



UNIVERSITAT
 & D
 VALÈNCIA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
 REGISTRE GENERAL
 ENTRADA

30 MAYO 2003

N.º 67424
 HORA 12.25'
 OFICINA AUXILIAR NÚM. 14

Facultat de Ciències Biològiques
 Departament de Genètica
 Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva

TESIS DOCTORAL:

Análisis de las restricciones evolutivas durante la evolución
 experimental del virus de la estomatitis vesicular (VSV)



Presentada por:

José Manuel Cuevas Torrijos

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
 BIBLIOTECA CIÈNCIES

Nº Registre 21842
 DATA 7-XI-03
 SIGNATURA
 TD-B 00707
 Nº LIBIS: 1385382

30cm.

DIRECTORES:

Dr. Andrés Moya Simarro
 Catedrático de la U.V.E.G.

Dr. Santiago F. Elena Fito
 Investigador del C.S.I.C.

TD-B
 00707



50001385382
 Biblioteca de Ciències

R. 21842

UMI Number: U607702

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607702

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

D. ANDRÉS MOYA SIMARRO, Doctor en Ciencias Biológicas y Filosofía de la Ciencia, Catedrático de Genética de la Universitat de València, Estudi General, y SANTIAGO F. ELENA FITO, Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (I.B.M.C.P.-C.S.I.C.),

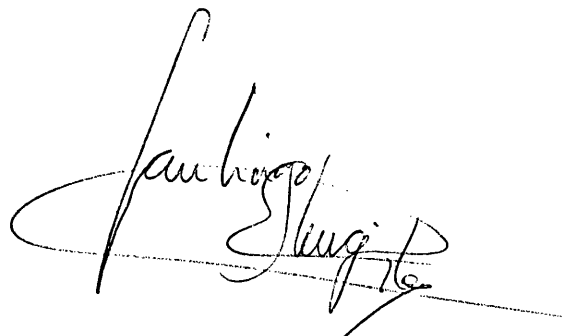
certifican:

Que D^o JOSÉ MANUEL CUEVAS TORRIJOS ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título "*Análisis de las restricciones evolutivas durante la evolución experimental del virus de la estomatitis vesicular (VSV)*", presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Burjassot a 26 de Mayo de 2003.



DR. ANDRÉS MOYA SIMARRO



DR. SANTIAGO F. ELENA FITO

Agradecimientos:

Cuando uno llega al final de la tesis y tiene que escribir los agradecimientos se da cuenta de que no es tan fácil como parece, sobretodo por el hecho de que durante estos últimos cuatro años y medio han pasado muchas cosas, unas buenas y otras no tanto. Hay mucha gente a la que tengo que mencionar en este apartado y espero no dejarme a nadie, aunque si es así, pido disculpas por adelantado. Si empezamos por la gente que me ha ayudado a lo largo de esta investigación en aspectos técnicos, el azar me envía a Alma, con la que aprendí a hacer mis primeras extracciones de ARN, eso sí, empleando el método tradicional (espero no tener que repetirlo nunca). A renglón seguido, me encontré con David, quien me enseñó cómo funcionaba un tal Staden, en su versión "años 20". Respecto a las numerosas secuencias que tuve que analizar, agradecer la colaboración de Amparo y Maite, a quienes asediaba continuamente con mis llamadas reclamadoras, y es que cuando hay prisa... Por otro lado, si nos adentramos en el campo de los cultivos celulares, mención de honor para Olga, sin olvidarnos de las recientes incorporaciones de Paula y Pepa, todas ellas sometidas al yugo de la preparación de medios y productos varios y cuya dedicación agradezco enormemente.

En el aspecto formal, agradecer a mis directores de tesis la oportunidad que me brindaron al confiar en mí en su momento. Espero no haberles defraudado; al menos he hecho lo que ha estado en mi mano, y si las cosas no han salido mejor ha sido debido a la providencia en algunas ocasiones, a causas naturales en otras, o a mí mismo en general, que por algo estaba al pie del cañón.

En un plano más personal, la lista es mucho más larga y aumenta el riesgo de olvidar a alguien, aunque intentaré no hacerlo. Vayamos por bloques y empecemos por el Departamento, donde a decir verdad no recibí demasiada ayuda técnica o teórica (yo no tenía la culpa de hacer cosas tan marcianas), pero sí mucho apoyo moral siempre que lo necesité. Comienzo, obviamente, por mi laboratorio adoptivo, Bioquímica, donde una vez llegaron a plantearse el cobrar me alquiler (afortunadamente les convencí para que no lo hicieran, habría quedado muy feo), con su enorme plantilla: Sara la "Justa y Solidaria", Salva el "Holandés errante", y Joel el "Cubano venido a menos" o a "Más", según se mire, además de una lista interminable (Luís, Jorge, Anna, Ana, Sales, Balta, Joan y alguno más, seguro). Y ahora el resto del Departamento, con Molecular (Juan Antonio, Josep, Isabel, Yvette *et al.*) y Desarrollo (Zaida, Silvia, Maya, Mónica y otras).

Ahora le toca el turno al Instituto y será mejor organizarlo por laboratorios. Si comenzamos por el laboratorio flotante (léase SS7), mencionar a los "Marios", y a mis "colaboratas", Rafa y Toni. Éste último pasó a mejor vida, mientras que el primero sigue con la mala vida. Por supuesto, a mi querida Rosario, quien me enseñó a tratar bien las células, aunque lo haya olvidado con cierta frecuencia (mis razones tenía). Subiendo al segundo piso, nos encontramos con el laboratorio 2.4.I., donde reinaban Beatriz, Ana y Carol, con su pléyade de colaboradores, Loreto, Laura, Vicente P., Paco, y alguno más. En el laboratorio 2.3.I, agradezco la amistad y ayuda de Marisa, Silvia, Benja y *col.* Finalmente, en el laboratorio 2.4.D. quiero mencionar a Nuria e Inma y al nuevo, Vicente S.

Aunque parezca que me voy olvidando de gente, intento tenerlos en mente e incluir a todos en los diversos apartados. Por ejemplo, respecto al laboratorio de "Virus", si es que existe, quiero mencionar a Yolima, que acaba de empezar y a Rafa, que ya está en las últimas. Además, hay mucha gente que ha aparecido transitoriamente a lo largo de la tesis, pero que también quiero mencionar, como son Paco "el francés", Sonia y Bjorg "los alemanes" o Boris "el murciano". Supongo que me he tenido que olvidar de algunos, pero os aseguro que no ha sido con mala intención, sino que mis neuronas no dan más de sí.

No tengo ningún apartado en el que pueda incluir a los que vienen ahora, así que he decidido inventármelo. Gracias a Paco, Carmen, Carlos, Sonia, Santi, Diana, Pili, Rafa, Alicia (P y S), Héctor, y a otros que no consigo recordar, por ser tan "guays y superdivers", algo que agradecer en el duro camino que hay que recorrer para conseguir llegar al final de este camino.

En otro apartado, más personal que profesional, quiero agradecer toda la ayuda que me ha proporcionado Santi, quien me animó cuando las cosas iban mal y cuando iban peor, e incluso cuando comenzaron a mejorar. Por todo ello, gracias. Bueno, para terminar sólo quiero dar las gracias a aquellas personas que me han apoyado incondicionalmente, sin importar lo bien o no tan bien que fueran las cosas, y a las que sin saber en absoluto a qué me estaba dedicando lo comprendían sin pedir explicaciones.

Por todo ello, gracias a todos.

A mi familia, a Manoli.

Índice

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. Emergencia de los virus	1
2. Clasificación y características de los virus de RNA	2
3. Evolución de la eficacia en poblaciones de virus de RNA	4
3.1. Cuasiespecies: origen y evolución del concepto	4
3.2. Paisajes adaptativos	5
3.3. El trinquete de Muller y la naturaleza estocástica de la evolución viral	6
3.4. Ganancias de eficacia: la Reina Roja y el principio de Exclusión Competitiva....	9
3.5. Umbrales de expresión fenotípica	10
3.5.1. El umbral de error	10
3.6. Naturaleza determinista de la evolución de los virus de RNA	12
3.7. Evolución viral y estrategias antivirales	13
3.8. Alternativas al concepto de cuasiespecies	13
4. Rabdovirus	17
4.1. El virus de la estomatitis vesicular (VSV)	17
4.2. Nivel estructural	18
4.3. Proceso de infección	19
OBJETIVOS	22
CAPÍTULO 1: BASES MOLECULARES DE LAS CONVERGENCIAS ADAPTATIVAS	23
1.1. Divergencia evolutiva de las poblaciones sexuales y asexuales	23
1.2. El modelo de Interferencia clonal	24
1.3. Comprobación experimental del modelo de interferencia clonal	28
1.4. Extensiones del modelo de interferencia clonal	30
* Molecular Basis of Adaptive Convergence in Experimental Populations of RNA Viruses. <i>Genetics</i> (2002), 162 : 533-542	533-542

CAPÍTULO 2: MIGRACIÓN ENTRE AMBIENTES HETEROGÉNEOS	42
2.1. Migración entre hospedadores	42
2.2. Migración entre órganos dentro de un hospedador	45
2.3. Importancia del fenómeno de migración	47
* Evolution of RNA virus in spatially structured heterogeneous environments. <i>J. Evol. Biol.</i> (2003), 16 :456-466	456-466
CAPÍTULO 3: DINÁMICAS EVOLUTIVAS EN PRESENCIA DE ANTIVIRALES	59
3.1. Antivirales sintéticos	60
3.2. Interferones	62
3.3. Terapias combinadas	63
* Mode of selection and experimental evolution of antiviral drug resistance in <i>vesicular stomatitis virus</i> (enviado a <i>Antiviral Research</i>)	65
DISCUSIÓN GENERAL	84
1. Convergencias evolutivas	84
2. Migración entre ambientes heterogéneos	86
3. Coste de la resistencia a antivirales	87
4. Restricciones evolutivas de las poblaciones virales	87
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	94

Introducción

1. Emergencia de los virus

Los virus de RNA son los parásitos moleculares más abundantes, infectando tanto a humanos como a animales y plantas (Murphy, 1996). La emergencia de nuevos patógenos virales está favorecida por la variabilidad genética de los virus de RNA y por alteraciones en el ambiente que tienen un efecto sobre la dinámica de los virus (Morse, 1994). Como resultado de esto, los virus pueden entrar en contacto con nuevos hospedadores, posibilitando de esta manera el salto de hospedador y la colonización de nuevos ambientes.

Los virus presentan ciertas capacidades intrínsecas que les permiten superar las presiones externas que tratan de limitar su replicación. En el mantenimiento de estas capacidades están implicados varios factores, como son la generación continua de mutaciones, la competición entre variantes genómicas, y la selección de aquellos variantes mejor adaptados a las condiciones particulares (Domingo *et al.*, 1978, 1985; Holland *et al.*, 1982).

La lucha contra las enfermedades virales ha de tener en cuenta las implicaciones de las altas tasas de mutación y la dinámica poblacional de los virus de RNA. De esta forma, la búsqueda de terapias se decanta hacia unos tipos de tratamiento en detrimento de otros, en concreto, se consideran más efectivas las terapias combinadas que las monoterapias (Domingo, 1989; de Jong *et al.*, 1995), como también las vacunas compuestas frente a las simples (Novella *et al.*, 1995a; Haynes, 1996).

Los virus, y en particular los virus de RNA, constituyen el modelo ideal para la comprensión de la evolución molecular, ya que presentan tres características que los hace idóneos: la complejidad limitada de los genomas, la elevada mutabilidad y la rápida tasa de replicación. La primera de estas características facilita enormemente la investigación, tanto a nivel de estudios de secuencia como en cuanto a la funcionalidad a nivel proteico. Por otro lado, las otras dos características nos permiten comprender la rápida evolución que presentan los virus en períodos de tiempo que no son asumibles a nivel de otros organismos más complejos.

2. Clasificación y características de los virus de RNA

La taxonomía viral distingue cuatro grandes grupos de virus de RNA, en función de su genoma: virus de RNA de doble hebra (RNAdh), RNA de hebra sencilla y cadena negativa (RNAhs-cn), RNA de hebra sencilla y cadena positiva (RNAhs-cp), y virus de RNA cuya replicación implica una etapa de transcripción reversa (Tabla 1). Esta clasificación está claramente definida a nivel de familias, pero con frecuencia aparecen indeterminaciones respecto a los géneros contenidos en ellas.

Tabla 1. Clasificación esquemática de los virus de RNA. En cada uno de los cuatro grandes grupos (transcripción reversa, RNAdh, RNAhs de cadena negativa y de cadena sencilla), se presenta únicamente la nomenclatura a nivel de familias, excepto en cuatro de ellas, Retroviridae, Orthomyxoviridae, Rhabdoviridae y Flaviviridae, donde también se incluye una especie representativa, junto con su correspondiente género. Se presentan dos órdenes, Mononegavirales y Nidovirales, que incluyen un conjunto de familias, acotadas por una elipse. Adaptado de Mayo y Pringle (1998).

<u>TRANSCRIPCIÓN REVERSA</u>	<u>RNAhs</u>	
	<u>CADENA NEGATIVA</u>	<u>CADENA POSITIVA</u>
<i>Retroviridae</i>		
<i>Lentivirus</i>		
<i>Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1</i>		
<i>Hepadnaviridae</i>		
<i>Caulimoviridae</i>		
<u>RNAdh</u>		
<i>Cystoviridae</i>		
<i>Totiviridae</i>		
<i>Partitiviridae</i>		
<i>Hypoviridae</i>		
<i>Birnaviridae</i>		
<i>Reoviridae</i>		
	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Leviviridae</i>
	<i>Influenzavirus</i>	<i>Togaviridae</i>
	<i>Virus de la gripe tipo A</i>	<i>Caliciviridae</i>
	<i>Arenaviridae</i>	<i>Astroviridae</i>
	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Picornaviridae</i>
		<i>Barnaviridae</i>
	<u>Mononegavirales</u>	<i>Tetraviridae</i>
	<i>Paramizoviridae</i>	<i>Nodaviridae</i>
	<i>Filoviridae</i>	<i>Sequiviridae</i>
	<i>Bornaviridae</i>	<i>Comoviridae</i>
	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>
	<i>Vesiculovirus</i>	<i>Hepacivirus</i>
	<i>Virus de la Estomatitis Vesicular</i>	<i>Virus de la Hepatitis C</i>
		<i>Potyviridae</i>
		<i>Bromoviridae</i>
		<i>Tombusviridae</i>
		<i>Closteroviridae</i>
		<u>Nidovirales</u>
		<i>Coronaviridae</i>
		<i>Arteriviridae</i>

Hasta la fecha, no se ha observado la presencia de fenómenos de recombinación en los virus de RNA no segmentados de cadena negativa (ej. Rabdovirus), a pesar de su capacidad para producir partículas defectivas (DIs) con pronunciadas deleciones genómicas (Holland, 1990). Sin embargo, en el caso de virus de RNA de cadena positiva son numerosos los casos donde se ha observado recombinación, tanto en poliovirus en un primer momento (Cooper, 1977), como también en coronavirus (Makino *et al.*, 1986) o alfavirus (Hahn *et al.*, 1988). Estudios con un poliovirus, el virus de la fiebre aftosa, así como con coronavirus, han proporcionado pruebas genéticas y bioquímicas de recombinación intramolecular (King *et al.*, 1980; Kirkegaard y Baltimore, 1986; Keck *et al.*, 1987).

El factor clave que contribuye a las elevadas tasas de mutación se encuentra en las actividades de reparación asociadas a las replicasas y transcriptasas virales, que presentan eficiencias muy bajas, si no totalmente ausentes (Steinhauer *et al.*, 1992; Friedberg *et al.*, 1995).

Los virus de RNA presentan tasas de mutación en el rango de 10^{-3} a 10^{-5} sustituciones por sitio nucleotídico y ronda de replicación, lo que para un genoma de 10 kb supondría la presencia de de 0.1 a 10 mutaciones en promedio en cada molécula de la progenie (Wain-Hobson, 1996; Drake y Holland, 1999). La adaptación de los virus a las condiciones cambiantes del ambiente se puede llevar a cabo mediante dos estrategias fundamentales, bien de forma discreta, como es el caso de la respuesta a ciertos anticuerpos (VandePol *et al.*, 1986; Borrego *et al.*, 1993), bien por la acumulación de una serie de mutaciones o de recombinaciones, que pueden requerir un tiempo evolutivo mayor. Además, en algunos casos, el proceso de adaptación requiere la asociación de un conjunto particular de mutaciones, de tal forma que el proceso de adaptación variará en función del orden de aparición de esas mutaciones (Pilipenko *et al.*, 1992; Wimmer *et al.*, 1993). Muchos virus emergentes pertenecen a grupos en los que se presentan fenómenos de recombinación. No obstante, en el caso de otros virus enormemente variables la aparente ausencia de estos fenómenos de recombinación parece dejar claro la necesidad de otros mecanismos promotores de variabilidad. Este es el caso de los Rabdovirus y, en particular, el virus de la

estomatitis vesicular (VSV), cuya evolución a corto y largo plazo no depende de la acción de la recombinación.

3. Evolución de la eficacia en poblaciones de virus de RNA

3.1. Cuasiespecies: origen y evolución del concepto

El término de cuasiespecies es introducido por Eigen y Schuster (1977, 1978) en un intento por comprender la evolución de replicones en un mundo pre-celular. No obstante, serían Domingo *et al.* (1976) los primeros en aplicar este concepto a la virología. Las cuasiespecies constituyen un estado estacionario donde se presenta una distribución de copias que difieren de la secuencia maestra. Se puede hablar de un espectro de mutantes, en el cual la complejidad aumenta cuanto menor es la fidelidad del proceso de replicación (Eigen y Schuster, 1977; Eigen y Biebricher, 1988). En esta situación, nos encontramos con una secuencia maestra de mayor eficacia, pero que no tiene necesariamente que coincidir con la secuencia consenso de la distribución de variantes. En conclusión, los distintos mutantes que componen la población viral no son considerados como unidad de selección, sino que sería la población en su conjunto la que se vería regida globalmente por las fuerzas de la selección (Eigen, 1971, 1996).

La aplicación de este concepto a casos reales tiene ciertas dificultades. El estado de equilibrio en la distribución de genomas es difícil de asumir en infecciones reales, donde son frecuentes las situaciones ambientales cambiantes, así como la variación en los tamaños poblacionales virales. A pesar de estas limitaciones, la aplicación del término de cuasiespecies ha sido de gran utilidad como herramienta para entender el ciclo de vida de los virus de RNA, en el cual tienen lugar de forma continuada los procesos de generación de mutantes, competición entre las distintas variantes y selección de las más eficaces. En este sentido, diversos trabajos han analizado la relación entre el concepto teórico de cuasiespecies y su aplicación real (Holland *et al.*, 1992; Duarte *et al.*, 1994; Domingo *et al.*, 1995).

