellet fue lavado con 200 μ L de etanol al 75% y secado a temperatura ambiente. El RNA fue resuspendido en 30 μ L de agua libre de nucleasas. La concentración de RNA fue determinada por espectrofotometría (GeneQuant, Pharmacia).

2.4 RT-PCR.

El RNA de VHC se detectó en una reacción de un paso de transcripción inversa (RT) seguido por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) utilizando el sistema "SuperScript™ III one step RT-PCR system with Platinum® Taq DNA Polymerase" (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante. En el anexo 1 se detallan todos los oligonucleótidos utilizados como partidores en esta tesis. El RT-PCR fue diseñado para detectar la región altamente conservada del 5'UTR de VHC utilizando el partidor sentido P1 y el partidor antisentido P4 generándose un amplicón de 371pb. La reacción de RT fue realizada a 50°C por 45 min. Luego, la enzima RT fue inactivada y la DNA polimerasa Taq Platinum® fue activada al someter la reacción a 95°C por 5 min. La amplificación por PCR se llevo a cabo en 40 ciclos, las condiciones de cada ciclo fueron las siguientes: 95°C por 45 seg, 58°C por 45 seg y 68°C por 45 seg, para finalizar con un paso de 68°C por 10 min. Se usaron como controles positivos: el RNA transcrito *in vitro* generado a partir del plasmidio pFK-I389neo/NS3-3'/wt (Lohmann y col., 1999) (AJ242654; proporcionado por Dr. Ralf Bartenschlager, Universidad de Heidelberg, Alemania) o el RNA total extraído de la línea celular de hepatoma humano, Huh-7, que expresa constitutivamente el plasmidio pFK-I389neo/NS3-3'/wt (Huh-7/replicón) (Lohmann y col., 1999) (proporcionado por Dr. Ralf Bartenschlager). Los controles

negativos fueron agua, RNA total extraído de células Huh-7 y RNA extraído de pacientes no infectados con VHC.

2.5 Cultivo celular.

La línea celular Huh-7 y Huh-7/replicón se cultivaron como se describió anteriormente (Lohmann y col., 1999). Las células Huh-7 y Huh-7/replicón se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FBS, aminoácidos no-esenciales y antibióticos. Para Huh-7/replicón se agregó al medio de cultivo G418 a una concentración final de 0,5 µg/mL.

2.6 Secuenciación del producto de amplificación del 5'UTR.

Las secuencias del 5'UTR de VHC (Macrogen Corp, USA) fueron analizadas utilizando el programa BioEdit y alineadas usando el programa CLUSTAL W (Thompson y col., 1994). Las secuencias del Gen Bank que fueron utilizadas en este análisis fueron las siguientes: 1a-HCV1 (M62321), 1b-HCVBK (M58335) para el alineamiento de los 5'UTR de la figura 11 y 1b-Con1 (AJ238799) para el alineamiento de los IRES utilizados en los experimentos de traducción *in vitro*, 1c-HC-G9 (D14853), 2a-HC-J6 (D00944), 2b-HC-J8 (D10988), 2c-BEBE1 (D50409), 3a-NZL1 (D17763), 3b-HCV Tr Kj(D49374) y 5a-EUH1480 (Y13184).

2.7 Análisis de las cuasiespecies de VHC mediante conformación de polimorfismo de hebra simple (SSCP).

Las cuasiespecies de VHC fueron comparadas mediante el ensayo de conformación de polimorfismo de hebra simple (SSCP) como ha sido descrito (Orita y col., 1989), pero realizando modificaciones que se describen a continuación: el ensayo de SSCP fue realizado utilizando amplicones de 371pb del 5'UTR, tomando 1/4 del volumen de la reacción de RT-PCR, los amplicones fueron mezclados con 2 volúmenes de solución desnaturalante (95% formamida; 10mM NaOH; 0,05% azul de bromofenol), la mezcla se desnaturaló por 5 min a 95°C y luego se incubó en hielo por 5 min. La electroforesis se realizó con el total del volumen de la mezcla en un gel de poliacrilamida no desnaturalante 0,5X MDE™ (Mutation Detection Enhancement, Cambrex Bio Science Rockland, Inc. ME, USA) en una cámara de electroforesis vertical a 3 watts por 14-15 hr a temperatura ambiente. Posteriormente, las bandas fueron visualizadas mediante tinción con nitrato de plata, el gel fue secado y se procedió al análisis de la migración electroforética de cada amplicón. Todos los productos analizados en SSCP fueron secuenciados en ambas direcciones (Macrogen Corp, USA). Los perfiles de SSCP fueron analizados considerando la presencia de bandas comparadas con los patrones de migración de las muestras aisladas de plasma y PBMC o comparadas con los patrones del amplicón del replicón de VHC 1b pFK-

I_{389neo}/NS3-3'/wt (AJ242654) (Lohmann y col., 1999).

2.8 Amplificación del IRES de VHC y construcción de los vectores bicistrónicos.

El IRES de VHC (nucleótidos 13-383 del genoma de VHC, genotipo 1b, aislado Con1, número de acceso: AJ238799) fue amplificado desde muestras de plasma y PBMC de pacientes chilenos infectados con el virus mediante RT-PCR utilizando el sistema "SuperScript™ III one step RT-PCR system with Platinum® Taq DNA Polymerase" (Invitrogen), utilizando los partidores P1-XhoI y P4-EcoRI (ver Anexo 1). La reacción de RT fue realizada a 50°C por 45 min. Luego, la reacción se sometió a 95°C por 5 min para inactivar la enzima RT y activar la Taq DNA polimerasa y a continuación se realizó el PCR por 40 ciclos, las condiciones de cada ciclo fueron las siguientes: 95°C por 45 seg, 58°C por 45 seg y 68°C por 45 seg, para finalizar con un paso de 68°C por 10 min. Posteriormente, los productos de PCR se separaron en gel de agarosa al 1% en tampón TBE 1X y se purificaron desde gel utilizando el sistema "Favor/Prep Gel/PCR purification kit" (Favorgen). Luego, el producto de PCR fue clonado en pGemT-easy (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante y se realizó la digestión con las enzimas de restricción XhoI y EcoRI (sitios agregados por PCR). Finalmente, los diferentes IRESs fueron clonados en la región intercistronica del vector

reportero dual luciferasa (Brasey y col., 2003), entre el gen de luciferasa de Renilla (RLuc) y luciferasa de Firefly (FLuc), de esta manera la traducción del primer cistrón es cap-dependiente y la del segundo cistrón es dependiente del IRES de VHC. Los clones fueron verificados por secuenciación (Macrogen Corp, USA) y alineados usando el programa CLUSTAL W. La representación esquemática de estas construcciones se muestra en la figura 12A.

2.9 Transcripción *in vitro*.

Todos los vectores bicistrónicos fueron linealizados con la enzima de restricción BamHI, excepto el vector pcDNA/Ren/HCV/FF que fue linealizado con la enzima NotI. Los DNAs linealizados fueron utilizados para la reacción de transcripción *in vitro* en un volumen final de 25 μ L. Los RNAs sin estructura cap en su extremo 5' fueron sintetizados usando la RNA polimerasa T7 (Fermentas) de acuerdo al protocolo del fabricante. La reacción se incubó por 2 hr a 37°C. Posteriormente, el templado de DNA fue digerido con DNasa I (Promega), y el RNA fue precipitado con 2,5M LiCl (Ambion). El RNA fue resuspendido en agua tratada con DEPC. La concentración de RNA fue determinada por espectrofotometría a 260nm (GeneQuant, Pharmacia) ajustando la concentración a 50ng/ μ L. La pureza se estimó por la razón de absorbancia a 260/280nm y la integridad del RNA fue monitoreada

mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturante al 1% (12,3M formaldehído) en tampón MOPS 1X (MOPS 10X: 0,4M MOPS pH 7.0; 0,1M acetato de sodio; 0,01M EDTA). Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 1,3X (95% formamida, 18mM EDTA, 0.025% SDS, azul de bromofenol) y se desnaturaron mediante incubación a 70°C por 5 min. Las bandas se visualizaron con luz ultravioleta en un transiluminador.

Los RNAs con estructura cap en su extremo 5' fueron sintetizados utilizando el sistema "mMESSAGE mMACHINE" (Ambion) de acuerdo al protocolo del fabricante. Para sintetizar los RNAs con cola de poli (A), se utilizó el sistema "poly (A) tailing kit" (Ambion) siguiendo las especificaciones del fabricante. La concentración de RNA fue determinada por espectrofotometría y su integridad fue monitoreada por electroforesis en gel de agarosa desnaturante como se explicó anteriormente.

2.10 Traducción *in vitro* utilizando lisado de reticulocito de conejo (RRL).

La traducción *in vitro* de las construcciones bicistrónicas fue realizada utilizando lisado de reticulocito de conejo tratado con nucleasas (RRL, Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante con las siguientes modificaciones, se utilizó 8ng/ μ L de RNA total en 35%

del volumen de RRL (2,1875 μ L para un volumen final de 6,25 μ L); 0,0625 μ L de cada una de las mezclas de aminoácidos menos Met y menos Cys; 0,125 μ L de inhibidor de ribonucleasas (Ribolock, Fermentas) y se agregó acetato de potasio y acetato de magnesio a una concentración final de 79mM y 0,5mM, respectivamente. La reacción de traducción se incubó por 90 min a 30°C.

2.11 Preparación de extractos de traducción de células Huh-7.

Los extractos de traducción de células Huh-7 fueron preparados de acuerdo al protocolo de Svitkin y Sonenberg (2004). Las células Huh-7 se crecieron en DMEM y fueron tratadas con tripsina-EDTA a 37°C, colectadas por centrifugación (120 xg por 8 min a 4°C) y lavadas 3 veces con tampón isotónico 1X (10X: 350mM HEPES-KOH pH 7,3; 1,46M NaCl; 110mM D-glucosa). Después del lavado final y centrifugación a 750 xg por 8 min a 4°C, el pellet de células fue resuspendido en 2 volúmenes de tampón B (25mM HEPES-KOH pH 7,3; 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂; 1mM DTT e inhibidor de proteasas ("complete mini, EDTA-free protein inhibitor cocktail tablets", Roche)). Las células fueron mantenidas en hielo por 30 min y posteriormente fueron homogeneizadas con una jeringa tuberculina (30 veces). Luego se agregó 1/9 de volumen de tampón C (25mM HEPES-KOH pH 7,3; 1M KOAc; 30mM MgCl₂; 30mM DTT e inhibidor de proteasas) y el homogeneizado se

centrifugó a 12,000 xg por 30 min a 4°C. El sobrenadante fue alicuotado y congelado rápidamente con nitrógeno líquido y almacenado a -80°C.

2.12 Traducción *in vitro* utilizando extractos de traducción de células Huh-7.

La reacción de traducción se realizó utilizando 50% del volumen del extracto de traducción de células Huh-7; 0,5 µL de "master mix" (10mM ATP; 2mM GTP; 100mM creatina fosfato; 1mg/mL creatina fosfoquinasa; 0,2mM de cada aminoácido; 125mM HEPES-KOH pH 7,3); 0,5µL de 2,5mM espermidina (Svitkin y Sonenberg, 2004); 0,1µL de inhibidor de ribonucleasas (Ribolock, Fermentas) y 300ng de RNA total con cap. La reacción se incubó por 90 min a 30°C.

2.13 Detección de las actividades de las luciferasas Renilla y Firefly.

La detección de las luciferasas de Renilla y Firefly se realizó en un solo tubo secuencialmente, utilizando el sistema reportero Dual-Luciferasa (Promega) debido a que sus actividades pueden ser diferenciadas experimentalmente utilizando distintos sustratos, coelenterazina y d-luciferina, respectivamente. Los productos de ambas reacciones emiten luz a distintas longitudes de onda, lo que puede detectarse en luminómetro (DS Sirius, Berthold). En estos experimentos se utilizaron como controles positivos el RNA sintetizado a partir del

vector pcDNA/Ren/HCV/FF (gentilmente proporcionado por Dr. J. Pelletier) (Bordeleau y col., 2005), el cual posee el IRES de VHC de genotipo 1a y una construcción bicistrónica que contiene el IRES de VHC de genotipo 1b (1b) (genotipo más representativo en la población chilena infectada). Como control negativo se utilizó una construcción que no contiene un IRES funcional en la región intercistrónica (DL) (Brasey y col., 2003).

2.14 Generación de plasmidios bicistrónicos que contienen los IRES mutantes de VHC.

Se utilizó el protocolo de mutagénesis basado en PCR (Mikaelian y Sergeant, 1992) para la construcción de los vectores bicistrónicos con IRESs mutantes con las siguientes sustituciones: G82A, A119C, G137U, A172G, A252G, G266A, G268U, G271A, G331A, A252G/G271A y G266A/G268U. En resumen, las mutaciones fueron introducidas en el vector bicistrónico dual luciferasa que contiene el IRES de VHC de genotipo 1b (1b), el cual fue utilizado como templado en las reacciones de PCR, utilizando 3 partidores comunes (renFw, P2anti y P1tag) y un oligonucleótido específico para cada mutación denominados mut1 al mut11. Específicamente los partidores utilizados para generar cada mutación fueron: G82A: mut1, A119C: mut2, G137U: mut3, A172G: mut4, A252G: mut5, G266A: mut6, G268U: mut7, G271A: mut8,

G331A: mut9, A252G/G271A: mut10 y G266A/G268U: mut 11 (ver Anexo 1). Para obtener los plasmidios dual luciferasa con los IRESs mutantes, se realizaron 2 rondas sucesivas de PCR utilizando una Taq polimerasa de alta fidelidad (Expand High Fidelity PCR System, Roche Molecular Biochemicals o Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity, Invitrogen) siguiendo los protocolos de los fabricantes. La primera ronda constó de dos reacciones de PCR simultáneas, la primera reacción de PCR fue realizada con los partidores renFw y los distintos partidores para generar las mutaciones (mut1 al mut11). La segunda reacción de PCR fue realizada con los partidores P1tag y P2anti. Los fragmentos amplificados de las dos reacciones de PCR de esta primera ronda, fueron purificados desde gel de agarosa, mezclados y usados para realizar la siguiente ronda de PCR con los partidores externos renFw y P2anti. Para las amplificaciones por PCR, se utilizó el siguiente programa: 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 15 o 30 seg (dependiendo de la Taq DNA polimerasa utilizada), 58°C (para los PCR con los partidores renFw-mut 1,3-7,10, P1tag-P2anti y renFw-P2anti) o 62°C (para renFw-mut 2, 8, 9 y 11) por 30 seg y 72°C o 68°C por 45 seg, para finalizar con un paso de 72°C o 68°C por 7 min (dependiendo de la Taq DNA polimerasa utilizada). Posteriormente, el producto de PCR resultante se digirió con las enzimas XhoI y EcoRI y se ligó en el vector dual luciferasa digerido con las mismas enzimas de restricción usando la enzima T4

DNA ligasa (Fermentas).

La construcción de los mutantes: C67U, A73G y G90A se realizó digiriendo los plasmidios DL VHC 32, DL VHC 41 y DL VHC 5, respectivamente (ver anexo 2, vectores bicistrónicos con los IRESs recuperados de los pacientes) con las enzimas XhoI y AgeI, luego el fragmento se purificó desde gel y se ligó en el vector 1b digerido con las mismas enzimas de restricción.

La construcción de los mutantes: A223G, U306C, C340U/G350A y U356A/A359G se realizó digiriendo los plasmidios DL VHC 33, DL VHC 18, DL VHC 41 y DL VHC 5, respectivamente (anexo 2) con las enzimas AgeI y EcoRI, posteriormente el fragmento se purificó desde gel y se clonó en el vector 1b digerido con las mismas enzimas de restricción.

Para la construcción de los dobles mutantes: G82A/A172G y A119C/G331A primero se realizó la mutación de cada nucleótido por separado mediante PCR en el plasmidio 1b como se explicó anteriormente. Posteriormente se procedió a digerir los vectores con las mutaciones A172G y G331A con las enzimas AgeI y EcoRI, se purificó el fragmento desde gel y se ligó en el vector que contenía las mutaciones G82A y A119C respectivamente, digeridos con las mismas enzimas de restricción.

Todas las construcciones fueron verificadas por secuenciación (Macrogen Corp, USA).

2.15 Transfección en células Huh-7 de RNAs bicistrónicos que contienen los IRES mutantes de VHC en el dominio IIIId.

Los RNAs con las estructuras 5'cap y 3'poli (A) generados a partir de los vectores bicistrónicos con los IRESs de VHC de genotipo 1b (control positivo) y mutantes en el dominio IIIId fueron utilizados para transfección en células Huh-7 utilizando el sistema "lipofectamineTM 2000 Transfection Reagent" (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las células Huh-7 se cultivaron hasta un 90% de confluencia en placas de cultivo de 12 pocillos y fueron transfectadas con 400ng de mRNA bicistrónico. Luego de 6-7 horas de la transfección, las células fueron cosechadas y se midió la actividad luciferasa utilizando el sistema reportero Dual-luciferasa (Promega) de acuerdo al protocolo del fabricante. El contenido total de proteína de cada muestra fue determinado mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad). La eficiencia traduccional relativa fue determinada mediante la razón de FLuc/RLuc corrigiendo cada valor por el contenido de proteína.

2.16 Simulación de dinámica molecular.

La estructura inicial del tallo-bucle IIIId fue realizada considerando directamente los datos experimentales de NMR, PDBid: 1F84. Los modelos de los mutantes (G266A, G268U y G266A/G268U) fueron construidos utilizando el módulo "DS Biopolymer" dentro del programa

“Discovery Studio®”. Las simulaciones de la dinámica molecular se llevaron a cabo utilizando el programa NAMD v 2.6 (Phillips y col., 2005). La parametrización de ácidos nucleicos se realizó de acuerdo al campo de fuerza de Cornell (Cornell y col., 1995). Los sistemas moleculares fueron embebidos en una caja periódica conteniendo ~14800 moléculas de agua (TIP3P). La fase de agua se extendió a una distancia de 25Å de cada átomo de soluto. La carga total del sistema fue neutralizada con la adición de 28 contraiones de Na⁺. Las estructuras iniciales fueron energéticamente minimizadas mediante el uso de un algoritmo de gradiente conjugado en 10000 pasos hasta la convergencia. Después de la minimización energética, la temperatura del sistema se incrementó hasta 298K por el método de reasignación de temperatura seguido por un tiempo de equilibración de 500ps. La simulación fue realizada durante 6ns a un tiempo de iteración de 1fs en un ensamble termodinámico isotérmico-isobárico a 298K. Se utilizó una restricción armónica para los enlaces de hidrógeno del agua mediante el algoritmo *Settle*. Las interacciones de Van der Waals fueron truncadas a 12Å, mientras que las interacciones electrostáticas fueron calculadas con el método “Particle Mesh Ewald (PME)”. Las fuerzas electrostáticas de largo alcance y Lenard-Jones fueron evaluadas cada 2 y 4 fs, respectivamente.

2.17 Dicroísmo circular.

Las mediciones de los espectros de dicroísmo circular (DC) se registraron con un espectropolarímetro Jasco (J-600). Los espectros de DC se midieron en el rango de 200 a 300nm a temperatura ambiente, utilizando un ancho de banda de 1nm, tiempo de respuesta de 1 seg y un paso de resolución de 1nm. Las muestras que se analizaron fueron RNAs sintéticos de 27 bases del tallo-bucle IIIId del IRES de VHC comprados a "Integrated DNA Technologies" de secuencia nativa (genotipo 1b) y los mutantes G266A, G268U y G266A/G268U; los cuales se utilizaron a una concentración de 11-16 μ M resuspendidas en agua ultrapura o conteniendo 1 o 2mM MgCl₂ en un volumen final de 180 μ L. Se utilizó una cubeta de cuarzo de paso óptico de 0,1cm.

Los valores de elipticidad molar ($[\theta]$) fueron calculados utilizando la siguiente ecuación:

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{c \times l}$$

Donde θ es la medida de la elipticidad en grados, c es la concentración de la muestra en mg/mL, l es el paso óptico en cm y M es el peso molecular. $[\theta]$ tiene las unidades en grados \times cm² \times dmol⁻¹ (Schmid, 1997). Los espectros de DC se representaron graficando la elipticidad molar versus la longitud de onda en nm.

3. RESULTADOS

3.1 Detección de RNA de VHC en Plasma y PBMC de pacientes chilenos con infección crónica de VHC.

El estudio se inició estableciendo la presencia de RNA de VHC en PBMC y plasma de pacientes chilenos infectados con este virus. La población estudiada presenta características únicas al compararla con otras poblaciones de países desarrollados. En Chile según lo descrito por Soza y col. (2004 y 2006) la mayoría de los pacientes infectados con VHC han adquirido el virus a través de transfusión de sangre; además, no presentan co-infección con VIH y debido al alto costo de la terapia no han recibido tratamiento antiviral.

Se evaluó la prevalencia de RNA de VHC en plasma y PBMC de 45 pacientes con infección crónica de VHC. El RNA viral aislado de los dos tipos de muestras clínicas fue amplificado por una reacción de RT-PCR, utilizando partidores específicos para detectar la región 5'UTR. La región 5'UTR fue amplificada desde todas las muestras de plasma (tabla 1 y figura 7). Sin embargo, 12 de los 45 pacientes infectados (27%) no exhibieron cantidades detectables de RNA viral en los PBMC analizados. En la figura 7 se presenta un ejemplo de los resultados experimentales. Se observa que los pacientes 1, 4 y 11 (carriles 6-11) presentan cantidades detectables de RNA de VHC del 5'UTR sólo en plasma (P),

mientras que los pacientes 26, 27, 28, 29, 30 y 31 (carriles 12-23) presentan RNA viral en ambos compartimentos, es decir plasma (P) y PBMC (C). En estos experimentos se utilizó como control positivo el RNA de VHC de genotipo 1b transcrito *in vitro* (carril 2) y como control negativo se utilizó el RNA total extraído de plasma (P) y PBMC (C) de un donante no infectado con VHC (carriles 4 y 5). Los resultados indican que los PBMC pueden ser infectados por VHC (73%), sin embargo la infección de estas células no representa un fenómeno general, ya que algunos pacientes sólo presentan RNA viral en plasma (27%).

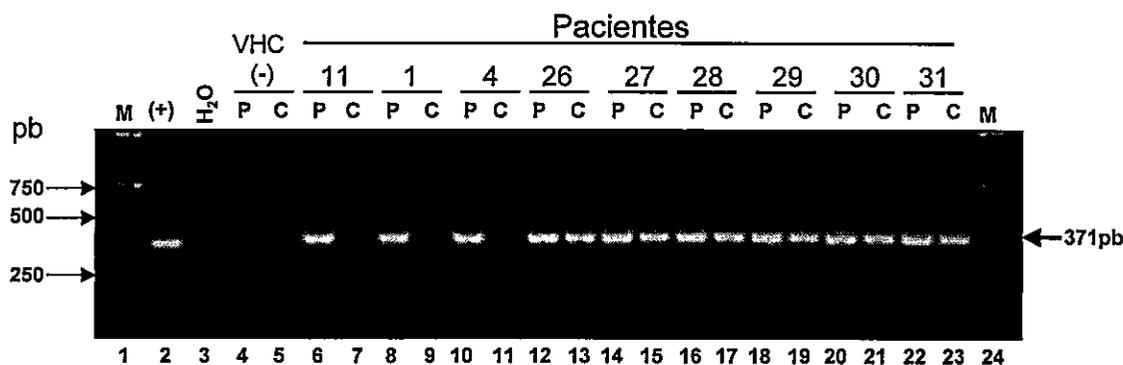


Figura 7. Detección de RNA de VHC en plasma y PBMC de pacientes crónicamente infectados con VHC. El RNA total se extrajo desde plasma (P) y PBMC (C) de los pacientes y se realizó RT-PCR en un único paso diseñado para amplificar la región 5'UTR (carriles 4-23). En estos experimentos se utilizó como control positivo un RNA transcrito *in vitro* de VHC (carril 2) y como control negativo el RNA total extraído de un donante no infectado con VHC (carril 4-5). M: estándar de peso molecular de DNA (carril 1 y 24). H₂O: control de la reacción de RT-PCR (carril 3). El tamaño del producto de PCR corresponde a 371 pb.

Tabla 1. Detección de RNA del 5'UTR de VHC en muestras de plasma y PBMC de individuos crónicamente infectados con el virus. Se indica el número y código del paciente, la presencia (+) o ausencia (-) de RNA de VHC en plasma (P) y PBMC (C), el genotipo y el grupo al cual pertenece el paciente de acuerdo al patrón de SSCP (Grupo SSCP).

Número Paciente	Código Paciente	5'UTR en plasma	5'UTR en PBMC	Genotipo en plasma (P) y PBMC (C)	Grupo SSCP
1	LOF-110	+	-	1b	1
2	GRG-111	+	-	3a	1
3	JMJ-112	+	-	1b	1
4	GSB-2-113	+	-	1b	1
5	JCC-114	+	-	1b	1
6	FH-105	+	-	1	1
7	PBC-3	+	-	3a	1
8	AMV-9	+	-	3a*	1
9	CF-100	+	-	1b	1
10	TC-1-129	+	-	1b	1
11	DV-109	+	-	1	1
12	AV-1-130	+	-	1b	1
13	RGO-29	+	+	1	2
14	LMI-1-126	+	+	1b	2
15	YPY-1-127	+	+	1b	2
16	LPM-108	+	+	2a*(P) / 1b (C)	2
17	JCV-1-137	+	+	3a (P) / 1b (C)	2
18	JBO-1-134	+	+	3a	2
19	ERA-1-122	+	+	1a	2
20	AG-1-124	+	+	1b	2
21	RSC-1-125	+	+	1	2
22	SSG-1-128	+	+	1b	2
23	SMC-25	+	+	1b	2
24	AGV-2	+	+	1b	2
25	ELM-1-131	+	+	1	3
26	AL-115	+	+	1	3
27	PZ-116	+	+	1b	3
28	ECR-117	+	+	1b	3
29	MBV-1-118	+	+	1b	3
30	RM-1-119	+	+	1	3
31	RMM-1-121	+	+	1b	3
32	CJI-1-132	+	+	1	3
33	VQ-1-133	+	+	1b	3
34	RUN-1-135	+	+	1b	3
35	EY-1	+	+	1b	3
36	JLC-5	+	+	5a y 1b (P) / 1b (C)	3
37	AMV-23	+	+	1	3
38	JSN-26	+	+	1b	3
39	LCP-32	+	+	1b	3
40	FP-104	+	+	3a	3
41	PDM-1-136	+	+	3 (P) / 1b (C)	3
42	MCL-4	+	+	1b*	ND
43	Hch-101	+	+	1b	ND
44	PF-103	+	+	1	ND
45	EMR-106	+	+	1	ND

*genotipo de VHC determinado por el sistema comercial "INNO-LIPA HCV II".

ND: Patrones de SSCP no fueron consistentes en experimentos independientes.

3.2 Análisis de las cuasiespecies de VHC presentes en plasma y PBMC mediante conformación de polimorfismo de hebra simple (SSCP).

VHC se caracteriza por un alto grado de heterogeneidad genética, principalmente asociada a la falta de actividad correctora de la RpRd. Como consecuencia, VHC circula como una población de genomas relacionados pero no idénticos, denominado cuasiespecies (Pawlotsky, 2006). Varios estudios han demostrado la capacidad de diferentes cuasiespecies de compartimentalizarse en PBMC, suero e hígado tanto en humanos como en chimpancés infectados (Shimizu y col., 1997; Navas y col., 1998; Maggi y col., 1999; Roque-Afonso y col., 2005). Basados en estas observaciones, se evaluó la distribución de cuasiespecies de VHC en plasma y PBMC mediante la técnica de SSCP, la cual ha sido ampliamente utilizada para estudios de cuasiespecies de VHC (Laskus y col., 2000; Laskus y col., 2004; Roque-Afonso y col., 2005). La técnica de SSCP se basa en la relación entre la movilidad electroforética de una hebra simple de DNA y su secuencia nucleotídica (Orita y col., 1989).