La evolución de las cuasiespecies virales es extremadamente dependiente del tamaño poblacional del virus implicado en las infecciones.

Cuellos de botella repetidos llevan a pérdidas de eficacia en promedio, debido a la acumulación de mutaciones deletéreas. Por el contrario, infecciones masivas conllevan rápidas ganancias de eficacia, mucho mayores que aquellas observadas en organismos celulares, consecuencia de la fijación de mutaciones ventajosas (figura 1). Estos dos fenómenos se tratarán ampliamente en los siguientes apartados.

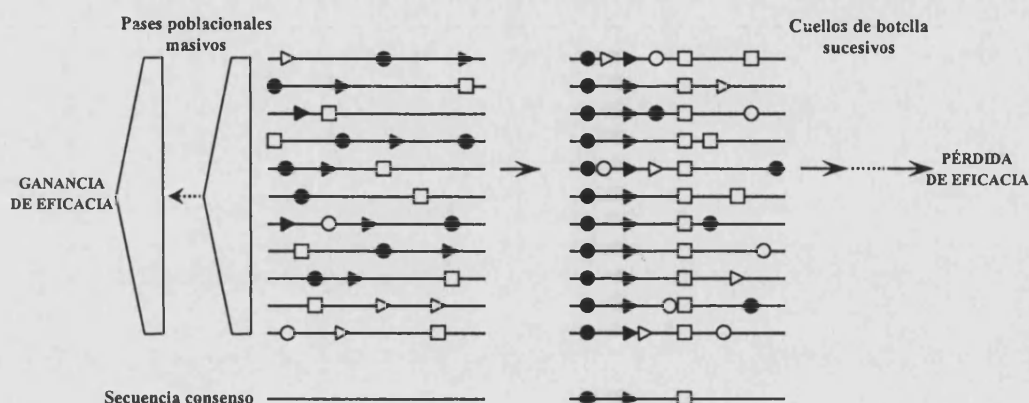


Figura 1. Representación esquemática del efecto del tamaño poblacional sobre la eficacia replicativa de las poblaciones virales (Modificada de Domingo *et al.*, 1999).

3.2. Paisajes adaptativos

La aplicación del concepto clásico de paisaje de eficacia descrito por Wright (1931) sobre las poblaciones de virus, puede hacerse considerando el movimiento de los genomas virales en un paisaje adaptativo de picos, valles y laderas (figura 2). En esta situación, los movimientos a lo largo del espacio de secuencia se producen como consecuencia de la generación de mutaciones y son regidos por la acción de la selección. Si estimamos el espacio de secuencia como todas las posibles permutaciones de secuencia en una molécula dada (Eigen, 1992; Kauffman, 1993), el valor teórico del espacio de secuencia sería desorbitado ($4^{10.000}$, para un genoma viral de 10 Kb). Sin embargo, a pesar de la existencia de una cierta continuidad en el espacio de secuencia (Eigen, 1992), únicamente una pequeña fracción de los cambios posibles está presente en las poblaciones virales.

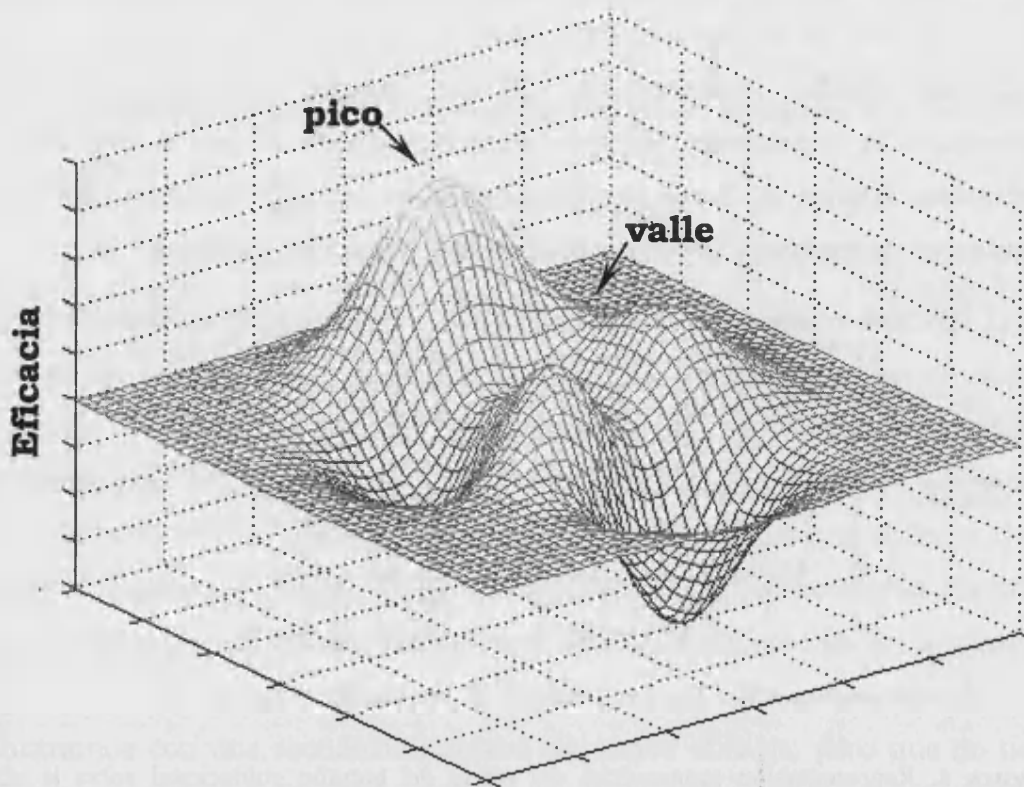


Figura 2. Paisaje adaptativo, donde se representa un relieve típico de picos y valles en base a la eficacia.

De cualquier manera, los virus de RNA presentan una gran capacidad para ascender los picos adaptativos, gracias a las altas tasas de mutación, los ciclos rápidos de replicación y los enormes tamaños poblacionales. La flexibilidad genética y fenotípica de una población viral depende del espectro de mutantes que presenta, siendo mayor cuanto mayor es el tamaño poblacional.

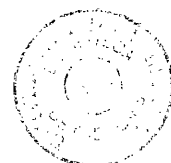
3.3. El trinquete de Muller y la naturaleza estocástica de la evolución viral.

Diversos trabajos muestran que repetidas transferencias de partículas individuales (cuellos de botella genéticos) provocan en las correspondientes poblaciones virales una pérdida de eficacia frente a las poblaciones parentales (Chao, 1990; Duarte *et al.*, 1992; Clarke *et al.*, 1993; Escarmís *et al.*, 1996). Las poblaciones virales, que son enormemente heterogéneas, sufren como consecuencia de los cuellos de botella una desviación respecto a su secuencia consenso de partida (figura 1). La acumulación progresiva de mutaciones

deletéreas, sin la presencia de mecanismos compensatorios (sexo o recombinación), fue propuesta por Muller en 1964, quien acuñó el término de “trinquete”. Las transferencias seriadas de partículas únicas limitan la capacidad de optimización de las poblaciones y, en consecuencia, provocan un aumento de los efectos deletéreos del trinquete de Muller.

Los cuellos de botella genéticos desempeñan un papel relevante en la diversificación genética de los organismos y en la colonización de nuevos nichos ecológicos. Los cuellos de botella son responsables de los efectos fundadores, es decir, de la aparición de un sesgo respecto a las diferencias genéticas entre poblaciones que derivan de una población original. Los efectos fundadores pueden ser de gran importancia en la evolución de las especies (Muller, 1964; Nei *et al.*, 1975).

La actuación de la deriva genética en los procesos de transmisión en cuellos de botella da lugar a la pérdida de polimorfismo (Burton y Feldman, 1981; Nei y Graur, 1984; O'Brien *et al.*, 1985) y a la fijación de alelos independientemente de su valor selectivo (Nei, 1987). Los cuellos de botella, cuando actúan en conjunción con un aislamiento geográfico, pueden promover los procesos de especiación (Powell, 1978, Galiana *et al.*, 1993). Novella *et al.* (1995b) y Elena *et al.* (2001), observaron que el tamaño de transmisión puede modular la eficacia replicativa de los virus y en consecuencia, su patogenicidad. En este sentido, en la evolución de los virus no sólo hay que considerar la transmisión entre hospedadores, sino que también tiene especial relevancia la transmisión dentro de cada hospedador, como se ha demostrado en diversos estudios con el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) (Cheynier *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995). Bergstrom *et al.* (1999) muestran que cuanto más pronunciado es el efecto de los cuellos de botella, mayor es la pérdida de la virulencia, siendo esta caída más acentuada en los modelos de transmisión vertical que en los de transmisión horizontal. Los cuellos de botella poblacionales pueden ser importantes en la patogénesis del virus HIV-1, porque algunas diferencias en la capacidad de replicación del virus en mutantes resistentes a drogas pueden causar una variación sustancial en la transmisión y la persistencia (Ibáñez *et al.*, 2000).



Duarte *et al.* (1993), trabajando con VSV, muestran que algunas de las pérdidas de eficacia ocurridas como consecuencia de repetidos cuellos de botella no pueden revertir, a pesar de llevar a cabo sucesivas amplificaciones masivas de las poblaciones virales. Por su parte, Escarmís *et al.* (1996), en un trabajo llevado a cabo con el virus de la fiebre aftosa (FMDV) donde se establece un modo de transferencia partícula simple-partícula simple, observan que las pérdidas de eficacia están asociadas a la aparición de mutaciones inusuales, nunca detectadas en poblaciones naturales. De aquí se deduce que los cuellos de botella pueden permitir la persistencia de mutaciones que en condiciones naturales son eliminadas por la selección. A pesar de esto, se ha observado que poblaciones muy debilitadas por la acción de repetidos cuellos de botella, pueden recuperar eficacia rápidamente después de un cierto número de transferencias masivas (Novella *et al.*, 1995b; Escarmís *et al.*, 1999).

Un estudio reciente de Escarmís *et al.* (2002) describe la resistencia a la extinción que presentan diversas poblaciones del virus de la fiebre aftosa (FMDV) sometidas a repetidos cuellos de botella. La secuenciación completa del genoma de estos virus de baja eficacia muestra una agrupación de mutaciones en unas regiones concretas del genoma, como posible estrategia para evitar su extinción, aunque las bases moleculares permanecen aún desconocidas. Estas observaciones se contraponen a la extinción sistemática de poblaciones de alta eficacia sometidas a la combinación de agentes mutagénicos e inhibidores antivirales (Pariente *et al.*, 2001). En condiciones de mutagénesis inducida, se produciría un incremento de la tasa de mutación, rebasándose el umbral de error, y perdiéndose con ello la capacidad de infección de forma irreversible (Swetina y Schuster, 1982; Sierra *et al.*, 2000; Pariente *et al.*, 2001).

En conclusión, la manipulación de los tamaños poblacionales condiciona enormemente los valores de eficacia de las poblaciones virales. En la naturaleza, pueden ocurrir fenómenos de cuellos de botella, como es el caso del ciclo de vida de los arbovirus (Novella *et al.*, 1995b), donde se producen transmisiones cíclicas entre mamíferos y hospedadores artrópodos.

3.4. Ganancias de eficacia: la Reina Roja y el principio de Exclusión Competitiva.

Las poblaciones virales, sometidas a ambientes constantes, tienden a ganar eficacia por medio de un proceso de optimización competitiva. Las fluctuaciones ambientales provocan, no obstante, conflictos en los procesos de adaptación.

Diversos autores (Clarke *et al.*, 1994; Quer *et al.*, 1996) han llevado a cabo ensayos de competencia entre dos clones con la misma eficacia relativa de partida, observando dos tipos de fenómenos que concuerdan con dos teorías fundamentales de la biología de poblaciones clásica: una fase de ganancia absoluta de eficacia en ambas poblaciones (la Reina Roja, van Valen, 1973) seguida por una fase donde tiene lugar una exclusión competitiva (Gause, 1964) (figura 3a). La situación de partida consta de poblaciones clonales del virus VSV de aproximadamente la misma eficacia. Existe, por tanto, una cierta simetría en eficacia entre las poblaciones, y que se mantiene a lo largo del proceso de selección a medida que ambas poblaciones se dirigen hacia valores superiores de eficacia (figura 3b). Esta fase puede entenderse como una carrera hacia un punto crítico. Las fluctuaciones deberían provocar la ruptura de la simetría de este proceso de competición, pero esto es evitado por el cambio constante que se produce en la eficacia. Asumiendo un paisaje adaptativo suave, ambas poblaciones van a evolucionar de forma similar durante un período de tiempo, hasta que llegado un momento bien se alcanza un máximo de eficacia, bien aparece un salto en la eficacia. Una vez ocurre esto, se rompe la simetría establecida, produciéndose un desplazamiento por parte de una de las poblaciones a su oponente.

Estas observaciones experimentales son objeto de estudio en un modelo teórico desarrollado por Solé *et al.* (1999). Estos autores observan que efectivamente los procesos de competición con el diseño anteriormente expuesto presentan una dinámica determinista con dos fases claramente separadas en el tiempo, a pesar de la generación de mutaciones de manera continua y aleatoria.

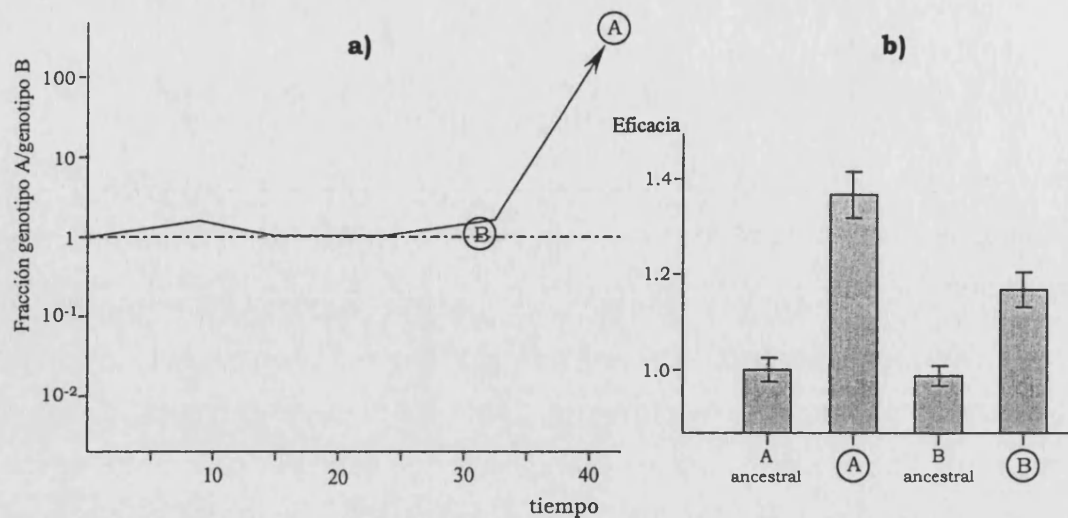


Figura 3 a) Representación de la proporción relativa de los linajes A y B durante un proceso prolongado de competencia. En un momento dado, A desplaza a B, fijándose de esta forma en la población. **b)** Comparación entre las eficacias de los linajes ancestrales y evolucionados. Se observa que tanto el linaje ganador (A) como el perdedor (B) han aumentado su eficacia (Clarke *et al.*, 1994).

3.5. Umbrales de expresión fenotípica.

La patogénesis viral está condicionada por los umbrales poblacionales críticos. Existe una capacidad tamponante por parte del conjunto de mutantes respecto a la expresión fenotípica, de tal manera que el destino de cada uno de las variantes virales depende del espectro de mutantes que constituyen la población (Eigen y Biebricher, 1988). Un clon de VSV de alta eficacia se convierte en dominante sólo si está presente por encima de una proporción crítica en la población parental (de la Torre y Holland, 1990). De la misma forma, las vacunas atenuadas de poliovirus pueden incluir variantes virulentas si éstas se encuentran por debajo de un umbral crítico, ya que en esas condiciones no son capaces de inducir la enfermedad neurológica en monos (Chumakov *et al.*, 1991).

3.5.1. El umbral de error

Un concepto importante en el mundo de los virus es el llamado “umbral de error”, que se puede entender en base a que la maquinaria replicativa presenta una fidelidad crítica, por debajo de la cual no es posible el

mantenimiento de la información genética, perdiéndose ésta de forma irreversible (Eigen, 1971; Eigen y Biebricher, 1988). El valor del umbral de error depende tanto de la complejidad genómica como del grado de superioridad que presenta la secuencia maestra frente al espectro de mutantes de la población.

Los virus de RNA parecen replicar con una fidelidad muy cercana al umbral de error. Estudios con genomas de VSV o poliovirus han mostrado que la acción de agentes mutagénicos, que actúan bien sobre las células o bien sobre las propias partículas virales, son capaces de incrementar únicamente de dos a tres veces la frecuencia de mutación en unos loci definidos (Holland *et al.*, 1990). Sin embargo, Pathak y Temim (1992), empleando un vector retroviral en presencia de 5-azacitidina, muestran un incremento de la tasa de mutación de hasta 13 veces. Estas diferencias pueden explicarse asumiendo una tasa de mutación menor para los retrovirus o bien una diferencia en la complejidad genómica.

A pesar de la enorme variabilidad potencial de los virus de RNA, hay que señalar que existen constricciones que limitan esta capacidad. En diversos estudios, se ha apreciado la abundancia relativa de ciertos tipos de sustituciones nucleotídicas o aminoacídicas en detrimento de muchas otras (Belsham y Sonenberg, 1996). La complejidad de las funciones virales y su interacción con las funciones celulares serían las responsables de las limitaciones que afectan a los virus. Además, se ha observado incluso limitaciones *a priori* no esperadas respecto a sustituciones sinónimas, consecuencia de la actuación de constricciones estructurales a nivel del RNA (Díez *et al.*, 1990; Escarmís *et al.*, 1996). En definitiva, los virus de RNA presentan limitaciones importantes por motivos tanto estructurales como funcionales, si bien no por ello constituyen, con diferencia, el conjunto de organismos conocidos con mayor variabilidad.

Asumiendo las limitaciones arriba mencionadas, los virus han de ser capaces de tolerar las variaciones del entorno para conseguir su adaptación y por tanto, su supervivencia. Una estrategia puede consistir en llevar a cabo los procesos de adaptación mediante un número relativamente pequeño de cambios. Este hecho fue observado por Fujita *et al.* (1996), quienes pusieron de manifiesto que la adaptación de un bromovirus (*cowpea chlorotic mottled*

virus) a un nuevo hospedador era consecuencia de la sustitución de un único codón. Por tanto, a pesar de la potencial plasticidad mostrada por los virus de RNA, el uso de esta capacidad dependería no sólo de las condiciones intrínsecas del virus, sino también de la situación ambiental que le rodea.