Para estudiar la posible relación entre las cuasiespecies presentes en plasma y PBMC, se analizaron los patrones de migración de SSCP de los amplicones de la región 5'UTR (371pb) de los 45 pacientes anteriormente estudiados. Los ensayos de SSCP se realizaron por duplicado y en experimentos independientes, considerando sólo los

resultados que fueron coherentes en experimentos independientes. Esta restricción redujo la población estudiada a 41 pacientes (tabla 1). Basados en la detección de RNA en los PBMC junto con los resultados obtenidos de los patrones de SSCP de la región 5'UTR, los pacientes estudiados se reunieron en tres grupos (ver tabla 1, última columna "Grupo SSCP"). En las figuras 8-10 se presentan resultados representativos de cada grupo. El primer grupo de pacientes, corresponde a los individuos que tienen cantidades detectables de RNA de VHC sólo en plasma (12 de 41 pacientes). En la figura 8 se observa el patrón de SSCP de los pacientes 1 al 8. Este grupo exhibió un patrón de migración de SSCP diverso (carriles 1-8), lo cual probablemente refleja diferentes cuasiespecies circulantes de VHC (Laskus y col., 2000; Laskus y col., 2004; Roque-Afonso y col., 2005). El segundo grupo, incluye a pacientes en los cuales se detectó RNA de VHC en plasma (P) y PBMC (C), pero que muestran distintos patrones de migración de SSCP entre los compartimentos, lo cual refleja compartimentalización de VHC (12 de 41 pacientes). En la figura 9 se presenta un ejemplo de pacientes pertenecientes al grupo 2, donde se observa el patrón de SSCP de los pacientes 19, 20, 21 y 22 (carriles 4-11) y en la figura 10 el patrón del paciente 24 (carriles 5-6). Una observación interesante es que la mayoría de las muestras de plasma del grupo 2 mostraron un patrón de SSCP diverso en comparación a los PBMC, lo cual sugiere la presencia

de diferentes cuasiespecies de VHC en plasma (figura 9 carriles 4, 6, 8 y 10). El tercer grupo está compuesto por pacientes que presentaron RNA de VHC en plasma (P) y PBMC (C), teniendo un patrón de migración de SSCP visualmente indistinguible entre los compartimentos (17 de 41 pacientes) (figura 9 y 10). En la figura 9 se puede observar el patrón de SSCP de los pacientes 31, 32 y 33 (carriles 2-3, 12-15) y en la figura 10 de los pacientes 37, 36, 35, 40 y 38 (carriles 1 al 4 y 7 al 12). Es interesante destacar que los patrones de SSCP de las muestras aisladas de los PBMC de los pacientes 19, 20, 21 y 22 (grupo 2) y del paciente 33 (grupo 3) fueron similares (comparar en la figura 9 los carriles 5, 7, 9, 11 y 15), lo que contrasta con la diversidad observada en las muestras de plasma del grupo dos (carriles 4, 6, 8 y 10 de la figura 9).

Se ha sugerido que el SSCP es capaz de discernir entre secuencias de VHC que se diferencian en una sustitución nucleotídica (Glavac y Dean, 1993; Laskus y col., 2004). Además, el SSCP permitiría identificar de una mezcla las variantes minoritarias de VHC que representen $\leq 3\%$ de la población total (Laskus y col., 2004). Considerando los antecedentes anteriores, los datos de SSCP apoyan la hipótesis de la compartimentalización de VHC; sin embargo, también sugieren que sólo algunas cuasiespecies presentes en el plasma son capaces de ser recuperadas desde PBMC.

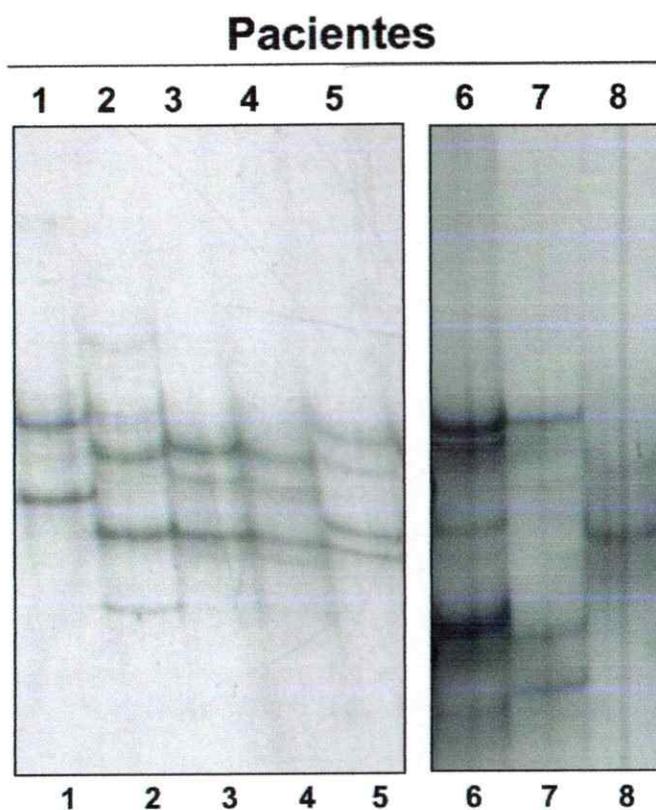


Figura 8. Análisis por SSCP del 5'UTR de VHC en pacientes en los cuales se detecta RNA sólo en plasma (Grupo 1 de SSCP). Patrón de SSCP del 5' UTR de VHC de los productos de PCR generados a partir del RNA extraído desde el plasma de los pacientes en que se detecta RNA de VHC sólo en este compartimiento (carriles 1 al 8) (grupo 1 en tabla 1). El número de los pacientes (1-8) se indica en la parte superior de la figura.

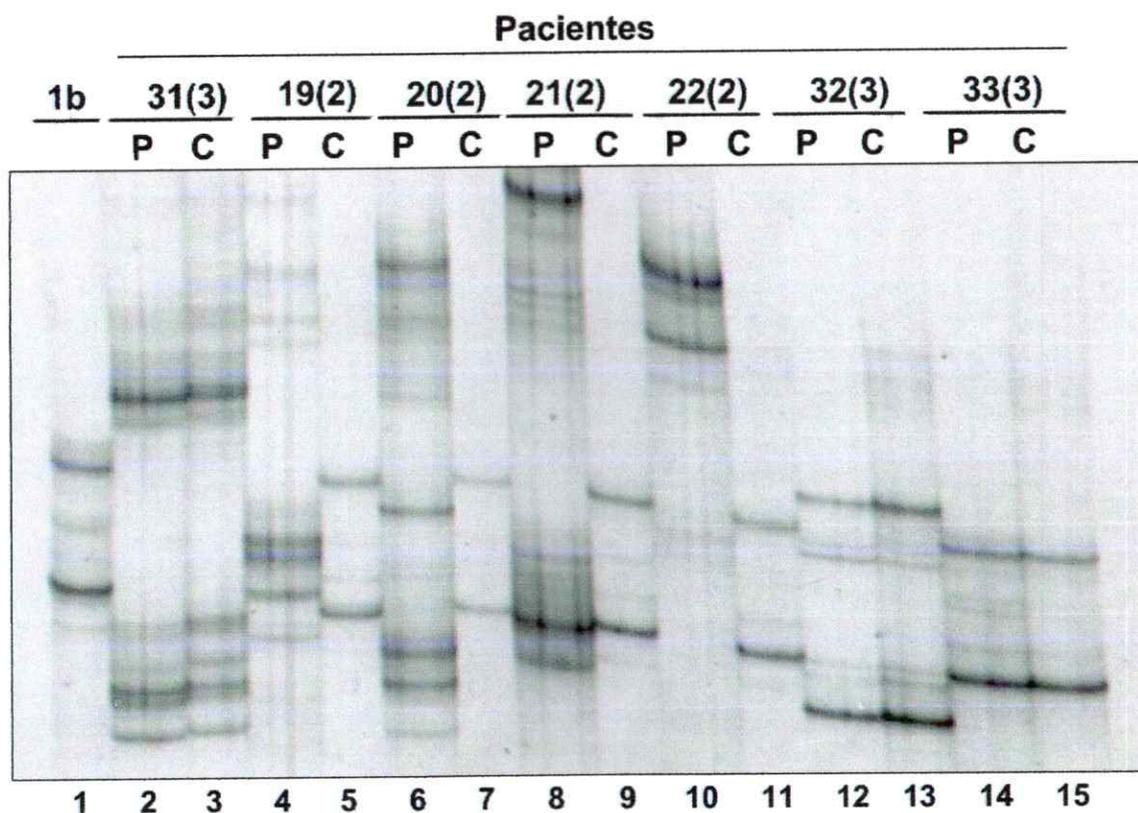


Figura 9. Análisis por SSCP del 5'UTR de VHC en pacientes en que se detecta RNA en plasma y PBMC (Grupo 2 y 3 de SSCP). Patrón de SSCP del 5'UTR de VHC de los productos de PCR generados a partir del RNA extraído desde el plasma (P) y PBMC (C) de diferentes pacientes. El número del paciente se muestra en la parte superior del gel indicándose entre paréntesis el grupo de SSCP al cual fue asignado. Grupo de SSCP 2 (patrones de SSCP diferentes entre P y C de cada individuo; carriles 4-11) y del grupo de SSCP 3 (patrones de SSCP similares entre P y C de cada individuo; carriles 2-3, 12-15). Como control positivo se utilizó un producto de PCR generado a partir del RNA de VHC de genotipo 1b (pFK-I₃₇₇neo/NS3-3' /wt) (carril 1).

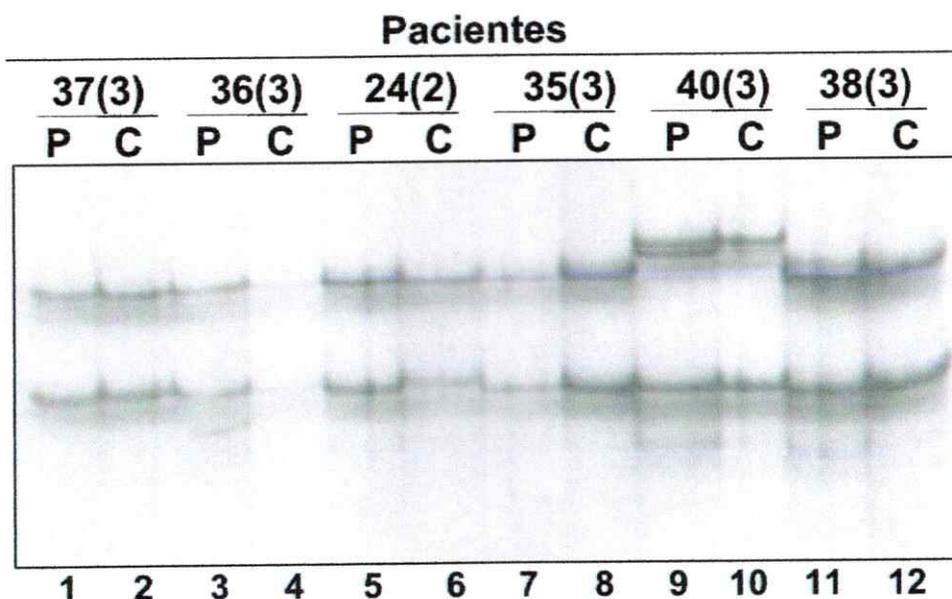


Figura 10. Análisis por SSCP del 5'UTR de VHC en pacientes en que se detecta RNA en plasma y PBMC (Grupo 2 y 3 de SSCP). Patrón de SSCP del 5' UTR de VHC de los productos de PCR generados a partir del RNA extraído desde el plasma (P) y PBMC (C) de diferentes pacientes que pertenecen al grupo de SSCP 2 y 3 de acuerdo a los patrones de migración de SSCP. El número del paciente se muestra en la parte superior del gel indicándose entre paréntesis el grupo de SSCP al cual fue asignado. Grupo de SSCP 2 (patrones de SSCP diferentes entre P y C de cada individuo; carriles 5 y 6) y del grupo de SSCP 3 (patrones de SSCP similares entre P y C de cada individuo; carriles 1-4 y 7-12).

3.3 Análisis de las secuencias del 5'UTR de VHC.

Con el fin de determinar el genotipo de los 5'UTR amplificados de las muestras clínicas, se procedió a la secuenciación de los amplicones obtenidos mediante RT-PCR de la región 5'UTR derivados del plasma y PBMC de los pacientes. Las secuencias se analizaron permitiendo confirmar el genotipo de VHC en pacientes que habían sido previamente genotipificados mediante el sistema comercial "INNO-LIPA HCV II" (datos no mostrados). Además, permitió adjudicar el genotipo a los pacientes

que no fueron analizados por este último método (tabla 1). El análisis de las secuencias confirmó que el genotipo 1 es el más representativo en el plasma de la población estudiada (80%), además se encontraron los genotipo 2 (2%), 3 (16%) y 5 (2%) (tabla 1 y figura 11). Estos datos concuerdan con estudios anteriores que muestran una alta prevalencia del genotipo 1b entre la población chilena (Soza y col., 2004; Soza y Lopez-Lastra, 2006). De los 33 pacientes en que se detectó RNA viral en plasma y PBMC (73%), 29 presentó el mismo genotipo en ambos compartimientos (88%), 3 mostraron distintos genotipos en plasma y PBMC (9%) y 1 presentó dos genotipos diferentes en plasma y uno de ellos en PBMC (3%) (tabla 1 y figura 11). Específicamente, en los pacientes 16, 17 y 41 se detectaron dos genotipos, presentando en el plasma (P) el genotipo 2, 3 y 3, respectivamente, mientras que en PBMC (C) presentaron el genotipo 1b. El paciente 36 presentó simultáneamente los genotipos 1b y 5a en el plasma, mientras que en PBMC sólo se detectó el 1b. Estos resultados están en acuerdo con una publicación anterior, en la cual se describe al genotipo 1 como linfotrópico (Lerat y col., 1998).

El alineamiento de las secuencias mayoritarias del 5'UTR encontradas en plasma y PBMC de los pacientes que se agruparon en el grupo de SSCP 2 (figura 11B), mostró que 6 de los 12 pacientes no presentaron diferencias nucleotídicas entre los compartimientos, aunque

mediante SSCP se observaron diferencias. De esta manera, los pacientes 15, 18, 19, 20, 22 y 24 presentaron secuencias idénticas entre plasma y PBMC (figura 11B). Esto sugiere que la secuencia mayoritaria (la secuencia principal amplificada en la reacción de RT-PCR) en ambos compartimentos es la misma. Al analizar las secuencias del grupo 3, del cual se esperaba obtener secuencias similares entre plasma y PBMC, se encontró que 4 de los 17 pacientes (pacientes 25, 31, 32 y 37) presentaron diferencias nucleotídicas entre los compartimentos (figura 11C). El análisis de las secuencias del 5'UTR amplificado de los pacientes 42-45 (grupo SSCP ND) mostró que sólo en el paciente 45 se observan diferencias nucleotídicas entre los compartimentos (figura 11D).

Al considerar los pacientes en que se detectó RNA del 5'UTR de VHC en plasma y PBMC, se puede señalar que 36% de los pacientes (grupo SSCP 2) exhibieron compartimentalización. Esta estimación no considera a los pacientes del grupo SSCP 3 y ND que presentaron diferencias nucleotídicas entre plasma y PBMC (tabla 1, figura 11).

A. Alineamiento de los 5'UTR de plasmas (p) de pacientes del grupo 1 de SSCP.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
1b	ACTCCCTGTGAGGAAC	TCTT	CACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCC	TATGAGTGTGGTGCAGCCTCCAGGACCC	CCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTC
1a
1c
2a
2b
2c
3a
3b
5a	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
p1
p2
p3
p4
p5
p6	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
p7
p9-a
p9-b
p10
p11
p12

B. Alineamiento de las secuencias de plasma (p) y PBMC (c) de pacientes del grupo 2 de SSCP.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
1b
1a
1c
2a
2b
2c
3a
3b
5a
p13
c13-a
c13-b
p14
c14
p15
c15
p16
c16
p17
c17
p18
c18
p19
c19
p20
c20
p21
c21
p22
c22
p23
c23
p24
c24

	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
1b
1a	TGGGACCGGTGAGTACACCGGAAATTCACAGGACGACCGGTCCTTTCTTGGATCAA-CCCGCTCAATGCGTGGAGATTGSGCGGTGCGCCCGGAGACTGCTAGCCGA
1c
2a
2b
2c
3a
3b
5a
p13
c13-a
c13-b
p14
c14
p15
c15
p16
c16
p17
c17
p18
c18
p19
c19
p20
c20
p21
c21
p22
c22
p23
c23
p24
c24

3.4 Comparación de las eficiencias traduccionales *in vitro* de los IRES de VHC recuperados de plasma y PBMC de pacientes con infección crónica por VHC.

Luego de establecer que sólo algunos individuos presentan cantidades detectables de VHC en PBMC y sabiendo que existen diferencias entre las cuasiespecies virales presentes en plasma y PBMC, se continuó con la caracterización funcional de los virus aislados desde ambos compartimentos biológicos. Considerando que la síntesis de las proteínas virales ha sido estimada como uno de los pasos limitantes en la replicación de VHC (Bartenschlager, 2002), el estudio se enfocó en el proceso de iniciación de la traducción a partir del mRNA viral, el cual es mediado por un IRES. La actividad traduccional de los IRESs aislados desde virus presente en plasma y PBMC se determinó utilizando vectores reporteros bicistrónicos Dual Luciferasa. En estos ensayos, el IRES de VHC (nucleótidos 13-383) fue recuperado a partir de las muestras clínicas mediante RT-PCR y el amplicón fue clonado en un vector de expresión Dual Luciferasa entre los genes de luciferasa de Renilla y luciferasa de Firefly, entre los sitios de restricción XhoI y EcoRI (figura 12A) (Brasey y col., 2003). En los vectores bicistrónicos, la traducción del primer cistrón (luciferasa de Renilla) es cap-dependiente, mientras que la traducción del segundo cistrón (luciferasa de Firefly) es

dependiente del IRES de VHC. Por lo tanto, la actividad del IRES de VHC es monitoreada mediante la actividad de luciferasa de Firefly (FLuc), mientras que la actividad de luciferasa de Renilla (RLuc) sirve como control de la reacción de traducción. La eficiencia relativa de los IRESs se determina al comparar la razón entre FLuc/RLuc entre los distintos RNAs bicistrónicos. Para estos experimentos lo primero que se realizó fue construir el vector que serviría como control positivo. Se seleccionó construir un vector bicistrónico control con el IRES del genotipo viral 1b (nombrado como 1b), ya que es el genotipo predominante en la población estudiada (figura 12A). La actividad traduccional del vector control (1b) se validó contra una construcción similar conteniendo el IRES de VHC de genotipo 1a (pcDNA/Ren/HCV/FF) previamente caracterizado por otro laboratorio (Bordeleau y col., 2005). Para esto, se realizaron experimentos de traducción *in vitro* en dos sistemas: en lisado de reticulocitos de conejo (RRL) y en extractos de traducción de células Huh-7 utilizando 8ng/ μ l de RNAs bicistrónicos sin cap y 60ng/ μ l de RNAs bicistrónicos con cap, respectivamente (figura 12B-D). Como se observa en la figura 12B el IRES de VHC de genotipo 1b puede iniciar la traducción de FLuc en ambos extractos traduccionales al igual que el IRES del vector publicado (pcDNA/Ren/HCV/FF). Las actividades de las luciferasas en los experimentos de traducción *in vitro* utilizando RRL y extractos de traducción de células Huh-7 se presentan en la figura 12C

donde se observa las actividades de RLuc y en la figura 12D las actividades de FLuc. En los experimentos de traducción *in vitro* se utilizó como control negativo un vector bicistrónico que contiene en la región intercistrónica el IRES trunco (Δ) y por tanto no funcional del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) (DL) (figura 12A). El IRES- Δ EMCV se seleccionó como control negativo puesto que es capaz de inhibir el proceso de reiniciación de los ribosomas y no es capaz de iniciar la traducción en forma interna (Brasey y col., 2003; Wilson y col. 2000).

Se analizaron cincuenta y cuatro vectores bicistrónicos Dual Luciferasa (llamados DL VHC 1 al 54, ver tabla 3 en anexo 2) que contenían los IRESs aislados desde virus presente en plasma y PBMC de 19 pacientes con infección crónica de VHC. Todos los vectores fueron secuenciados y la secuencia de los IRESs alineados usando el programa "CLUSTAL W". En el anexo 2 se indica el genotipo y los cambios nucleotídicos de los IRESs clonados en el vector bicistrónico considerando la secuencia prototipo de cada genotipo de VHC. La eficiencia traduccional relativa de los IRESs de VHC fue calculada como la razón de las actividades de FLuc/RLuc y comparada con la razón del IRES de genotipo 1b, el cual fue arbitrariamente designado como 100% (figura 13). Basado en los resultados de las secuencias se determinó como actividad 100% el promedio de todas las actividades calculadas para los IRESs con genotipo 1b. Por consiguiente, en este cálculo se

incluyó las actividades relativas de los vectores bicistrónicos que presentaron secuencia 1b (ver tabla 3) junto con la actividad relativa del control positivo 1b construido para este estudio. Por lo tanto, de los 54 vectores DL VHC estudiados se obtuvieron sólo 28 vectores bicistrónicos (nombrados como IRES 1-28 en la figura 13) con secuencia IRES diferente a la de su prototipo.

En la figura 13 se presenta el resumen de los resultados obtenidos de los experimentos de traducción *in vitro* de los plasmidios DL VHC utilizando RRL; se grafica el porcentaje de actividad traduccional de los 28 IRESs (IRES 1-28) identificados en el estudio presentándose los promedios de las actividades de los vectores DL VHC con la misma secuencia IRES y 1b (ver tabla 3). Como se muestra en la figura 13 se observa una gran heterogeneidad en las eficiencias traduccionales de los IRESs aislados variando entre un 9 y 109% con respecto a la actividad del IRES 1b. En la figura además se indica el genotipo y el número de vectores bicistrónicos generados a partir de diferentes aislados utilizados en el cálculo de la eficiencia traduccional. La mayoría de los IRESs presentaron una actividad comparable con el IRES 1b; sin embargo, los IRESs 15 y 25 presentaron actividades de 9,3 y 9% respectivamente, siendo los IRESs con la menor eficiencia traduccional de este estudio. Al considerar que la actividad relativa del control negativo (DL) es de 7,1% podemos señalar que estos IRES presentan

una actividad extremadamente baja de 2,2 y 1,9%, respectivamente. Se encontraron otros IRESs con una actividad intermedia, es decir, de aproximadamente 50% o menos de la actividad del genotipo 1b. En este grupo se encuentra a los IRES 1, 7, 10, 16, 18, 19, 21, 24 y 27 (figura 13). Otros IRESs presentaron actividades mayores al 50%, como los IRES 2 al 6, 8, 11, 14, 20 y 28 (figura 13).

Por último, se encontraron IRESs que presentaron actividades traduccionales levemente superior al IRES 1b en los experimentos de traducción *in vitro* en RRL. Los IRES 9, 12, 13, 17, 22, 23 y 26 presentaron actividades promedios de 109, 104, 106, 108, 107, 102 y 109 %, respectivamente (figura 13). De estos resultados se puede proponer que los cambios nucleotídicos encontrados en estos IRES no afectarían de manera importante la actividad traduccional del IRES de VHC en el sistema de traducción *in vitro* utilizado.

En la figura 14 se presentan las actividades de RLuc y FLuc de los RNAs bicistrónicos utilizados en la figura 13. Los resultados muestran la gran variabilidad de las actividades de FLuc, determinadas por los distintos IRESs y de RLuc como el control de traducción.

Si comparamos las actividades de los IRESs clonados desde el plasma y PBMC de un mismo paciente (tabla 3, figura 13), se puede observar que en 11 pacientes los IRESs aislados desde plasma (P) y PBMC (C) presentaron actividades traduccionales diferentes: 1 (P: 1b y

C: IRES 5), 2 (P: IRES 11 y C: 1b), 5 (P: IRES 9, 25 y C: IRES 8, 1b), 25 (P: IRES 19 y C: 1b), 29 (P: IRES 18 y C: IRES 2), 101 (P: IRES 27 y C: 1b), 106 (P: IRES 10 y C: IRES 15), 108 (P: IRES 28 y C: IRES 1 y 14), 110 (P: IRES 8, 24 y C: 1b), 112 (P: IRES 23, 24 y C: IRES 16) y 116 (P: 1b y C: IRES 3). En resumen, en 69% de los pacientes (11 de 16) en los cuales se analizaron las actividades traduccionales *in vitro* de los IRES aislados desde plasma y PBMC utilizando RRL, se observaron diferencias entre las eficiencias traduccionales de los IRES aislados desde los dos compartimentos. El análisis de las secuencias de estos IRESs reveló diferencias nucleotídicas entre los IRESs aislados de plasma y PBMC, lo cual sugiere la presencia de diferentes variantes del virus en estos pacientes. Por otra parte, en 5 pacientes se observaron actividades traduccionales *in vitro* similares entre los IRES aislados desde plasma y PBMC; específicamente en los pacientes: 23 (P: 1b y C: IRES 9), 26 (P y C: 1b), 104 (P y C: IRES 20), 115 (P y C: IRES 12) y 117 (P: IRES 13 y C: 1b) (tabla 3, anexo 2). De éstos, los pacientes 23 y 117 presentaron diferencias nucleotídicas entre el plasma y PBMC, en cambio los pacientes 26, 104 y 115 presentaron la misma secuencia nucleotídica entre los compartimentos (tabla 3, anexo 2).

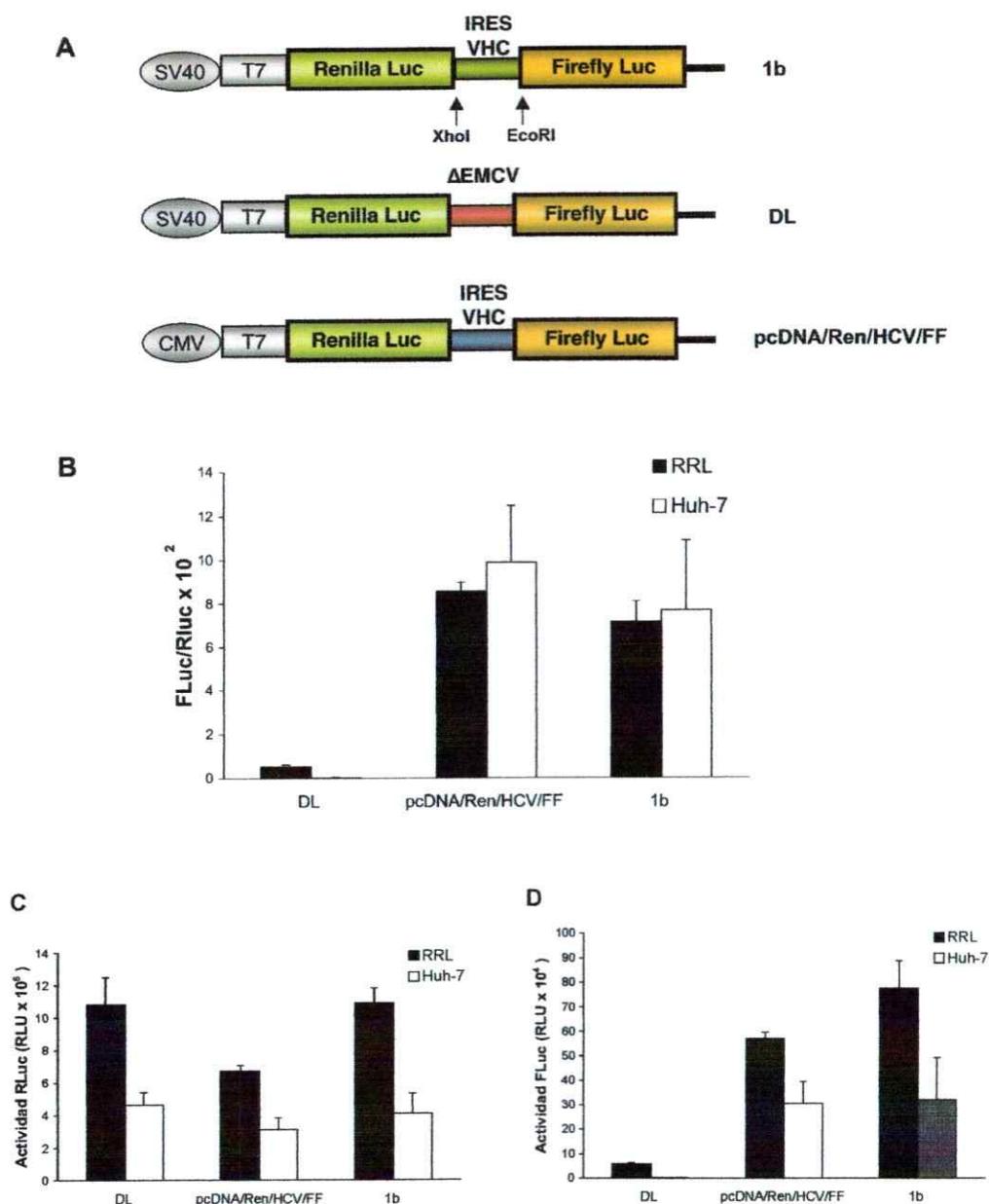


Figura 12. Plasmidios bicistrónicos y la actividad traduccional *in vitro* del IRES de VHC 1b en RRL y extractos Huh-7. A. Representación esquemática de los vectores reporteros Dual luciferasa usados en este estudio, DL: control negativo, pcDNA/Ren/HCV/FF: vector con IRES de VHC genotipo 1a (control positivo en este experimento), 1b: vector con el IRES de VHC de genotipo 1b construido en este estudio y que será el control positivo en los experimentos siguientes. B. RNAs bicistrónicas sin cap (RRL) y con cap (extractos Huh-7) fueron traducidos como se describe en materiales y métodos. Se presenta la razón FLuc/RLuc ($\times 10^2$) en RRL y en extractos Huh-7 (Huh-7). C. Se muestra la actividad de la luciferasa de Renilla (RLuc) (RLU $\times 10^6$) en RRL y Huh-7. D. Se muestra la actividad de la luciferasa de Firefly (FLuc) (RLU $\times 10^4$) en RRL y Huh-7.

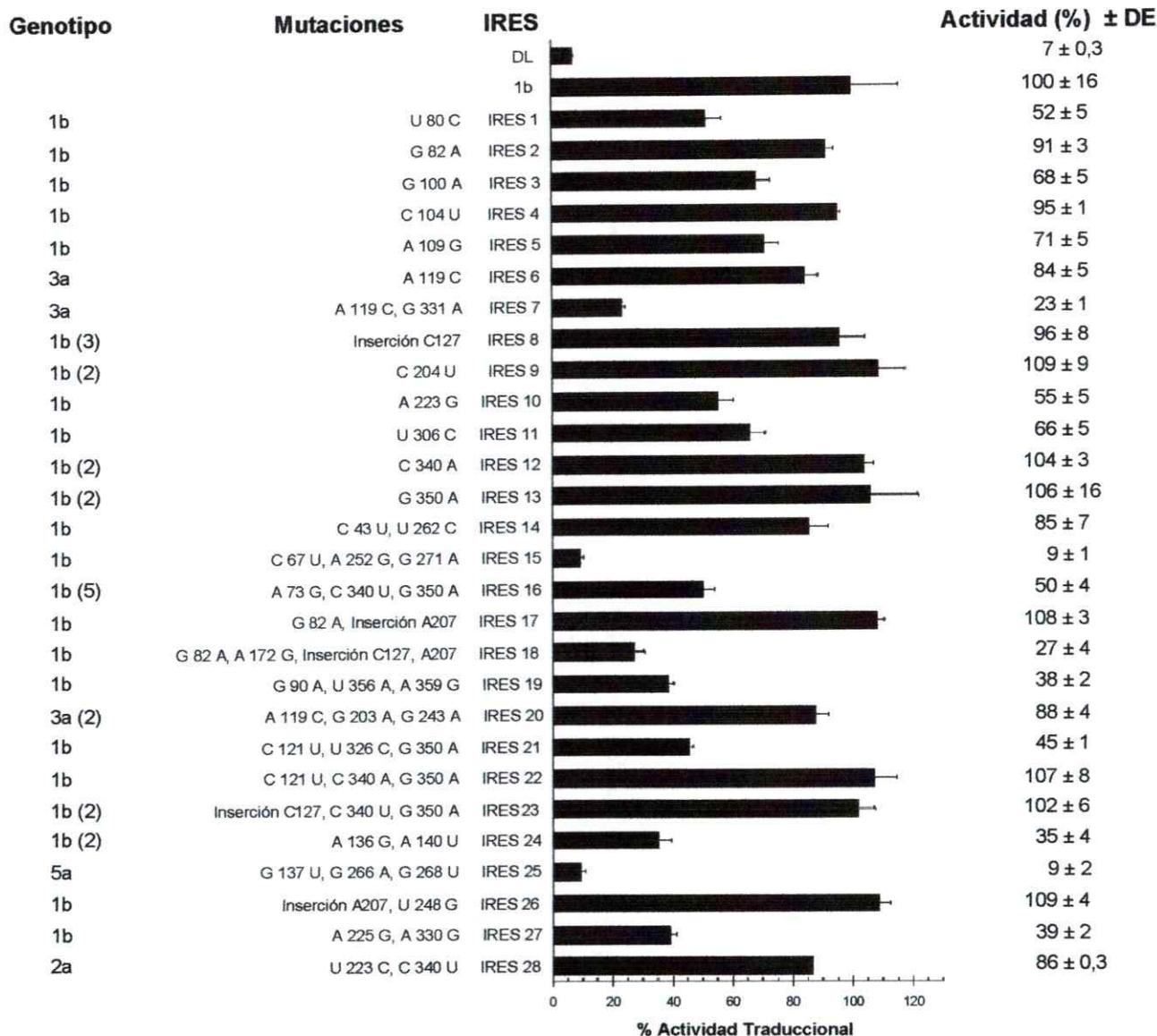


Figura 13. Resumen de las eficiencias traduccionales *in vitro* en RRL de los IRESs de VHC recuperados de los virus presentes en los pacientes y las mutaciones encontradas en estos IRES. Plasmidios bicistrónicos correspondientes a los IRESs indicados (IRES 1-28) fueron usados para realizar traducción *in vitro* utilizando RRL. La actividad relativa de los IRESs se determinó mediante la razón entre FLuc/RLuc, las actividades fueron normalizadas con respecto al IRES 1b, razón que fue arbitrariamente considerada como el 100%. Para determinar las actividades promedios se consideraron las actividades de todos los RNAs bicistrónicos con IRES con la misma secuencia. A la derecha se presentan los porcentajes de actividad con respecto al IRES nativo 1b y la desviación estándar y a la izquierda las mutaciones encontradas en los IRESs al comparar cada IRES con su secuencia prototipo. Además se indica el genotipo del IRES y entre paréntesis la cantidad de vectores bicistrónicos con IRES de igual secuencia.

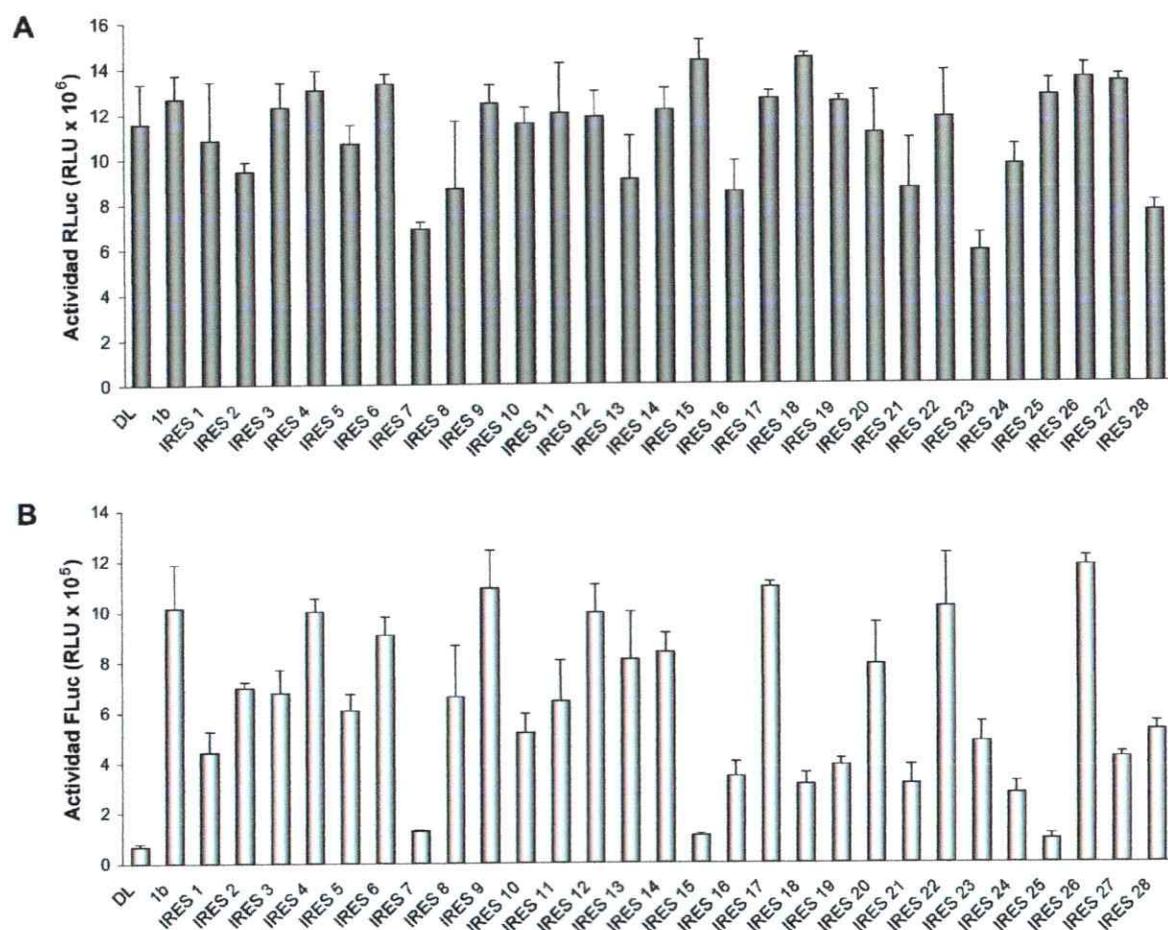


Figura 14. Actividad de RLuc y FLuc de los RNA bicistrónicos con los IRESs de VHC recuperados de los virus presentes en las muestras clínicas de los pacientes en RRL. Plasmidios bicistrónicos correspondientes a los IRES indicados (IRES 1-28) fueron usados para realizar traducción *in vitro* utilizando RRL. Se grafican las actividades promedio de RLuc (A) y de FLuc (B) con la desviación estándar.

3.5 Caracterización de los IRESs clonados en el vector Dual Luciferasa mediante secuenciación.

Las secuencias de los 54 IRESs recuperados desde los virus circulantes en plasma y PBMC de 19 diferentes pacientes que se clonaron en el vector bicistrónico, fueron alineadas con el programa CLUSTAL W contra la secuencia de los IRESs de genotipo 1b (número de acceso AJ238799), 2a (número de acceso D00944), 3a (número de acceso D17763) y 5a (número de acceso Y13184). De los IRESs clonados de los pacientes, 89% correspondió al genotipo 1b (48 de 54 DL VHC), 7% al genotipo 3a (4 de 54 DL VHC), 2% al genotipo 2a (1 de 54 DL VHC) y 2% al 5a (1 de 54 DL VHC). Los IRES fueron agrupados en base a su genotipo y alineados contra la secuencia prototipo del genotipo correspondiente, identificándose los cambios nucleotídicos respecto a la secuencia nativa (tabla 3, anexo 2). De los 35 cambios nucleotídicos identificados, la mayor parte de ellos fueron sustituciones, sin embargo, también se describen las inserciones C127 y A207 (figura 15).

En la tabla 3 se presentan los cambios nucleotídicos encontrados en los IRESs que se utilizaron en los experimentos de traducción *in vitro* (figura 13) y en la figura 15 se esquematiza la posición de estas mutaciones en la estructura secundaria del IRES de VHC.

Al realizar el alineamiento de los IRESs de genotipo 1b, se puede observar que se encontraron las inserciones C127 y A207. Estas

inserciones se encontraron en más de un IRES analizado (inserción C127 en los vectores DL VHC 1, 37, 46, 48, 49 y 50 e inserción A207 en los DL VHC 9, 24 y 37) y recuperados a partir de muestras de diferentes pacientes. Esta observación sugiere que estas mutaciones no corresponden a errores azarosos asociados al procedimiento experimental utilizado o a errores asociados a la enzima Taq DNA polimerasa durante el proceso de clonamiento; además la inserción C127 ha sido reportada anteriormente por otros grupos (Laporte y col., 2000; Radkowski y col., 2004; van Leeuwen y col., 2004; Gallegos-Orozco y col., 2006). También se encontraron algunas substituciones nucleotídicas las cuales concuerdan con publicaciones previas, como por ejemplo: C104U (Radkowski y col., 2004; Thelu y col., 2007); C121U, G350A (Thelu y col., 2004); A119C, A136G (Moratorio y col., 2007); A109G, A172G (Tang y col., 1999); C204U (Radkowski y col., 2004; Thelu y col., 2004; Gallegos-Orozco y col., 2006); A225G (Laporte y col., 2000) y C340U (Thelu y col., 2004; Thelu y col., 2007). Además, este estudio permitió identificar, nuevas substituciones como: G90A, U356A, A359G en el DL VHC 5; G82A en los DL VHC 9 y 37; C340A en los DL VHC 11, 12 y 53; G100A en el DL VHC 13; U306C en el DL VHC 18; U248G en el DL VHC 24; A330G en el DL VHC 27; C67U, A252G y G271A en el DL VHC 32; A223G en el DL VHC 33; A73G en los DL VHC 41-45; U80C en el DL VHC 22; A136G y A140U en el DL VHC 51;

C121U y U326C en el DL VHC 52 (tabla 3, anexo 2).

Al realizar el alineamiento de DL VHC 21 de genotipo 2a, se encontró la sustitución U223C la cual no ha sido reportada por otros grupos.

Al realizar el alineamiento de los IRES de genotipo 3a, se encontraron sustituciones antes publicadas como A119C (Moratorio y col., 2007) en todos los IRESs de este genotipo; G243A (Lerat y col., 2000; Thelu y col., 2004) en los DL VHC 19 y 20 y G331A (Laporte y col., 2000) en el DL VHC 30. Además se encontró la mutación G203A en los DL VHC 19 y 20. Esta última mutación aún no ha sido reportada.

Finalmente, al realizar el alineamiento de DL VHC 35 de genotipo 5a, se encontró la sustitución antes publicada G266A (Laporte y col., 2000) y las mutaciones no reportadas G137U y G268U.

En concordancia con los resultados de secuenciación de los 5'UTR utilizados en los ensayos de SSCP (tabla 1), el análisis de las secuencias de los IRESs clonados en el vector bicistrónico confirmó que el paciente 108 presenta el genotipo 2a en plasma y 1b en PBMC y que el paciente 5 presenta en plasma el genotipo 1b y 5a pero en PBMC presenta el genotipo 1b (tabla 3, anexo 2).

Al analizar los datos de secuencia en conjunto con los experimentos de traducción *in vitro* (figura 13), se observa que los IRESs que exhiben una baja actividad traduccional (IRES 7, 15, 18 y 25) presentan mutaciones en dominios del IRES de VHC involucrados en la unión de la

subunidad 40S ribosomal (figura 15). El IRES 7 presenta el cambio G331A en el dominio IV, el IRES 15 presenta las mutaciones A252G y G271A en el dominio IIIId, el IRES 18 presenta el cambio A172G en la unión de los dominios IIIabc y por último el IRES 25 presenta las mutaciones G266A y G268U en el bucle IIIId. Otros IRESs con una actividad IRES disminuida son el IRES 10 con la mutación A223G en el dominio IIIb, el IRES 21 que presentó las mutaciones U326C en el pseudo nudo (dominio IIIf), el IRES 24 que presentó las mutaciones A136G y A140U en la base del dominio III y el IRES 27 que presentó las mutaciones A225G y A330G en el dominio III (figura 15).

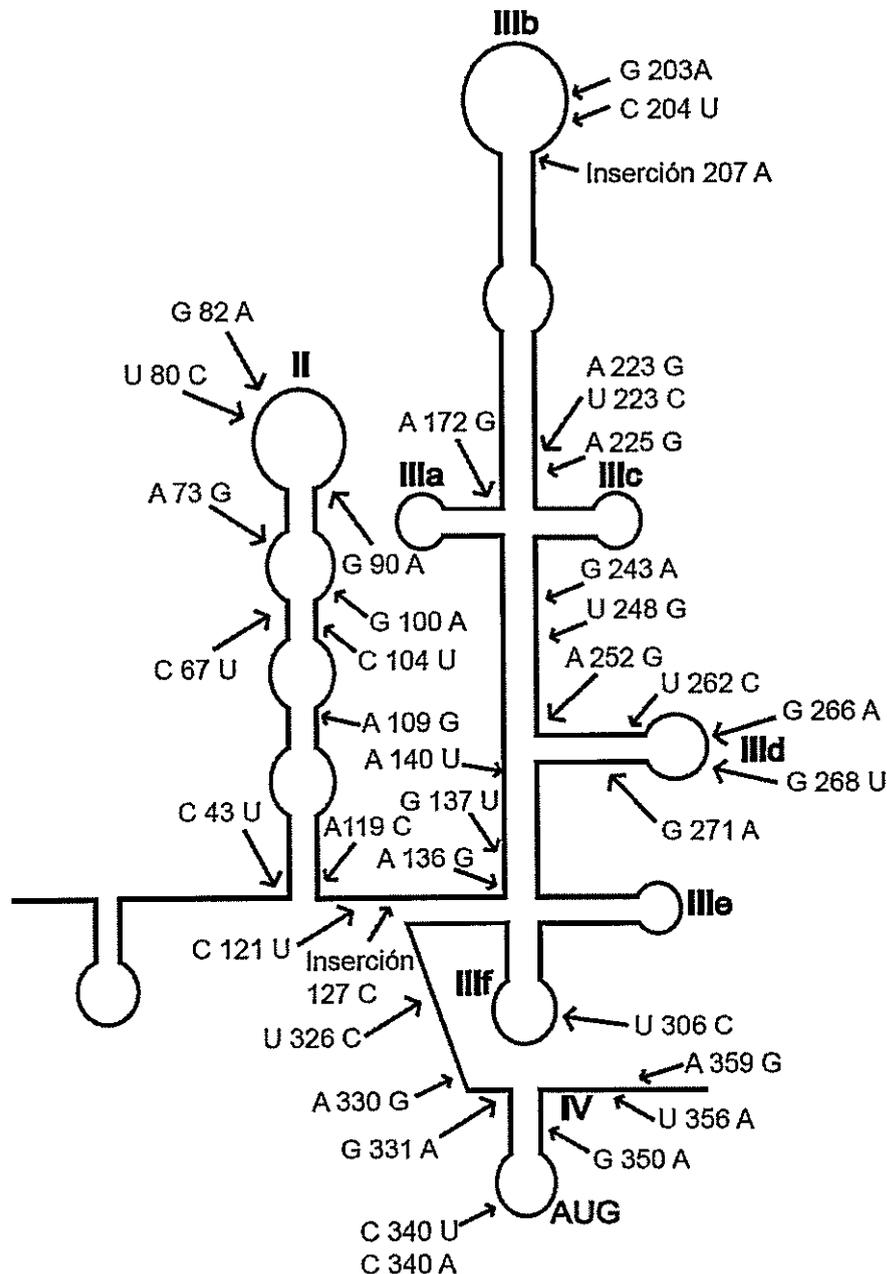


Figura 15. Esquema del modelo de la estructura secundaria del 5'UTR de VHC con las mutaciones encontradas en los IRESs de los virus recuperados de los pacientes que se utilizaron en los experimentos de traducción *in vitro*. Se indican los nombres de los dominios del IRES de VHC (II, IIIa-f y IV). Las flechas indican la posición de las sustituciones nucleotídicas identificadas en los IRESs de los pacientes que se clonaron en el vector bicistrónico Dual Luciferasa y que fueron utilizados para determinar la actividad traduccional *in vitro*. Estructura basada en las publicadas por Brown y col. (1992) y Honda y col. (1996a).

3.6 Eficiencia traduccional *in vitro* de las mutaciones que ocurren naturalmente en el IRES de VHC.

Diversos estudios han demostrado que mutaciones nucleotídicas diseñadas para mantener la estructura helicoidal en la región 5'UTR de VHC preserva la función del IRES. Estos experimentos sugieren que la integridad estructural del IRES es fundamental para su actividad traduccional (Lukavsky y col., 2000; Collier y col., 2002; Kieft y col., 2002). Sin embargo, se ha observado que ciertas mutaciones en algunos bucles del dominio III son capaces de inhibir la actividad traduccional del IRES. Estas últimas observaciones permiten sugerir que la función del IRES de VHC puede también depender, en cierta medida, de la secuencia primaria (Kieft y col., 1999; Tang y col., 1999; Jubin y col., 2000). La función de la secuencia primaria y la sensibilidad de diferentes regiones del IRES de VHC a ser mutadas y modificar su actividad aún no ha sido dilucidada completamente. Con el fin de comprender mejor el efecto de las mutaciones identificadas a partir de los IRESs aislados de virus presentes en las muestras clínicas sobre la actividad traduccional, se procedió a introducir cada una de ellas o en combinación en el contexto del IRES 1b prototipo. Con el fin de acotar el estudio, se analizaron sólo las substituciones nucleotídicas de aquellos IRESs virales que exhibieron una actividad traduccional reducida relativa al IRES 1b prototipo utilizado como control (figura 13). Por

tanto, en este estudio se analizaron las substituciones encontradas en los IRES 7, 10, 11, 15, 16, 18, 19 y 25 (figura 13). Las mutaciones fueron nombradas de acuerdo al cambio nucleotídico con respecto a la secuencia prototipo y a su posición. El efecto de las mutaciones en la actividad IRES se determinó mediante experimentos de traducción *in vitro* en RRL. Para mayor claridad, los resultados se presentan ordenados de acuerdo a los distintos dominios estructurales del IRES de VHC.

En la figura 16 se presentan las eficiencias traduccionales graficadas como la razón FLuc/RLuc de los RNAs bicistrónicos con las mutaciones que se analizaron en el dominio II. Se puede observar que las mutaciones del tallo-bucle II (figura 16A) presentan actividades relativas promedios entre 61 y 88%. C67U presentó 88%, A73G presentó 61%, G82A presentó 88%, G90A presentó 62% y A119C presentó 72% de actividad con respecto al IRES 1b nativo (figura 16B). En los paneles C y D de la figura 16 se grafican las actividades RLuc y FLuc, respectivamente, mostrando que RLuc se mantiene constante mientras que la actividad FLuc varía. Esto indica que la diferencia observada en la razón FLuc/RLuc no se debe a la inestabilidad del RNA ni a la modificación de la actividad traduccional.

En la figura 17 se presentan las eficiencias traduccionales promedios graficadas como la razón FLuc/RLuc de los RNAs bicistrónicos con las

mutaciones que se analizaron en el dominio III (figura 17A). Los resultados muestran que la mutación G137U que se encuentra en la unión de los dominios IIIef presentó 64% de actividad con respecto al IRES 1b prototipo (figura 17B). La mutación A172G que se encuentra en la unión de los dominios IIIabc presentó 30% de actividad y A223G que se encuentra en el dominio IIIb un 50% de actividad (figura 17B). La mutación U306C que se encuentra ubicada en el dominio IIIf presentó una actividad de 64% (figura 17B) similar al IRES 11 con esta mutación (66%, figura 13). La doble mutante G82A/A172G que tiene mutaciones en el dominio II y III, presentó 32% de actividad con respecto al IRES 1b (figura 17B), si se comparan las actividades por separado, G82A presentó 88% (figura 16B) y A172G 30% con respecto al IRES 1b (figura 17B). Estas mutaciones fueron encontradas en el IRES 18 que presentó una actividad promedio de 27% (figura 13), en este IRES además se encontraron las inserciones C127 y A207. Si se analiza la figura 13, se puede observar que el IRES 8 posee sólo la inserción C127 con respecto a la secuencia 1b y presentó una actividad de 96% con respecto al IRES 1b, por lo tanto se puede inferir que el cambio responsable de la baja actividad del IRES 18 es la sustitución A172G. En los paneles C y D de la figura 17 se grafican las actividades RLuc y FLuc, respectivamente, mostrando la variación en la actividad de FLuc, la cual está determinada por los IRESs con las distintas mutaciones mientras que RLuc se

mantiene constante.

En la figura 18B se grafican las eficiencias traduccionales representadas como la razón FLuc/RLuc promedio obtenidas de los experimentos de traducción *in vitro* utilizando RRL de las mutaciones realizadas en el tallo-bucle IIIId identificadas desde los pacientes (figura 18A). Se puede observar que la mutante A252G (última base del dominio IIIc) presenta 47% y G271A 59% de actividad, sin embargo la doble mutante A252G/G271A sólo presenta un 15% de actividad con respecto al IRES 1b, si se considera que el DL (control negativo) presenta sólo 9% de actividad del IRES 1b; esta doble mutante presentaría sólo 6% de actividad del IRES control. El IRES 15 recuperado del paciente que presentó las mutaciones: C67U, A252G y G271A exhibió una actividad promedio de 9,3% (figura 13). De estos resultados se puede concluir que las substituciones A252G y G271A son las responsables de la baja actividad traduccional relativa de este IRES, ya que la mutación C67U presentó 88% de actividad del IRES 1b control (figura 16). Las otras mutantes que se analizaron en el dominio IIIId del IRES fueron la mutante G266A, G268U y la doble mutante G266A/G268U que presentaron 14% de actividad con respecto al IRES 1b (5% si se resta la actividad del control negativo DL). Estas mutaciones se encontraron en el IRES 25 junto con la substitución G137U, de acuerdo a los resultados de las traducciones *in vitro* se puede concluir que la baja actividad

presentada por este IRES (9%) se debe principalmente a las mutaciones G266A y G268U. Para comprobar estas observaciones se realizaron experimentos de traducción *in vitro* utilizando extractos de traducción cap-dependientes derivados de células Huh-7 (figura 18B); en este sistema se obtuvo el mismo comportamiento antes observado con el sistema de traducción en RRL, es decir, A252G y G271A presentaron actividades de 18% y 26% respectivamente y las mutantes G266A, G268U, A252G/G271A y G266A/G268U presentaron un 2-1% de actividad con respecto al IRES 1b (figura 18B, barras blancas). En los paneles C y D de la figura 18 se grafican las actividades de RLuc (barras claras) y FLuc (barras oscuras) del experimento de traducción en RRL y en Huh-7, respectivamente, mostrando la variación en la actividad de FLuc, la cual está determinada por los IRESs con las distintas mutaciones.

Para evaluar si las mutaciones en el dominio IIIId presentan una actividad disminuida en un sistema celular, se procedió a transfectar los RNAs bicistrónicos con cap y poli (A) correspondiente a los mutantes del dominio IIIId en células Huh-7. En la figura 19A se presenta la eficiencia traduccional de los RNAs en porcentaje considerando como 100% la razón entre FLuc/RLuc/ μ g proteína del IRES 1b. Se observa que todos los mutantes del dominio IIIId analizados presentan una actividad disminuida en células Huh-7, en el panel B se grafican las actividades

de Rluc/ μ g proteína y Fluc/ μ g proteína.

Las mutaciones presentes en el dominio IIIId afectaron drásticamente la actividad del IRES de VHC. Esto concuerda con publicaciones de otros grupos, las cuales señalan la importancia de esta región en la unión de la subunidad 40S ribosomal (Klinck y col., 2000; Lukavsky y col., 2000; Fraser y Doudna, 2007).

En la figura 20 se grafica la eficiencia traduccional del IRES de VHC como la razón FLuc/RLuc obtenidas de los experimentos de traducción *in vitro* utilizando RRL de las mutaciones estudiadas en el dominio IV (figura 20A). Se observa que la mutación G331A, que se encuentra en el extremo 5' de esta región, presentó 28% de actividad con respecto al IRES 1b (figura 20B). Esta mutación se encontró en el IRES 7 que tiene una actividad promedio de 23% (figura 13); además este IRES tiene la mutación A119C la cual presenta una actividad promedio de 72% con respecto al IRES 1b (figura 16B), por lo tanto, se analizó el efecto de la mutante A119C/G331A en experimentos de traducción *in vitro* en RRL; esta doble mutante presentó una actividad del 21% (figura 20B). De estos resultados se puede concluir que la actividad disminuida del IRES 7 se debe a los cambios nucleotídicos encontrados en este IRES, especialmente de la mutación G331A. En esta región del IRES además se estudiaron las dobles mutantes C340U/G350A que presentó 106% de actividad y U356A/A359G con 81% de actividad con respecto al IRES 1b

(figura 20B). De los resultados de las dobles mutantes se puede concluir que estos cambios nucleotídicos no afectan significativamente la actividad del IRES de VHC en el sistema de traducción *in vitro* utilizado. Si consideramos al IRES 16 en el cual se encontraron los cambios A73G, C340U y G350A que presentó una eficiencia traduccional de aproximadamente 50% (figura 13), podemos señalar que el cambio con el mayor efecto inhibitorio fue A73G (61%), ya que la doble mutante C340U/G350A presentó 106% de actividad IRES con respecto al control 1b. Al analizar el IRES 19 con 38% de actividad IRES (Figura 13) y que presentó los cambios G90A, U356A y A359G; podemos señalar que la sustitución con el efecto inhibitorio mayor fue G90A (62%), en cambio la doble mutante U356A/A359G presentó una eficiencia traduccional de 81% con respecto al IRES 1b. De estos datos podemos sugerir que para el caso de estos IRES la combinación de las sustituciones encontradas estaría dando cuenta de la disminuida actividad traduccional. En los paneles C y D de la figura 20 se grafican las actividades RLuc y FLuc, respectivamente, mostrando que RLuc se mantiene constante mientras que la actividad FLuc varía.