3.6. Naturaleza determinista de la evolución de los virus de RNA

Las poblaciones virales presentan una distribución estacionaria, que teóricamente puede abarcar todos los posibles mutantes en una población infinita. Sin embargo, el comportamiento de las poblaciones virales es a menudo impredecible. Se ha observado que poblaciones del virus FMDV sometidas a un ambiente celular constante pueden desplazarse a picos de alta eficacia o a valles de baja eficacia siguiendo distintos caminos (Escarmís *et al.*, 1996, 1999). La contribución que los organismos hospedadores realizan al carácter impredecible de los virus se fundamenta en una amplia variedad de constricciones selectivas, no sólo a nivel de la respuesta inmune, sino también por la variedad de tipos celulares, de órganos con distintas interacciones entre células y por fluctuaciones en los microambientes donde tiene lugar la replicación (temperatura, pH, etc.). Ejemplo de esta situación es la persistencia que el virus de la hepatitis C muestra en humanos, donde sigue distintas rutas moleculares como reflejo probablemente del ajuste a los distintos ambientes (Manzin *et al.*, 1998).

No obstante, en algunos casos la evolución viral muestra un comportamiento altamente reproducible. Quer *et al.* (1996) observan un comportamiento predecible, no lineal, durante un proceso de competición prolongada de dos clones de VSV en un cultivo celular. Un resultado similar obtienen Escarmís *et al.* (1998), durante un proceso de selección de variantes del virus FMDV frente a la resistencia celular a la infección. En este estudio se observa que, en cinco linajes independientes, los virus seleccionados muestran dos sustituciones aminoacídicas comunes a lo largo de todo el genoma y no otras. Cabe esperar que sean limitaciones estructurales y funcionales las que condicionen la aparición de convergencias evolutivas.

En conclusión, la adaptación de los virus a un ambiente dado depende no sólo de su propia naturaleza, sino también de una gran cantidad de parámetros ambientales interconectados, que en conjunto dan lugar a procesos de adaptación a través de una o varias rutas moleculares.

3.7. Evolución viral y estrategias antivirales

La gran capacidad de adaptación de los virus de RNA supone un desafío en el diseño de estrategias para combatir su proliferación. Diversas metodologías empleadas se han mostrado no completamente eficaces, debido a la aparición de variantes capaces de superar esas restricciones (Domingo, 1989; Holland *et al.*, 1992; Duarte *et al.*, 1994; Novella *et al.*, 1995a; Haynes, 1996). La generación continua de mutantes en las poblaciones virales permite que el fenómeno de aparición de resistencias tenga lugar en períodos muy cortos. La utilización de vacunas se ha demostrado eficaz en algunos casos, aunque a largo plazo no puede evitar la aparición de resistencias. Una estrategia potencial que no presentaría estos inconvenientes estaría basada en la llamada catástrofe de error. El hecho de que los virus presenten una fidelidad de replicación con valores próximos al umbral de error (Holland *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1997), podría ser aprovechado para, mediante la inducción externa de mutaciones en los genomas virales, inducir la pérdida de la integridad genética (Domingo *et al.*, 1992). En consecuencia, este procedimiento constituiría una potente arma en la lucha contra las enfermedades virales (Eigen y Biebricher, 1988; Eigen *et al.*, 1988). Diversos estudios han mostrado que el empleo de esta estrategia constituye una alternativa plausible al empleo de vacunas y otros tipos de terapias (Bebenek *et al.*, 1995; Martín-Hernández *et al.*, 1996; Pandey *et al.*, 1996).

3.8. Alternativas al concepto de cuasiespecies

Una diferencia fundamental entre los virus de RNA y los organismos celulares estriba en el espacio de secuencia que son capaces de explorar y ocupar como resultado de los errores de la replicación. Otra característica distintiva de los virus de RNA, comparados con los organismos celulares, es el enorme tamaño poblacional que presentan en relación a su complejidad genética. En muchas poblaciones virales están potencialmente presentes una gran cantidad

de mutantes (Domingo y Holland, 1988; Eigen y Biebricher, 1988; Temim, 1993). Sin embargo, en cualquier generación de un organismo celular sólo una diminuta fracción de todos los posibles mutantes puede presentarse. Esta diferencia podría explicar la gran capacidad de adaptación de los virus de RNA, y respaldaría en cierta manera el concepto de cuasiespecies como descriptor de los virus de RNA.

El concepto de cuasiespecies ha constituido la base sobre la cual se ha sustentado la investigación de las dinámicas virales en el campo de la virología moderna. Sin embargo, también se han levantado voces proponiendo explicaciones alternativas al particular comportamiento que exhiben los virus de RNA.

En un trabajo reciente, Holmes y Moya (2002) discuten la posibilidad de aplicar un punto de vista estrictamente genético poblacional al estudio de las poblaciones virales y a la interpretación de los resultados obtenidos. Según estos autores, si bien es obvio que los virus se caracterizan por presentar una rápida evolución, esto no implica que estos organismos deban estar sujetos a procesos evolutivos diferentes a los del resto de seres vivos. La evidencia fundamental a favor de las cuasiespecies es la alta variabilidad de los virus de RNA, pero esto no tiene porqué ser definitivo, sino que esta enorme variabilidad puede también interpretarse a partir de un modelo en el cual la mutación y la selección actuarían exclusivamente sobre los genomas virales a nivel individual.

La estabilidad de las secuencias consenso es *a priori* un argumento a favor de las cuasiespecies. En esta situación, los paisajes adaptativos con picos de alta eficacia y valles de eficacia baja describen el comportamiento de las poblaciones virales, donde el genoma de mayor eficacia (la secuencia maestra) no sufre cambios a pesar de las altas tasas de mutación. La población viral constituye en este contexto una estructura cooperativa donde las partículas individuales no tienen la capacidad de mantener los cambios que sufren continuamente (Domingo *et al.*, 1978; Steinhauer *et al.*, 1989). Es en este punto donde Jenkins *et al.* (2001) introducen la relevancia que puede tener la neutralidad en la evolución viral. La presencia de cambios neutrales (sinónimos y no sinónimos) implica que el número de secuencias próximas al máximo de

eficacia puede exceder el tamaño poblacional del propio virus, con lo que la población viral sería incapaz de ocupar todo el espacio de secuencia en torno a la secuencia maestra, entrando en juego la deriva genética. La secuencia consenso, a pesar de la actuación de la deriva, podría mantener su estabilidad por el efecto que la selección estabilizadora ejercería sobre esta secuencia de eficacia superior. Por tanto, el mantenimiento de la secuencia consenso no representaría en absoluto una prueba tajante de la existencia de las cuasiespecies.

Hasta la fecha, hay muy pocos estudios acerca del número real de sitios neutrales que se pueden presentar en los genomas virales. Jenkins *et al.* (2001) han observado un número relativamente elevado de sitios neutrales, y por ende la actuación de la deriva, poniendo en tela de juicio la concepción de cuasiespecies. No obstante, numerosos trabajos han señalado también las diversas constricciones que limitan la variabilidad de los virus de RNA, tanto a nivel funcional como estructural (Díez *et al.*, 1990; Belsham y Sonenberg, 1996; Escarmís *et al.*, 1996).

Estudios recientes han encontrado pruebas que apoyan la teoría de las cuasiespecies. Burch y Chao (2000), en un intento por confirmar una predicción teórica previa (Schuster y Swetina, 1988), obtienen una clara evidencia experimental a favor de las cuasiespecies. Estos autores observan que dos poblaciones del fago $\Phi 6$ procedentes de una misma población ancestral, evolucionan a distintas tasas y hacia máximos de eficacia diferentes. La distribución de mutantes difiere entre ambas poblaciones, de tal manera que una población A, que evoluciona hacia un máximo superior, contiene en su distribución numerosas mutaciones ventajosas, mientras que la población B, que evoluciona hacia un máximo más bajo, se caracteriza por presentar únicamente mutaciones deletéreas en su distribución. Estos autores postulan la existencia de un valle de eficacia que separa las poblaciones A y B; esto explica las diferencias en la capacidad para evolucionar, consecuencia de su proximidad a los distintos picos de magnitudes diferentes. En conclusión, la evolución parece estar limitada por otro factor, la robustez mutacional, además de la capacidad para generar variación genética.

Otra prueba que apoya el concepto de cuasiespecies es la obtenida por Wilke *et al.* (2001). Estos autores emplean organismos digitales para explorar la situación real en un sistema biológico distinto. La teoría de las cuasiespecies predice que bajo unas condiciones apropiadas (alta presión mutacional), una mutación que confiere una tasa de replicación menor puede fijarse en una población, siempre que exista robustez mutacional. De este modo, un organismo con una alta tasa de replicación, que ocupa un pico elevado y estrecho en el paisaje adaptativo, puede ser desplazado por un organismo presente en un pico más bajo pero más aplanado. Wilke *et al.* (2001) demuestran que efectivamente los organismos que replican más rápidamente, bajo elevadas tasas de mutación, pueden ser desplazados por organismos que replican más lentamente, pero que disponen de un espectro mutacional más robusto. Se puede considerar, por tanto, que las altas tasas de mutación, típicas de los virus de RNA (Drake *et al.*, 1998; Drake y Holland, 1999), generan una presión selectiva que favorece la robustez (Wagner y Stadler, 1999).

Un argumento crucial a favor de las cuasiespecies es la imposición de poblaciones con bajos picos de eficacia frente a otras con picos de eficacia superiores. Si asumimos una población A bien adaptada, situada en un pico de eficacia superior al de una población B, la imposición de la población B podría ser explicada por la naturaleza de las cuasiespecies, como se ha discutido anteriormente. Sin embargo, este fenómeno podría explicarse también en base a la aparición de interacciones epistáticas. La presencia de epistasis podría provocar el salto a nuevos picos de eficacia, aunque con ciertas limitaciones. Hay un factor importante a tener en cuenta, la varianza de la frecuencia de mutación. Si este factor es lo suficientemente elevado como para promover la aparición de interacciones epistáticas, la imposición de poblaciones de baja eficacia podría ser explicada sin necesidad de recurrir al concepto de cuasiespecies.

En definitiva, estudios recientes muestran evidencias tanto a favor como en contra del concepto clásico de cuasiespecies, y tal vez sea la fusión de las distintas visiones la que nos permita obtener una teoría más globalizada. El argumento de Holmes y Moya (2002) abre una puerta hacia una nueva concepción del mundo de los virus de RNA, pero todavía son muchas las

lagunas del conocimiento y al menos a corto plazo, parece difícil discernir hacia donde se dirige la investigación en este campo.

4. Rabdovirus

Los virus de la familia Rhabdoviridae conforman el grupo de virus más ampliamente distribuido en la naturaleza. Los rabdovirus infectan a vertebrados e invertebrados, así como a muchas especies de plantas. De entre las enfermedades más importantes que provocan, destaca sobremanera la rabia, aunque también causan otras enfermedades de importancia a nivel económico, afectando a numerosas especies de vertebrados, tanto terrestres como marinos. El resto de especies de rabdovirus conocidas es transmitido a vertebrados y plantas a través de vectores artrópodos.

Los virus de la familia Rhabdoviridae capaces de infectar a mamíferos, incluyendo a humanos, se clasifican en dos géneros: el género Vesiculovirus, donde destaca el virus de la estomatitis vesicular (VSV), y el género Lyssavirus, que incluye a toda una serie de virus relacionados con el virus de la rabia.

4.1. El virus de la estomatitis vesicular (VSV)

VSV puede dividirse en dos especies antigénicamente distintas o serotipos, llamados VSV-Indiana y VSV-New Jersey, infectando tanto a insectos como a mamíferos. Este virus causa generalmente enfermedades de carácter leve en ganado y cerdos. En humanos, se han observado algunos casos, presentándose una sintomatología similar a la gripe.

La figura 4 muestra un diagrama esquemático del prototipo de los rabdovirus, el VSV, mostrando la distribución de los componentes principales. También se representa el orden génico del genoma de RNA, así como las distintas proteínas codificadas. La forma y tamaño de la partícula, 180 nm de longitud y 75 nm de anchura, es típica de todos los rabdovirus, excepto algunos viriones de plantas, que son baciliformes y casi del doble de tamaño (Jackson *et al.*, 1987).

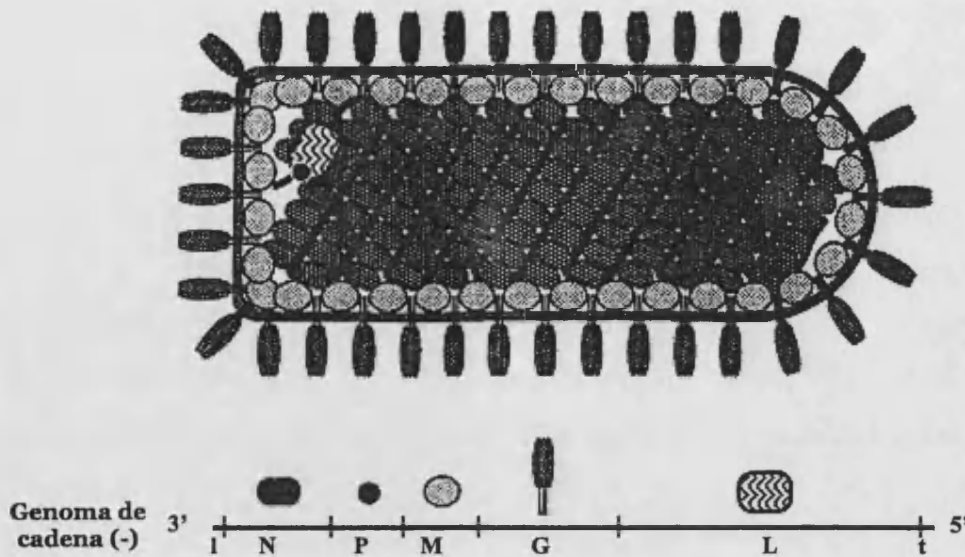


Figura 4. Representación esquemática de la morfología del virus VSV. Se muestran los dos componentes estructurales principales: la nucleocápsida (RNP), que contiene RNA de cadena sencilla recubierto por la proteína N, junto con las proteínas L y P, y la bicapa lipídica asociada con otras dos proteínas, la proteína integral glicosilada (G), que atraviesa la bicapa, y la proteína periférica de la matriz (M), que se adhiere a la superficie interna de la membrana, uniéndose a la RNP. En la parte inferior se muestra el orden génico del genoma de VSV, con distintos símbolos para cada una de las proteínas que se expresan.

4.2. Nivel estructural

Los viriones de los rabdovirus están compuestos por dos componentes principales a nivel estructural: una nucleocápsida o ribonucleoproteína (RNP) y una cubierta en forma de bicapa lipoproteica íntimamente unida a la nucleocápsida (figura 4).

El componente infeccioso del VSV y de todos los rabdovirus es el RNP. El genoma del VSV-Indiana consta de una sola cadena de RNA no segmentado que contiene 11161 nucleótidos (Rose y Schubert, 1987). El RNA genómico es de sentido negativo, por lo que requiere de su propia RNA polimerasa para llevar a cabo la transcripción del RNA mensajero de cadena positiva (Baltimore *et al.*, 1970). El genoma de RNA está íntimamente revestido por la proteína N, que consta de 422 aminoácidos (Gallione *et al.*, 1981). Asociadas a esta estructura, se encuentran las proteínas L y P. Se ha demostrado que la conjunción de las proteínas L, P y N constituyen la transcriptasa viral (Emerson *et al.*, 1975). El gen de la proteína L representa el 60% del genoma de VSV (6380 nucleótidos) mientras que el gen P (822 nucleótidos) codifica para una proteína de 222

aminoácidos.

La membrana del VSV está compuesta por lípidos y proteínas al 50% (Clark *et al.*, 1994). Los lípidos proceden de la célula, aunque se presentan en distintas proporciones a los de las membranas celulares. La membrana del VSV, así como de todos los rabdovirus, contiene dos proteínas: una orientada al exterior, la glicoproteína G, y la proteína M, que se dispone hacia el interior de la membrana del virión (Pal y Wagner, 1987). La proteína G es el principal determinante antigénico responsable del reconocimiento celular (Wagner, 1987). La proteína M parece desempeñar la función de molécula puente encargada de anclar la nucleocápsida a la membrana donde está insertada la proteína G (Chong y Rose, 1993).

4.3. Proceso de infección

La figura 5 esquematiza el ciclo de infección de los rabdovirus, donde podemos diferenciar los siguientes procesos: adsorción, penetración, desencapsidación, transcripción, traducción, procesado, replicación, ensamblaje y liberación.

La infección de los rabdovirus se inicia al producirse el anclaje del virus a un receptor fosfolipídico de la superficie celular (fosfatidilserina), gracias a la actuación de la glicoproteína G. A continuación, se produce la penetración y acto seguido tiene lugar el proceso de desencapsidación o eliminación de la envuelta. La proteína G cataliza una reacción de fusión de la membrana celular con la membrana del virión, liberándose el contenido del virus en el citoplasma y continuando de esta forma el proceso de infección (Matlin *et al.*, 1982). El genoma de RNA de los rabdovirus es de polaridad negativa, por lo que no es capaz de codificar proteínas hasta que no se ha producido su transcripción a RNA mensajeros (RNAm) por la acción de una RNA polimerasa propia del virus (Baltimore *et al.*, 1970).

La transcripción comienza produciendo un RNA líder de 48 nucleótidos, seguido por la síntesis secuencial de los RNAs mensajeros individuales que codifican para las proteínas N, P, M, G y L (figura 5).