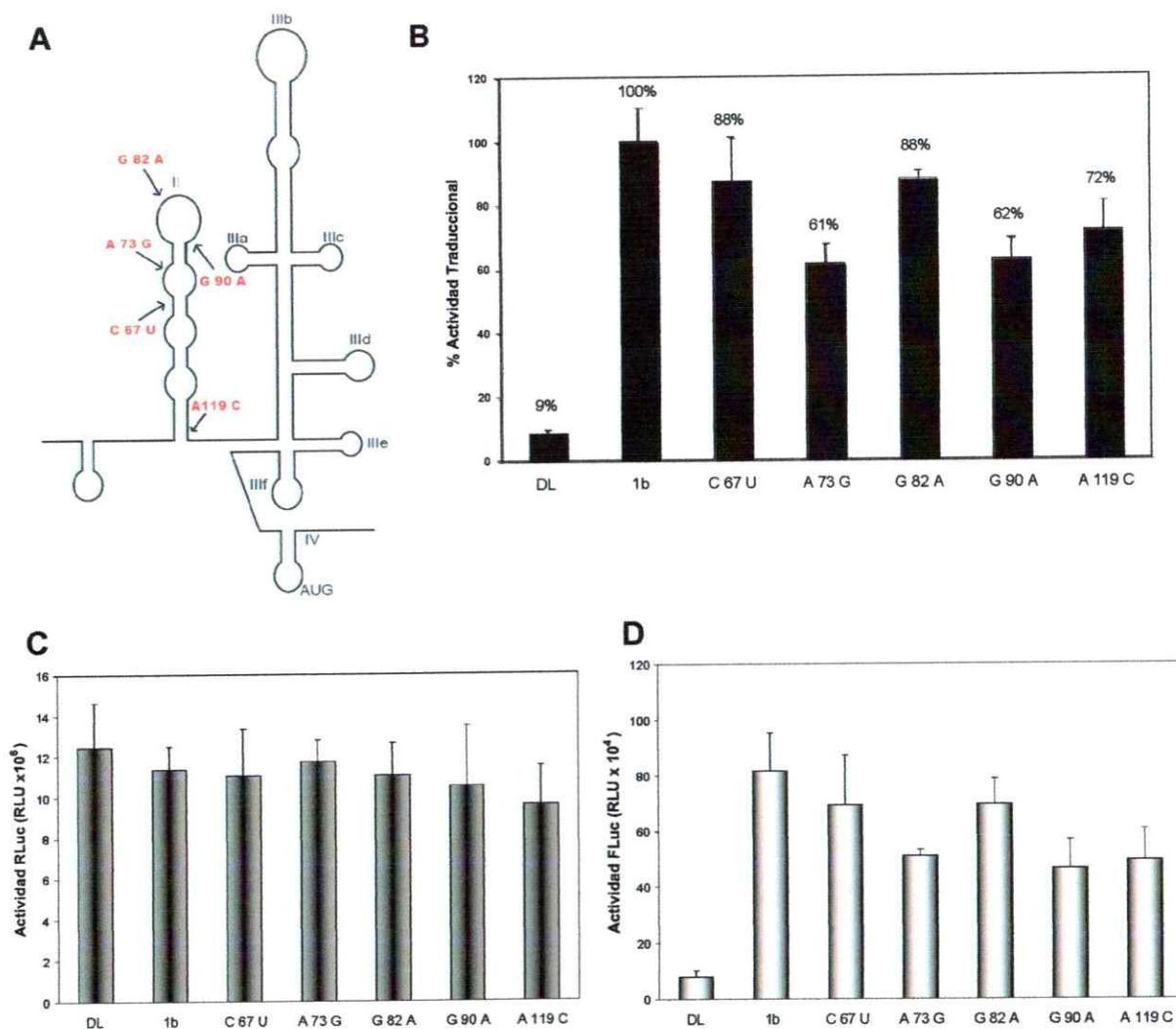


Figura 16. Eficiencia traduccional *in vitro* de los IRESs con mutaciones en el dominio II identificadas en los virus presentes en los pacientes con infección crónica por VHC. A. Estructura secundaria del IRES de VHC indicando en letras rojas las mutaciones realizadas en el dominio II. B. RNAs bicistrónicas usados para realizar traducción *in vitro* en RRL. Las eficiencias relativas de las mutaciones fueron determinadas comparando la razón FLuc/RLuc de los mutantes con el valor del IRES nativo 1b (arbitrariamente designado como el 100%). Se indica sobre cada barra el porcentaje. C. Actividad de RLuc (RLU x 10⁶). D. Actividad de FLuc (RLU x 10⁴). DL: control negativo, 1b: control positivo, IRES genotipo 1b.

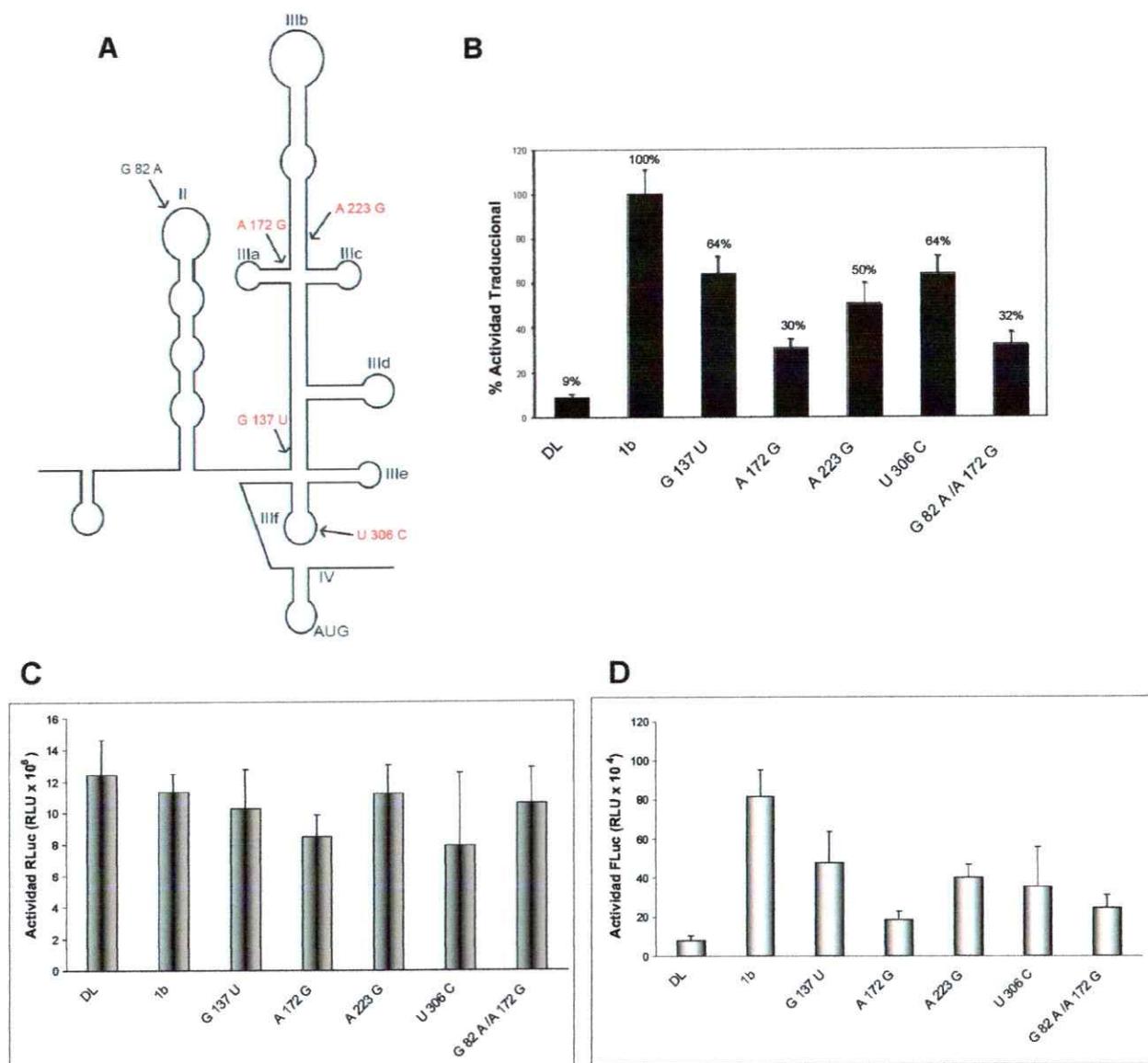


Figura 17. Eficiencia traduccional *in vitro* de los IRESs con mutaciones en el dominio III identificadas en los virus presentes en los pacientes con infección crónica por VHC. A. Estructura secundaria del IRES de VHC indicando en letras rojas las mutaciones realizadas en el dominio III. B. RNAs bicistrónicas fueron usados para realizar traducción *in vitro* en RRL. Las eficiencias relativas de las mutaciones fueron determinadas comparando la razón FLuc/RLuc de los mutantes con el valor del IRES nativo 1b (arbitrariamente designado como el 100%). Se indica sobre cada barra el porcentaje. C. Actividad de RLuc (RLU x 10⁶). D. Actividad de FLuc (RLU x 10⁴). DL: control negativo, 1b: control positivo, IRES genotipo 1b.

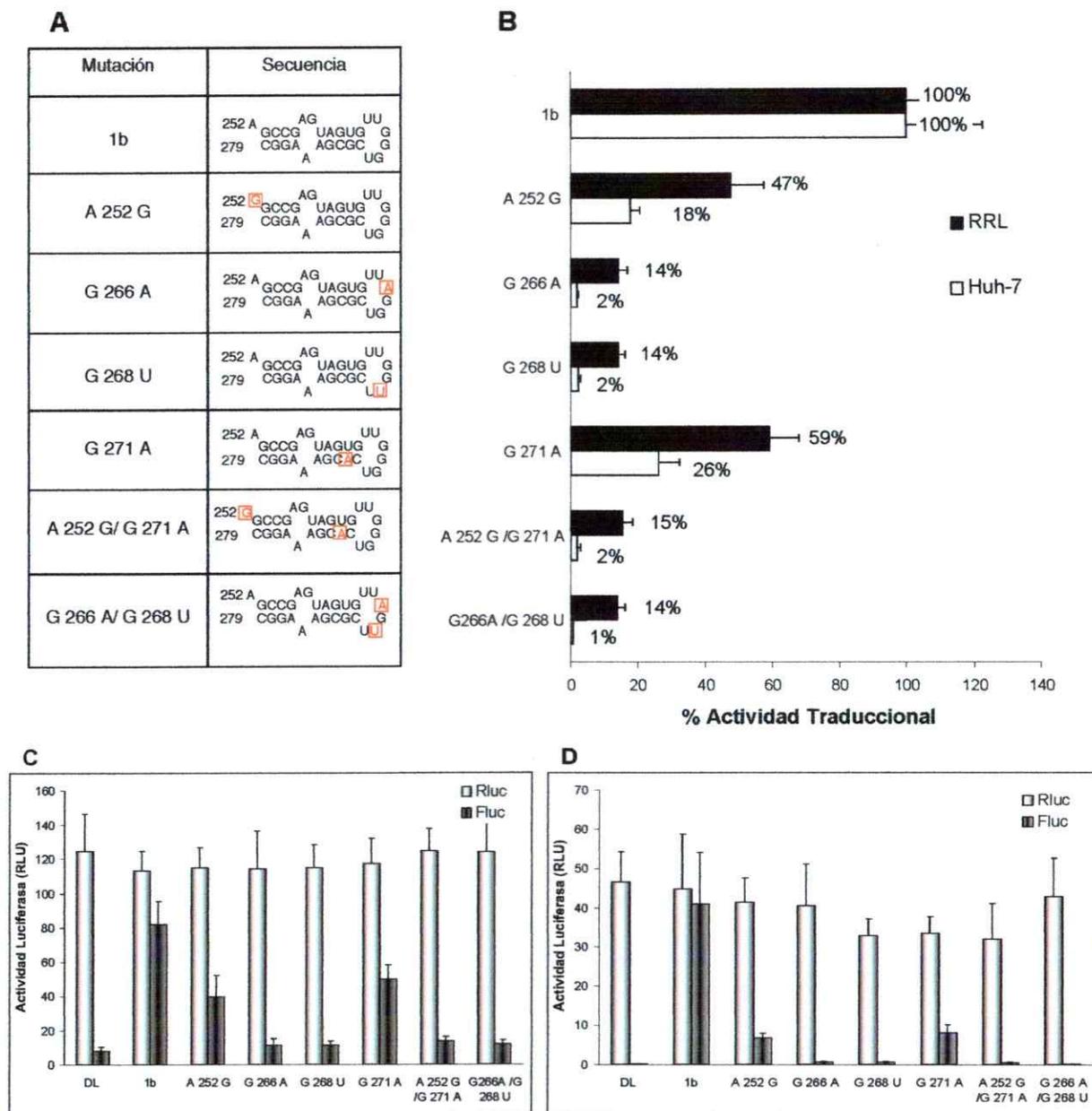


Figura 18. Eficiencia traduccional *in vitro* de los IRESs con mutaciones en el tallo-bucle III_d identificadas en los virus presentes en los pacientes con infección crónica por VHC. A. Representación de la estructura secundaria del dominio III_d indicando en color rojo las mutaciones específicas realizadas en esta región del IRES de VHC. B. RNAs bicistrónicas usados para realizar traducción *in vitro* en RRL y en extractos Huh-7. Las eficiencias relativas de las mutaciones fueron determinadas comparando la razón FLuc/RLuc de los mutantes con el valor del IRES nativo 1b (arbitrariamente designado como el 100%). Se indica al lado de cada barra el porcentaje. C. Actividades de RLuc (RLU x 10⁵) y FLuc (RLU x 10⁴) en RRL. D. Actividades de RLuc (RLU x 10⁵) y FLuc (RLU x 10⁴) en extractos Huh-7. DL: control negativo, 1b: IRES genotipo 1b.

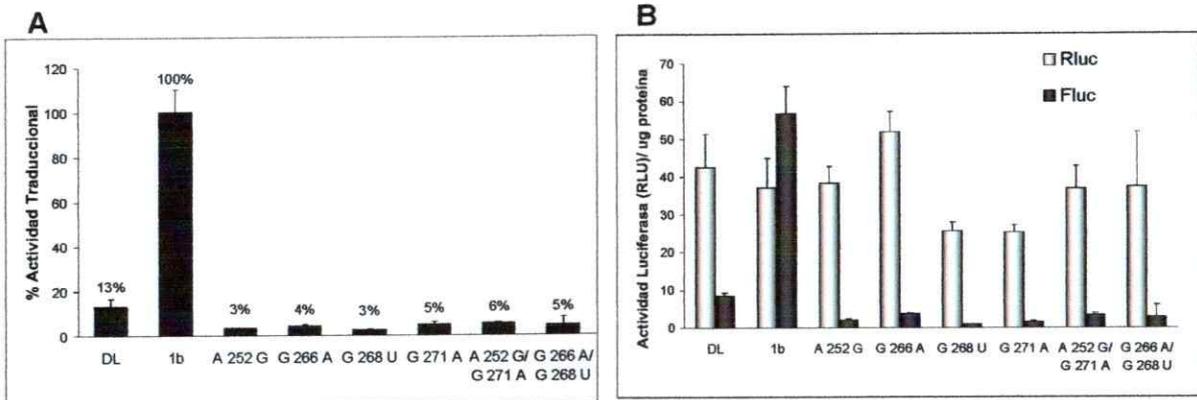


Figura 19. Eficiencia traduccional *ex vivo* de los IRESs con mutaciones en el tallo-bucle III_d identificadas en los virus presentes en los pacientes con infección crónica por VHC. RNAs bicistrónicos con cap y poli(A) fueron transfectados en células Huh-7. A. Se indican las eficiencias relativas del RNA 1b y de las mutantes, las que fueron determinadas comparando la razón FLuc/RLuc/ μ g proteína de los distintos RNAs con el valor del IRES nativo 1b (arbitrariamente designado como el 100%). Se indica sobre cada barra el porcentaje de traducción. B. Actividades de RLuc (RLU/ μ g proteína x 10^4) y FLuc (RLU/ μ g proteína x 10^2).

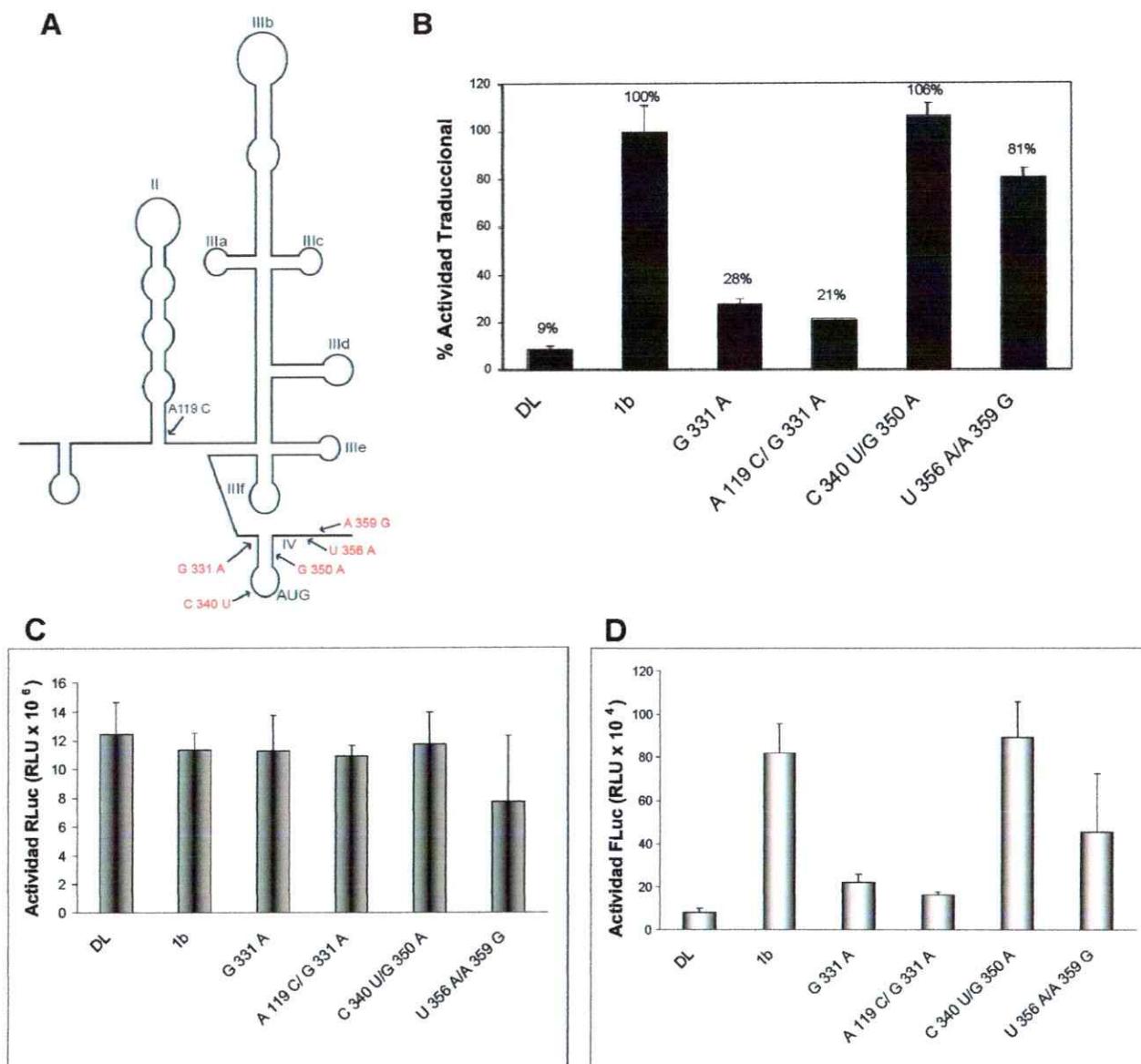


Figura 20. Eficiencia traduccional *in vitro* de los IRESs con mutaciones en el dominio IV identificadas en los virus presentes en los pacientes con infección crónica por VHC. A. Estructura secundaria del IRES de VHC indicando en letras rojas las mutaciones analizadas en el dominio IV. B. RNAs bicistrónicas usados para realizar traducción *in vitro* en RRL. Las eficiencias relativas de las mutaciones fueron determinadas comparando la razón FLuc/RLuc de los mutantes con el valor del IRES nativo 1b (arbitrariamente designado como el 100%). Se indica sobre cada barra el porcentaje. C. Actividad de RLuc (RLU x 10⁶). D. Actividad de FLuc (RLU x 10⁴). DL: control negativo, 1b: control positivo, IRES genotipo 1b.

3.7 Estudios de simulación de dinámica molecular del dominio IIIId del IRES de VHC. Efecto de las mutaciones G266A, G268U y G266A-G268U.

Con el propósito de analizar si la disminuida actividad traduccional de las mutaciones G266A, G268U y G266A/G268U en el dominio IIIId del IRES de VHC podrían deberse a un cambio estructural de esta región del IRES, se decidió establecer como primera aproximación un modelo teórico que explicara las observaciones anteriores. Para esto, se procedió a realizar simulaciones moleculares *in silico* y ensayos de dinámica molecular (DM) del dominio IIIId del IRES de VHC.

Recientemente, se han resuelto los mapas de criomicroscopía electrónica del IRES de VHC unido a las subunidades ribosomales 40S (Spahn y col., 2001) y 80S (Boehringer y col., 2005) a 20Å, demostrando que el dominio III, incluyendo el IIIId establece extensos contactos con el cuerpo de la subunidad 40S ribosomal. Estos contactos proporcionan un punto de anclaje estable para el IRES, crítico en el mecanismo de traducción. Además, estudios bioquímicos y funcionales apoyan el papel del dominio IIIId en la interacción con la subunidad 40S ribosomal. Por último, ha sido determinada la estructura de éste dominio por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) estableciéndose que el dominio IIIId forma un tallo ("stem") helicoidal con apareamientos no-canónicos seguido de una región bucle ("loop") de seis nucleótidos

(Klinck y col., 2000; Lukavsky y col., 2000). Este dominio está compuesto por cuatro regiones principales (figura 21): una región de hélice-A, una estructura de bucle E, una interacción no canónica U-G flanqueada por dos interacciones de tipo Watson-Crick G-C y un bucle apical compuesto por seis nucleótidos que contiene el triplete GGG, el cual es altamente conservado entre los virus aislados y desempeña un papel fundamental en el reconocimiento de la subunidad 40S ribosomal (Klinck y col., 2000; Lukavsky y col., 2000).

El estudio se enfocó en las mutantes G266A, G268U y en la doble mutación G266A-G268U. Para poder desarrollar esta investigación lo primero que se realizó fue analizar el comportamiento del dominio III d 1b utilizando simulaciones de DM a partir de una estructura determinada experimentalmente por NMR (Lukavsky y col., 2000). La simulación de DM es un método computacional que calcula el comportamiento de un sistema molecular a través de un período de tiempo determinado basado en las leyes de la física clásica a través de las ecuaciones de movimiento, lo cual proporciona información sobre cambios conformacionales de proteínas y ácidos nucleicos. Este método permite el estudio de la estructura y comportamiento dinámico de las moléculas biológicas, entregando información útil sobre cambios conformacionales o estabilidad de proteínas y en el diseño de drogas, entre otros. El objetivo de las simulaciones de DM es imitar la dinámica

en tiempo real de biomoléculas solvatadas con el fin de dilucidar los detalles de su dinámica estructural a resolución atómica y eventualmente estimar la energía de sus conformaciones específicas, asumiendo que cada átomo experimenta una fuerza especificada por un campo de fuerza que determina su interacción con el resto del sistema.

En la figura 22 se presentan los resultados de la simulación de DM del dominio III_d del IRES de VHC (genotipo 1b) y la comparación con los resultados derivados de la literatura; esto es importante ya que la exactitud de la simulación de DM se puede evaluar comparándola con las estructuras determinadas experimentalmente por NMR. En la figura 22A se observa la superposición de 25 estructuras del dominio III_d determinado por NMR (Lukavsky y col., 2000); en la figura 22B la superposición de 14 estructuras representativas de la evolución de la simulación de DM a través de 2,6 ns publicada anteriormente (Golebiowski y col., 2004) y en la figura 22C la superposición de 7 estructuras representativas de la evolución del dominio III_d a lo largo de 6 ns de simulación de DM obtenida en éste estudio. Como se observa en la figura 22, la estructura del dominio III_d permanece estable durante el tiempo de la simulación, las mayores variaciones se observan en el bucle apical de los hexanucleótidos (5'-UUGGGU) (HN) indicando que es una región más desordenada. En la parte basal de la estructura también se observa una desviación, probablemente causada por la ausencia del

resto de la estructura del IRES. Al analizar la desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) de los átomos pesados (no hidrógenos), la cual es una medida de la estabilidad estructural de las simulaciones de DM, que indica el desplazamiento de la posición de los átomos pesados desde una estructura de referencia, por lo general la estructura inicial, a través de la simulación, podemos señalar que la estructura determinada por NMR presenta un valor de RMSD de 1.61 Å y la realizada en éste estudio de 2.4 Å, siendo más similares entre ellas que lo anteriormente publicado por Golebiowski y col (2004) de 3.4 Å.

En la figura 23 se presenta el análisis comparativo de los modelos estructurales del dominio IIIId del genotipo 1b (IIIId-1b) y de los mutantes: G266A, G268U y G266A-G268U, mostrando la superposición de 7 estructuras del dominio IIIId representativas de la evolución de la simulación de DM a través de los 6 ns. El dominio IIIId-1b presentó un valor RMSD total de 2.4 Å y la doble mutante (G266A-G268U) de 2 Å; según estos valores los modelos del dominio IIIId-1b y la doble mutante resultan ser más rígidos que la mutante simple G266A que presentó un valor RMSD de 4.7 Å y G268U de 3.8 Å. De hecho, la mutante G266A-G268U presentó una estructura global más rígida durante la simulación que la estructura obtenida con el IIIId-1b. Las mayores fluctuaciones se observaron en la región del bucle de los HN. En la figura 23 (A-D) las estructuras se colorearon de acuerdo a los valores RMSD promedios

calculados como se observa en la figura 23E, donde se indican los valores RMSD promedio por residuo (átomo C3') durante los 6 ns de la simulación de DM; la región del bucle HN se indica con una línea azul. Al estudiar con mayor detalle la región del bucle de los HN se observa que claramente es la región más flexible de la estructura, los nucleótidos presentan grandes variaciones de sus posiciones durante la simulación, con valores de RMSD en esta región en el IRES 1b de 3.8 Å (figura 23), lo cual es mayor que el valor de toda la estructura (2.4 Å). Si se analizan los valores de RMSD de esta región en los mutantes se puede observar que la mutante doble G266A-G268U presenta un valor de 2.9 Å, y las simples mutantes G266A de 9.4 Å y G268U de 6.8 Å (figura 23). Los valores de RMSD del bucle HN de las mutantes también fueron más elevados en comparación a los valores obtenidos considerando toda la estructura al igual que en la estructura IIIId-1b, indicando nuevamente que esta región presenta gran flexibilidad; sin embargo, la doble mutante fue la que presentó el menor valor de desviación asemejándose más a la estructura IIIId-1b.

En la figura 24 se observa una vista desde el surco menor de la región de los HN del dominio IIIId. Se puede observar que en la estructura IIIId-1b las bases G266-267 se encuentran sobre el surco menor por fuera del bucle estableciendo interacciones de apilamiento ("stacking") entre sus anillos aromáticos. Por otro lado, el nucleótido

G268 se ubica hacia el surco mayor en la estructura. Durante la simulación, G266 está siempre expuesto al solvente y no interactúa con otros elementos de la estructura (con la excepción de G267). En la doble mutante A266 y G267 están sobre el surco menor y U268 sobre el surco mayor, en esta mutante se forma un puente de hidrógeno que no se encuentra en la estructura IIIId-1b ni en las otras mutantes, entre U264 y el oxígeno de la ribosa de U268 lo que genera que se cierre la estructura, haciéndola más rígida. Las estructuras de las simples mutantes G266A y G268U son altamente fluctuantes. En la mutante G266A, las bases A266 y G267 se encuentran sobre el surco menor y G268 se ubica en la interfase entre el surco menor y el mayor. En la mutante G268U, las bases U265, G266 y G267 se encuentran expuestas al solvente y U268 se ubica hacia el interior del surco menor. En las estructuras IIIId-1b y de las simples mutantes, las bases G263 y C270 cierran el bucle, formándose una interacción Watson-Crick entre ellas, por lo tanto generándose 3 puentes de hidrógeno.

La alta estabilidad de la doble mutante G266A-G268U podría ser mediada por los enlaces de hidrógeno no-canónicos e interacciones entre los nucleótidos en el surco mayor (figura 25A). El puente de hidrógeno entre U264 y U268 se mantiene durante toda la simulación de DM (figura 25B). Este enlace junto con la interacción Watson-Crick G263-C270 estabilizan la región del bucle de este mutante.

Se midieron las interacciones de apilamiento entre las bases del bucle apical del dominio IIIId: 265-266 y 266-267, analizando las distancias entre los centros de masa (COM) de los anillos aromáticos de las bases a través del tiempo de la simulación (Swart y col., 2007). En la figura 26A se representa la distancia COM entre las bases U265 y 266, se puede observar que en la estructura IIIId-1b y en la doble mutante G266A/G268U no se observa interacción entre estas bases a través de la simulación de DM (distancias aproximadas entre 10-14Å), en cambio en las mutantes G266A y G268U sí se observa un acercamiento de las bases en ciertos momentos de la simulación. En la figura 26B se presenta la distancia COM entre las bases 266 y G267 a través de la simulación. Se observa que en la mayor parte del tiempo de la simulación ocurre un acercamiento de estas bases en la estructura de las mutantes, en la estructura IIIId-1b en la mayoría del tiempo se observa el acercamiento y sólo en algunos instantes se alejan. Si se observa la figura 26 podemos ver que incluso en algunos instantes de la simulación se produce una triple interacción, U265-266-G267 en las estructuras de las simples mutantes G266A y G268U, pero nunca en las estructuras IIIId-1b y doble mutante. En la figura 26C, se representa la estructura de las mutantes simples en un momento de la simulación que ocurre lo descrito anteriormente, observándose el apilamiento de las tres bases. Estos resultados sugieren que las simples mutantes

presentan un mayor apilamiento de bases en algunos momentos de la simulación.