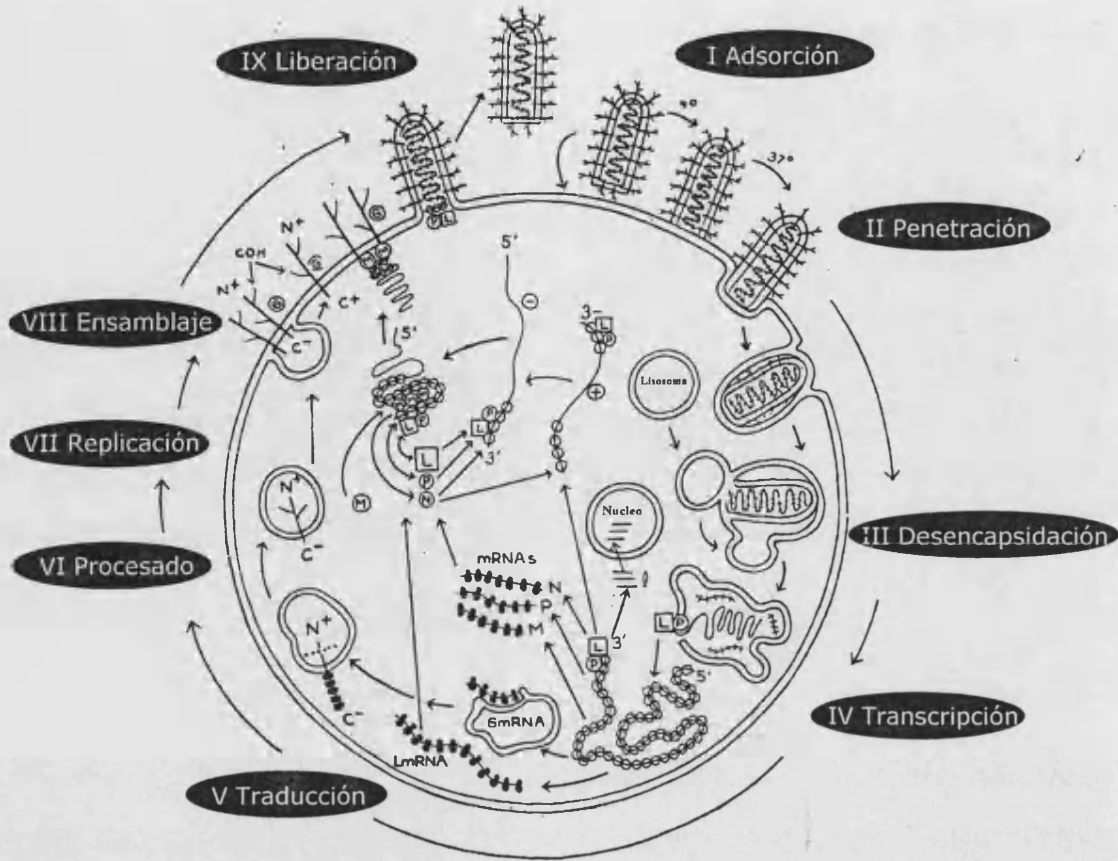


Figura 5. Ciclo de infección del VSV, donde se muestra cada una de las distintas etapas: I. Adsorción, II. Penetración, III. Desencapsidación, IV. Transcripción, V. Traducción, VI. Procesado, VII. Replicación, VIII. Ensamblaje, IX. Liberación.

Posteriormente, tiene lugar la traducción y el procesado de los productos proteicos. A diferencia de la transcripción, el proceso de replicación requiere de la actuación de las proteínas virales N y P (Wertz *et al.*, 1987; Banerjee y Barik, 1992). Estas dos proteínas, en asociación con la proteína L, constituyen el complejo encargado de llevar a cabo la replicación, donde se pueden distinguir dos sucesos que ocurren secuencialmente: en primer lugar, la síntesis de varias cadenas completas de RNA positivo complementaria al genoma parental, seguido por la producción de los RNAs completos de cadena negativa, que constituirán la progenie del virus. Finalmente, las proteínas de nueva síntesis N, P y L, se asocian en el citoplasma con los RNAs nacientes para formar las ribonucleoproteínas. La proteína M juega un doble papel, por un lado en la asociación de los componentes de la nucleocápsida en el citoplasma, y por

otro en la unión de las RNPs a la membrana como paso previo al proceso de liberación de los virus (Newcomb *et al.*, 1982). La proteína G también presenta un papel esencial en el proceso de ensamblaje, aunque no tanto en la liberación de los virus (Schnitzer *et al.*, 1979). El modelo que se baraja en la actualidad prevé la unión de las nucleocápsidas condensadas a las regiones de la membrana celular ricas en las proteínas M y G. A continuación, interacciones entre las proteínas G y M con las nucleocápsidas producen presumiblemente el recubrimiento de las partículas y la posterior liberación (Lyles *et al.*, 1992), con lo que finaliza el ciclo de infección.

En las preparaciones de laboratorio de todos los rabdovirus, particularmente donde se llevan a cabo infecciones sin dilución, es bastante habitual la aparición de las llamadas partículas truncadas o DIs (“*defective-interfering*”); estas partículas presentan la misma anchura, pero sólo del 20 al 50% de la longitud de los viriones infecciosos estándar. El hecho de que estas partículas presenten deleciones de entre el 50 y el 80% del genoma provoca que no sean infecciosas, a pesar de que constan del mismo complemento de proteínas y de lípidos (Holland, 1987). Hay dos tipos fundamentales de partículas DIs. Uno de ellos es el llamado DI 5', donde las partículas son transcripcionalmente inertes, excepto por la síntesis de un pequeño RNA de 46 nucleótidos. Estas DIs presentan deleciones desde el 50 hasta el 80% del extremo 3' del genoma y sólo tienen la capacidad de replicar si van acompañados de otra partícula viral infecciosa en el interior de la célula. El otro tipo es menos frecuente y se conoce como DI 3', presentando deleciones en torno al 50% del extremo 5'. Estas partículas pueden transcribir los mensajeros de los cuatro genes que no están incluidos en la deleción (figura 4). Ambos tipos de partículas interfieren en la replicación de los virus.

Objetivos

- ◆ Caracterización molecular de las poblaciones virales. Miralles *et al.* (1999a), llevaron a cabo la demostración experimental de la actuación del proceso de interferencia clonal en las poblaciones virales. A partir de las muestras obtenidas en este estudio, se abordó la secuenciación completa del genoma de VSV, con objeto de establecer una correlación entre los cambios acaecidos a nivel de secuencia y las eficacias obtenidas.
- ◆ Estudio del efecto del fenómeno de migración en las poblaciones virales. Para ello, se planteó un diseño experimental próximo a la situación real que se presentaría en un hospedador multicelular: se utilizó un ambiente heterogéneo, así como diversas tasas de migración que abarcaran un rango lo suficientemente amplio. Mediante esta aproximación experimental, se intenta evaluar el efecto que pueden tener los procesos de migración a nivel de hospedador, entre los distintos órganos o tejidos, como mecanismo de dispersión en las infecciones virales.
- ◆ Análisis del coste asociado a la adquisición de resistencias a antivirales. Los tratamientos con antivirales a menudo dan lugar a la aparición de variantes resistentes, que suelen pagar un coste a nivel de eficacia. Sin embargo, a medida que evolucionan las poblaciones resistentes en presencia de antivirales, el coste puede desaparecer por la aparición de cambios que incrementen la eficacia de estas poblaciones. En nuestro trabajo, se pretende analizar la aparición de ese coste. Además, también se pretende observar la aparición de procesos compensatorios.

Capítulo I:

Bases moleculares de las
convergencias adaptativas

1.1 Divergencia evolutiva de las poblaciones sexuales y asexuales

En poblaciones sexuales, las mutaciones beneficiosas que ocurren en distintos linajes pueden recombinar dentro de un único linaje. En poblaciones asexuales, sin embargo, los clones que transportan distintas mutaciones beneficiosas compiten los unos con los otros y por tanto, interfieren con el proceso esperado de progresión hacia la fijación de una mutación dada.

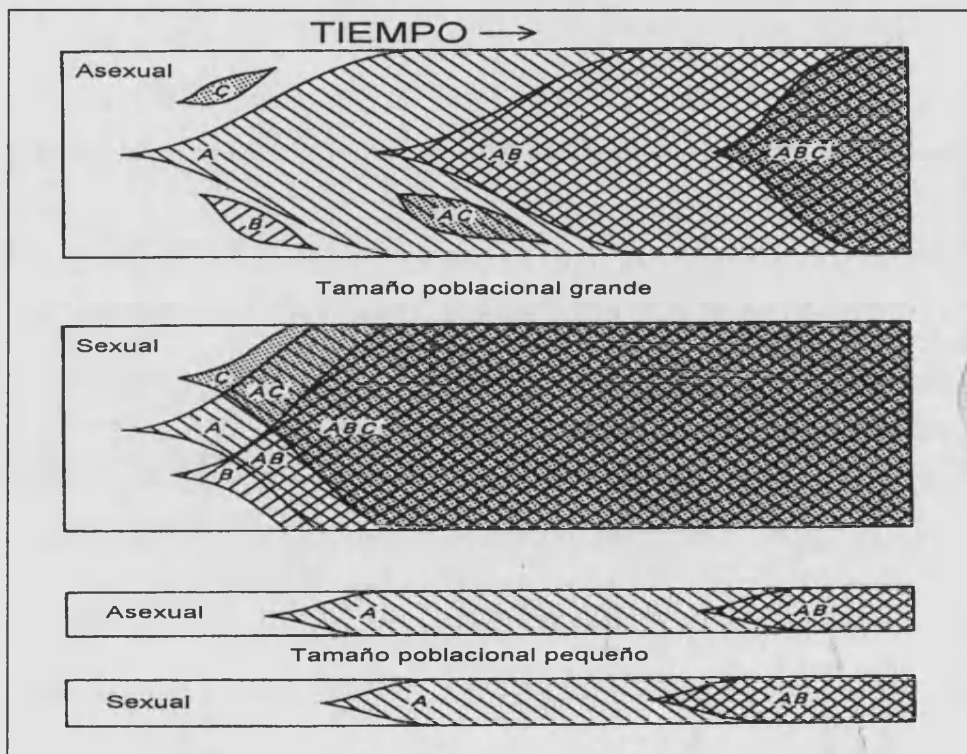


Figura 1. Representación esquemática del proceso de fijación de mutaciones en poblaciones sexuales y asexuales, tanto para pequeños como para grandes tamaños poblacionales.

La figura 1 nos permite observar las distintas dinámicas evolutivas que exhiben las reproducciones sexual y asexual: suponemos tres mutantes A, B y C, que presentan distintas ventajas selectivas en el orden $A > B > C$. Si los tres mutantes aparecen en una población asexual, únicamente A acabará fijándose, mientras que B y C se perderán. Sólo una vez que A haya aumentado su frecuencia considerablemente será probable que otro mutante, en este caso B, emerja sobre el fondo genético de A, apareciendo el mutante AB, y lo mismo

ocurrirá posteriormente con el mutante C. Por tanto, el proceso de fijación de mutaciones en una población asexual es secuencial, mientras que en una población sexual puede ser simultáneo, por efecto de la recombinación. Estas diferencias, que no son muy significativas para tamaños poblacionales pequeños, se acrecientan enormemente en el caso de tamaños poblacionales grandes, de tasas de mutación elevadas y de reducidas ventajas selectivas de las mutaciones.

2.1 El modelo de interferencia clonal

Las poblaciones asexuales se adaptan a su ambiente por la aparición y subsiguiente aumento en la frecuencia de mutaciones beneficiosas. En ausencia de recombinación, una población debe incorporar mutaciones beneficiosas de forma secuencial (Fisher, 1930; Muller, 1932, 1964; Crow & Kimura, 1965). En consecuencia, en el caso de poblaciones de gran tamaño el tiempo requerido para que una mutación beneficiosa se fije debe ser considerable; es más, las mutaciones permanecerían a baja frecuencia durante un gran período de tiempo (Lenski *et al.*, 1991). Es en este intervalo donde otra mutación beneficiosa puede aparecer en la población, y la naturaleza asexual de esta población condiciona la competencia entre ambos genotipos, de tal manera que se ralentiza el proceso de fijación de la primera mutación, llegándose incluso a su eliminación. Este proceso, conocido como “interferencia clonal” (Gerrish & Lenski, 1998), entrafña consecuencias relevantes para la evolución de las poblaciones asexuales.

Fue Muller (1932, 1964) el primero en articular la idea de que la fijación de las mutaciones beneficiosas se vería afectada por la competencia con nuevas mutaciones beneficiosas emergentes. Gerrish y Lenski (1998) resaltan este fenómeno, bajo tratamiento teórico. En las primeras generaciones, una mutación beneficiosa puede perderse como consecuencia de sucesos aleatorios de muestreo o deriva. En contraposición con estos sucesos de deriva, que aparecerían en las primeras generaciones, la pérdida debida a interferencia clonal es más probable en etapas tardías, con lo que ambos procesos pueden ser considerados de forma independiente.

Según el modelo de Gerrish y Lenski (1998), bajo la asunción de tamaños poblacionales grandes, elevadas variaciones en la tasa de mutación

beneficiosa implican poco efecto en la tasa de sustitución de la población (figura 2). Matemáticamente, se observa que la tasa de evolución adaptativa (dw/dt) se aproxima a un valor máximo a medida que aumenta el tamaño poblacional (N). En otras palabras, la evolución de las poblaciones asexuales presenta una especie de velocidad límite impuesta por la interferencia clonal.

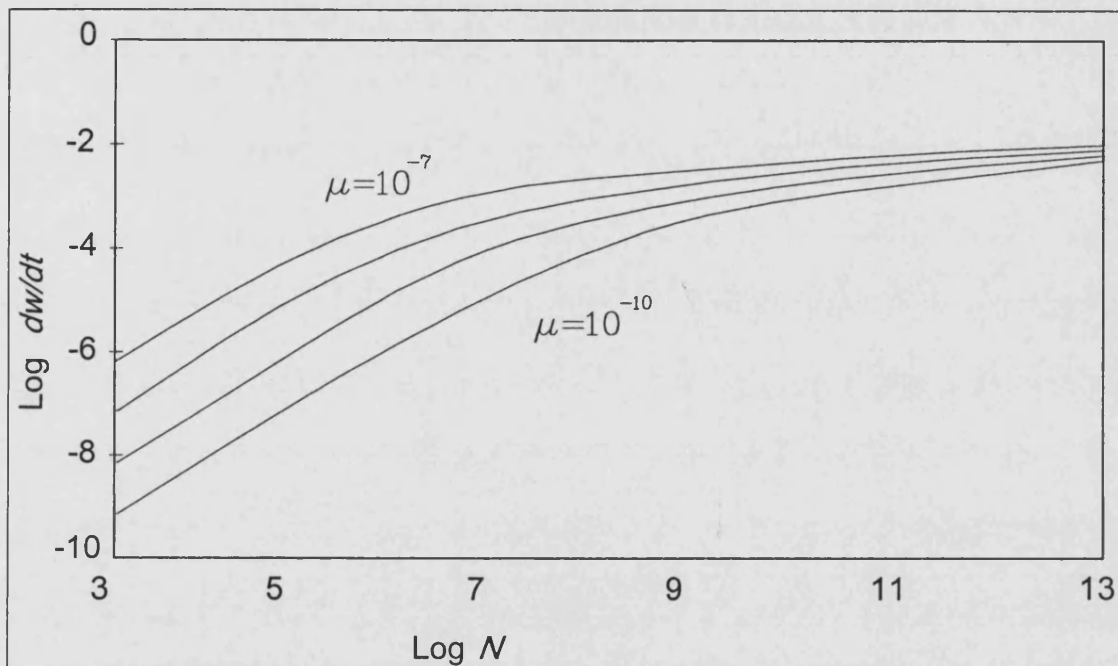


Figura 2. Representación de la tasa de evolución adaptativa (dw/dt) frente al tamaño poblacional (N), a distintos valores de tasa de mutación (μ).

La competencia entre clones que presentan distintas mutaciones beneficiosas puede desempeñar un importante papel en la dinámica evolutiva de las poblaciones asexuales. La intensidad de la interferencia clonal entre mutaciones beneficiosas se incrementa dramáticamente con el tamaño poblacional y la tasa de mutación. Como consecuencia de esto, la probabilidad de fijación de una mutación beneficiosa dada es una función decreciente del tamaño poblacional y de la tasa de mutación conjuntamente.

Las sustituciones aparecen como sucesos raros y puntuales, independientemente de la frecuencia con que aparecen mutaciones beneficiosas. En poblaciones asexuales puede ser bastante común la presencia de mutaciones beneficiosas que alcanzan de forma transitoria una frecuencia

relativamente alta, pero que no llegan a la fijación. Algunos de estos polimorfismos transitorios pueden conducir a un efecto “leapfrog”, en el que el genotipo mayoritario en un momento dado puede estar más cercano al genotipo ancestral que no al inmediatamente anterior (figura 3).

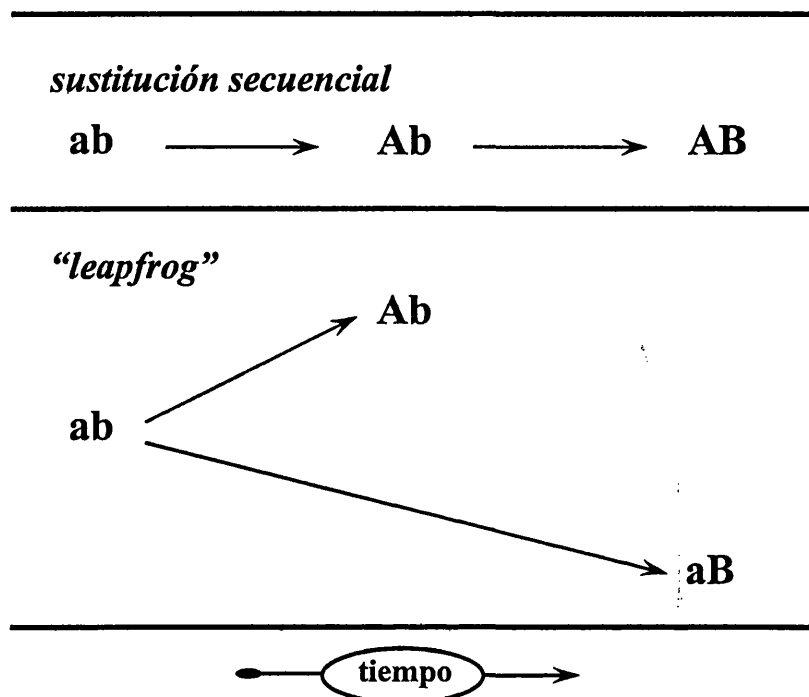


Figura 3. Representación filogenética del fenómeno “leapfrog” en comparación con un proceso de sustitución secuencial.

El modelo presentado por Gerrish y Lenski (1998) asume que los efectos mutacionales beneficiosos siguen una distribución exponencial, lo que parece una buena aproximación teniendo en cuenta que lo más razonable es la presencia de muchas mutaciones de pequeño efecto frente a un número muy reducido de gran efecto (Orr, 1998).

Este modelo asume que el progreso de una mutación beneficiosa no se ve afectado por la presencia de mutaciones beneficiosas inferiores, ya que no son capaces de excluir a la mutación de mayor efecto. Aún así, debido a que la ventaja selectiva frente a estas mutaciones será menor que frente al genotipo ancestral, cabe esperar que se prolongue el tiempo requerido para la fijación de una mutación beneficiosa dada.