De los datos obtenidos de las simulaciones de DM podemos señalar que aunque todos los modelos estructurales son diferentes, la estructura del dominio IIIId-1b con la del dominio IIIId del doble mutante se asemejan estructuralmente más entre ellas que al compararlas con las otras dos mutantes simples. La doble mutante presenta una estructura más estable que la IIIId-1b y las simples mutantes presentan estructuras más móviles a través de la simulación de acuerdo a los datos de RMSD. La mayor estabilidad en el caso de la doble mutante y la gran movilidad en la región del bucle de HN en el caso de las simples mutantes podrían explicar la baja actividad traduccional observada en los experimentos de traducción *in vitro* y en los experimentos *ex vivo*. También es factible que los cambios en el bucle HN, aunque no tienen efectos considerables en la conformación global del dominio IIIId, modifiquen el medio local y por lo tanto puedan alterar el sitio de reconocimiento del ribosoma, lo cual podría explicar la reducida capacidad de traducción de las mutantes.

Los resultados indican que las mutaciones inhibitorias analizadas en este bucle no afectan la estructura general del dominio IIIId. Esta observación refuerza la importancia de la conservación de la secuencia en esta región para establecer interacciones específicas con el ribosoma.

Los resultados resaltan el papel de la secuencia primaria y de la estructura del dominio IIIId en la actividad IRES de VHC.

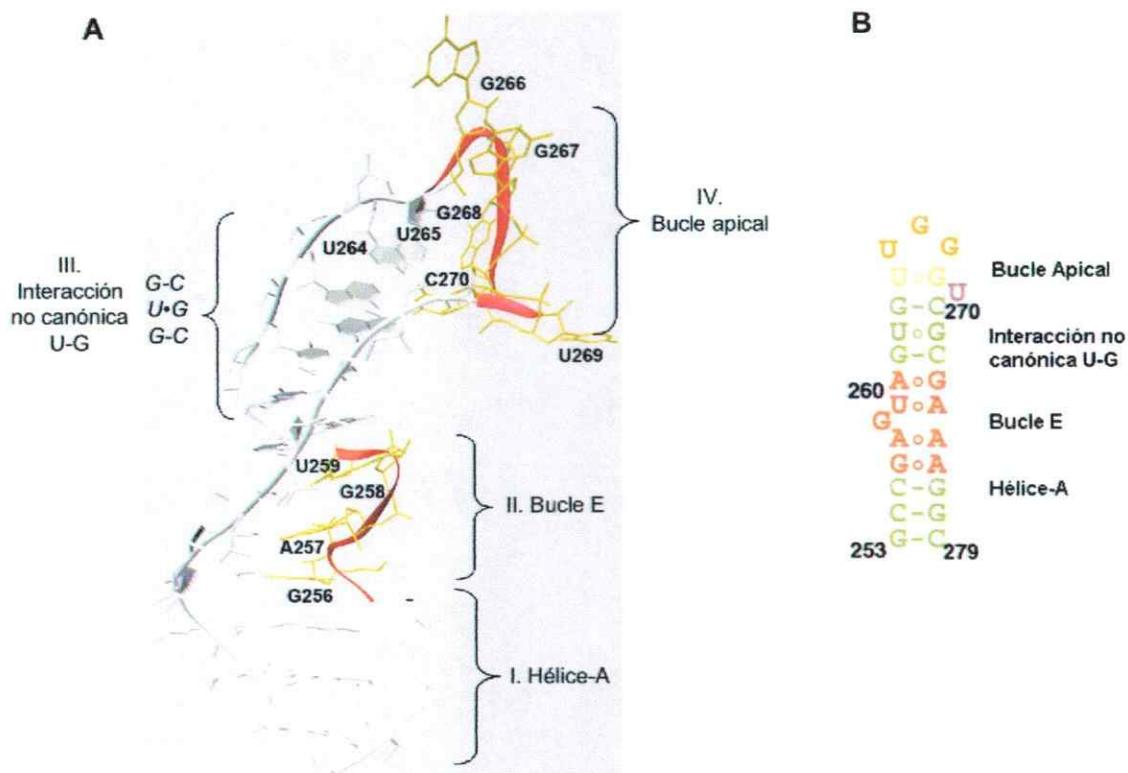


Figura 21. Modelo de la estructura de los subdominios del tallo-bucle IIIId. A. El dominio IIIId del IRES de VHC forma un tallo helicoidal con apareamientos no canónicos seguido de una región bucle de seis nucleótidos. La estructura está compuesta de cuatro regiones principales: I. Región de hélice-A, II. Estructura de bucle E, III. Interacción no canónica U-G flanqueada por dos interacciones de tipo Watson-Crick G-C, IV. Bucle apical. B. Secuencia del dominio IIIId y los subdominios que forma (Klinck y col., 2000; Lukavsky y col., 2000).

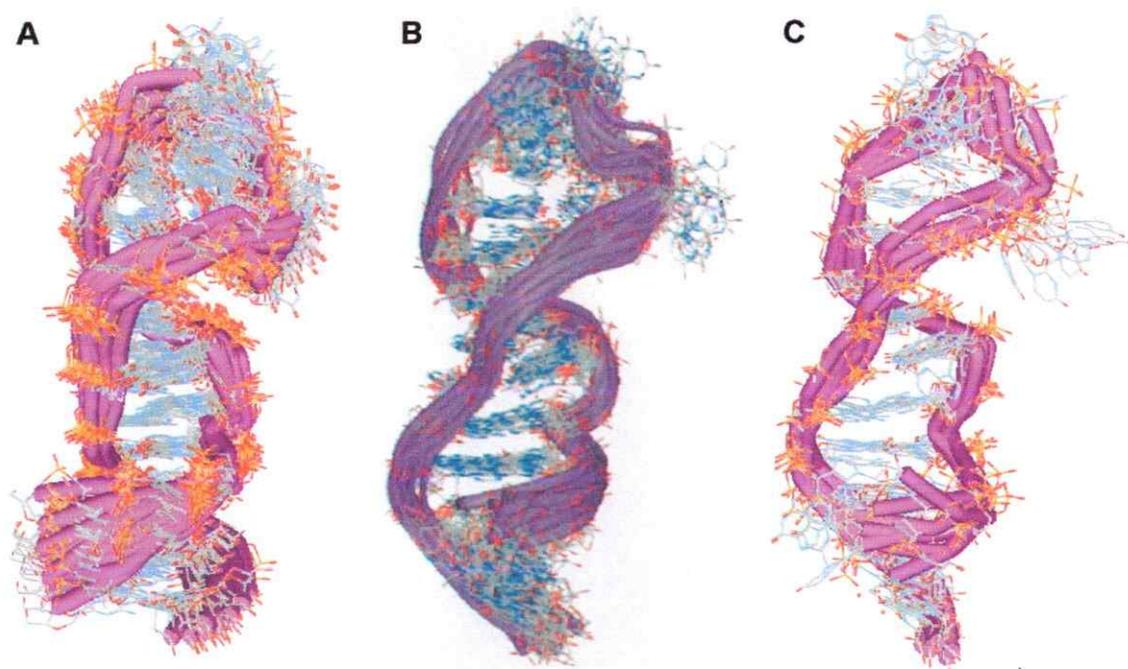


Figura 22. Comparación estructural de los modelos del dominio IIIId nativo. Análisis estructural comparativo del dominio IIIId del IRES de VHC derivado de la literatura y el realizado en este estudio. A. Superposición de 25 estructuras determinado mediante NMR (Lukavsky y col., 2000). B. Superposición de 14 estructuras representativas de la simulación de DM de 2,6 ns (Golebiowski y col., 2004). C. Superposición de 7 estructuras representativas de la evolución de la DM de 6 ns determinada en este estudio.

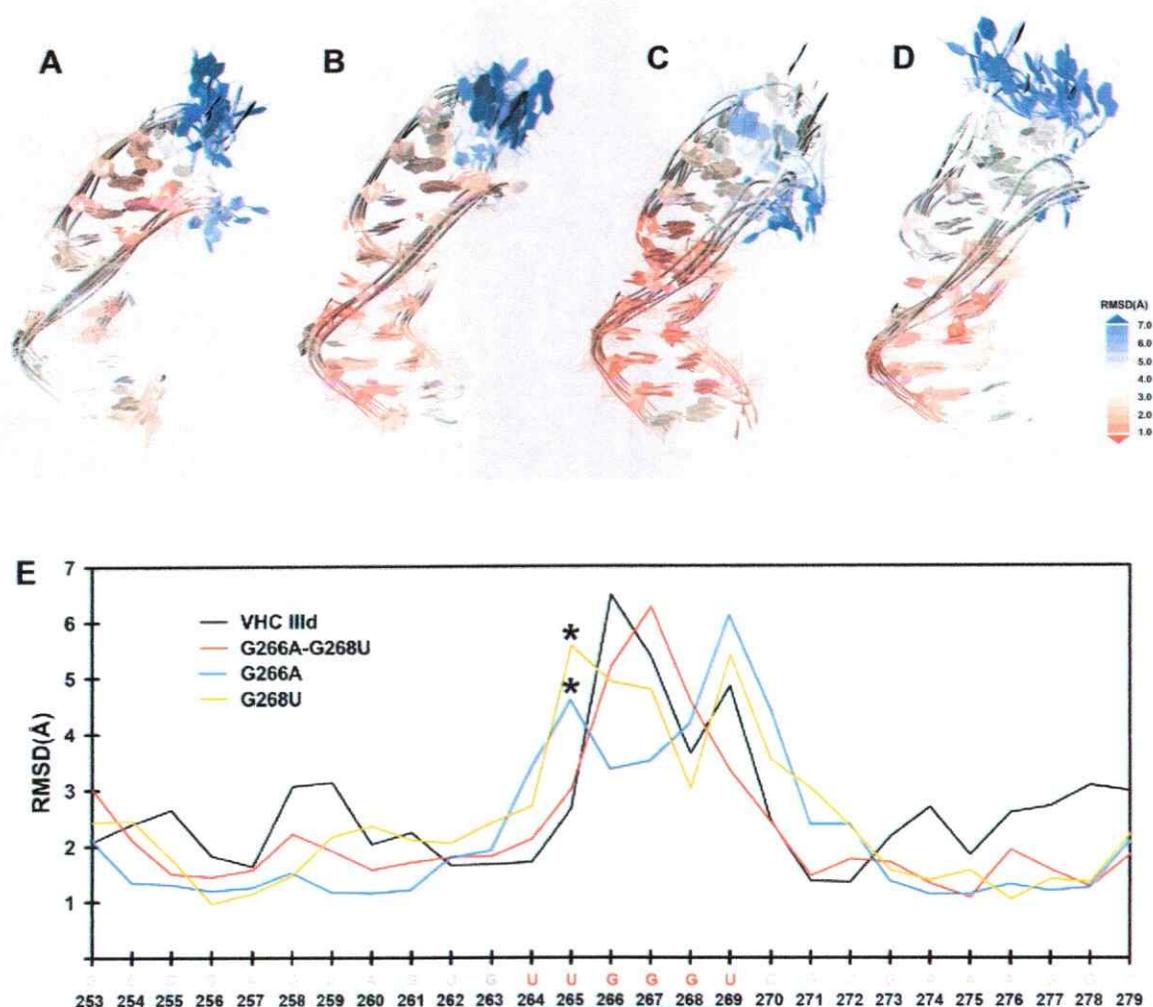


Figura 23. Análisis estructural comparativo de los modelos del dominio IIIId nativo y mutantes del IRES de VHC. (A-D) Superposición de estructuras representativas de la evolución del dominio IIIId del IRES a través de los 6 ns de simulación de DM. A. Dominio IIIId de VHC nativo 1b. B. Doble mutante (G266A-G268U). C. Mutante G266A. D. Mutante G268U. Las estructuras están coloreadas de acuerdo al promedio de los valores RMSD calculados en E. E. valores RMSD promedio por residuo (átomo C3') durante la simulación de DM de 6 ns. Las bases del bucle hexanucleótido (HN) están subrayadas con una línea azul. El valor RMSD de la base U265 en los modelos de los simples mutantes está marcado con un asterisco.

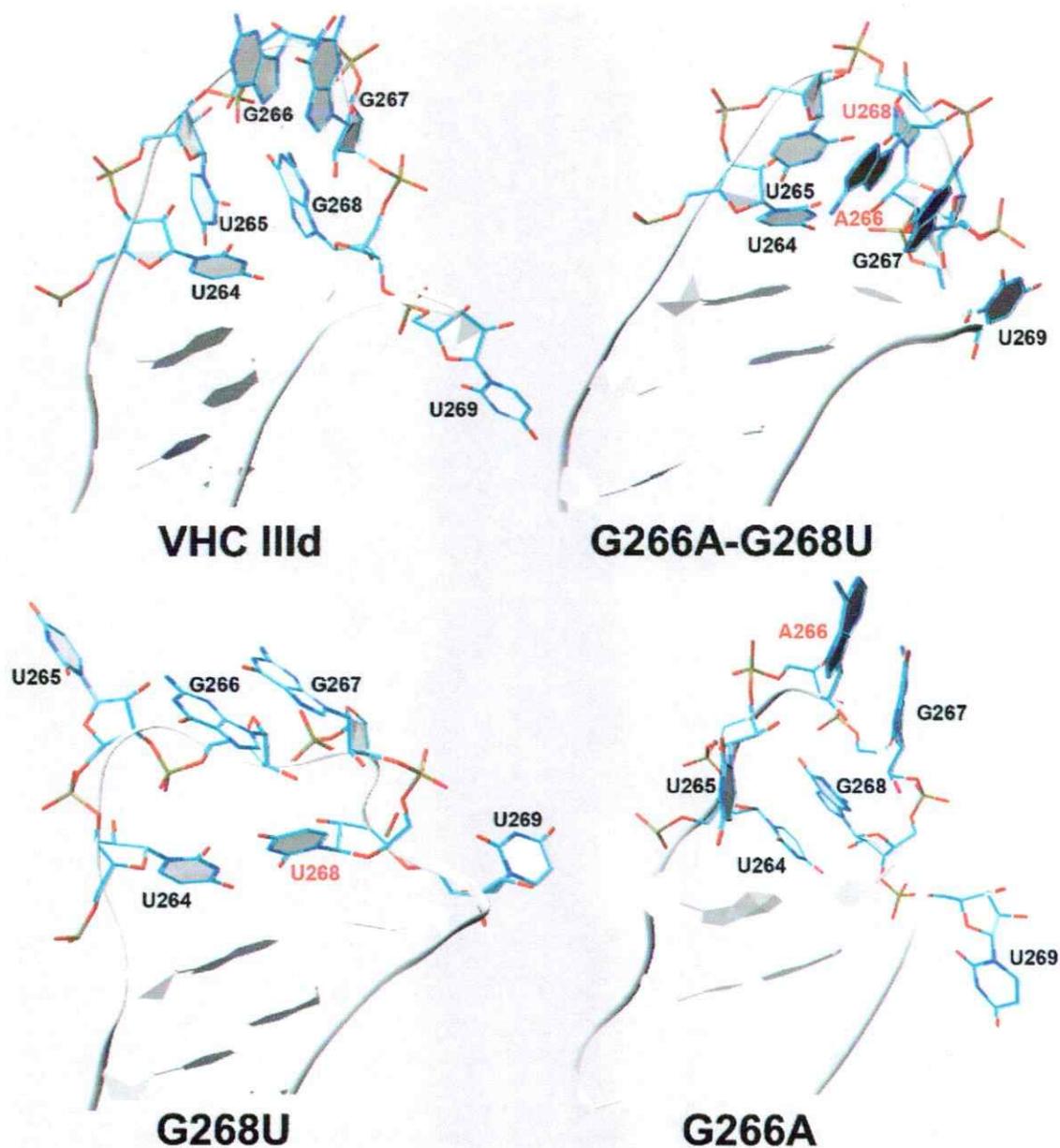


Figura 24. Análisis estructural comparativo de las conformaciones del bucle hexanucleótido del dominio IIIId del IRES de VHC nativo y mutantes de una estructura promedio de la simulación de DM. (Vista desde el surco menor) Estructura promedio de VHC IIIId, doble mutante (G266A-G268U), mutante G266A y mutante G268U. El esqueleto ribosa-fosfato del RNA se presenta en color plomo (cinta), los oxígenos en rojo, carbonos en celeste y nitrógenos en azul. Las figuras fueron generadas con el programa VMD.

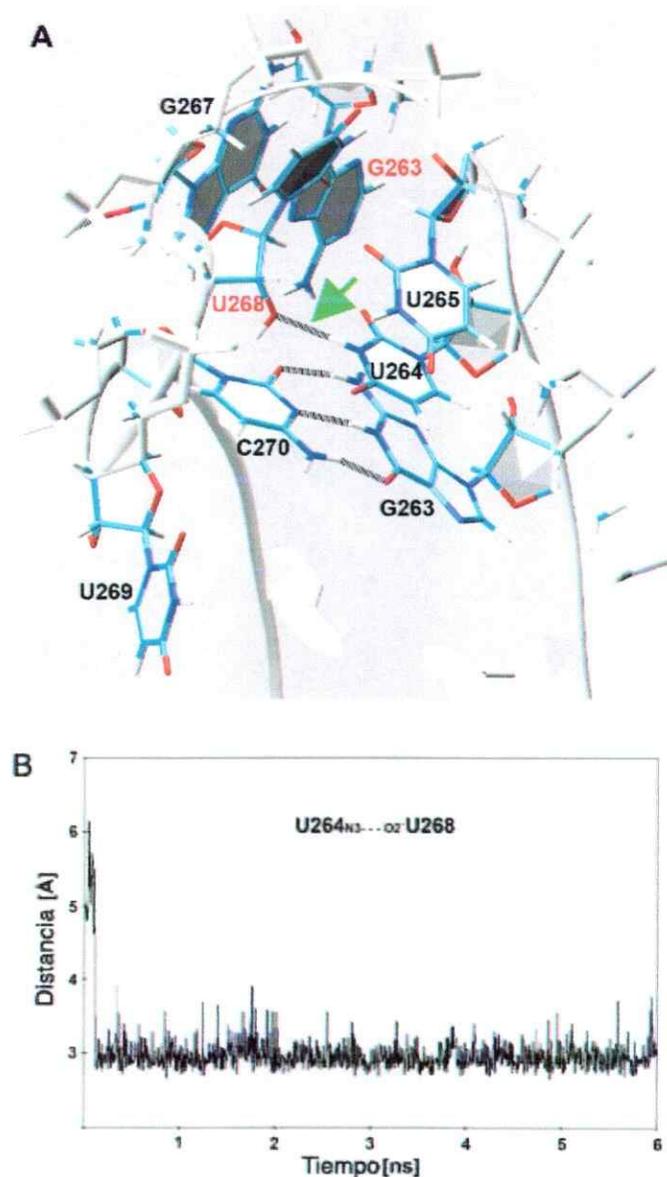


Figura 25. Puente de hidrógeno adicional generado en la doble mutante G266A-G268U. A. Análisis estructural del bucle hexanucleótido del mutante G266A-G268U. Se observa el enlace de hidrógeno entre N₃ de U264 y el O_{2'} de U268 (flecha verde) B. Seguimiento de la estabilidad del enlace de hidrógeno intramolecular en la doble mutante durante la simulación de DM. Se grafica la distancia entre los átomos pesados del hidrógeno donador y el grupo aceptor durante la simulación de DM. Esta interacción junto con la interacción Watson-Crick entre G263-C270 contribuyen a la disminuida movilidad de los residuos en la región del bucle. El esqueleto ribosa-fosfato del RNA se presenta en color plomo (cinta), oxígenos en rojo, carbonos en celeste y nitrógenos en azul. Las figuras fueron generadas con el programa VMD.

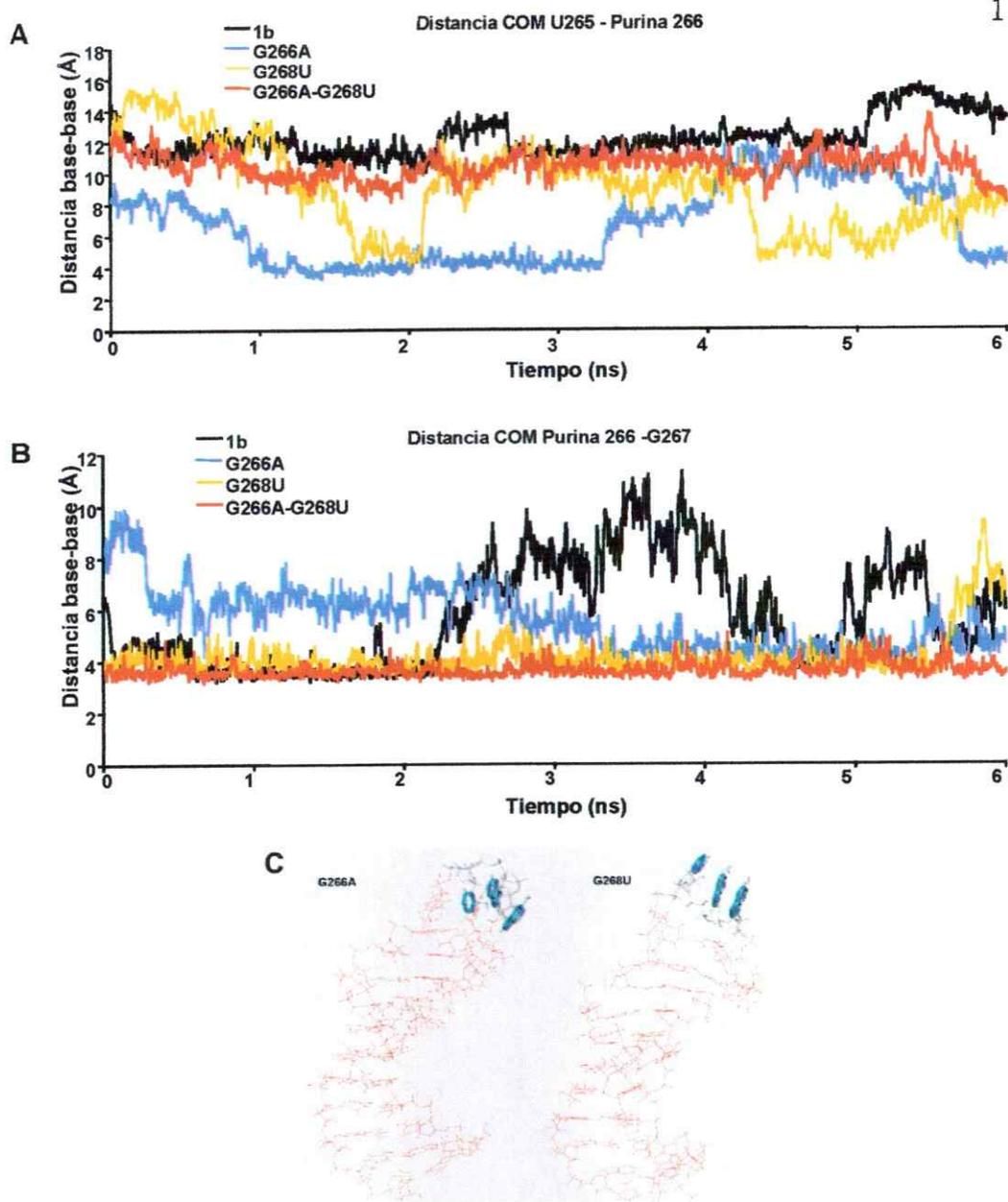


Figura 26. Apilamiento de las bases en las posiciones 265-266 y 266-267 en el bucle apical del dominio III d del IRES de VHC durante la simulación de DM. A. Distancia entre los centros de masas (COM) del anillo pirimidínico U265 y la purina en la posición 266. Se observa la interacción entre estas bases en las simples mutantes pero no en la estructura nativa ni en la doble mutante. B. Distancia entre los COM de los anillos aromáticos de las bases en las posiciones 266 y 267. Se observa el apilamiento la mayor parte del tiempo. C. Estructura a los 2 ns de la simulación de DM, donde se observa el apilamiento entre los residuos U265-266-G267, los cuales se muestran destacados en las estructuras de las mutantes G266A (derecha) y G268U (izquierda). A-B: se grafican las distancias de 1b (nativa) en negro, G266A en azul, G268U en amarillo y G266A/G268U en rojo.

3.8 Dicroísmo circular de los RNA del dominio III. Comparación de la estructura nativa con las mutantes G266A, G268U y G266A-G268U.

El dicroísmo circular (DC) es un tipo de espectroscopía de absorción que mide la actividad óptica de moléculas asimétricas en solución. El DC entrega información de las diferencias en absorción del componente izquierdo y derecho de la luz circularmente polarizada inducido por moléculas con actividad óptica; este método ha sido ampliamente utilizado para estudiar la estructura secundaria de proteínas y ácidos nucleicos (Van Holde y col., 1998). De esta manera, esta técnica se ha usado para determinar la estructura secundaria de diversos RNAs como por ejemplo, tRNA (Blum y col., 1972), rRNA 5S de *Escherichia coli* (Johnson y Gray, 1991) y el elemento con afinidad a Tat (TAR) de VIH (Loret y col., 1992). Además permitió determinar el papel de magnesio en la estabilización de la estructura de tRNAs (Beuning y Musier-Forsyth, 1999). Aunque el DC no puede dar detalles acerca de la estructura terciaria, puede ser utilizado para estudiar transiciones del plegamiento terciario del RNA, así como cambios conformacionales inducidos por solventes (Sosnik y col., 2000).

En ácidos nucleicos, los grupos ópticamente activos son las purinas y pirimidinas, aunque intrínsecamente son simétricos y no tienen actividad óptica, son activas cuando se encuentran unidas al azúcar,

además la actividad óptica aumenta cuando forman parte de una estructura helicoidal. Los espectros de DC en los ácidos nucleicos se deben principalmente a las interacciones entre las transiciones Π - Π^* de las bases. El espectro de DC es característico de la conformación del ácido nucleico y dependerá de la composición de las bases y de la interacción entre bases adyacentes (apilamiento de bases); además depende de las condiciones del solvente, de las sales y de la temperatura (Van Holde y col., 1998).

Como una aproximación experimental para caracterizar la estructura secundaria del dominio IIIId de VHC y compararla con las estructuras de los mutantes G266A, G268U y G266A-G268U, se realizaron experimentos de DC con un RNA correspondiente al dominio IIIId nativo (IIIId-1b), el cual se comparó con las estructuras de los RNAs con las mutaciones. Además, con el fin de aproximarse a las condiciones salinas en la cual ocurre la síntesis de proteína se realizaron experimentos de DC en presencia de sales ($MgCl_2$) para determinar su efecto sobre los cambios conformacionales de los RNAs estudiados.

Kieft y col. (1999) determinaron que la concentración de magnesio a la cual ocurre la transición de la estructuración del IRES de VHC es entre 0,5 y 1mM. Considerando esto se realizó una curva de concentración de magnesio de 0, 1 y 2mM de $MgCl_2$ con el RNA IIIId-1b (figura 27). Se puede observar que el magnesio induce la estructuración

de IIIId-1b; considerando los resultados y los datos publicados se decidió utilizar 2mM de magnesio para evaluar el efecto de este ión en los otros RNAs mutantes.

Se realizó un primer experimento resuspendiendo los RNAs sintéticos (liofilizados) en agua y midiendo los espectros de DC (figura 28A). Posteriormente, se realizaron experimentos de DC con RNAs que fueron desnaturalados por 1 min a 90°C y mantenidos en hielo para su renaturación, en ausencia de sal (figura 28B) o con 2mM de MgCl₂ (figura 28C). Se puede observar que los espectros exhiben un pico positivo a 260nm y un pico negativo a 206-208nm, característicos de una conformación helicoidal en forma A (figura 28). Estos picos son debidos a transiciones electrónicas $\Pi-\Pi^*$ en el plano de las bases apiladas, influenciado por el anillo del azúcar 3' endo asimétrico (Vos y col., 2002). Además de estos dos picos, los espectros muestran picos menores a 220nm (positivo) y 240nm (negativo). Al comparar los espectros de las figuras 28A y B, se puede observar que cuando los RNAs del dominio IIIId-1b y el del doble mutante G266A-G268U se desnaturalaron los espectros presentaron una baja señal, indicando poca estructuración en comparación a los espectros de la figura 28A. Los espectros de DC de los mutantes simples G266A y G268U permanecieron estructurados en ambas condiciones (figura 28A-B). Los espectros de DC cambian significativamente cuando se adiciona MgCl₂ a

las muestras de RNA. Los cambios en los espectros reflejan cambios conformacionales en el RNA inducidos por los iones Mg^{2+} , lo cual podría deberse a la neutralización de cargas o a uniones específicas al RNA. En los RNAs IIIId-1b y en la doble mutante G266A-G268U, las magnitudes de los picos a 260 y 206nm aumentan cuando se adiciona $MgCl_2$ a la mezcla, indicando un incremento en la estructura hélice y en el apilamiento de las bases (comparar línea azul y negra en la figura 28B y C). En el caso de la simple mutante G266A el pico a 260nm incrementa levemente y en G268U disminuye levemente (comparar líneas rosada y verde en las figuras 28B y C).