Muller (1964) alude al concepto de interferencia clonal en relación a la ventaja evolutiva del sexo. Según este autor, la evolución adaptativa de las poblaciones asexuales no resulta eficaz, puesto que una importante fracción de las mutaciones beneficiosas puede perderse por efecto de la competición con mutaciones beneficiosas alternativas. Este inconveniente sería solucionado por la acción del fenómeno de recombinación, que proporciona una ventaja evolutiva al sexo. Maynard Smith (1968) critica las conclusiones obtenidas por Muller, ya que se basan en el supuesto erróneo de que las mutaciones son sucesos únicos. Para ello, Maynard Smith (1968) emplea modelos de sistemas sexuales y asexuales, en los que obtiene la misma tasa de evolución adaptativa bajo unas condiciones en las que las mutaciones son tratadas como sucesos recurrentes.

El incremento en la tasa de mutación apenas cambia la tasa de adaptación de poblaciones grandes, por efecto de la interferencia clonal (figura 2). La trayectoria de la eficacia media de una población asexual sería puntuada, con cortos períodos de rápido y elevado incremento, seguidos de largos períodos de éxtasis, independientemente del tamaño de la población o de su tasa de mutación.

Holmes *et al.* (1992) describe la evolución molecular de una población del virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV). En este trabajo se evidencia que ciertas mutaciones alcanzan transitoriamente frecuencias relativamente elevadas, seguido de procesos de disminución en su frecuencia. Además, también se observa un efecto “leapfrog” en el que el tipo mayoritario en un momento dado no procede del genotipo mayoritario inmediatamente anterior (figura 3). En consecuencia, Holmes *et al.* (1992) concluyen que los cambios en las poblaciones virales no suceden por la sustitución de una variante viral por otra, sino que dependen de la interacción entre las distintas líneas evolutivas presentes.

También es de especial importancia el considerar que la extinción de ciertas variantes no se produce únicamente por la presencia de mutaciones superiores, sino que la influencia del sistema inmune del organismo hospedador puede desempeñar un importante papel, condicionando la respuesta de los virus

a situaciones cambiantes en el ambiente. Aún así, la asexualidad puede traducirse en importantes consecuencias dinámicas sobre la patogénesis viral. Este es el caso del efecto “leapfrog”, que necesariamente incrementa la distancia genética entre los tipos mayoritarios sucesivos, facilitando de este modo la evasión del patógeno a la respuesta inmune.

La interferencia clonal no es el único factor que dificulta la fijación de mutaciones beneficiosas en poblaciones asexuales. Un efecto similar puede ser causado por el trinquete de Muller (1964), según el cual en poblaciones asexuales pequeñas existe una tendencia a la acumulación de mutaciones deletéreas. El destino de una mutación beneficiosa está determinado no sólo por su propia ventaja selectiva, sino también por la desventaja selectiva de cualquier mutación deletérea a la que esté ligada (Manning & Thompson, 1984; Peck, 1994). El proceso de fijación de una mutación beneficiosa supone la aparición de un drástico cuello de botella, ya que tiene lugar a partir de un genoma único. En conclusión, una mutación beneficiosa puede considerarse ventajosa sólo si su beneficio es capaz de compensar la drástica reducción en el tamaño poblacional efectiva causada por su fijación y la acentuación asociada del trinquete de Muller. La integración de estos modelos sobre los efectos de las mutaciones deletéreas (Manning & Thompson, 1984; Peck, 1994), junto con los tratamientos de Gerrish y Lenski (1998), puede constituir una valiosa contribución en la comprensión de la dinámica evolutiva de los sistemas asexuales.

3.1 Comprobación experimental del modelo de interferencia clonal

Las predicciones del modelo de Gerrish y Lenski han sido demostradas experimentalmente tanto en bacterias (de Visser *et al.*, 1999) como en virus de RNA (Miralles *et al.*, 1999a), habiéndose comprobado de esta forma la influencia que puede tener en la determinación de la tasa de adaptación de organismos asexuales.

Los resultados obtenidos por Miralles *et al.* (1999a) proporcionan una clara evidencia de la actuación del fenómeno de interferencia clonal en las

poblaciones virales. A partir de estos resultados, es posible la inferencia de una serie de propiedades acerca de la evolución adaptativa en los virus de RNA.

La primera conclusión que se extrae del trabajo de Miralles *et al.* (1999a) consiste en que las sustituciones adaptativas aparecen como sucesos raros y discretos, independientemente de la tasa de mutación o del tamaño poblacional. Además, estas sustituciones no son la consecuencia de una sola mutación, sino que representan el resultado final de varios procesos de competición entre mutaciones.

En segundo lugar, para poblaciones cuyo tamaño se encuentra en un rango de medio a grande, la tasa de incremento de la eficacia apenas se ve afectada por cambios en la tasa de mutación o en el tamaño poblacional. En otras palabras, cuando las tasas de mutación son ya de por sí elevadas, cambios en estas tasas suponen un efecto muy pequeño sobre la capacidad adaptativa. De este modo, una reducción de la tasa de mutación no conlleva necesariamente una pérdida de la capacidad adaptativa.

Finalmente, el trabajo de Miralles *et al.* (1999a) permite extraer como conclusión que las poblaciones residentes se protegen de las invasoras en base simplemente a su ventaja numérica. Un clon de VSV de alta eficacia que se encuentra en baja frecuencia en una población de clones de menor eficacia, puede ser desplazado por los competidores de baja eficacia (de la Torre & Holland., 1990). Por el contrario, si este clon se encuentra a una frecuencia por encima de un cierto umbral, será capaz de desplazar a los variantes de baja eficacia en la población residente (Holland *et al.*, 1991). Esta observación tiene una fácil explicación según el modelo de interferencia clonal: si un clon de alta eficacia se encuentra presente inicialmente a frecuencias muy bajas, es probable que las mutaciones beneficiosas que aparezcan en los genotipos más frecuentes mejoren su eficacia e interfieran con este clon, provocando finalmente su eliminación de la población residente. Si la frecuencia inicial del clon de alta eficacia es elevada, este clon incrementará su frecuencia en la población antes de que los variantes de baja eficacia hayan tenido la posibilidad de incorporar mutaciones beneficiosas, y por tanto como resultado final se producirá la fijación del clon de alta eficacia. La existencia de este umbral de frecuencia en la

dominancia impone un grado de incertidumbre en la evolución de las dinámicas virales.

4.1 Extensiones del modelo de interferencia clonal

Gerrish y Lenski (1998) demuestran que la interferencia clonal incrementa el tiempo medio entre los sucesos de fijación, y por tanto disminuye la tasa de sustitución adaptativa. La tasa de sustitución no aumenta a medida que lo hace la tasa de mutación, sino que tiende asintóticamente hacia un máximo. La interferencia clonal puede imponer una velocidad límite en la tasa de adaptación de poblaciones asexuales.

Orr (2000) encuentra que la tasa de adaptación no tiende a un valor máximo asintótico al aumentar la tasa de mutación, sino que aparecería un máximo transitorio (figura 4). La tasa de mutación que maximiza la tasa de adaptación depende únicamente de la fuerza de la selección contra las mutaciones deletéreas.

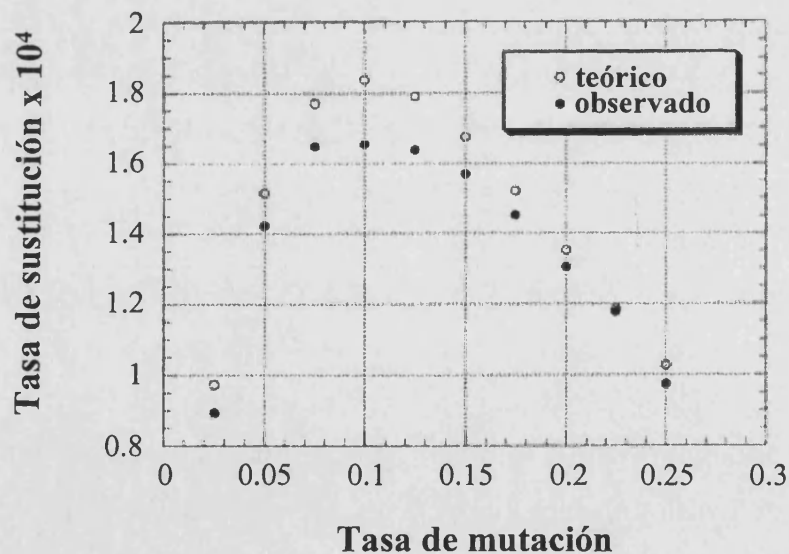


Figura 4. Representación de la tasa de sustitución frente a la tasa de mutación. Los valores teóricos son los obtenidos al emplear las ecuaciones de Orr, mientras que los observados son los procedentes de las simulaciones de ordenador.

El modelo de Orr (2000) asume que los coeficientes de selección para las mutaciones beneficiosas son más bajos que para las mutaciones deletéreas

(Hartl & Taubes, 1996; Orr, 1998). Bajo estas condiciones, la evolución adaptativa está limitada esencialmente a aquellas mutaciones favorables que aparecen en genomas libres de mutaciones deletéreas (Fischer, 1930; Peck, 1994; Barton, 1995).

La adaptación alcanza el máximo valor asumiendo un valor intermedio de la tasa de mutación. La razón para esto estriba en que la tasa de mutación se desplaza por una zona en la que se maximiza el número efectivo de mutaciones favorables, pero se mantiene aún el de deletéreas en un número bajo. Cuando la tasa de mutación está por encima del óptimo, hay demasiadas mutaciones deletéreas, por lo que se presentan muy pocos genomas libres de mutaciones. Cuando por el contrario, la tasa de mutación está por debajo del óptimo, el número de mutaciones favorables es demasiado pequeño para poder aprovechar la ventaja de los genomas libres de mutaciones, con lo que se ralentiza la adaptación. A efectos de estas aproximaciones, la tasa de mutación en poblaciones asexuales es independiente del tamaño poblacional, y se asume que se presenta un equilibrio mutación-selección.

El modelo de Orr parte de una importante simplificación: las mutaciones favorables tienen destinos independientes, es decir, se ignora la interferencia clonal (Gerrish & Lenski, 1998), la cual sí puede tener relevancia en el caso de tamaños poblacionales grandes. De cualquier manera, la inclusión del fenómeno de interferencia clonal no altera los resultados obtenidos en el trabajo de Orr, ya que este fenómeno no puede por sí mismo establecer una velocidad límite de la adaptación. Las constricciones a esta velocidad se encontrarían determinadas por las mutaciones deletéreas y no por las favorables.

Molecular Basis of Adaptive Convergence in Experimental Populations of RNA Viruses

José M. Cuevas, Santiago F. Elena and Andrés Moya¹

Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva and Departament de Genètica, Universitat de València, 46071 València, Spain

Manuscript received March 27, 2002
Accepted for publication June 24, 2002

ABSTRACT

Characterizing the molecular basis of adaptation is one of the most important goals in modern evolutionary genetics. Here, we report a full-genome sequence analysis of 21 independent populations of vesicular stomatitis ribovirus evolved on the same cell type but under different demographic regimes. Each demographic regime differed in the effective viral population size. Evolutionary convergences are widespread both at synonymous and nonsynonymous replacements as well as in an intergenic region. We also found evidence for epistasis among sites of the same and different loci. We explain convergences as the consequence of four factors: (1) environmental homogeneity that supposes an identical challenge for each population, (2) structural constraints within the genome, (3) epistatic interactions among sites that create the observed pattern of covariation, and (4) the phenomenon of clonal interference among competing genotypes carrying different beneficial mutations. Using these convergences, we have been able to estimate the fitness contribution of the identified mutations and epistatic groups. Keeping in mind statistical uncertainties, these estimates suggest that along with several beneficial mutations of major effect, many other mutations got fixed as part of a group of epistatic mutations.

ONE of the main tasks in evolutionary biology is to measure the forces operating in populations, not only by statistical inference, but by bringing together evidences from population genetics and functional biology (LEWONTIN 2000). To show which molecular changes are responsible for differences in fitness, we need an appropriate experimental setup, *i.e.*, an experimental population of sufficient size and appropriate time periods where small selection intensities can be detected. RNA viruses meet both conditions. They reach population sizes as high as 10^{10} after just a few hours of replication in fully susceptible cell cultures. Their evolution can be followed by sampling evolving populations every day or even more often if desired.

Here, we explore the molecular basis of viral adaptation to cell culture by characterizing the molecular changes that occurred during the experimental evolution of two competing populations of the ribovirus vesicular stomatitis virus (VSV; MIRALLES *et al.* 1999). In previous work, we confirmed the role played by clonal interference in the evolution of VSV (MIRALLES *et al.* 1999, 2000). Clonal interference is a phenomenon characteristic of rapidly evolving asexual populations (GERRISH and LENSKI 1998). As a consequence of high mutation rates and large population sizes, beneficial mutations arise in different co-

existing lineages. The lack of recombination precludes the possibility that two beneficial mutations combine in the same genotype and, therefore, coexisting beneficial mutations compete with each other to become fixed in the population. Consequently, only the best possible candidate will become fixed and all alternative beneficial mutations of smaller effect will be outcompeted. The larger the population size or the mutation rate, the more beneficial mutations may coexist and, thus, the more intense clonal interference will be. In our previous work, we tested two specific predictions of this model: (1) A positive correlation exists between the magnitude of the fixed beneficial effect and the population size (MIRALLES *et al.* 1999) and (2) the rate of adaptation is not linearly proportional to the availability of beneficial mutations but a diminishing-returns effect exists (MIRALLES *et al.* 1999, 2000).

Our results are interesting in two ways. First, they extend previous observations, on other viral systems, about the extent of convergent evolution under constant environmental conditions. Convergent evolution indicates the existence of constraints in RNA virus evolution. Second, we show how epistasis among nucleotide sites modulates genomic divergence of experimental viral populations. We made an attempt to assign fitness effects to each observed substitution. As a result, we have been able to identify five statistically significant beneficial changes. Four of these changes arose at the protein involved in recognition of the cellular receptor. The fifth positively selected amino acid belongs to the major component of the RNA polymerase. Despite the evidence for multiple

¹Corresponding author: Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Edifici d'Institut d'Investigació, Campus de Burjassot-Paterna, Universitat de València, Apartat 22085, 46071 València, Spain. E-mail: andres.moya@uv.es

mutations occurring on each lineage, our results are still consistent with one of the major predictions of the clonal interference model: the positive correlation between population size and the magnitude of fixed beneficial effects.

Epistasis is a key factor in evolutionary genetics. The existence and abundance of epistasis are important for many different evolutionary theories, including those seeking an explanation for the origin and maintenance of sexual reproduction (KONDRASHOV 1985), diploidy (KONDRASHOV and CROW 1991), dominance (PECK and WAXMAN 2000), reproductive isolation (COYNE 1992), segmentation of viral genomes (CHAO 1988), and even the shifting-balance process (WRIGHT 1931). Therefore, one of the most interesting questions for evolutionary biologists is how common is epistasis. However, the role of epistasis on the evolutionary dynamics of RNA viruses has been poorly explored from an experimental standpoint, despite the fact that their compacted genome seems prone to strong interactions among gene products as well as at the level of the RNA secondary structure. So far, only the extent of synergistic epistasis among deleterious mutations accumulated after consecutive bottlenecks of foot-and-mouth disease virus has been explored (ELENA 1999).

MATERIALS AND METHODS

Overview of the evolution experiments and fitness determinations: A detailed description of the experimental methods is provided in MIRALLES *et al.* (1999). In brief, we mixed, in equal proportions, two variants of VSV that differed only in the presence of a neutral marker, implying that they should coexist in a stable state until a successful beneficial mutation appeared in one of them (MIRALLES *et al.* 1999). These two clones were a surrogate wild type and an I₁ mAb-resistant mutant (MARM C). Seven different evolutionary regimes were designed, each one differing from the others in effective population size, N_e , ranging between $\sim 10^2$ and $\sim 10^8$ viral particles (see MIRALLES *et al.* 1999 for an operative definition of N_e). Each regime was independently replicated five times, for a total of 35 experimental lines. Each mixture was kept under the appropriate batch transfer conditions until one of the two variants became fixed. Our criterion for considering that one allele had fixed was to obtain, during three consecutive days, no evidence for the presence of the opposite genetic marker.

Then, the winner variant was placed in a head-to-head competition with its nonevolved counterpart to estimate the fitness effect (W) associated with the beneficial mutation that became fixed. Competition experiments are described elsewhere (HOLLAND *et al.* 1991; MIRALLES *et al.* 1999, 2000). In brief, each evolved population was mixed, in three independent test tubes, with a known amount of the ancestral strain bearing the opposite phenotypic neutral marker, and the initial ratio for each replicate mixture, R_0 , was determined by performing plaque assays with and without I₁ mAb in the agarose overlay medium. Each competition mixture was transferred serially during a sufficient number of passages to obtain good estimates of relative fitness as follows. At each transfer, the resulting virus was diluted and used to initiate the next competition passage by infection of a fresh host cell monolayer. The ratio of each genotype was determined by plating with and

without I₁ mAb in the overlay agarose medium at different transfers. These determinations gave the proportion of each competitor at time t , R_t . Selection rate constants (S , with per-day units) were estimated from the linear regression $\ln R_t = \ln R_0 + St$. MIRALLES *et al.* (1999) reported fitness as selection rate constants, whereas the values shown here (fourth column in Figure 1) are dimensionless fitness. To transform a selection rate constant into a true fitness, it is necessary to take into account the dilution factor employed at each competition day ($D = 10^4$) and how many days of competition occurred (t), and then apply the expression $W = 1 + S/\ln D^t$ (LENSKI *et al.* 1994).

Twenty-one of the evolved mixed populations were chosen for the whole-genome consensus sequencing analysis reported in this study.

RNA sequences determination: Three end-point-evolved populations from each of the seven N_e were randomly chosen for sequencing, as well as the two ancestral clones. Full-genome (11,161 bp) sequencing was done according to standard techniques (BRACHO *et al.* 1998). For each evolved population, we determined the consensus sequence of the whole population. RNA was extracted by a guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method, and it was reverse-transcribed and amplified by reverse transcription (RT)-PCR with specific primers. PCR products were directly sequenced in an ABI 310 automated sequencer following manufacturer's indications. Sequences were processed and analyzed with the STADEN software package. We used 14 pairs of primers to amplify the whole genome (available upon request). The resulting fragments were overlapping, facilitating the task of assembling fragments.

The sequencing of both ancestral clones (MARM C and wild type) confirmed that they differed only in the Asp₂₅₉ → Ala substitution in the G surface protein that confers the neutral MARM phenotype.