En general, los espectros no difieren cualitativamente, es decir, la forma es la misma y sólo la intensidad varía, por lo tanto no hay cambios estructurales fundamentales asociados a las mutaciones. La doble mutante G266A-G268U es más similar a la estructura IIIId-1b que las simples mutaciones. En la figura 29 se puede observar que los espectros del RNA IIIId-1b y G266A-G268U son similares en todas las condiciones analizadas, es decir sin sales (figura 29A), a 1mM de $MgCl_2$ (figura 29B) y 2mM de $MgCl_2$ (figura 29C).

El aumento en intensidad a 260nm en las simples mutantes G266A y G268U (figura 28A y B) puede ser interpretado como un mayor apilamiento de bases, lo cual podría ser explicado por el apilamiento triple que se observó en la simulación de DM (figura 26).

De los experimentos de DC se concluye que las estructuras secundarias del dominio III_d de los mutantes G266A, G268U y G266A/G268U son distintas, que el magnesio induce su estructuración y que la composición estructural es similar entre el III_d-1b y la doble mutante G266A/G268U.

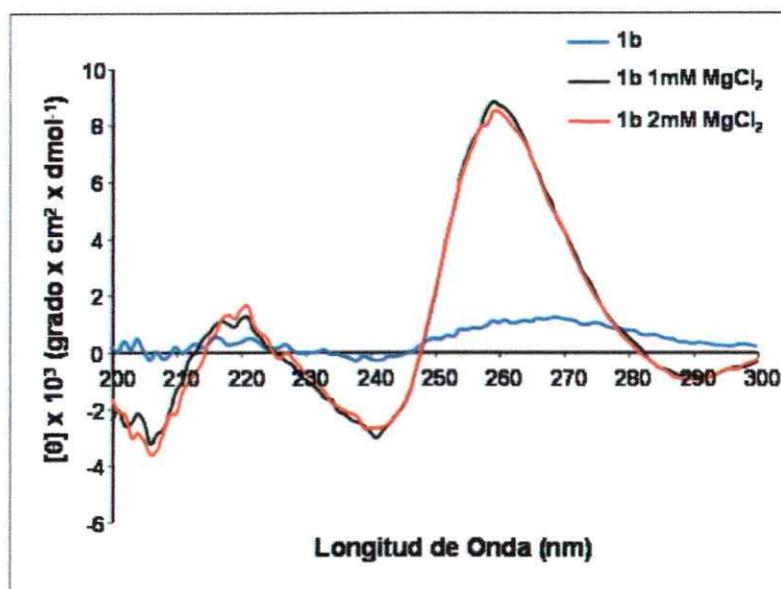


Figura 27. Espectros de DC del RNA del dominio III_d nativo del IRES de VHC en ausencia o presencia de magnesio. El RNA del dominio III nativo (1b) fue resuspendido en agua, desnaturalado y mantenido en hielo. Se observan los espectros del RNA en agua (azul), con 1mM MgCl₂ (negro) y 2mM MgCl₂ (rojo). El gráfico representa la elipticidad molar $[\theta]$ versus la longitud de onda (nm).

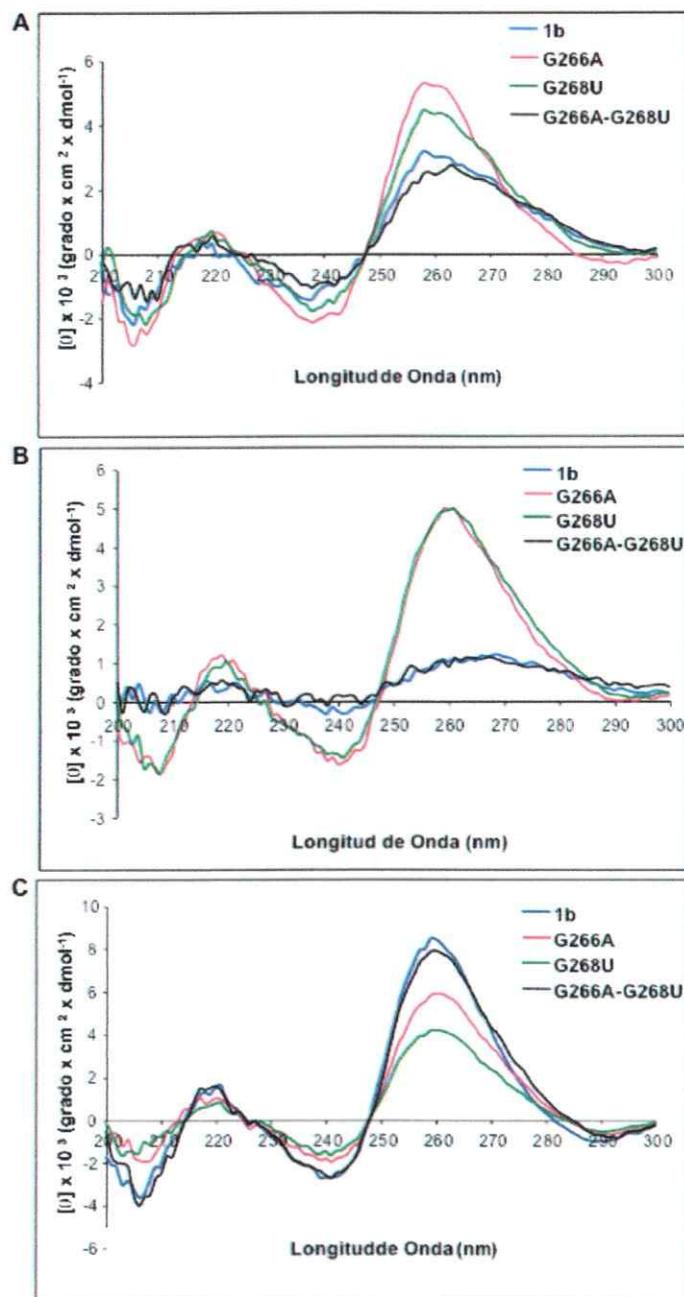


Figura 28. Espectros de DC de los RNAs del dominio IIIId del IRES de VHC. A. Los RNAs fueron resuspendidos en agua y se midió el espectro de DC. B-C. Los RNAs fueron desnaturados y mantenidos en hielo. B. Espectros de los RNAs en agua. C. Espectros de los RNAs en agua y 2mM MgCl_2 . En azul se grafica el espectro de DC del RNA nativo IIIId-1b (1b), en rosado el mutante G266A, en verde G268U y en negro la doble mutante G266A-G268U. El gráfico representa la elipticidad molar $[\theta]$ versus la longitud de onda (nm).

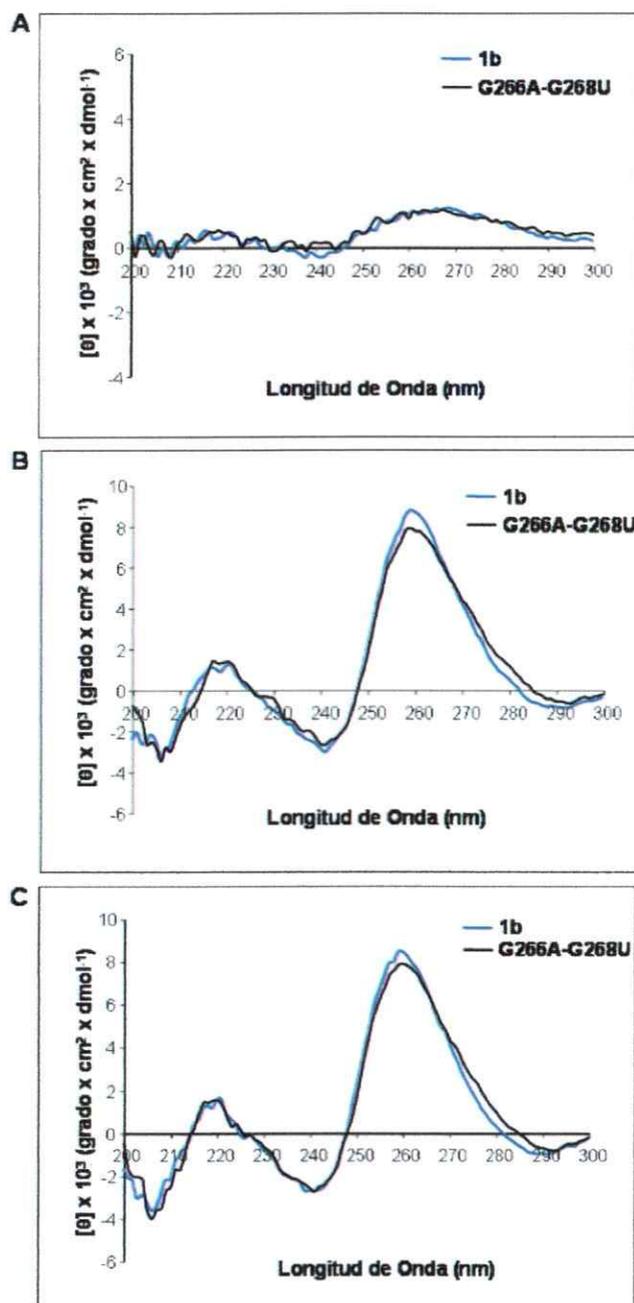


Figura 29. Espectros de DC de los RNAs del dominio IIIId nativo y G266A-G268U del IRES de VHC. A-C. Los RNAs fueron desnaturalados y mantenidos en hielo. A. Espectros de los RNAs en agua. B. Espectros de los RNAs en agua y 1mM MgCl $_2$. C. Espectros de los RNAs en agua y 2mM MgCl $_2$. En azul se grafica el espectro de DC del RNA nativo IIIId-1b (1b) y en negro el doble mutante G266A-G268U. El gráfico representa la elipticidad molar $[\theta]$ versus la longitud de onda (nm).

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se investigaron las variantes de VHC circulantes en la población chilena crónicamente infectada, así como las cuasiespecies virales circulantes en un mismo individuo. Durante el transcurso de este estudio se realizaron tres observaciones. Primero, se determinó que la presencia de VHC en PBMC no se restringe exclusivamente, como había sido propuesto por otros grupos de investigación, a individuos inmunodeprimidos, como los individuos que han sido transplantados de hígado o los co-infectados con VIH. Además, este trabajo sugiere que sólo ciertas cuasiespecies son encontradas en PBMC. Asimismo, las observaciones presentadas en este trabajo de tesis sugieren que los PBMCs podrían representar un reservorio natural para algunas cuasiespecies virales. Segundo, el análisis a nivel de la síntesis de proteína de los virus circulantes, nos indica que durante el proceso de replicación también se generan partículas con una actividad traduccional disminuida. Tercero, el análisis estructural del dominio III_d del IRES de VHC y el efecto de las mutaciones identificadas en esta región desde virus aislados de muestras clínicas nos sugiere que la actividad IRES de VHC no sólo depende de la integridad estructural del dominio III_d sino que también de su secuencia primaria.

4.1 Presencia de RNA de VHC en células mononucleares de sangre periférica en pacientes crónicamente infectados con el virus.

Diversos estudios han sugerido la presencia de reservorios extrahepáticos de VHC (Roque Afonso y col., 1999; Goutagny y col., 2003; Blackard y col., 2006). Estos estudios se encuentran apoyados principalmente por la observación de que pacientes infectados crónicamente con VHC que han sido transplantado de hígado usualmente se reinfectan con el virus (Araya y col., 1997). La existencia de replicación extrahepática en PBMC aún es debatida debido a que el RNA de polaridad negativa, intermediario de la replicación viral, generalmente no es detectado en estas células (Laskus y col., 1997). Sin embargo, los ensayos para detectar específicamente la hebra negativa son relativamente insensibles. A pesar de esto, se ha mostrado que cuando los PBMC son estimulados con fitohemaglutinina e interleuquina se puede detectar el intermediario de replicación (Pham y col., 2005). Esto sugiere que el virus replicaría de manera activa sólo en células activadas. Esta posibilidad concuerda con resultados que muestran que un replicón subgenómico de VHC sólo replica en células que se encuentran ciclando (Pietschmann y col., 2001). Varios estudios describen que PBMC infectados con VHC frecuentemente contienen variantes virales que difieren de los circulantes en el plasma o en el

permiten una replicación autónoma de VHC (Shimizu y col., 1997; Roque Afonso y col., 1999; Radkowski y col., 2001; Roque-Afonso y col., 2005).

Varios autores han postulado que la presencia de RNA en PBMC podría ser debido a contaminación de plasma o absorción de las partículas virales circulantes (Roque-Afonso y col., 2005; Januszkiewicz-Lewandowska y col., 2007), aunque en los ensayos realizados en el presente estudio no se puede descartar esta posibilidad; resultados iniciales del laboratorio mostraron la detección de RNA viral en PBMC luego de cultivar y estimular estas células con fitohemaglutinina e interleuquina 2 por una semana; además se han podido establecer líneas de linfocitos B de pacientes chilenos con infección crónica de VHC, detectándose el RNA viral durante meses. Aunque estos experimentos no se realizaron con todas las muestras de los pacientes, estos datos nos sugirieron que el virus puede replicar y persistir en los PBMC y que el RNA detectado en estos casos no se debería a contaminación con partículas virales del plasma, ya que su vida media es sólo de algunas horas (Moradpour y col., 2007). Debido a estas observaciones iniciales desestimamos la posibilidad de contaminación de plasma o absorción de virus en las muestras de PBMC (Bronowicki y col., 1998, Cribier y col., 1995; Sung y col., 2003), sin embargo, futuros experimentos tendrán que ser realizados para demostrar que la

detección del RNA viral proviene de virus citoplasmáticos. Una estrategia que se puede realizar para descartar la posibilidad de que el RNA de VHC detectado provenga de contaminación del plasma es incubar PBMC de un individuo sin VHC con plasma de un paciente infectado y realizar el RT-PCR para ver si en nuestro ensayo, el plasma podría ser una fuente de contaminación como lo realizado por Muratori y col. (1996). Otra estrategia para eliminar la posible contaminación por RNA de VHC del plasma, es tratar las células con tripsina y RNasa como fue descrito por Cribier y col. (1995). Sin embargo, la mejor demostración de que el RNA detectado es intracelular es determinar si el virus está replicando, por ejemplo mediante la detección de la hebra negativa, no obstante, en nuestros experimentos no se detectó, esto podría deberse a que el virus no está replicando o a que el nivel de detección de la técnica es muy bajo. Sin embargo, hay que señalar que estos experimentos se realizaron con PBMC no estimulados, por lo cual, de acuerdo a lo publicado por Pham y col. (2005) posiblemente no se detectó RNA de hebra negativa debido a que VHC sólo replicaría en PBMCs estimulados.

En este trabajo de tesis se analizaron muestras de PBMC y plasma de 45 pacientes chilenos crónicamente infectados con VHC, encontrando RNA viral en PBMC en un 73% de los pacientes analizados. Estos resultados sugieren que habría infección de estas células y que esto es un evento frecuente en los pacientes con infección crónica. Para

estudiar la posible compartimentalización de VHC en plasma y PBMC en los pacientes infectados, se realizaron experimentos de SSCP utilizando el 5'UTR de VHC. Esta región es una de las más conservadas dentro del genoma de VHC y posee un IRES, el cual es esencial para la traducción viral (Tsukiyama-Kohara y col., 1992). La actividad del IRES es altamente dependiente de la estructura secundaria/terciaria que adopte el RNA; el alto grado de dependencia impone un cierto grado de conservación en la secuencia nucleotídica (Fraser y Doudna, 2007). Por ello, se predice que el patrón de SSCP de esta región debería exhibir un número restringido de variantes (Laskus y col., 2000; Laskus y col., 2004; Roque-Afonso y col., 2005). A pesar de lo anterior, las muestras del plasma del grupo 1 de SSCP (pacientes que presentaron cantidades detectables de RNA de VHC sólo en plasma) y del grupo 2 de SSCP (pacientes en los cuales se detectó RNA de VHC en plasma y PBMC que muestran distintos patrones de migración de SSCP entre los compartimentos) exhibieron patrones muy variables de SSCP. Sin embargo, los patrones de SSCP de PBMC fueron más homogéneos (comparar la migración electroforética en las figura 8 y 9). Estos resultados sugieren que existe una gran variedad de cuasiespecies virales circulantes en plasma, sin embargo, sólo ciertas cuasiespecies de la población total de virus circulante son capaces de ser detectadas en PBMC. Consistente con esta conclusión, los resultados de SSCP

muestran que el 36% de los pacientes estudiados (grupo SSCP 2) exhibieron compartimentalización viral entre el plasma y PBMC. La compartimentalización de VHC fue corroborada con la secuenciación de clones individuales de IRESs aislados a partir de virus de plasma y PBMC de pacientes infectados y que se utilizaron para los ensayos de traducción *in vitro*. En ese estudio se determinó que 13 de los 19 pacientes (68%) presentaron diferencias entre los dos compartimentos.

El análisis de las secuencias mayoritarias (la secuencia principal amplificada en la reacción de RT-PCR, es decir la secuencia obtenida al analizar los picos más altos en el electroferograma) del 5'UTR amplificadas desde plasma y PBMC de los pacientes indicó que no siempre se observó una correlación entre las secuencias y los datos de SSCP. Lo que se esperaría es que las secuencias amplificadas de PBMC y plasma de los pacientes del grupo 2 fueran distintas y las del grupo 3 (pacientes en que se detectó RNA de VHC en plasma y PBMC que presentan un patrón de migración de SSCP visualmente indistinguible entre los compartimentos) fueran iguales. Sin embargo, en 6 de los 12 pacientes del grupo 2 de SSCP (15, 18, 19, 20, 22 y 24) en los cuales el patrón de SSCP fue diferente entre los compartimentos, se observaron secuencias idénticas entre plasma y PBMC. De la misma manera, en 4 de los 17 pacientes del grupo 3 de SSCP (32, 36, 37 y 41) en los cuales el patrón de SSCP fue similar entre ambos compartimentos, se

observaron cambios a nivel de la secuencia nucleotídica. Esta desventaja de la técnica de SSCP podría deberse al efecto de factores experimentales, tales como la temperatura, concentración de iones y solvente sobre el comportamiento electroforético de las moléculas de hebra simple de DNA (Hayashi, 1991). Por ello, patrones idénticos de SSCP, no necesariamente reflejan moléculas idénticas. Además, en los ensayos de SSCP las hebras sentido y antisentido no co-migran (no se observa una sola banda en el gel), ya que no tienen la misma secuencia, no necesariamente poseen el mismo peso molecular ni las interacciones involucradas en generar una cierta estructuración son idénticas (Nielsen y col., 1995). Asimismo, se ha reportado que ocasionalmente una hebra puede ser separada en dos o más bandas en un gel de SSCP, aunque la secuencia sea la misma, lo cual sugiere que las hebras, aunque tengan la misma secuencia, pueden adoptar más de una conformación estable en las condiciones del SSCP (Orita y col., 1989). Asimismo, debido a las restricciones estructurales impuestas por el IRES de VHC para ser funcional en el proceso del inicio de la traducción de su mRNA (Fraser y Doudna, 2007), no se puede descartar que existan mutaciones en el IRES de VHC que no varíen la estructura global de esta región. Sin embargo, lo más probable es que las discrepancias entre las técnicas de SSCP y de secuenciación se deban a que la secuenciación del 5'UTR no se realizó con varios clones del 5'UTR amplificado, sino que

probablemente sólo es la secuencia circulante principal amplificada en la reacción de RT-PCR, por lo cual la secuenciación sólo nos indica la secuencia mayoritaria en la muestra analizada y no es una indicación de las cuasiespecies presentes en la muestra, como si ocurre con el ensayo de SSCP. De esta forma, aunque la secuencia mayoritaria sea la misma entre los compartimentos podrían existir diferencias entre plasma y PBMC que no esten siendo detectadas con la secuenciación del producto de RT-PCR. Por lo tanto, la secuenciación directa del producto de RT-PCR nos indica el genotipo de la secuencia mayoritaria amplificada y el ensayo de SSCP las cuasiespecies amplificadas de la muestra de los pacientes. A pesar de las discrepancias entre las técnicas utilizadas y anteriormente señaladas, también se pudo observar una relación entre los patrones de migración en los ensayos de SSCP y los datos de secuenciación del 5'UTR, de esta manera, los 5'UTR que corresponden al genotipo 3 presentaron un patrón distinto en comparación a los 5'UTR de genotipo 1 (figura 8 y 10).

En resumen, a pesar de la aparente discrepancia entre las técnicas usadas en este estudio al considerar en conjunto las observaciones, se puede sugerir que el linfotropismo no es un fenómeno general de los virus circulantes, y sólo se restringiría a ciertas cuasiespecies de VHC. Además, nuestros datos (figuras 8-11, 13) muestran que existe compartimentalización de VHC a nivel del 5'UTR entre los virus aislados

compartimentalización de VHC a nivel del 5'UTR entre los virus aislados de plasma y PBMC de los pacientes con infección crónica por este virus. El hecho de que se encontraron diferencias en las variantes virales en PBMC sugiere que estas células podrían representar un reservorio extra-hepático para el virus y que éste podría replicar de manera independiente al virus que se encuentra en el hígado que por lo general es el predominante en el plasma, como ha sido postulado en varios estudios anteriormente (Radkowskiy col., 1998; Sung y col., 2003; Blackard y col., 2006).

4.2 Eficiencia traduccional *in vitro* de variantes naturales del IRES de VHC aislados a partir de muestras clínicas.

Debido a que la etapa de la iniciación de la síntesis de las proteínas virales es considerada por muchos autores como uno de los pasos limitantes en el ciclo replicativo de VHC, se procedió a evaluar la actividad IRES de los virus recuperados desde PBMC y plasma. El nivel traduccional se utilizó luego como un parámetro experimental para determinar la capacidad de replicación de los virus aislados a partir de muestras clínicas.

El IRES de VHC posee tres dominios estructurales, denominados II, III y IV que adoptan una estructura terciaria en condiciones fisiológicas

IRES actúa como un andamiaje estructural, lo cual permite unir directamente la subunidad 40S ribosomal y eIF3 para formar el complejo de pre-iniciación de la síntesis de proteína. Varios estudios apoyan esta hipótesis demostrando que la estructura es fundamental para la actividad IRES de VHC; sin embargo, también se ha sugerido que la secuencia podría jugar un papel importante en la etapa de iniciación de la traducción (Fraser y Doudna, 2007). Debido a que se encontraron diferencias nucleotídicas en los IRESs recuperados de los pacientes, se investigó si estos cambios podrían afectar la iniciación de la traducción del mRNA de VHC y si la actividad traduccional observada se correlacionaría con la estructura local del IRES. Los resultados de los ensayos de traducción *in vitro* utilizando vectores reporteros bicistrónicos a los que se les introdujo las mutaciones identificadas en los virus aislados desde muestras clínicas, permitieron establecer una correlación entre las mutaciones analizadas y un cambio en la actividad traduccional del IRES.

Una de las mutaciones que ejerció un efecto deletereo en la actividad IRES de VHC es el cambio A172G. Los datos de cristalografía de esta región del IRES, muestran que A172 se aparea con U227 y que interactúa con A155 la cual a la vez se aparea con U228 formando una estructura "four-way" crítica para la unión de eIF3 (Kieft y col., 2002). Además, en ese estudio generan la mutación U228C, la cual afectó la

estabilidad de la estructura, por lo tanto se puede sugerir que A172G podría estar afectando el correcto plegamiento de esta región y, probablemente, la baja actividad IRES se deba a la reducida formación de ribosomas 80S, como se ha mostrado para la mutante U228C (Ji y col., 2004), sin embargo, se necesitan más estudios para validar esta hipótesis. No obstante, otro estudio determinó mediante el programa "M-fold" que la estructura secundaria del IRES 1b y de la mutante A172G son idénticas; además en ese trabajo generan la mutante compensatoria A172G/U227C sin recuperar por completo la actividad IRES (Tang y col., 1999), lo cual sería una evidencia de que la secuencia primaria también es importante en esta región del IRES. Otra mutación que afectó drásticamente la actividad IRES de VHC fue G331A que se encuentra en el dominio IV. De acuerdo al modelo de la estructura secundaria del IRES, G331 aparee con la base C354, por lo tanto, la mutante A331 podría estar interactuando de otra manera con C354 o afectando el plegamiento de este dominio. La baja actividad del IRES G331A podría explicarse porque esta mutante estaría perjudicando el correcto posicionamiento de la subunidad 40S ribosomal en el codón de inicio, ya que se ha reportado que el dominio IV está involucrado en este proceso (Honda y Lemon 1996; Otto y Puglisi, 2004). Las mutaciones que produjeron el mayor efecto inhibitorio fueron las que se ubicaron en el tallo-bucle IIIId, lo cual concuerda con varias publicaciones que

señalan la importancia de esta región para la actividad IRES de VHC (Klinck y col., 2000; Lukavsky y col., 2000). La relevancia de esta región queda reflejada en que el triplete de guaninas G(266-268) que se ubica en el bucle de este dominio, se encuentran conservadas en todos los genotipos de VHC aislados, además de en otros miembros de la familia *Flaviviridae*, como VGB-B, VDVB y CSFV (Jubin y col., 2000). Las mutaciones ubicadas en esta región probablemente están afectando la interacción de la subunidad 40S ribosomal con el IRES, lo cual ocurriría por el cambio estructural generado o por una incorrecta asociación al ribosoma. También se encontraron las mutaciones U326C y A330G con reducida actividad, pero que no se analizaron con detalle en este estudio. Si nos basamos en datos de la literatura, se puede sugerir que estas últimas mutaciones estarían afectando la formación del pseudonudo ("pseudoknot") que se encuentra en la base del IRES de VHC y con esto al correcto posicionamiento del codón de inicio en el sitio P del ribosoma (Boehringer y col., 2005).

Aunque el 5'UTR de VHC es una de las regiones más conservadas del genoma viral, diversos estudios e incluido éste han observado variaciones en esta región (Lerat y col., 2000; Laporte y col., 2003; Thelu y col., 2004; Gallegos-Orozco y col., 2006; Moratorio y col., 2007; Thelu y col., 2007). Una posible explicación de la existencia de estas variaciones, es que éstas confieran alguna ventaja adaptativa para la

replicación en PBMC (Laporte y col., 2000; Lerat y col., 2000). Por otra parte, se ha reportado una menor eficiencia traduccional entre cuasiespecies de IRESs obtenidas desde sistema nervioso central de un paciente comparadas con las cuasiespecies predominantes de su plasma. Esto podría reflejar una adaptación viral que favorecería un estado de latencia en sitios extra-hepáticos. De esta forma, bajas eficiencias traduccionales podrían resultar en una disminución de la síntesis proteica favoreciendo así la persistencia viral (Forton y col., 2004). En concordancia con esto, en algunos casos encontramos IRESs aislados de PBMC con una actividad traduccional disminuida. Para confirmar esta hipótesis se deberían estudiar estas mutaciones a nivel traduccional en diversas líneas celulares, ya sea linfoides y/o PBMC, experimentos que escaparon de los objetivos inicialmente propuestos en esta tesis.

Los resultados obtenidos sugieren que durante el proceso de replicación viral se genera una población de partículas defectivas que están restringidas a nivel traduccional. Es importante destacar que en estos estudios sólo se cuantificó la actividad traduccional de los IRES virales. Por lo tanto, la existencia de partículas defectuosas asociadas a otros niveles de la replicación del virus no puede ser descartada.

4.3 Estructura del dominio IIIId del IRES de VHC y su relación con la actividad traduccional *in vitro*.

Para evaluar si las mutaciones identificadas en el dominio IIIId (IIIId) presentan una estructura similar al IIIId-1b, se realizó un enfoque teórico de simulación de dinámica molecular (DM) y experimental mediante dicroísmo circular (DC). Los datos teóricos de simulación de DM indicaron que la estructura de la doble mutación G266A/G268U, al menos en el dominio IIIId, es similar a la estructura 1b nativa y que las mutaciones simples son distintas. Además, a través del tiempo de la simulación la estructura de la doble mutante demostró ser más rígida que la IIIId-1b. Esto sugiere que la baja actividad traduccional puede deberse a una mayor estabilidad y rigidez de la estructura de este dominio del IRES. Existen diversas hipótesis para explicar nuestras observaciones. La primera considera que la subunidad 40S no es capaz de interactuar con el IRES, lo que está apoyado por los estudios de Ji y cols. (2004), en los cuales la mutación G(266-268)C posee una reducida unión de la subunidad 40S ribosomal y no forma complejos 48S. Alternativamente, en el estudio de Otto, en el cual utilizan la mutante G(266-268)A ocurre la unión de la subunidad 40S, pero no se observa la formación del complejo 48S (Otto y Puglisi, 2004). Además, las investigaciones de Lukavsky señalan que la mutación de G por A en esta región mantendría el plegamiento del dominio IIIId (Lukavsky y col.,

2000). Con estos antecedentes, es factible postular que en la doble mutante la subunidad 40S ribosomal pueda ser reclutada al IRES. Sin embargo, la mayor estabilidad del IRES podría evitar la formación del complejo de pre-iniciación. Esta idea está apoyada por los estudios de Honda, en los cuales se ha observado que la estabilización del dominio IV induce una inhibición de la traducción (Honda y col., 1996a).

Además, de los datos de simulación de DM y de los resultados de NMR (Klinck y col., 2000; Lukavsky y col., 2000), se puede observar que las bases que quedan expuestas hacia el solvente en la región del bucle apical del dominio IIIId son G266 y G267. Por la posición de estas bases, podemos proponer que tendrían un papel en el reconocimiento e interacción con alguna proteína ribosomal; por lo tanto, al quedar ocluidas en la estructura o bien al presentar una movilidad excesiva, alterarían la interacción con la subunidad 40S ribosomal lo cual se reflejaría en una actividad traduccional disminuida. Sin embargo, la única forma de confirmar estas hipótesis es realizar experimentos para determinar la unión de la subunidad 40S ribosomal a los IRES mutantes y estudiar la formación del complejo de pre-iniciación sobre el IRES.

La observación de que el tallo-bucle IIIId con la doble mutación (G266A/G268U) presenta una estructura similar al IIIId-1b a diferencia de cada mutación por separado, fue comprobada experimentalmente

mediante DC, técnica que ha sido extensamente utilizada para estudiar la estructura secundaria de ácidos nucleicos como por ejemplo, tRNA y rRNA. Los espectros de DC del RNA del IIIId obtenidos en este estudio concuerdan con los espectros publicados de una región del IRES de VHC correspondiente a los dominios IIIId, e y f nativo (Vos y cols., 2002). Además, ellos observaron al igual que nosotros el incremento en los picos a aproximadamente 260 y 208nm de los espectros cuando $MgCl_2$ fue agregado al RNA nativo. La mayor estructuración obtenida con magnesio concuerda con publicaciones que señalan la importancia de este ión en el plegamiento del IRES de VHC (Kieft y cols., 1999). Sin embargo, nuestros resultados no están de acuerdo con el trabajo de Klinck y cols. (2000), quienes señalan que la estructura del tallo-bucle IIIId no es afectada por los iones magnesio.

Considerando en conjunto las observaciones obtenidas de los datos teóricos de simulación de DM y experimentales de DC de los RNAs del dominio IIIId, se puede concluir que en ausencia de sales, condiciones en que se han realizado las simulaciones de DM y los experimentos de NMR (Lukavsky y col., 2000), así como en presencia de magnesio, a una concentración en la cual el IRES es funcional, la estructura secundaria del RNA del dominio IIIId-1b y la doble mutante son similares, y que las estructuras de las simples mutantes son diferentes. Esto sugiere que para la actividad IRES de VHC, tanto la estructura del dominio IIIId

como la secuencia son fundamentales. Esto indica que para que ocurra la formación del complejo de iniciación de la traducción sobre el IRES de VHC se requiere de determinadas estructuras para el correcto posicionamiento de la maquinaria traduccional, pero que también ciertas bases del IRES podrían estar involucradas en la unión directa con proteínas ribosomales, eIF2, eIF3 o con proteínas celulares que regulan este proceso. Esto último además podría explicar porqué aunque el IRES de VHC puede reclutar directamente la maquinaria traduccional *in vitro*, no siempre es funcional en células, lo cual está apoyado por la observación de que el IRES de VHC es diferencialmente regulado a través del ciclo celular (Honda y col., 2000). Además, es importante mencionar que la proteína viral Core se puede unir al triplete de guaninas G(266-268) del dominio IIIId inhibiendo la traducción, sugiriendo que el mecanismo utilizado por Core en la inhibición de la traducción de su propio mRNA sería impedir la interacción entre el IRES y la subunidad 40S ribosomal (Shimoike y col., 2006), lo que confirma la importancia de esta región en la regulación de la traducción del IRES de VHC.

En resumen, nuestro estudio indica que la estructura del dominio IIIId con la doble mutación en la región del bucle apical (G266A/G268U) es similar a la nativa. Sin embargo, se inhibe la traducción del IRES de VHC, por lo tanto, la secuencia y la estructura de este dominio del IRES

serían importantes para su función. Existen investigaciones precedentes que señalan la importancia de la secuencia en dominios estructurales de RNA. Es así, que se ha determinado que el cambio U2590C en el bucle de la señal de encapsidación de VHB de pato no cambia la estructura secundaria, aunque impide la interacción con la proteína P, la cual media la encapsidación del RNA genómico en la nucleocápside y la iniciación de la transcripción reversa (Beck y Nassal, 1997). La importancia de la secuencia en una región bucle también se ha descrito en la señal de encapsidación del virus de leucemia bovino (BLV) (Mansky y Gajary, 2002). Otro ejemplo es el estudio de Johansson, en el cual se observó que un residuo uracilo en el bucle del tallo-bucle del RNA genómico del bacteriófago MS2, es uno de los determinantes principales para la unión específica de su proteína de cubierta, en este caso se ha observado que el cambio U por purina disminuye la unión, sin embargo cuando fue cambiado a C la unión aumentó, a pesar de que la estructura del RNA unido a la proteína fue similar (Johansson y col., 1998).

Los ensayos teóricos y de DC se realizaron sólo con el dominio III_d, por lo tanto, no se puede concluir que las mutaciones no afecten la estructura de otras regiones del IRES (estructura terciaria). Aunque no existe considerable evidencia de la interacción del dominio III_d con otras regiones del IRES, el trabajo de Kieft sugiere que el dominio III_d está

involucrado en el plegamiento del IRES de VHC, ya que mutaciones en el bucle de esta región afectaron el patrón de protección de los dominios IIIe y IIIf en ensayos con RNasa T1 (Kieft y col., 1999). De acuerdo a este antecedente, podríamos sugerir que si las mutaciones analizadas en el dominio IIIId a nivel estructural influyen en alguna otra región del IRES sería en los dominios adyacentes IIIe-f.

Debido al alto grado de conservación a nivel de secuencia y estructura del IRES de VHC, es altamente probable que ambos sean importantes. Los datos conducidos durante esta tesis derivados de la simulación de DM y del DC refuerzan esta idea, sugiriendo que tanto la secuencia primaria como la estructura local del dominio IIIId son fundamentales para la actividad IRES de VHC. Además indican que el dominio IIIId es vital para la función del IRES; por lo tanto, entender cómo las mutantes identificadas en esta región inhiben la traducción, es importante para tratar de generar nuevas estrategias para inhibir la traducción viral.

Debido a la limitada respuesta de los pacientes a las terapias actuales contra VHC, es importante estudiar nuevos blancos terapéuticos. Es así que varios laboratorios están investigando a las proteínas NS3 y NS5B así como también al IRES de VHC, ya que la específica inhibición de la traducción proteica produciría una reducción global del nivel viral y además reduciría la aparición de mutantes que

escapen a la terapia (Jubin, 2001).

El IRES de VHC es un buen candidato como blanco terapéutico, ya que comanda la primera etapa limitante en el ciclo replicativo, luego del ingreso del virus a la célula. Además su mecanismo de inicio de la traducción tiene características que lo hacen único entre los IRES eucarióticos e incluso entre los virales. Una proyección muy relevante del estudio de mutaciones en IRES aislados desde virus circulantes en los pacientes infectados, es la posibilidad de identificar mutaciones puntuales que inhiban la interacción de esta estructura viral con la subunidad 40S ribosomal. De encontrarse estas mutaciones puntuales, podría considerarse esta región como un posible blanco terapéutico para el desarrollo de moléculas pequeñas capaces de inhibir el inicio de la traducción viral. Por lo tanto, la relevancia futura de este trabajo es determinar el mecanismo molecular por el cual las mutaciones en el dominio IIIId están inhibiendo la traducción en VHC.

5. CONCLUSIONES

- En la población estudiada, el genotipo mayoritario corresponde al genotipo 1 subtipo b.
- La mayoría de los pacientes analizados con infección crónica por VHC presentan RNA viral en PBMC. Esta observación sugiere que la presencia del virus en compartimentos extrahepáticos no se restringe a individuos inmunodeprimidos, sino que sería un evento general en la historia natural de la infección crónica por VHC.
- Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que distintas poblaciones del VHC son capaces de infectar diferentes compartimentos biológicos en un mismo individuo.
- El análisis de las eficiencias traduccionales de los IRES aislados a partir de virus circulantes indica que la mayoría son activos *in vitro*. Sin embargo, también se identificaron IRES con una actividad traduccional reducida indicando que durante la replicación viral se generan especies traduccionalmente deficientes. Nuestro estudio permitió identificar los cambios nucleotídicos presentes en estos IRES que son responsables de esta disminuida eficiencia traduccional.

- En 69% de los pacientes estudiados (11 de 16) se observaron diferencias entre las eficiencias traduccionales *in vitro* de los IRES aislados desde plasma y PBMC. El análisis de las secuencias reveló diferencias nucleotídicas entre los IRESs aislados desde los dos compartimentos, lo cual sugiere la presencia de diferentes variantes del virus en cada uno de estos compartimentos biológicos.

- Los datos de simulación de DM indican que las mutaciones del dominio IIIId: G266A, G268U y G266A/G268U no cambian la estructura global de esta región. Sin embargo, se observan diferencias en el bucle apical. Según los valores de RMSD, de menor a mayor rigidez se encuentra: G266A, G268U, el dominio IIIId nativo y la doble mutante G266A/G268U.

- La simulación de DM identificó un puente de hidrógeno extra en la doble mutante G266A/G268U entre las bases U264 y U268, que no se encuentra en los otros modelos estructurales estudiados, lo cual podría explicar la mayor rigidez de esta mutante.

- Las estructuras de RNA del dominio IIIId de las mutantes: G266A, G268U y G266A/G268U son distintas. La estructura del RNA del dominio IIIId nativo y doble mutante G266A/G268U en ausencia o

presencia de $MgCl_2$ son similares.

- Los experimentos de traducción *in vitro* junto con los resultados de simulación de DM y de DC confirman la importancia de la conservación de la secuencia y de la estructura en el dominio IIIId para la actividad traduccional del IRES de VHC y resaltan la importancia de este dominio estructural en el reconocimiento de la subunidad 40S ribosomal.

6. ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en este estudio.

Nombre	orientación	Secuencia (5' → 3')
P1	+	TTGGGGGCGACACTCCACCATGATC
P4	-	GTTACGTTTGGTTTTTCTTTGAGGT
P1-XhoI	+	GCCGCTCGAGTTGGGGGCGACACTCCACCATAGATC
P4-EcoRI	-	CGGGGAATTCGTTACGTTTGGTTTTTCTTTGAGG
renFw	+	TCGGACCCAGGATTCCTTTC
P2anti	-	TCTCTTCATAGCCTTATGCAGTTG
P1tag	+	TGGCGAATAATTGGGGGCGACACTCCACCATAG
mut1	-	CGCCATGGtTAGACGCTTTC
mut2	-	TCCCGGGAGGGGGGGgCCT
mut3	-	CACTATGGaTCTCCCGGGAG
mut4	-	CGCCATGGtTAGACGCTTTC
mut5	-	CTACTCGGcAGCAGTCTCG
mut6	-	TCGCGACcAACACTACTCG
mut7	-	TCGCGAaCCAACACTACTCG
mut8	-	AAGGCCTTTCGtGACCCAAC
mut9	-	TGCACGGTtTACGAGACCTG
mut10	-	CTTTCGtGACCCAACACTACTCGGcAGCAG
mut11	-	TCGCGAaCtAACACTACTCG

Las mutaciones introducidas en la región 5'UTR están en letra minúscula.

ANEXO 2

Tabla 3. IRES de VHC recuperados de virus circulantes en pacientes con infección crónica por VHC y clonados en el vector bicistrónico Dual Luciferasa. Se indica el genotipo y las sustituciones nucleotídicas de los IRES de acuerdo a su secuencia prototipo. c: PBMC, p: plasma. Cuando el "código paciente" se encuentra con guión indica el número del clon. También se indica el número del IRES asignado para los experimentos de traducción *in vitro* y la actividad IRES (%) en RRL de acuerdo a la figura 13.

DL VHC	Código Paciente	Genotipo IRES	Sustituciones nucleotídicas	Nº IRES en experimentos traducción <i>in vitro</i>	Actividad IRES en RRL (%) ± DE
1	c5	1b	Inserción C127	IRES 8	96 ± 8
2	p5	1b	C204U	IRES 9	109 ± 9
3	c23	1b	C204U	IRES 9	109 ± 9
4	p23	1b	1b	1b	100 ± 16
5	c25	1b	G90A, U356A, A359G	IRES 19	38 ± 2
6	p25	1b	1b	1b	100 ± 16
7	c26	1b	1b	1b	100 ± 16
8	p26	1b	1b	1b	100 ± 16
9	c29	1b	G82A, Inserción A207	IRES 17	108 ± 3
10	p29	1b	1b	1b	100 ± 16
11	c115	1b	C340A	IRES 12	104 ± 3
12	p115	1b	C340A	IRES 12	104 ± 3
13	c116	1b	G100A	IRES 3	68 ± 5
14	p116	1b	1b	1b	100 ± 16
15	c117	1b	1b	1b	100 ± 16
16	p117	1b	G350A	IRES 13	106 ± 16
17	c2	1b	1b	1b	100 ± 16
18	p2	1b	U306C	IRES 11	66 ± 5
19	c104	3a	A119C, G203A, G243A	IRES 20	88 ± 4
20	p104	3a	A119C, G203A, G243A	IRES 20	88 ± 4
21	p108	2a	U223C, C340U	IRES 28	86 ± 0,3
22	c108-3	1b	U80C	IRES 1	52 ± 5
23	c108-2	1b	C43U, U262C	IRES 14	85 ± 7
24	c106	1b	Inserción A207, U248G	IRES 26	109 ± 4
25	p106	1b	C104U	IRES 4	95 ± 1
26	c101	1b	1b	1b	100 ± 16
27	p101	1b	A225G, A330G	IRES 27	39 ± 2
28	c1	1b	A109G	IRES 5	71 ± 5
29	p1	1b	1b	1b	100 ± 16
30	p3	3a	A119C, G331A	IRES 7	23 ± 1
31	p11	3a	A119C	IRES 6	84 ± 5
32	c106-3	1b	C67U, A252G, G271A	IRES 15	9 ± 1
33	p106-1	1b	A223G	IRES 10	55 ± 5
34	c5-3	1b	1b	1b	100 ± 16
35	p5-2	5a	G137U, G266A, G268U	IRES 25	9 ± 2
36	c29-5	1b	G82A	IRES 2	91 ± 3
37	p29-3	1b	G82A, A172G, Inserción C127 y A207	IRES 18	27 ± 4
38	c110-1	1b	1b	1b	100 ± 16
39	c110-7	1b	1b	1b	100 ± 16
40	c110-8	1b	1b	1b	100 ± 16
41	c112-1	1b	A73G, C340U, G350A	IRES 16	50 ± 4
42	c112-4	1b	A73G, C340U, G350A	IRES 16	50 ± 4
43	c112-5	1b	A73G, C340U, G350A	IRES 16	50 ± 4
44	c112-3	1b	A73G, C340U, G350A	IRES 16	50 ± 4
45	c112-2	1b	A73G, C340U, G350A	IRES 16	50 ± 4
46	p110-1	1b	Inserción C127	IRES 8	96 ± 8
47	p110-2	1b	A136G, A140U	IRES 24	35 ± 4
48	p110-10	1b	Inserción C127	IRES 8	96 ± 8
49	p112-1	1b	Inserción C127, C340U, G350A	IRES 23	102 ± 6
50	p112-2	1b	Inserción C127, C340U, G350A	IRES 23	102 ± 6
51	p112-9	1b	A136G, A140U	IRES 24	35 ± 4
52	p121-1	1b	C121U, U326C, G350A	IRES 21	45 ± 1
53	p121-5	1b	C121U, C340A, G350A	IRES 22	107 ± 8
54	p121-10	1b	G350A	IRES 13	106 ± 16

ANEXO 3



Pontificia Universidad Católica de Chile
 Facultad de Medicina
 Departamento de Gastroenterología
 Marcoleta 367 - Santiago
 Tel: 56-2-6863820
 Fax: 56-2-6397780

Consentimiento Informado

Queremos invitarlo a participar en el estudio titulado: *"Rol de la replicación extra-hepática del virus de la hepatitis C en la expresión clínica e historia natural de la enfermedad"*. El Dr. Alejandro Soza está conduciendo este estudio para determinar si el virus de la hepatitis C puede multiplicarse en sitios del organismo fuera del hígado, lo que puede tener importancia para entender por qué los tratamientos no tienen la efectividad esperada y puede también contribuir al desarrollo de nuevas terapias.

Le pedimos que lea atentamente este documento y pregunte si tiene cualquier duda al respecto. Usted puede cambiar de opinión sobre su participación en este estudio en cualquier momento, sin necesidad de dar ninguna explicación. La atención médica que usted reciba no estará influida por su participación en este estudio.

¿Por qué se realiza este estudio?

La hepatitis C es una enfermedad causada por un virus (virus de la hepatitis C) que se multiplica en el hígado y puede generar lentamente daño, llegando a producir cirrosis y cáncer al hígado en algunos casos. No existe vacuna para esta enfermedad y los tratamientos son imperfectos. La razón por la cual las terapias no son exitosas en un alto porcentaje de los pacientes no está aclarada. Es posible que el virus, al multiplicarse en células fuera del hígado pueda escaparse de las defensas contra la infección o de los medicamentos usados para su tratamiento.

¿En qué consiste mi participación en el estudio?

Su participación en el estudio consiste en la donación de sangre en cantidad de aproximadamente 20 a 40 mL. Es posible que se le pida repetir esta donación. Se intentará que esta extracción coincida con la obtención de exámenes de rutina que usted necesite para el seguimiento de su enfermedad.

Si usted requiere la realización de una biopsia hepática o cirugía hepática como parte de la evaluación o tratamiento de su enfermedad, un pequeño trocito del tejido obtenido irá también para investigación. La decisión de realizar estos procedimientos es realizada por su médico tratante según criterios clínicos y no se ve influida por este estudio.

¿Qué riesgos tengo al participar en el estudio?

La extracción de sangre se realiza en la forma habitual como se extrae sangre para los exámenes rutinarios y no tiene un riesgo mayor que el de cualquier examen de sangre (moretón en el brazo, leve dolor después de la extracción, sensación de lipotimia o desmayo). La obtención eventual de una muestra de hígado no tiene riesgo adicional para el paciente, ya que se obtiene del tejido.

¿Qué beneficios obtengo al participar?

Usted no obtendrá ningún beneficio monetario o clínico directo al participar, salvo la

satisfacción de saber que está contribuyendo a una comprensión más detallada de la enfermedad y eventualmente al desarrollo de mejores tratamientos.

¿Para qué se utilizarán mis muestras?

Se realizarán diversos estudios para determinar si el virus está presente en las células de la sangre, como detección del material genético del virus (ARN), estudios de microscopía electrónica y otros.

¿Cómo se manejarán las muestras que se obtengan a través de este estudio?

Las muestras serán obtenidas bajo un código que relaciona su información clínica, pero que no lleva su nombre ni otros identificadores personales para proteger su privacidad. Las muestras serán almacenadas en el Departamento de Gastroenterología de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las muestras serán utilizadas para estudiar una serie de aspectos relacionados con la hepatitis C y será almacenada para eventuales estudios posteriores.

¿Se me comunicarán los resultados de los estudios realizados con mis muestras?

Los resultados de las investigaciones realizadas en sus muestras tienen gran valor para el desarrollo del conocimiento de la enfermedad, pero habitualmente no tienen un valor específico para el paciente en términos clínicos, motivo por el cual no se le va a informar sobre los resultados de estos estudios, salvo que se considere que alguna información sea importante para su salud.

¿Cuánto tiempo dura mi participación en el estudio?

Su participación consiste en la donación de una muestra de sangre por una vez y eventualmente su repetición un año después.

CONSENTIMIENTO

Se le dará una copia de este formulario de consentimiento para que lo guarde. Al firmar este formulario, usted no está renunciando a sus derechos legales. Si usted tiene cualquier pregunta sobre sus derechos como participante de la investigación, usted puede llamar al Comité de Ética de la Pontificia Universidad Católica de Chile, teléfono 632 -1925, Marcoleta # 391, Casilla 114 - D.

He leído (o alguien me ha leído) la información en este formulario de consentimiento. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y todas han sido contestadas a mi satisfacción. Al firmar este formulario, estoy de acuerdo en participar en este estudio.

Nombre: _____

Firma: _____

Investigador: _____

Firma: _____

Fecha: _____

7. PUBLICACIONES GENERADAS DURANTE ESTA TESIS

López-Lastra M, Rivas A, Barría MI. 2005. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res.* 38(2-3):121-46.

Barría M.I., Vera-Otarola J., León U., Vollrath V., Marsac D. Riquelme A., López-Lastra M., Soza A. 2008. Influence of extrahepatic viral infection on the natural history of hepatitis C. *Annals of Hepatology* 7(2):136-43.

Vera-Otarola J., Barría M.I., León U., Marsac D., Carvallo P., Soza A., López-Lastra M. Hepatitis C virus quasispecies distribution in plasma and peripheral blood mononuclear cells in treatment naive chronically infected patients. (Enviado)

María Inés Barría, Angel Gonzalez, Jorge Vera-Otarola, Ursula León, Valeska Vollrath, Delphine Marsac, Tomás Pérez-Arce, Octavio Monasterio, Alejandro Soza, Marcelo López-Lastra. Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site relies on both primary sequence and structure for driving cap-independent translation initiation. (En preparación)

8. REFERENCIAS

Agnello V., Abel G., Elfahal M., Knight G.B. and Zhang Q.X. 1999. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12766-12771.

Ali N., Pruijn G.J., Kenan D.J., Keene J.D. and Siddiqui A. 2000. Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* 275: 27531-27540.

Appel N., Pietschmann T. and Bartenschlager R. 2005. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol* 79: 3187-3194.

Araya V., Rakela J. and Wright T. 1997. Hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 112: 575-582.

Bagaglio S., Cinque P., Racca S., Pedale R., Grasso M.A., Lazzarin A. and Morsica G. 2005. Hepatitis C virus populations in the plasma, peripheral blood mononuclear cells and cerebrospinal fluid of HIV/hepatitis C virus-co-infected patients. *Aids* 19 Suppl 3: S151-165.

Bartenschlager R. 2002. Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nature reviews* 1: 911-916.

Bartenschlager R. 2004. Unexpected host range of hepatitis C virus replicons. *Hepatology* 39: 835-838.

Bartenschlager R. 2006. Hepatitis C virus molecular clones: from cDNA to infectious virus particles in cell culture. *Current opinion in microbiology* 9: 416-422.

Bartosch B. and Cosset F.L. 2006. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 348: 1-12.

Beck J, Nassal M. 1997. Sequence- and structure-specific determinants in the interaction between the RNA encapsidation signal and reverse transcriptase of avian hepatitis B viruses. *J Virol.* 71:4971-80.

Belsham G.J. and Sonenberg N. 2000. Picornavirus RNA translation: roles for cellular proteins. *Trends in microbiology* 8: 330-335.

Berlioz C. and Darlix J.L. 1995. An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polyprotein precursors. *Journal of virology* 69: 2214-2222.

Beuning P.J. y Musier-Forsyth K. 1999. Transfer RNA Recognition by Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Biopolymers* 52: 1-28.

Blackard J.T., Kemmer N. and Sherman K.E. 2006. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology* 44: 15-22.

Blackard J.T., Hiasa Y., Smeaton L., Jamieson D.J., Rodriguez I., Mayer K.H. and Chung R.T. 2007. Compartmentalization of hepatitis C

Mayer K.H. and Chung R.T. 2007. Compartmentalization of hepatitis C virus (HCV) during HCV/HIV coinfection. *The Journal of infectious diseases* 195: 1765-1773.

Blanchard E., Belouzard S., Goueslain L., Wakita T., Dubuisson J., Wychowski C. and Rouille Y. 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80: 6964-6972.

Blight K.J. and Rice C.M. 1997. Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 71: 7345-7352.

Blum AD, Uhlenbeck OC, Tinoco I Jr. 1972. Circular dichroism study of nine species of transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* 11:3248-56.

Boehringer D., Thermann R., Ostareck-Lederer A., Lewis J.D. and Stark H. 2005. Structure of the hepatitis C Virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES. *Structure* 13: 1695-1706.

Bordeleau M.E., Matthews J., Wojnar J.M., Lindqvist L., Novac O., Jankowsky E., Sonenberg N., Northcote P., Teesdale-Spittle P. and Pelletier J. 2005. Stimulation of mammalian translation initiation factor eIF4A activity by a small molecule inhibitor of eukaryotic translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10460-10465.

Branch A.D., Stump D.D., Gutierrez J.A., Eng F. and Walewski J.L. 2005. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Seminars in liver disease* 25: 105-117.

Brasey A., Lopez-Lastra M., Ohlmann T., Beerens N., Berkhout B., Darlix J. and Sonenberg N. 2003. The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *Journal of Virology* 77: 3939-3949

Bronowicki, J.P., M.A. Loriot, V. Thiers, Y. Grignon, A.L. Zignego, and C.Brechot. 1998. Hepatitis C virus persistence in human hematopoietic cells injected into SCID mice. *Hepatology* 28:211-8

Brown E.A., Zhang H., Ping L.H. and Lemon S.M. 1992. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* 20: 5041-5045.

Buratti E., Tisminetzky S., Zotti M. and Baralle F.E. 1998. Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *Nucleic acids research* 26: 3179-3187.

Chomczynski P. and Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W. and

Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362.

Collier A.J., Gallego J., Klinck R., Cole P.T., Harris S.J., Harrison G.P., Aboul-Ela F., Varani G. and Walker S. 2002. A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site. *Nature structural biology* 9: 375-380.

Cornell W.D., Cieplak P., Bayley C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W. and Kollman P.A. 1995. A second generation force field for simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. *J Am Chem Soc* 117: 5179-5197.

Craig A.W., Svitkin Y.V., Lee H.S., Belsham G.J. and Sonenberg N. 1997. The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation. *Molecular and cellular biology* 17: 163-169.

Cribier B., Schmitt C., Bingen A., Kirn A. and Keller F. 1995. In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *The Journal of General Virology* 76: 2485-2491.

Das S. and Maitra U. 2001. Functional significance and mechanism of eIF5-promoted GTP hydrolysis in eukaryotic translation initiation. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 70: 207-231.

Di Liberto G., Roque-Afonso A.M., Kara R., Ducoulombier D., Fallot G., Samuel D. and Feray C. 2006. Clinical and therapeutic implications of hepatitis C virus compartmentalization. *Gastroenterology* 131: 76-84.

Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Torre J., Portela A., Ortin J., Lopez-Galindez C., Perez-Brena P., Villanueva N., Najera R., VandePol S., Steinhauer D. and Holland J. 1985. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance—a review. *Gene expression* 40: 1-8.

Egger D., Wolk B., Gosert R., Bianchi L., Blum H.E., Moradpour D. and Bienz K. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76: 5974-5984.

Evans M.J., Rice C.M. and Goff S.P. 2004. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13038-13043.

Evans M.J., von Hahn T., Tscherne D.M., Syder A.J., Panis M., Wolk B., Hatzioannou T., McKeating J.A., Bieniasz P.D. and Rice C.M. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446: 801-805.

Farci P. and Purcell R.H. 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Seminars in liver disease* 20: 103-126.

Farci P., Shimoda A., Coiana A., Diaz G., Peddis G., Melpolder J.C.,

Strazzer A., Chien D.Y., Munoz S.J., Balestrieri A., Purcell R.H. and Alter H.J. 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 288: 339-344.

Féray C., Gigou M., Samuel D., Paradis V., Wilber J., David M.F., Urdea M. et al. 1994. The course of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 20:1137-1143.

Fernandez-Miragall O. and Martinez-Salas E. 2003. Structural organization of a viral IRES depends on the integrity of the GNRA motif. *RNA* 9: 1333-1344.

Forton D.M., Karayiannis P., Mahmud N., Taylor-Robinson S.D. and Thomas H.C. 2004. Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol* 78: 5170-5183.

Fraser C.S. and Doudna J.A. 2007. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nature reviews* 5: 29-38.

Friebe P., Lohmann V., Krieger N. and Bartenschlager R. 2001. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75: 12047-12057.

Friebe P. and Bartenschlager R. 2002. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 76: 5326-5338.

Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., Smith C., Marinos G., Goncalves F.L., Jr., Haussinger D., Diago M., Carosi G., Dhumeaux D., Craxi A., Lin A., Hoffman J. and Yu J. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347: 975-982.

Fukushi S., Katayama K., Kurihara C., Ishiyama N., Hoshino F.B., Ando T. and Oya A. 1994. Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochemical and biophysical research communications* 199: 425-432.

Gabrielli A., Manzin A., Candela M., Caniglia M.L., Paolucci S., Danieli M.G. and Clementi M. 1994. Active hepatitis C virus infection in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells from patients with mixed cryoglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 97: 87-93.

Gale M., Jr., Blakely C.M., Kwieciszewski B., Tan S.L., Dossett M., Tang N.M., Korth M.J., Polyak S.J., Gretch D.R. and Katze M.G. 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Molecular and cellular biology* 18: 5208-5218.