Minimizing the risk of contaminations: To minimize the possibility of cross-contamination among evolving populations, we took four precautions:

1. The five replicates of the evolution experiments were done in four independent, sequential in time, blocks (1, 2, 3, and 4 + 5; second column in Figure 1) by MIRALLES *et al.* (1999). Each block contained one replicate per each N_e . By doing this, we protected the experiment against among-replicates cross-contamination, since blocks were separated in time (with the exception of only replicates 4 and 5). Still, common changes are present among replicates.
2. RNA extractions were done in six independent blocks (third column in Figure 1), and each block was separated in time as well. During RNA extraction, control tubes were added. Each mock tube was subjected to exactly the same steps as the true samples. We never obtained RNA from these tubes.
3. The RT-PCR and sequencing reactions were done in random blocks, protecting the results from undesirable effects associated with specific blocks.
4. Regarding the probability of cross-contamination during the RT-PCR procedure, each time we ran a RT-PCR, we also ran control tubes containing all the reaction mixture but without the RNA template. DNA amplification was never obtained within these control tubes.

RESULTS

Ruling out the possibility of cross-contamination: Our conclusion of evolutionary convergence is extremely sensitive to contaminations. Contaminations can create identical changes in otherwise unrelated lineages and thus give the false impression of convergence. There-

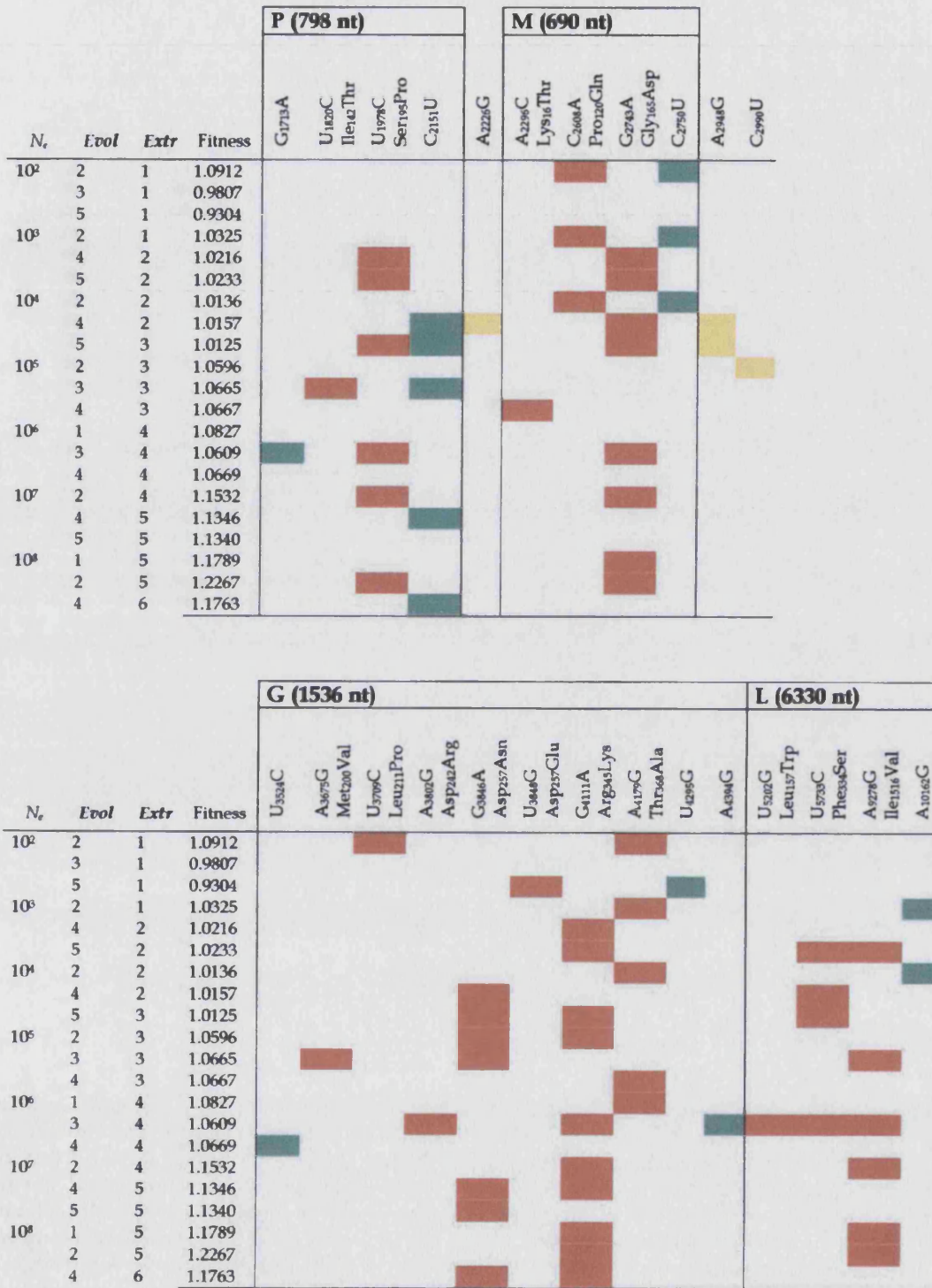


FIGURE 1.—Molecular changes characterized for independent lineages evolved under different demographic conditions (N_e). The length of each gene (bp) is indicated in parentheses, as well as the type and position (with respect to the total genome length) of the nucleotide change detected. Wherein nonsynonymous changes were detected, the amino acid replacements are also indicated (numbered within the protein). Red boxes represent nonsynonymous changes; green boxes, synonymous changes; and yellow boxes, changes in noncoding regions. *Evol* stands for the experimental block at which the corresponding population was evolved; *Extr* represents the experimental block at which RNA was purified from each population.

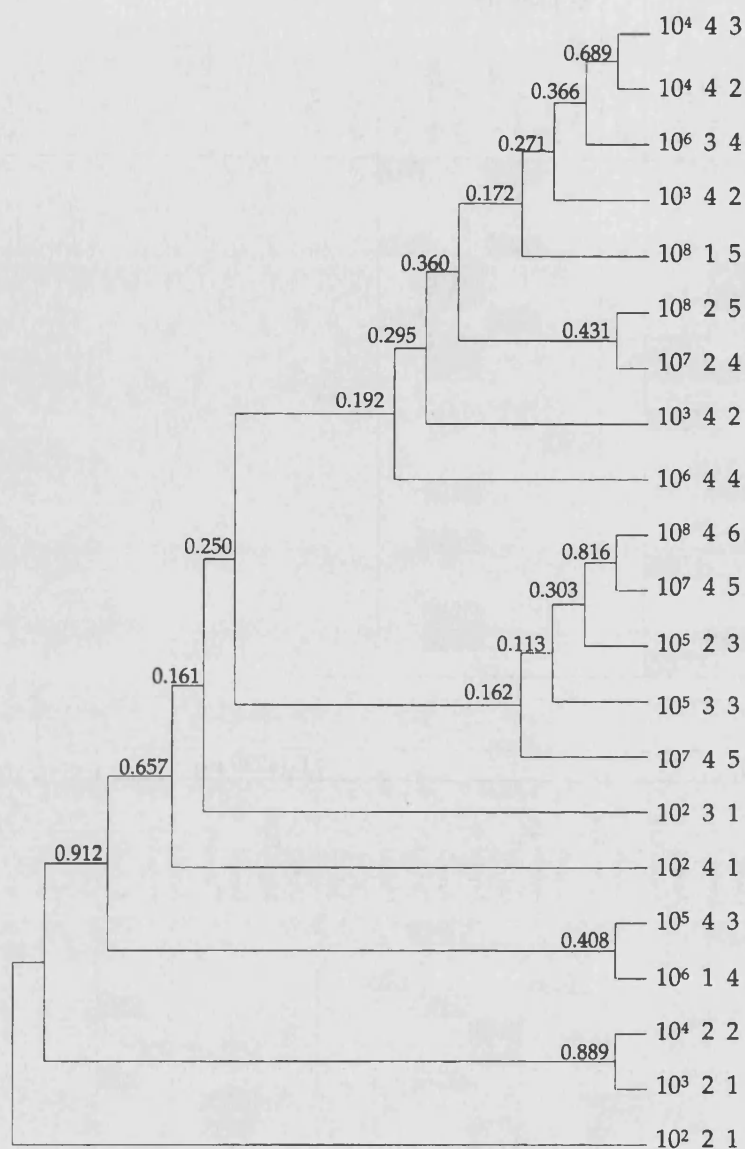


FIGURE 2.—A maximum-likelihood phylogenetic analysis of the sequences rules out the possibility of cross-contamination among populations at different stages of the experimental protocol. Numbers in nodes correspond with bootstrap *P* values. Populations are labeled as follows: The first number corresponds with the effective population size at which it was evolved, the second number with the evolution experimental block, and the third number represents the RNA purification block.

fore, previous to making any inference from our data regarding evolutionary convergences, it is compulsory to test whether our results can be explained simply by cross-contamination among populations. A possible way to test whether the observed sequences are the result of cross-contamination among populations evolved at the same time or among RNA extractions done simultaneously is to compute a phylogenetic tree from the sequences obtained for each population and compare the observed clades with those expected if contaminations occurred at the different critical stages of our experimental protocol. Figure 2 shows the estimated maximum-likelihood unrooted tree topology. This tree was obtained using DNAML program from PHYLIP v3.6 α package (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip>) and assuming Kimura's two-parameter nucleotide substitu-

tion model. Bootstrap values were obtained from a set of 1000 randomized sequences. The Akaike information criterion (AIC; AKAIKE 1974) for this tree topology is 423.04. As the tree shows, sequences do not group according to RNA extraction blocks (third column in Figure 1). Under the hypothesis of cross-contamination, during the RNA purification, among lineages treated simultaneously, we should expect a tree with six clades, each containing sequences of populations treated at the same time. The AIC for such a tree (actually, the one showing the smallest value) was 587.43, larger than the value obtained for the inferred tree. This result rules out the possibility of cross-contamination during the RNA purification. [Note that the model with minimum AIC is considered to be the most appropriate one (AKAIKE 1974).] In general, with the exception of three

pairs of identical sequences (sequences in lines 4 and 7, 16 and 20, and 17 and 21 in Figure 1), sequences do not group according to blocks of evolution (second column in Figure 1). According to the hypothesis of cross-contamination among populations evolved at the same time, we should expect a tree showing four different clades, one for each evolution block. The AIC for such a tree topology (again, the one showing the smallest value) was 571.46, larger than that observed for the inferred tree topology. [The SHIMODAIRA and HASEWAGA (1999) test generated exactly the same conclusion: None of the trees expected under both cross-contamination hypotheses was significantly better than the inferred tree.]

Most of the bootstrap *P* values shown in Figure 2 are too low for identifying significant clusters. This finding gives further support to the view of an independent evolutionary history for each population; in other words, populations radiated from a common ancestor. In conclusion, results are better explained by evolutionary convergence on independently evolved lineages than by cross-contamination among lineages at the two more critical steps of our experimental protocol.

Nevertheless, the existence of three pairs of identical sequences that were evolved in the same blocks calls for extra caution when interpreting the results. These three pairs could be the result of either evolutionary convergences, as we believe, or rare cross-contaminations during the evolutionary part of our experiment.

Identification of nucleotide substitutions: Figure 1 shows the fitness values estimated for each of the 21 chosen populations (MIRALLES *et al.* 1999) as well as the 25 molecular changes observed. Red blocks indicate nonsynonymous changes, green blocks synonymous changes, and yellow blocks changes in intergenic regions. Twenty-five different positions showed differences among evolved populations and the ancestral genotypes. The substitutions observed in each population were always fixed (at the resolution level of the sequencing chromatograms). Of those, 15 were nonsynonymous changes, 6 were synonymous changes, and only 3 were changes at intergenic regions. Regarding specific genes, the nucleocapsid protein (N) does not show any difference, a fact that could be telling us about the importance of this gene. The phosphoprotein (P), which is a minor component of the RNA polymerase, shows four variable sites among populations; two were synonymous and two were nonsynonymous. The matrix protein (M), which covers the inner side of the virion, also shows four variable sites among populations; three of them are nonsynonymous changes. The coat protein (G) is the major antigenic component of the capsid and responsible for interactions with the cell receptors. *A priori*, we should expect this gene to be one of the main targets of selection during the adaptation to cell culture conditions. Naked eye inspection of the data supports this expectation, since 10 nucleotide positions were variable among populations, being 7 non-

TABLE 1
Nonparametric analysis of variance for the number of nucleotide substitutions among genes and for each experimental population size

Source of variation	d.f.	<i>H</i>	<i>P</i>
Gene	3	16.0453	0.0011
N_e	6	8.0237	0.2364
Gene $\times N_e$	18	8.4263	0.9716

synonymous changes. Finally, the major component of the RNA polymerase protein (L) shows four polymorphic sites among populations, three of them nonsynonymous.

Heterogeneity among sites and among genes in the number of mutations: Of course, the observed pattern of polymorphic sites could, in principle, be produced by chance. To rule out this possibility, we computed the dispersion coefficient, δ , of the number of times that a site changed across lineages (SOKAL and ROHLF 1995). Under the null hypothesis of changes being randomly distributed across the entire 11,161 bp of the genome, the number of times that a site changes follows a Poisson distribution and hence $\delta = 1$. Alternatively, if certain sites changed by chance more often than expected, then $\delta > 1$. Our estimate of $\delta = 5.16$ rejects the null hypothesis of observing this pattern by chance ($\chi^2 = 57,566.97$, 11,160 d.f., one-tailed $P < 0.0001$). (This conclusion holds if instead of the full genome we compute δ for only the 25 variable sites: $\delta = 2.34$, $\chi^2 = 56.16$, 24 d.f., one-tailed $P = 0.0001$.) Hence, we conclude that some sites mutated more often than others along the entire genome.

Now, we were interested in testing whether different genes accumulated different numbers of mutations or, alternatively, whether mutations were equally scattered among genes. A Scheirer-Ray-Hare nonparametric two-way ANOVA (SOKAL and ROHLF 1995) showed a significant among-genes heterogeneity in the number of mutations accumulated per nucleotide site (Table 1). A *post hoc* Tukey's test (SOKAL and ROHLF 1995) indicates that this difference was due to the ~ 10 -fold lower number of mutations per nucleotide site observed for the L gene, the major RNA polymerase component. This observation suggests that the L gene is subjected to more evolutionary constraints than any other component in the genome (with the exception of the N gene, at which we did not find any change at all). On the other side, on average, M, P, and G genes had the same number of mutations per nucleotide site. This tells us about the naïveté of our above expectation of the G gene fixing more changes than any other component of the genome as a result of being an important target of selection. However, as we see in the next two sections, changes in the G protein were selectively more important than changes in other parts of the genome. There is no effect

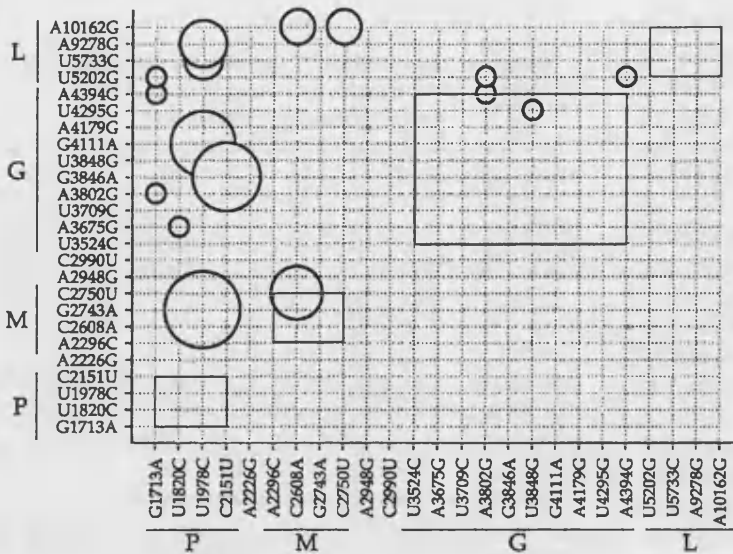


FIGURE 3.—Covariation among nucleotide sites. Each significant covariance among sites (after sequential Bonferroni's correction) is represented in the plot by a bubble. The size of each bubble is proportional to the magnitude of the covariance. The rectangles represent regions of possible covariation within genes. Every significant covariance outside these regions corresponds with interactions among genes. It is noteworthy that the number of significant epistatic interactions is significantly greater among than within genes (binomial test, $P = 0.0213$). Only the upper one-half of the matrix is shown.

of the N_e on the number of mutations fixed per gene. The interaction of gene by N_e term was not significant either.

Covariation among sites: Another interesting feature of Figure 1 is the existence of an apparent covariation among sites. For example, the substitution of Ser₁₉₅ → Pro at the P gene in almost every case goes together with the substitution Gly₁₆₅ → Asp at the M gene. Similarly, substitutions Pro₁₂₀ → Gln and C₂₇₅₀ → U at the M gene and A₁₀₁₆₂ → G at the L gene always occur together. Covariation among sites within and among genes arises as a result of epistatic gene interactions and selection acting on the groups of sites rather than on individual sites. To assess the extent of this covariation among sites, as well as to identify pairs of significantly interacting sites, we computed the matrix of covariances among sites. Figure 3 shows, in a schematic way, the 16 significant cases (after sequential Bonferroni's correction for multiple tests of the same hypothesis). Significant covariance values ranged between 0.0476 (the smallest bubbles in Figure 3) and 0.1857 (the largest bubble in Figure 3). These 16 significant cases can be grouped into the following six different covariation groups.

Group I: U₁₈₂₀ (Ile₁₄₂ → Thr) in the P gene covaried with site A₃₆₇₅ (Met₂₀₀ → Val) in the G gene. These two sites are present in only one population (labeled 10⁶ 3 4 in Figure 1).

Group II: U₁₉₇₈ (Ser₁₉₅ → Pro in the P gene) and G₂₇₄₃ (Gly₁₆₅ → Asp in the M gene) were present together in several lineages (Figure 1). It is worth noting that all synonymous changes always covaried with nonsynonymous changes (with the only exception of unique change U₃₅₂₄ → C in the G gene, which, indeed, was not neutral; see below).

Group III: For example, synonymous sites G₁₇₁₃ and A₄₃₉₄ covaried with nonsynonymous sites A₃₈₀₂ (Asp₂₄₂ → Arg

in the G protein) and U₅₂₀₂ (Leu₁₅₇ → Trp in the L protein) in the same population (labeled 10⁶ 3 4 in Figure 1).

Group IV: A synonymous change at site C₂₁₅₁ was present in several populations significantly associated with a nonsynonymous change at site G₃₈₄₆ (Asp₂₅₇ → Asn of the G protein).

Group V: Similarly, nonsynonymous changes at sites C₂₇₅₀ and A₁₀₁₆₂ significantly covaried with a nonsynonymous change at position C₂₆₀₈ (Pro₁₂₀ → Gln) in several populations.

Group VI: Finally, a synonymous substitution at site U₄₂₉₅ was associated with a nonsynonymous substitution in site U₃₈₄₈ (Asp₂₅₇ → Asn of the G protein) in a single population (labeled 10² 2 1 in Figure 1).

Could we assign fitness values to specific mutations or to covariation groups? We took advantage of these convergences to estimate specific fitness effects for each site or covariation group (*i.e.*, epistatic sites). The general way to model epistatic fitness effects is to assume that the fitness of a genotype that carries k epistatic mutations that interact together as a group is $W_{1,2,\dots,k} = \prod_{i=1}^k (1 + s_i) + \varepsilon_{1,2,\dots,k}$, where the s_i are the multiplicative effects of each mutation and $\varepsilon_{1,2,\dots,k}$ is the increase in fitness gained by the overall interaction of all mutations in the group (PHILLIPS *et al.* 2000). Hence, to describe the fitness effect of each epistatic group of mutations we need to estimate as many parameters from the dataset as mutations involved in the group [s_i ($i = 1, 2, \dots, k$)] plus an overall interaction term ($\varepsilon_{1,2,\dots,k}$). A way of reducing the number of parameters to be estimated is to assign a single fitness value to each epistatic group as a whole, regardless of the specific contribution of each mutation. This value will, obviously, be composed of the individual contribution of each mutation plus the added value.

By assuming an infinite-sites model, the expected fit-

TABLE 2
Fitness values estimated for different mutations
and covariation groups

Mutation or epistatic group	Fitness contribution (\pm SE), s
C ₂₁₅₁ → U - Asp ₂₅₇ → Asn (G protein)	0.0489 \pm 0.0322
Lys ₁₆ → Thr (M protein)	0.0232 \pm 0.0169
C ₂₉₉₀ → U	0.0032 \pm 0.0201
U ₃₅₂₄ → C	0.0669 \pm 0.0035*
Leu ₂₁₁ → Pro (G gene)	0.0467 \pm 0.0194*
Arg ₃₄₅ → Lys (G gene)	0.0562 \pm 0.0282*
Thr ₃₆₈ → Ala (G gene)	0.0425 \pm 0.0191*
Ile ₁₅₁₆ → Val (L gene)	0.0578 \pm 0.0041*

* Values significantly different from zero; z -test, one-tailed $P < 0.05$.

ness of a given clone, $E(W_i)$, will be determined by multiplying the fitness effects, $1 + s_j$, associated with each observed covariation group (six in our dataset, involving 15 nucleotide sites) and with each nonepistatic, purely multiplicative, site ($25 - 15 = 10$). Hence, $\ln E(W_i) = \sum_{j=1}^{16} \ln(1 + s_j)$. These 16 s_j parameters can then be estimated, from the 21 populations, by means of a quadratic sequential programming procedure that minimizes the differences between the observed and expected fitnesses (CNLR procedure in the SPSS package). The advantage of quadratic sequential programming compared with linear regression is that the former allows us to impose biologically meaningful restrictions to the parameters. We used the following two restrictions: (1) When a mutation appears alone, it necessarily has to be beneficial (*i.e.*, $s_j > 0$); (2) if a mutation belonging to an epistatic group is found alone in any population, then it must be beneficial by itself ($s_j > 0$) and its numerical value must be necessarily smaller than the value for the whole epistatic group. Furthermore, the MIRALLES *et al.* (1999) study dealt with beneficial mutations and fitness improvements. Deleterious mutations would not have an effect under their experimental setup since they were washed out by strong purifying selection. Hence, we implicitly assumed that all the nonvariable sites detected in our study ($11,161 - 25 = 11,136$) were deleterious or (quasi-neutral) under our experimental conditions.

Table 2 shows the estimated fitness contribution of each observed change (either point mutations or covariation groups). We report in Table 2 only those sites whose fitness contributions converged to nonzero estimates (not necessarily significant) in the quadratic sequential programming procedure. The correlation between predicted and observed fitness values can be used as a way to assess the goodness of fit of the model. Here, the match between observed and predicted fitnesses was highly significant ($r = 0.8966$, 19 d.f., $P < 0.0001$). All nonsignificant cases must be considered either as neutral or, in the worse case, as small-effect mutations

that are indistinguishable from zero with the statistical power associated with our experimental sample size.

None of the four changes found at the P protein were beneficial by themselves. The synonymous substitution C₂₁₅₁ → U, along with the replacement Asp₂₅₇ → Asn at the G protein, had an estimated fitness effect of 4.9%, although nonsignificant. The only substitution at intergenic regions with a fitness effect was C₂₉₉₀ → U at the M-G segment. The small effect associated with this substitution, 0.3%, was not significant either. Whether or not this replacement has a real fitness effect, the fact is that nucleotide substitutions in intergenic regions had been previously reported to be of special significance for the transcription levels of downstream genes in VSV (SMALLWOOD and MOYER 1993). One of the four changes found in the M protein was beneficial, with a fitness effect of $\sim 2.3\%$. This was a nonsynonymous change, which implies replacing a positive charge (Lys) by a polar radical (Thr). However, it is worthwhile to note that this change was not significant either. The small effect of this change is probably associated with the fact that it was present in only one clone. Five significant changes were detected at the G protein, one of them linked with a change in the P protein (see above). Surprisingly, one of these beneficial substitutions was the synonymous change at position 3524. Furthermore, this change had the largest observed effect on fitness among all the beneficial mutations ($\sim 6.7\%$). The change Leu₂₁₁ → Pro ($\sim 4.8\%$ effect) implies a substantial structural change in the protein, since Pro is associated with the induction of β -turns. The change Arg₃₄₅ → Lys *a priori* seems conservative, since it maintains the positive charge at the radical. However, it has a significant effect of $\sim 5.6\%$. Finally, the change Thr₃₆₈ → Ala ($\sim 4.3\%$ effect) replaces a polar radical by a short nonpolar one. As we speculated above, the G protein is important for adaptation to a cellular host, since it is responsible for interacting with the cellular receptor (phosphatidylserine). In the other side, only one nonsynonymous change was identified at the L protein. The change Ile₁₅₁₆ → Val at this important gene had the second largest effect detected ($\sim 5.8\%$), although it is difficult to find a biochemical explanation of this effect, since it implies a reduction of only one carbon in the length of the radical. Nonetheless, changes in the major component of the RNA polymerase should be of importance in our experimental system, since our daily transfer protocol selects for rapidly replicating viruses and improvement in replication efficiency must arise by changes in the L protein.

Conservatively, we can say that changes in 5 of the 11,161 nucleotide sites of the VSV genome were selectively important in our experimental conditions.

DISCUSSION

Our experiment dealt with the existence of evolutionary convergences. Evolutionary convergences constitute

a very slippery topic, since a result of convergent evolution can always be seen as a cross-contamination by those critical of the existence of convergence. The only serious way to address evolutionary convergences is to (1) design and run experiments in such a way that physical or temporal coexistence of evolving lineages is minimized and (2) test whether the results can be explained by potential contaminations at different experimental steps. With our experiments, we took all possible precautions to minimize the risk of cross-contaminations and, in fact, a detailed phylogenetic analysis of our results supports the view that our results are better explained by evolutionary convergences than by a general contamination at different steps. However, we found three pairs of identical sequences that were, unfortunately, obtained from populations evolved in the same blocks. For these three particular cases, our phylogenetic analysis could not fully rule out the possibility of a cross-contamination. The problem in these cases was that we did not have any basis to decide which member of each pair must be eliminated (the contaminated) and which one retained (the contaminator) in the analysis. Conservatively, we removed all six sequences and redid all the above analysis. By doing so, a few covariances in Figure 3 became not significant (but none that were nonsignificant changed) and the CNLR method provided slightly different estimates for fitness effects (interestingly, the four significant cases in Table 2 retained their significance). Hence, despite absolute numerical values, our major conclusions of molecular convergences and epistasis are solidly supported by our dataset.

One of the most amazing features illustrated in Figure 1 is the large amount of evolutionary convergences observed among independent lineages. Twelve of the variable sites were shared by different lineages. More surprisingly, convergences also occurred within synonymous sites and intergenic regions. Evolutionary convergences during the adaptation of viral lineages under identical artificial environmental conditions have been described previously (BULL *et al.* 1997; WICHMAN *et al.* 1999; FARES *et al.* 2001). However, this phenomenon is observed not only in the laboratory. It is also a relatively widespread observation among human immunodeficiency virus (HIV)-1 clones isolated from patients treated with different antiviral drugs; parallel changes are frequent, often following a common order of appearance (LARDER *et al.* 1991; BOUCHER *et al.* 1992; KELLAM *et al.* 1994; CONDRA *et al.* 1996; MARTÍNEZ-PICADO *et al.* 2000). Subsequent substitutions may confer increasing levels of drug resistance or, alternatively, may compensate for deleterious pleiotropic effects of earlier mutations (MOLLA *et al.* 1996; MARTÍNEZ-PICADO *et al.* 1999; NIJHUIS *et al.* 1999). Also, molecular convergences have been observed between chimeric simian-human immunodeficiency viruses (strain SHIV-vpu⁺) isolated from pig-tailed macaques, rhesus monkeys, and humans after either chronic infections or rapid virus passage

(HOFMANN-LEHMANN *et al.* 2002). Convergent evolution at the molecular level is not controversial as long as it can be reconciled with the neutralist and the selectionist theories. The neutral theory suggests that convergences are simply accidents, whereas within the framework of selectionism, there are two qualifications for convergences. The first explanation considers convergences as being adaptive and the result of organisms facing the same environment (as in the case of our experiments) with a few alternative pathways of adaptation (as expected for compacted genomes). Second, keeping in mind the model of clonal interference, beneficial mutations have to become fixed in an ordered way (GERRISH and LENSKI 1998), with the best possible candidate fixing first, and then the second best candidate, and so on. This implies that, given a large enough population size to make clonal interference an important evolutionary factor, we should always expect the same mutations to be fixed.

The above argument is valid for nonsynonymous changes but an alternative explanation must be found for synonymous changes and for changes in the intergenic regions. Genomic RNA is involved in many RNA-RNA and RNA-protein interactions that affect viral replication. This is obvious for noncoding, regulatory regions (STILLMAN and WHITT 1997, 1998), but there is increasing evidence that capsid-coding regions in picornaviruses may also have an effect on viral replication (McKNIGHT and LEMON 1998; FARES *et al.* 2001). Therefore, the RNA itself (apart from its protein-coding capacity) may contribute to the viral phenotype, and fitness may also be affected by synonymous replacements. Evidence for selection on synonymous sites has been inferred also in mammals (EYRE-WALKER 1999), as a consequence of selection acting upon the base composition of isochores and large sections of junk DNA.

For the sake of illustration, it would be interesting to compare the number of selectively important sites in the VSV genome with those estimated for other genomes. For example, FAY *et al.* (2001) reported that, in humans, the vast majority (80%) of amino acid changes are deleterious to some extent and only a minor fraction are neutral. Among these deleterious amino acid mutations, at least 20% are slightly deleterious. Here, we found that 15 amino acid sites changed, with only 5 being significantly advantageous. At this point, we can only speculate about the selective role of all the amino acid sites shown to be invariable in our study. The total number of amino acids in the five genes of VSV is 3536. Assuming that changes in any of the $3536 - 15 = 3521$ invariable amino acids would be deleterious (and thus washed out by purifying selection during our evolution experiment), then the fraction of amino acid replacements that are potentially harmful would be $3521/3536 \approx 99.58\%$; the fraction of neutral sites would be $10/3536 \approx 0.28\%$, whereas only $5/3536 \approx 0.14\%$ would be beneficial. Despite the differences between humans and VSV in ge-

nome size and organization and in the nature of the nucleic acid used, in both cases the fraction of potentially deleterious amino acid substitutions is overwhelmingly larger than that of neutral or beneficial ones.

At the other extreme, we can make the otherwise unrealistic assumption that all the 3521 invariable amino acids are neutral or quasi-neutral (*sensu* OHTA 1973; depending on population size); then the fraction of neutral sites in the VSV genome would be as high as $3531/3536 \equiv 99.86\%$, 0.14% would be advantageous, and none would be deleterious. However, recent computations showed that the deleterious genomic mutation rate for VSV might be as high as ~ 1.2 per genome replication, with a majority of mutations of small effect but with a significant fraction being of large effect (ELENA and MOYA 1999).

Quantifying the proportion of amino acid substitutions in the proteome of RNA viruses that are effectively neutral (or quasi-neutral) is of extreme importance for testing the validity of the quasi-species model of viral evolution. The quasi-species model differs from the classical population genetics models in that neutral mutations do not lead to genetic drift of the population, and natural selection acts on the mutant distribution as a whole rather than on individual variants. The reason for challenging the quasi-species model resides on whether or not neutral sites are abundant in the genome (JENKINS *et al.* 2001; HOLMES and MOYA 2002). If neutral mutations are abundant, the sequence space may be too large to allow the formation of a stable quasi-species distribution. If an RNA virus genome contains neutral sites, then the number of sequences close to maximum fitness may exceed the population size of the virus itself (JENKINS *et al.* 2001). This would prevent the formation of a quasi-species because the viral population could not occupy all the sequence space around the master sequence and so would be subjected to genetic drift, which in turn would prevent the mutational coupling necessary for natural selection to act on the entire mutant distribution.

The presence of multiple beneficial mutations in the same genome allows some important conclusions to be drawn. Fitness effects previously measured (MIRALLES *et al.* 1999) cannot be assigned to single changes. Instead, the picture is a little bit more complex, involving multiple beneficial mutations as well as linked neutral changes. Is this jeopardizing our previous conclusion of clonal interference as a key factor during the evolution of RNA viruses? To test whether the first prediction (see above) of the clonal interference model still holds when multiple mutations got fixed on each lineage, we studied the correlation between the best beneficial effect fixed within each clone (from Table 2) and N_e . If the prediction still holds, a positive correlation between these two parameters would be expected. Figure 4 illustrates the existence of a significant positive trend ($r =$

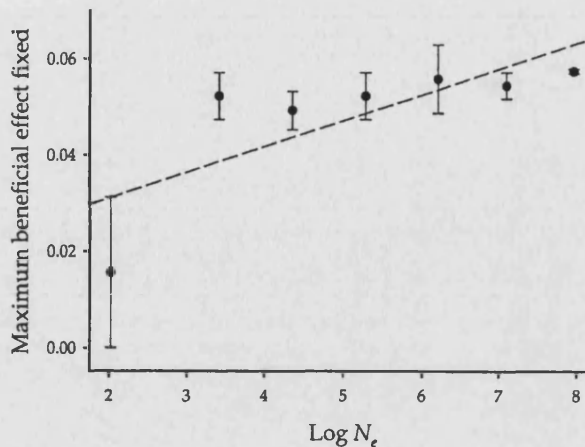


FIGURE 4.—Correlation between the best beneficial mutation fixed in a given lineage and the effective population size at which the lineage evolved. Error bars represent SEM ($n = 3$). The dashed line is shown for illustrative purposes only.

0.6128, 19 d.f., one-tailed $P = 0.0016$), confirming the prediction made by the clonal interference model.

A second important conclusion of our study is the existence of extensive epistatic interactions among and within viral genes (Figure 3). However, we have shown that the net effect of epistasis on fitness is likely to be very low in VSV, since only 1 out of 16 detected epistatic interactions had significant fitness effects (4.9%, Table 2). This result adds to the emerging picture that epistasis between mutations is very weak across a broad phylogenetic range (DE VISSER *et al.* 1997; ELENA and LENSKI 1997; CHARLESWORTH 1998; ELENA 1999; PETERS and KEIGHTLEY 2000).

The results reported in this article open the possibility for new and exciting research. The most straightforward step to be taken is the recreation, by site-directed mutagenesis on a full-genome cDNA, of each observed mutation alone and measuring the fitness of individual mutations to confirm the validity of the above inferences and the role of epistasis among pairs of mutations. Other interesting research will be to quantify the magnitude of nucleotide diversity within our evolving populations. The results of such an analysis would, in principle, be helpful for understanding the role of processes such as hitchhiking, background selection, or selective sweeps in the evolution of RNA viruses.

We thank Rosario Miralles and Rafael Sanjuán for stimulating and fruitful discussions, Olga Cuesta for technical assistance, and A. M. Powell for critical reading of the manuscript. The comments of two reviewers were invaluable for improving the manuscript. This work was supported by a predoctoral fellowship to J.M.C. and a grant to A.M., both from the Spanish Ministerio de Educación y Cultura.

LITERATURE CITED

- AKAIKE, H., 1974 A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Contr.* 19: 716–723.