Gallegos-Orozco J.F., Arenas J.I., Vargas H.E., Kibler K.V., Wilkinson J.K., Nowicki M., Radkowski M., Nasser J., Rakela J. and Laskus T. 2006. Selection of different 5' untranslated region hepatitis C virus

variants during post-transfusion and post-transplantation infection. *Journal of viral hepatitis* 13: 489-498.

Galli M., Zehender G., Monti G., Ballare M., Saccardo F., Piconi S., De Maddalena C., Bertoncelli M.C., Rinaldi G., Invernizzi F. and et al. 1995. Hepatitis C virus RNA in the bone marrow of patients with mixed cryoglobulinemia and in subjects with noncryoglobulinemic chronic hepatitis type C. *The Journal of infectious diseases* 171: 672-675.

Gardner J.P., Durso R.J., Arrigale R.R., Donovan G.P., Maddon P.J., Dragic T. and Olson W.C. 2003. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4498-4503.

Germi R., Crance J.M., Garin D., Guimet J., Lortat-Jacob H., Ruigrok R.W., Zarski J.P. and Drouet E. 2002. Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *Journal of medical virology* 68: 206-215.

Gingras A.C., Raught B. and Sonenberg N. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of biochemistry* 68: 913-963.

Glavac D. and Dean M. 1993. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Human mutation* 2: 404-414.

Golebiowski J., Antonczak S., Di-Giorgio A., Condom R. and Cabrol-Bass D. 2004. Molecular dynamics simulation of hepatitis C virus IRES IIIId domain: structural behavior, electrostatic and energetic analysis. *Journal of molecular modeling* 10: 60-68.

González R, Soza A, Hernández V, Pérez RM, Alvarez M, Morales A, Arellano M, Riquelme A, Viviani P, Covarrubias C, Arrese M, Miquel JF, Nervi F. 2005. Incidence and prevalence of hepatitis C virus infection in Chile. *Ann Hepatol.* 4(2):127-30.

Gosert R., Egger D., Lohmann V., Bartenschlager R., Blum H.E., Bienz K. and Moradpour D. 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77: 5487-5492.

Goutagny N., Fatmi A., De Ledinghen V., Penin F., Couzigou P., Inchauspe G. and Bain C. 2003. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases* 187: 1951-1958.

Grakoui A., McCourt D.W., Wychowski C., Feinstone S.M. and Rice C.M. 1993. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10583-10587.

Griffin S.D., Beales L.P., Clarke D.S., Worsfold O., Evans S.D., Jaeger J., Harris M.P. and Rowlands D.J. 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS letters* 535: 34-38.

Hayashi K. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR methods and applications* 1: 34-38.

Hellen C.U. and Pestova T.V. 1999. Translation of hepatitis C virus RNA. *Journal of viral hepatitis* 6: 79-87.

Hellen C.U. and Sarnow P. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes & development* 15: 1593-1612.

Hentze M.W. 1997. EIF4G:A multipurpose ribosome adapter?. *Science* 275: 500-501.

Hepp J., Rios H., Suarez L., Zaror M., Quiroga M., Rodríguez G., Valderrama R., Humeres R., Innocenti F., Sanhueza E., Zapata R., Cardenas R., Palacios J.M., Abarca J., Montalvan C., Noriega L.M., Videla D., Reynolds E., Espinoza R., Sandoval R. and Rius M. 2002. Liver transplantation in adults: a caseload from Clínica Alemana de Santiago, Chile. *Rev Med Chil* 130: 779-786.

Hershey J.W.B. and Merrick W.C. 2000. Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In Sonenberg N, Hershey JWB y Mathews MB (eds), *Translation Control* pp 33-88. Cold spring, NY: Cold Spring harbor Laboratory Press.

Hijikata M., Mizushima H., Akagi T., Mori S., Kakiuchi N., Kato N., Tanaka T., Kimura K. and Shimotohno K. 1993. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 67: 4665-4675.

Honda M., Kaneko S., Sakai A., Unoura M., Murakami S. and Kobayashi K. 1994. Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. *Hepatology* 20: 1144-1151.

Honda M., Brown E.A. and Lemon S.M. 1996a. Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* 2: 955-968.

Honda M., Ping L.H., Rijnbrand R.C., Amphlett E., Clarke B., Rowlands D. and Lemon S.M. 1996b. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 222: 31-42.

Honda M., Beard M.R., Ping L.H. and Lemon S.M. 1999. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *Journal of virology* 73: 1165-1174.

Honda M., Kaneko S., Matsushita E., Kobayashi K., Abell G.A. and Lemon S.M. 2000. Cell cycle regulation of hepatitis C virus internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterology* 118: 152-162.

Hoofnagle J.H. 1997. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 26: 15S-20S.

Jang S.K., Krausslich H.G., Nicklin M.J., Duke G.M., Palmenberg

A.C. and Wimmer E. 1988. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62: 2636-2643.

Januszkiewicz-Lewandowska D, Wysocki J, Pernak M, Nowicka K, Zawada M, Rembowska J, Lewandowski K, Mańkowski P, Nowak J. 2007. Presence of hepatitis C virus (HCV)-RNA in peripheral blood mononuclear cells in HCV serum negative patients during interferon and ribavirin therapy. *Jpn J Infect Dis.* 60: 29-32.

Ji H., Fraser C.S., Yu Y., Leary J. and Doudna J.A. 2004. Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16990-16995.

Johansson HE, Dertinger D, LeCuyer KA, Behlen LS, Greef CH, Uhlenbeck OC. 1998. A thermodynamic analysis of the sequence-specific binding of RNA by bacteriophage MS2 coat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:9244-9.

Johnson KH, Gray DM. 1991. An estimate of the nearest neighbor base-pair content of 5S RNA using CD and absorption spectroscopy. *Biopolymers* 31:385-95.

Jubin R., Vantuno N.E., Kieft J.S., Murray M.G., Doudna J.A., Lau J.Y. and Baroudy B.M. 2000. Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIIId contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding. *J Virol* 74: 10430-10437.

Jubin R. 2001. Hepatitis C IRES: translating translation into a therapeutic target. *Curr Opin Mol Ther.* 3:278-87.

Kamoshita N., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. and Nomoto A. 1997. Genetic analysis of internal ribosomal entry site on hepatitis C virus RNA: implication for involvement of the highly ordered structure and cell type-specific transacting factors. *Virology* 233: 9-18.

Kieft J.S., Zhou K., Jubin R., Murray M.G., Lau J.Y. and Doudna J.A. 1999. The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold. *J Mol Biol* 292: 513-529.

Kieft J.S., Zhou K., Jubin R. and Doudna J.A. 2001. Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* 7: 194-206.

Kieft J.S., Zhou K., Grech A., Jubin R. and Doudna J.A. 2002. Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nature structural biology* 9: 370-374.

Klinck R., Westhof E., Walker S., Afshar M., Collier A. and Aboul-Ela F. 2000. A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *RNA (New York, NY)* 6: 1423-1431.

Kolykhalov A.A., Feinstone S.M. and Rice C.M. 1996. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70: 3363-3371.

Koutsoudakis G., Kaul A., Steinmann E., Kallis S., Lohmann V., Pietschmann T. and Bartenschlager R. 2006. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 80: 5308-5320.

Kozak M. 1989. Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Molecular and cellular biology* 9: 5073-5080.

Kulinski T, Olejniczak M, Huthoff H, Bielecki L, Pachulska-Wieczorek K, Das AT, Berkhout B, Adamiak RW. 2003. The apical loop of the HIV-1 TAR RNA hairpin is stabilized by a cross-loop base pair. *J Biol Chem.* 278:38892-901.

Lafuente E., Ramos R. and Martinez-Salas E. 2002. Long-range RNA-RNA interactions between distant regions of the hepatitis C virus internal ribosome entry site element. *The Journal of General Virology* 83: 1113-1121.

Lancaster A.M., Jan E. and Sarnow P. 2006. Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *RNA* 12: 894-902.

Laporte J., Malet I., Andrieu T., Thibault V., Toulme J.J., Wychowski C., Pawlotsky J.M., Huraux J.M., Agut H. and Cahour A. 2000. Comparative analysis of translation efficiencies of hepatitis C virus 5' untranslated regions among intraindividual quasispecies present in chronic infection: opposite behaviors depending on cell type. *J Virol* 74: 10827-10833.

Laporte J., Bain C., Maurel P., Inchauspe G., Agut H. and Cahour A. 2003. Differential distribution and internal translation efficiency of hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells. *Blood* 101: 52-57.

Laskus T., Radkowski M., Wang L.F., Cianciara J., Vargas H. and Rakela J. 1997. Hepatitis C virus negative strand RNA is not detected in peripheral blood mononuclear cells and viral sequences are identical to those in serum: a case against extrahepatic replication. *The Journal of General Virology* 78: 2747-2750.

Laskus T., Radkowski M., Wang L.F., Jang S.J., Vargas H. and Rakela J. 1998a. Hepatitis C virus quasispecies in patients infected with HIV-1: correlation with extrahepatic viral replication. *Virology* 248: 164-171.

Laskus T., Radkowski M., Wang L.F., Vargas H. and Rakela J. 1998b. The presence of active hepatitis C virus replication in lymphoid tissue in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of infectious diseases* 178: 1189-1192.

Laskus T., Radkowski M., Wang L.F., Nowicki M. and Rakela J. 2000. Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease: confounding effect of viral

adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J Virol* 74: 1014-1017.

Laskus T, Radkowski M, Wilkinson J, Vargas H, Rakela J. 2002a. The origin of hepatitis C virus reinfecting transplanted livers: serum-derived versus peripheral blood mononuclear cell-derived virus. *J Infect Dis.* 185:417-21.

Laskus T., Radkowski M., Bednarska A., Wilkinson J., Adair D., Nowicki M., Nikolopoulou G.B., Vargas H. and Rakela J. 2002b. Detection and analysis of hepatitis C virus sequences in cerebrospinal fluid. *J Virol* 76: 10064-10068.

Laskus T., Wilkinson J., Gallegos-Orozco J.F., Radkowski M., Adair D.M., Nowicki M., Operskalski E., Buskell Z., Seeff L.B., Vargas H. and Rakela J. 2004. Analysis of hepatitis C virus quasispecies transmission and evolution in patients infected through blood transfusion. *Gastroenterology* 127: 764-776.

Lerat H., Berby F., Trabaud M.A., Vidalin O., Major M., Trepo C. and Inchauspe G. 1996. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *The Journal of clinical investigation* 97: 845-851.

Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, Berby F, Trabaud MA, Trépo C, Inchauspe G. 1998. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood.* 91:3841-9.

Lerat H., Shimizu Y.K. and Lemon S.M. 2000. Cell type-specific enhancement of hepatitis C virus internal ribosome entry site-directed translation due to 5' nontranslated region substitutions selected during passage of virus in lymphoblastoid cells. *J Virol* 74: 7024-7031.

Lindenbach B.D., Evans M.J., Syder A.J., Wolk B., Tellinghuisen T.L., Liu C.C., Maruyama T., Hynes R.O., Burton D.R., McKeating J.A. and Rice C.M. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309: 623-626.

Locker N., Easton L.E. and Lukavsky P.J. 2007. HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *EMBO J* 26: 795-805.

Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L. and Bartenschlager R. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285: 110-113.

Lopez-Lastra M., Rivas A. and Barria M.I. 2005. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biological research* 38: 121-146.

Loret EP, Georgel P, Johnson WC Jr, Ho PS. 1992. Circular dichroism and molecular modeling yield a structure for the complex of human immunodeficiency virus type 1 trans-activation response RNA and the binding region of Tat, the trans-acting transcriptional activator.

Proc Natl Acad Sci U S A. 89:9734-8.

Lukavsky P.J., Otto G.A., Lancaster A.M., Sarnow P. and Puglisi J.D. 2000. Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nature structural biology* 7: 1105-1110.

Lukavsky P.J., Kim I., Otto G.A. and Puglisi J.D. 2003. Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nature structural biology* 10: 1033-1038.

MacParland S.A., Pham T.N., Gujar S.A. and Michalak T.I. 2006. De novo infection and propagation of wild-type Hepatitis C virus in human T lymphocytes in vitro. *The Journal of general virology* 87: 3577-3586.

Maggi F., Fornai C., Morrica A., Vatteroni M.L., Giorgi M., Marchi S., Ciccorossi P., Bendinelli M. and Pistello M. 1999. Divergent evolution of hepatitis C virus in liver and peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *Journal of medical virology* 57: 57-63.

Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358:958-965.

Mansky L.M. y Gajary L.C. 2002. The Primary Nucleotide Sequence of the Bovine Leukemia Virus RNA Packaging Signal Can Influence Efficient RNA Packaging and Virus Replication. *Virology* 301: 272-280.

Manzin A., Solfrosi L., Petrelli E., Macarri G., Tosone G., Piazza M. and Clementi M. 1998. Evolution of hypervariable region 1 of hepatitis C virus in primary infection. *J Virol* 72: 6271-6276.

Martell M., Esteban J.I., Quer J., Genesca J., Weiner A., Esteban R., Guardia J. and Gomez J. 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66: 3225-3229.

Martinez-Salas E., Saiz J.C., Davila M., Belsham G.J. and Domingo E. 1993. A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *Journal of virology* 67: 3748-3755.

Martinez-Salas E., Ramos R., Lafuente E. and Lopez de Quinto S. 2001. Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *The Journal of general virology* 82: 973-984.

Martinez-Salas E., Lopez de Quinto S., Ramos R. and Fernandez-Miragall O. 2002. IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* 84: 755-763.

Martinez-Salas E. and Fernandez-Miragall O. 2004. Picornavirus IRES: structure function relationship. *Current pharmaceutical design* 10: 3757-3767.

McCaffrey A.P., Ohashi K., Meuse L., Shen S., Lancaster A.M., Lukavsky P.J., Sarnow P. and Kay M.A. 2002. Determinants of hepatitis C translational initiation in vitro, in cultured cells and mice. *Mol Ther* 5: 676-684.

McMullan L.K., Grakoui A., Evans M.J., Mihalik K., Puig M., Branch A.D., Feinstone S.M. and Rice C.M. 2007. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2879-2884.

Melcher S.E., Wilson T.J. and Lilley D.M. 2003. The dynamic nature of the four-way junction of the hepatitis C virus IRES. *RNA* 9: 809-820.

Mikaelian I. and Sergeant A. 1992. A general and fast method to generate multiple site directed mutations. *Nucleic Acids Res* 20: 376.

Mitchell S.A., Spriggs K.A., Coldwell M.J., Jackson R.J. and Willis A.E. 2003. The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Molecular cell* 11: 757-771.

Mitchell S.A., Spriggs K.A., Bushell M., Evans J.R., Stoneley M., Le Quesne J.P., Spriggs R.V. and Willis A.E. 2005. Identification of a motif that mediates polypyrimidine tract-binding protein-dependent internal ribosome entry. *Genes & development* 19: 1556-1571.

Moradpour D., Penin F. and Rice C.M. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews* 5: 453-463.

Moratorio G., Martinez M., Gutierrez M.F., Gonzalez K., Colina R., Lopez-Tort F., Lopez L., Recarey R., Schijman A.G., Moreno M.P., Garcia-Aguirre L., Manascero A.R. and Cristina J. 2007. Evolution of naturally occurring 5'non-coding region variants of Hepatitis C virus in human populations of the South American region. *Virology* 4: 79.

Muratori L, Gibellini D, Lenzi M, Cataleta M, Muratori P, Morelli MC, Bianchi FB. 1996. Quantification of hepatitis C virus-infected peripheral blood mononuclear cells by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood*. 88:2768-74.

Navas S., Martin J., Quiroga J.A., Castillo I. and Carreno V. 1998. Genetic diversity and tissue compartmentalization of the hepatitis C virus genome in blood mononuclear cells, liver, and serum from chronic hepatitis C patients. *J Virol* 72: 1640-1646.

Nielsen D.A., Novoradovsky A. and Goldman D. 1995. SSCP primer design based on single-strand DNA structure predicted by a DNA folding program. *Nucleic Acids Res* 23: 2287-2291.

Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. and Sekiya T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2766-2770.

Otto G.A., Lukavsky P.J., Lancaster A.M., Sarnow P. and Puglisi J.D. 2002. Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S

interaction. *RNA* 8: 913-923.

Otto G.A. and Puglisi J.D. 2004. The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* 119: 369-380.

Pavlovic D., Neville D.C., Argaud O., Blumberg B., Dwek R.A., Fischer W.B. and Zitzmann N. 2003. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6104-6108.

Pawlotsky J.M. 2006. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Current topics in microbiology and immunology* 299: 261-284.

Pelletier J. and Sonenberg N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334: 320-325.

Perez I., McAfee J.G. and Patton J.G. 1997. Multiple RRM's contribute to RNA binding specificity and affinity for polypyrimidine tract binding protein. *Biochemistry* 36: 11881-11890.

Pestova T.V., Borukhov S.I. and Hellen C.U. 1998. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394: 854-859.

Pestova T.V., Lomakin I.B., Lee J.H., Choi S.K., Dever T.E. and Hellen C.U. 2000. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403: 332-335.

Pestova T.V., Kolupaeva V.G., Lomakin I.B., Pilipenko E.V., Shatsky I.N., Agol V.I. and Hellen C.U. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 7029-7036.

Pfeifer U., Thomssen R., Legler K., Bottcher U., Gerlich W., Weinmann E. and Klinge O. 1980. Experimental non-A, non-B hepatitis: four types of cytoplasmic alteration in hepatocytes of infected chimpanzees *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 33 233-243.

Pham T.N., MacParland S.A., Mulrooney P.M., Cooksley H., Naoumov N.V. and Michalak T.I. 2004. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *J Virol* 78: 5867-5874.

Pham TN, Macparland SA, Coffin CS, Lee SS, Bursey FR, Michalak TI. 2005. Mitogen-induced upregulation of hepatitis C virus expression in human lymphoid cells. *J Gen Virol.* 86:657-66.

Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kale L. and Schulten K. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of computational chemistry* 26: 1781-1802.

Pietschmann T., Lohmann V., Rutter G., Kurpanek K. and Bartenschlager R. 2001. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 75: 1252-1264.

Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S., Galli G., Falugi F., Petracca R.,

Weiner A.J., Houghton M., Rosa D., Grandi G. and Abrignani S. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282: 938-941.

Pohlmann S., Zhang J., Baribaud F., Chen Z., Leslie G.J., Lin G., Granelli-Piperno A., Doms R.W., Rice C.M. and McKeating J.A. 2003. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 77: 4070-4080.

Psaridi L., Georgopoulou U., Varaklioti A. and Mavromara P. 1999. Mutational analysis of a conserved tetraloop in the 5' untranslated region of hepatitis C virus identifies a novel RNA element essential for the internal ribosome entry site function. *FEBS letters* 453: 49-53.

Radkowski M., Wang L.F., Vargas H.E., Rakela J. and Laskus T. 1998. Detection of hepatitis C virus replication in peripheral blood mononuclear cells after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 66: 664-666.

Radkowski M., Wang L.F., Vargas H., Wilkinson J., Rakela J. and Laskus T. 2001. Changes in hepatitis C virus population in serum and peripheral blood mononuclear cells in chronically infected patients receiving liver graft from infected donors. *Transplantation* 72: 833-838.

Radkowski M., Wilkinson J., Nowicki M., Adair D., Vargas H., Ingui C., Rakela J. and Laskus T. 2002. Search for hepatitis C virus negative-strand RNA sequences and analysis of viral sequences in the central nervous system: evidence of replication. *J Virol* 76: 600-608.

Radkowski M., Bednarska A., Horban A., Stanczak J., Wilkinson J., Adair D.M., Nowicki M., Rakela J. and Laskus T. 2004. Infection of primary human macrophages with hepatitis C virus in vitro: induction of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 8. *The Journal of general virology* 85: 47-59.

Radkowski M., Gallegos-Orozco J.F., Jablonska J., Colby T.V., Walewska-Zielecka B., Kubicka J., Wilkinson J., Adair D., Rakela J. and Laskus T. 2005. Persistence of hepatitis C virus in patient

Rakela J. and Vargas H.E. 2002. Hepatitis C: magnitude of the problem. *Liver Transpl* 8: S3-6.

Reynolds J.E., Kaminski A., Carroll A.R., Clarke B.E., Rowlands D.J. and Jackson R.J. 1996. Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *RNA* 2: 867-878.

Rijnbrand R., Bredenbeek P., van der Straaten T., Whetter L., Inchauspe G., Lemon S. and Spaan W. 1995. Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS letters* 365: 115-119.

Rijnbrand R.C., Abbink T.E., Haasnoot P.C., Spaan W.J. and Bredenbeek P.J. 1996. The influence of AUG codons in the hepatitis C virus 5' nontranslated region on translation and mapping of the translation initiation window. *Virology* 226: 47-56.

Rijnbrand R., Abell G. and Lemon S.M. 2000. Mutational analysis of the GB virus B internal ribosome entry site. *Journal of virology* 74: 773-783.

Robertson B., Myers G., Howard C., Brettin T., Bukh J., Gaschen B., Gojobori T., Maertens G., Mizokami M., Nainan O., Netesov S., Nishioka K., Shin i T., Simmonds P., Smith D., Stuyver L. and Weiner A. 1998. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol* 143: 2493-2503.

Roque Afonso A.M., Jiang J., Penin F., Tareau C., Samuel D., Petit M.A., Bismuth H., Dussaix E. and Feray C. 1999. Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Virol* 73: 9213-9221.

Roque-Afonso A.M., Ducoulombier D., Di Liberto G., Kara R., Gigou M., Dussaix E., Samuel D. and Feray C. 2005. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 79: 6349-6357.

Saunier B., Triyatni M., Ulianich L., Maruvada P., Yen P. and Kohn L.D. 2003. Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol* 77: 546-559.

Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., Roccasecca R.M., Acali S., Filocamo G., Traboni C., Nicosia A., Cortese R. and Vitelli A. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 21: 5017-5025.

Schalm S., Weiland O., Hansen B., Milella M., Lai M., Hollander A., Michielsen P., Bellobuono A., Chemello L., Pastore G., Chen D., Brouwer J. and Hepatitis A.T.E.S.G.F.V. 1999. Interferon-Ribavirin for Chronic Hepatitis C With and Without Cirrhosis: Analysis of Individual Patient Data of Six Controlled Trials. *Gastroenterology* 117: 408-413.

Schmid F.X. 1997. Protein Structure: A practical approach. In Creighton T.E. (ed), *Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes*. pp 261-298. The Practical Approach Series. Oxford University Press, USA.

Shimizu Y.K., Igarashi H., Kanematu T., Fujiwara K., Wong D.C., Purcell R.H. and Yoshikura H. 1997. Sequence analysis of the hepatitis C virus genome recovered from serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells of infected chimpanzees. *J Virol* 71: 5769-5773.

Shimoike T., Koyama C., Murakami K., Suzuki R., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. 2006. Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop III_d domain of IRES and the viral core protein. *Virology* 345: 434-445.

Simmonds P., Holmes E.C., Cha T.A., Chan S.W., McOmish F., Irvine B., Beall E., Yap P.L., Kolberg J. and Urdea M.S. 1993. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *The Journal of general virology* 74: 2391-2399.

Simmonds P. 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *The Journal of general virology* 85: 3173-3188.

Simmonds P., Bukh J., Combet C., Deleage G., Enomoto N., Feinstone S., Halfon P., Inchauspe G., Kuiken C., Maertens G., Mizokami M., Murphy D.G., Okamoto H., Pawlotsky J.M., Penin F., Sablon E., Shin I.T., Stuyver L.J., Thiel H.J., Viazov S., Weiner A.J. and Widell A. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42: 962-973.

Siridechadilok B., Fraser C.S., Hall R.J., Doudna J.A. and Nogales E. 2005. Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis. *Science* 310: 1513-1515.

Sizova D.V., Kolupaeva V.G., Pestova T.V., Shatsky I.N. and Hellen C.U. 1998. Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J Virol* 72: 4775-4782.

Sosnick TR, Fang X, Shelton VM. 2000. Application of circular dichroism to study RNA folding transitions. *Methods Enzymol.* 317:393-409.

Soza A., Arrese M., Gonzalez R., Alvarez M., Perez R.M., Cortes P., Patillo A., Riquelme A. and Riquelme A. 2004. Clinical and epidemiological features of 147 Chilean patients with chronic hepatitis C. *Ann Hepatol* 3: 146-151.

Soza A. and Lopez-Lastra M. 2006. [Hepatitis C in Chile: burden of the disease]. *Revista medica de Chile* 134: 777-788.

Spahn C.M., Kieft J.S., Grassucci R.A., Penczek P.A., Zhou K., Doudna J.A. and Frank J. 2001. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291: 1959-1962.

Stoneley M. and Willis A.E. 2004. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23: 3200-3207.

Sung V.M., Shimodaira S., Doughty A.L., Picchio G.R., Can H., Yen T.S., Lindsay K.L., Levine A.M., Lai M.M.. 2003. Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol* 77: 2134-46.

Suzuki T., Ishii K., Aizaki H. and Wakita T. 2007. Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 1200-1212.

Svitkin Y.V. and Sonenberg N. 2004. An efficient system for cap- and poly(A)-dependent translation in vitro. *Methods in molecular biology*

(Clifton, NJ 257: 155-170.

Swart M., van der Wijst T., Fonseca Guerra C. and Bickelhaupt F.M. 2007. Pi-pi stacking tackled with density functional theory. *Journal of molecular modeling* 13: 1245-1257.

Tang S., Collier A.J. and Elliott R.M. 1999. Alterations to both the primary and predicted secondary structure of stem-loop IIIc of the hepatitis C virus 1b 5' untranslated region (5'UTR) lead to mutants severely defective in translation which cannot be complemented in trans by the wild-type 5'UTR sequence. *J Virol* 73: 2359-2364.

Tellinghuisen T.L., Evans M.J., von Hahn T., You S. and Rice C.M. 2007. Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol* 81: 8853-8867.

Thelu M.A., Drouet E., Hilleret M.N. and Zarski J.P. 2004. Lack of clinical significance of variability in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *Journal of medical virology* 72: 396-405.

Thelu M.A., Leroy V., Ramzan M., Dufeu-Duchesne T., Marche P. and Zarski J.P. 2007. IRES complexity before IFN-alpha treatment and evolution of the viral load at the early stage of treatment in peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis C patients. *Journal of medical virology* 79: 242-253.

Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.

Tscherne D.M., Jones C.T., Evans M.J., Lindenbach B.D., McKeating J.A. and Rice C.M. 2006. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* 80: 1734-1741.

Tsukiyama-Kohara K., Iizuka N., Kohara M. and Nomoto A. 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of virology* 66: 1476-1483.

Unbehaun A., Borukhov S.I., Hellen C.U. and Pestova T.V. 2004. Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes & development* 18: 3078-3093.

Van Holde K.E., Johnson C. and Ho P.S. 1998. Principles of physical biochemistry. Linear and Circular Dichroism pp 418-451. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River, New Jersey.

van Leeuwen H.C., Reusken C.B., Roeten M., Dalebout T.J., Riezu-Boj J.I., Ruiz J. and Spaan W.J. 2004. Evolution of naturally occurring 5' non-translated region variants of hepatitis C virus genotype 1b in selectable replicons. *The Journal of General Virology* 85: 1859-1866.

Vos S., Berrisford D.J. and Avis J.M. 2002. Effect of magnesium ions on the tertiary structure of the hepatitis C virus IRES and its affinity for

the cyclic peptide antibiotic viomycin. *Biochemistry* 41: 5383-5396.

Wakita T., Pietschmann T., Kato T., Date T., Miyamoto M., Zhao Z., Murthy K., Habermann A., Krausslich H.G., Mizokami M., Bartenschlager R. and Liang T.J. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine* 11: 791-796.

Wang C., Sarnow P. and Siddiqui A. 1994. A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 68: 7301-7307.

Wang C., Le S.Y., Ali N. and Siddiqui A. 1995. An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA* 1: 526-537.

Wilson JE, Powell MJ, Hoover SE, Sarnow P. 2000. Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol.* 20):4990-9.

Wolk B., Sansonno D., Krausslich H.G., Dammacco F., Rice C.M., Blum H.E. and Moradpour D. 2000. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* 74: 2293-2304.

Yanagi M., St Claire M., Emerson S.U., Purcell R.H. and Bukh J. 1999. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2291-2295.

Yasui K., Wakita T., Tsukiyama-Kohara K., Funahashi S.I., Ichikawa M., Kajita T., Moradpour D., Wands J.R. and Kohara M. 1998. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 72: 6048-6055.

Yi M. and Lemon S.M. 2003. 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 77: 3557-3568.

Zhang J., Yamada O., Ito T., Akiyama M., Hashimoto Y., Yoshida H., Makino R., Masago A., Uemura H. and Araki H. 1999. A single nucleotide insertion in the 5'-untranslated region of hepatitis C virus leads to enhanced cap-independent translation. *Virology* 261: 263-270.

Zhao W.D. and Wimmer E. 2001. Genetic analysis of a poliovirus/hepatitis C virus chimera: new structure for domain II of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 75: 3719-3730.

Zignego A.L. and Brechot C. 1999. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. *J Hepatol* 31: 369-376.