- BOUCHER, C. A. B., E. O'SULLIVAN, J. W. MULDER, C. RAMAUTARSING, P. KELLAM *et al.*, 1992 Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. *J. Infect. Dis.* **165**: 105–110.
- BRACHO, M. A., A. MOYA and E. BARRIO, 1998 Contribution of Taq polymerase-induced errors to the estimation of RNA virus diversity. *J. Gen. Virol.* **79**: 2921–2928.
- BULL, J. J., M. R. BADGETT, H. A. WICHMAN, J. P. HUELSENBECK, D. M. HILLIS *et al.*, 1997 Exceptional convergent evolution in a virus. *Genetics* **147**: 1497–1507.
- CHAO, L., 1988 Evolution of sex in RNA viruses. *J. Theor. Biol.* **133**: 99–112.
- CHARLESWORTH, B., 1998 The effect of synergistic epistasis on the inbreeding load. *Genet. Res.* **71**: 85–89.
- CONDRA, J. H., D. J. HOLDER, W. A. SCHLEIF, O. M. BLAHY, R. M. DANOVICH *et al.*, 1996 Genetic correlates of in vivo viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *J. Virol.* **70**: 8270–8276.
- COYNE, J. A., 1992 The genetics of speciation. *Nature* **355**: 511–515.
- DE VISSER, J. A. G. M., R. F. HOEKSTRA and H. VAN DEN ENDE, 1997 Test of interaction between genetic markers that affect fitness in *Aspergillus niger*. *Evolution* **51**: 1499–1505.
- ELENA, S. F., 1999 Little evidence for synergism among deleterious mutations in a nonsegmented RNA virus. *J. Mol. Evol.* **49**: 703–707.
- ELENA, S. F., and R. E. LENSKI, 1997 Test of synergistic interactions among deleterious mutations in bacteria. *Nature* **390**: 395–398.
- ELENA, S. F., and A. MOYA, 1999 Rate of deleterious mutation and the distribution of its effects on fitness in vesicular stomatitis virus. *J. Evol. Biol.* **12**: 1078–1088.
- EYRE-WALKER, A., 1999 Evidence of selection on silent site base composition in mammals: potential implications for the evolution of isochores and junk DNA. *Genetics* **152**: 675–683.
- FARES, M. A., A. MOYA, C. ESCARMIS, E. BARANOWSKI, E. DOMINGO *et al.*, 2001 Evidence for positive selection in the capsid protein-coding region of the foot-and-mouth disease virus (FMDV) subjected to experimental passage regimens. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 10–21.
- FAY, J. C., G. J. WYCHOFF and C.-I. WU, 2001 Positive and negative selection on the human genome. *Genetics* **158**: 1227–1234.
- GERRISH, P. J., and R. E. LENSKI, 1998 The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica* **102** (103): 127–144.
- HOFMANN-LEHMANN, R., J. VLASAK, A. L. CHENINE, P. L. LI, T. W. BABA *et al.*, 2002 Molecular evolution of human immunodeficiency virus *env* in humans and monkeys: similar patterns occur during natural disease progression or rapid virus passage. *J. Virol.* **76**: 5278–5284.
- HOLLAND, J. J., J. C. DE LA TORRE, D. K. CLARKE and E. A. DUARTE, 1991 Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J. Virol.* **65**: 2960–2967.
- HOLMES, E. C., and A. MOYA, 2002 Is the quasispecies concept relevant to RNA viruses? *J. Virol.* **76**: 460–462.
- JENKINS, G. M., M. WOROBAY, C. H. WOELF and E. C. HOLMES, 2001 Nonquasispecies evidence for the evolution of RNA viruses. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 987–994.
- KELLAM, P., C. A. B. BOUCHER, J. M. G. H. TIJNAGEL and B. A. LARDER, 1994 Zidovudine treatment results in the selection of human immunodeficiency virus type 1 variants whose genotypes confer increasing levels of drug resistance. *J. Gen. Virol.* **75**: 341–351.
- KONDRASHOV, A. S., 1985 Deleterious mutations as an evolutionary factor. II. Facultative apomixes and selfing. *Genetics* **111**: 635–653.
- KONDRASHOV, A. S., and J. F. CROW, 1991 Haploidy or diploidy: Which is better? *Nature* **351**: 314–315.
- LARDER, B. A., K. E. COATES and S. D. KEMP, 1991 Zidovudine-resistant human immunodeficiency virus selected by passage in cell culture. *J. Virol.* **65**: 5232–5236.
- LENSKI, R. E., V. SOUZA, L. P. DUONG, Q. G. PHAN, T. N. NGUYEN *et al.*, 1994 Epistatic effects of promoter and repressor functions of the Tn10 tetracycline-resistance operon on the fitness of *Escherichia coli*. *Mol. Ecol.* **3**: 127–135.
- LEWONTIN, R., 2000 Population genetics: problems, foundations, and historical perspectives, pp. 5–23 in *Evolutionary Genetics: From Molecules to Morphology*, edited by C. B. KRIMBAS and R. S. SINGH. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- MARTÍNEZ-PICADO, J., A. V. SAVARA, L. SUTTON and R. T. D'AQUILA, 1999 Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **73**: 3744–3752.
- MARTÍNEZ-PICADO, J., M. P. DEPASQUALE, N. KARTSONIS, G. J. HANNA, J. WONG *et al.*, 2000 Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 10948–10953.
- McKNIGHT, K. L., and S. M. LEMON, 1998 The rhinovirus type 14 genome contains an internally located RNA structure that is required for viral replication. *RNA* **4**: 1569–1584.
- MIRALLES, R., P. J. GERRISH, A. MOYA and S. F. ELENA, 1999 Clonal interference and the evolution of RNA viruses. *Science* **285**: 1745–1747.
- MIRALLES, R., A. MOYA and S. F. ELENA, 2000 Diminishing returns of population size in the rate of RNA virus adaptation. *J. Virol.* **74**: 3566–3571.
- MOLLA, A., M. KORNEYEVA, Q. GAO, S. VASAVANONDA, P. J. SCHIPPER *et al.*, 1996 Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nat. Med.* **2**: 760–766.
- NIJHUIS, M., R. SCHUURMAN, D. DE JONG, E. J. RICKSON, E. GUSTCHINA *et al.*, 1999 Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during sub-optimal therapy. *AIDS* **13**: 2349–2359.
- OHTA, T., 1973 Slightly deleterious mutant substitutions in evolution. *Nature* **246**: 74–76.
- PECK, J. R., and D. WAXMAN, 2000 Mutation and sex in a competitive world. *Nature* **406**: 399–404.
- PETERS, A. D., and P. D. KEIGHTLEY, 2000 A test for epistasis among induced mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **156**: 1635–1647.
- PHILLIPS, P. C., S. P. OTTO and M. C. WHITLOCK, 2000 Beyond the average: the evolutionary importance of gene interactions and variability of epistatic effects, pp. 20–38 in *Epistasis and the Evolutionary Process*, edited by J. B. WOLF, E. D. BRODIE III and M. J. WADE. Oxford University Press, Oxford.
- SHIMODAIRA, H., and M. HASEGAWA, 1999 Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1114–1116.
- SMALLWOOD, S., and S. A. MOYER, 1993 Promoter analysis of the vesicular stomatitis virus RNA polymerase. *Virology* **192**: 254–263.
- SOKAL, R. S., and F. J. ROHLF, 1995 *Biometry*, Ed. 3. W. H. Freeman, New York.
- STILLMAN, E. A., and M. A. WHITT, 1997 Mutational analyses of the intergenic dinucleotide and the transcriptional start sequence of vesicular stomatitis virus (VSV) define sequences required for efficient termination and initiation of VSV transcripts. *J. Virol.* **71**: 2127–2137.
- STILLMAN, E. A., and M. A. WHITT, 1998 The length and sequence composition of vesicular stomatitis virus intergenic regions affect mRNA levels and the site of transcript initiation. *J. Virol.* **72**: 5565–5572.
- WICHMAN, H. A., M. R. BADGETT, L. A. SCOTT, C. M. BOULIANNE and J. J. BULL, 1999 Different trajectories of parallel evolution during viral adaptation. *Science* **285**: 422–424.
- WRIGHT, S., 1931 Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**: 97–159.

Communicating editor: H. OCHMAN

Capítulo II:

Migración entre ambientes heterogéneos

Las poblaciones están sometidas fundamentalmente a la acción de cuatro fuerzas evolutivas: mutación, deriva, selección natural y migración. La migración difiere de las otras fuerzas en un aspecto importante. La migración *per se* no cambia las frecuencias génicas: los procesos de migración pueden modificar localmente las frecuencias génicas, pero globalmente las frecuencias permanecen invariables. En definitiva, el fenómeno de migración transcurre de forma continua abarcando desde situaciones completamente dirigidas hasta otras totalmente al azar.

La cantidad de migración entre las poblaciones en un ambiente heterogéneo se ve influenciada por el grado en el cual las poblaciones pueden adaptarse a sus circunstancias locales. En este sentido, la selección natural puede verse restringida por la migración (Pease *et al.*, 1989).

La migración es un proceso muy generalizado, pero en el caso de los virus, y en particular los virus de RNA, este proceso puede verse desde dos puntos de vista distintos, hablándose de dos tipos diferenciados de migración:

- Migración entre hospedadores.
- Migración entre órganos dentro de un hospedador.

Bajo este punto de vista, numerosos trabajos han tratado de esclarecer los procesos que intervienen en la dispersión de las poblaciones virales a nivel de hospedador y entre distintos hospedadores.

2.1. Migración entre hospedadores

Los arbovirus, que replican en hospedadores mamíferos e insectos, constituyen un ejemplo clásico de alternancia ambiental obligada *in vivo* (Scott *et al.*, 1994; Weaver, 1998). Entre ellos, VSV ha sido el modelo clásico empleado en numerosos estudios de evolución. Este virus infecta a mamíferos e insectos y puede ser transmitido por vectores artrópodos (Wagner, 1991). En consecuencia, la exposición a nuevos ambientes puede ser importante en la evolución de VSV. Los saltos entre hospedadores son más comprensibles si partimos de la base de que VSV es un virus de RNA que constitutivamente presenta altas tasas de mutación (Drake y Holland, 1999). Este hecho puede explicar porqué la gran mayoría de los arbovirus que alternan entre

hospedadores presentan genomas de RNA. Además, una de las mayores limitaciones respecto al rango de hospedador es la existencia de receptores apropiados, pero esto no constituye un problema en el caso de VSV por el hecho de explotar un receptor (fosfatidilserina) común a la mayoría de las células animales (Wagner, 1991).

Las constricciones asociadas con un ciclo de vida de dos hospedadores pueden favorecer el mantenimiento de genotipos virales específicos (Scott *et al.*, 1994; Weaver *et al.*, 1999). La presencia de presiones selectivas específicas de hospedador limita la tasa de evolución como consecuencia de la existencia de un compromiso de eficacia; en otras palabras, el proceso de optimización a uno de los hospedadores disminuye la eficacia del virus en el hospedador alternativo (Strauss y Strauss, 1994; Novella *et al.*, 1995b; Turner y Elena, 2000).

La existencia de bajas tasas de evolución en una gran cantidad de arbovirus (Scott *et al.*, 1994), puede interpretarse como consecuencia de la necesidad que muestra el virus de comprometerse entre dos ambientes muy diferenciados, mamíferos e insectos. Weaver *et al.* (1992, 1997) describen la baja tasa de evolución que presenta el virus de la encefalitis equina del este (EEEV), en contraposición con muchos virus de RNA que sólo replican en un hospedador. Esta estabilidad genética se puede explicar en base a una fuerte selección purificadora impuesta por el ciclo de alternancia de hospedadores (vertebrados e insectos), minimizando ambos el papel de la deriva genética o los efectos fundadores.

Algunos autores han observado que las poblaciones virales son capaces de llevar a cabo una evolución rápida como respuesta a nuevos ambientes celulares, así como que la replicación de los virus en células de vertebrados e invertebrados implica distintas presiones selectivas (Novella *et al.*, 1995b, 1999; Weaver *et al.*, 1999). En consecuencia, la transferencia en un ciclo de dos hospedadores actúa a favor de poblaciones virales bien adaptadas en ambos hospedadores. Ahondando en el asunto, los resultados obtenidos por Cooper y Scott (2001) corroboran la hipótesis inicial según la cual la evolución viral no es aleatoria. Estos autores observan que poblaciones virales procedentes del mismo régimen selectivo son más similares entre sí de lo que lo son con aquellas

que proceden de dinámicas distintas. Estas similitudes pueden surgir en respuesta a la selección de viriones con eficacias replicativas crecientes (Bull *et al.*, 1997).

De cualquier manera, la adaptación de distintas líneas a un determinado ambiente no necesariamente ha de ser sincrónica, sino que las poblaciones virales pueden evolucionar de forma continua a distintas tasas (Cooper y Scott, 2001). En este sentido y a nivel experimental, el hecho de prolongar la dinámica de las distintas líneas puede conducir a un aumento de la homogeneidad hallada, así como a patrones de adaptación más consistentes (Newman *et al.*, 1985; Novella *et al.*, 1995b; Elena *et al.*, 1998), si bien por la misma razón también cabe la posibilidad de que emerjan nuevas líneas virales.

En términos de paisajes adaptativos (Wright, 1931), sólo aquellas poblaciones que se encuentran en uno de los pocos picos de eficacia comunes a ambos hospedadores, serán capaces de sobrevivir. VSV presenta dos estrategias opuestas de replicación (persistente en el vector frente a lítica en el hospedador), que pueden conllevar paisajes dispares, lo cual implicaría un compromiso genético y sería responsable de la estabilidad de las poblaciones naturales de arbovirus (Novella, 1999). En una población existe un compromiso entre dos hospedadores cuando, bajo selección natural únicamente (es decir, ignorando mutación y deriva genética), no hay un posible estado de equilibrio que maximice la eficacia media en ambos hospedadores simultáneamente. Diversos autores han apuntado que la existencia de compromisos requiere simplemente que algunos loci tengan efectos antagonistas sobre los distintos componentes de la eficacia, no que todos los loci tengan tales efectos (Charlesworth, 1990; Jaenike, 1990; Houle, 1991; Fry, 1993).

Los virus que evolucionan en un nuevo hospedador experimentan aumentos sustanciales de eficacia, pero muestran una reducción en su capacidad para competir en el hospedador original (Turner y Elena, 2000). Además, la adaptación a un nuevo hospedador no implica una mejora en la capacidad para infectar a otros hospedadores, sino que los cambios acontecidos en las poblaciones virales tienden a ser específicos de célula. Estos resultados pueden considerarse en acuerdo con la noción de que los compromisos de

eficacia entre los distintos hábitats conducen a la especialización de las especies (Levins, 1968), pero fundamentalmente deja a las claras la especificidad de la adaptación viral a un nicho particular.

Diversos experimentos con el virus de la encefalitis equina (Weaver *et al.*, 1999) y VSV (Novella *et al.*, 1999; Turner y Elena, 2000) muestran que la adaptación no se ve limitada por ciclos en los que alternan los hospedadores. Estos trabajos entran en contradicción con la idea de que los organismos generalistas presentan una reducción en la eficacia frente a los especialistas debido a que acarrear un incremento en la carga mutacional o una mayor laxitud en la respuesta a la selección (Kawecki, 1994, 1998; Whitlock, 1996).

La capacidad de los virus que alternan hospedadores para adquirir ganancias de eficacia comparables a aquellas obtenidas durante adaptaciones a un único hospedador, indica la presencia de dos tipos distintos de soluciones genéticas para la consecución de estas ganancias de eficacia: unas adaptaciones específicas del hospedador y otras más generalizadas (Weaver *et al.*, 1999). Además, Weaver *et al.* (1999) obtienen evidencias de que la replicación con alternancia de hospedadores limita las tasas de evolución de los arbovirus.

2.2. Migración entre órganos dentro de un hospedador

Diversos estudios han mostrado que las secuencias provirales del virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV-1) se distribuyen de forma heterogénea a lo largo del cuerpo (Ball *et al.*, 1994; Itescu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1996; Hughes *et al.*, 1997). Delwart (1998) propone una serie de explicaciones a este hecho. Poblaciones virales del HIV-1 pueden aumentar su eficacia replicativa en algunos tipos celulares específicos en base a una selección para tropismos particulares, tales como la especificidad de receptor u otras propiedades virales. Otra explicación consiste en la existencia de distintas presiones inmunológicas en los diferentes tipos celulares, condicionando de esta forma la evolución hacia poblaciones diversificadas en cada uno de los diferentes compartimentos.

Se tiene constancia de la existencia de distintos genotipos del virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV-1) en un mismo paciente (Hahn *et al.*, 1986; Saag *et al.*, 1988; Wain-Hobson, 1989), presentándose además una fluctuación de los distintos genotipos. Ball *et al.* (1994) observan que un individuo puede

presentar en un momento dado distintas variantes virales coexistiendo en los diferentes órganos y fluidos corporales. Estos autores encuentran que la mayoría de las variantes halladas en los nódulos linfáticos, la médula ósea y el plasma, están presentes en las muestras de sangre periférica. Aparentemente, los tejidos linfáticos, junto con la médula ósea, constituyen un reservorio de variantes de HIV-1, las cuales, bajo unas condiciones adecuadas, pueden reincorporarse a la circulación periférica, dando lugar al patrón típico fluctuante de las poblaciones periféricas (Meyerhans *et al.*, 1989; Wain-Hobson, 1989). Esta situación puede tener un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.

En teoría, el plasma debería contener todas las variantes virales producidas en el cuerpo. Sin embargo, Maggi *et al.* (1997) encuentran que diversas variantes del virus de la hepatitis C detectadas en el hígado no están presentes en las correspondientes muestras de plasma. Estas variantes no detectadas pueden ser secuencias genéticas no liberadas por las células infectadas (Saito *et al.*, 1996) o procesadas antes de alcanzar el torrente sanguíneo, o bien pueden ser mutantes emergidos que todavía no han entrado en la circulación.

Como se ha comentado anteriormente, hay diversas razones que nos permiten comprender el motivo por el que se presentan poblaciones divergentes en distintos órganos; éstas pueden consistir en posibles diferencias en las presiones de selección inmune a nivel local, constricciones en la entrada viral y en las tasas de replicación debido a una disponibilidad diferencial de dianas celulares, y también diferencias en la presión de selección de drogas respecto a cada tipo celular cuando se emplean antivirales.

La generación de variantes genéticas virales ocurre principalmente como consecuencia de sucesos de mutación y recombinación, pero la fijación de estos mutantes y la emergencia esporádica de secuencias maestras dominantes se produce debido a diferencias de eficacia regidas por presiones selectivas ambientales.

2.3. Importancia del fenómeno de migración

La atenuación viral por medio de infecciones en nuevos hospedadores es una de las estrategias típicas empleadas en el desarrollo de vacunas, provocando una respuesta inmune sin inducir la enfermedad.

Saltos recientes en la naturaleza en el rango de hospedador han sido la causa de algunas epidemias importantes en humanos y otros animales (Morse, 1993; Nathanson *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 1999). Por el contrario, cambios en el rango de hospedador se han empleado de forma deliberada como método para la producción de vacunas atenuadas, por medio de la adaptación del virus a nuevos ambientes. La población viral resultante a menudo presenta una virulencia atenuada en el hospedador original, y por tanto, puede ser utilizada como una vacuna efectiva (Fenner y Cairns, 1959; Bull, 1994; Ebert, 1998).

De cualquier manera, la distribución heterogénea de las variantes virales dentro de un mismo individuo es de especial relevancia en la lucha contra las enfermedades infecciosas, por una sencilla razón: las poblaciones virales procedentes de la sangre constituyen la mayor fuente de vacunas en todos los estudios publicados hasta la fecha, pero estas poblaciones pueden diferir de aquellas presentes en el tracto genital, por ejemplo, lo cual podría tener un efecto negativo en los intentos por obtener una inmunización generalizada. La evaluación de vacunas, por tanto, ha de tener muy en cuenta estas posibles diferencias entre las poblaciones virales presentes en los distintos órganos.

Evolution of RNA virus in spatially structured heterogeneous environments

J. M. CUEVAS, A. MOYA & S. F. ELENA

Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva and Departament de Genètica, Universitat de València, València Spain

Keywords:

changing environments;
generalists;
host range;
migration;
specialists;
vesicular stomatitis virus;
viral evolution.

Abstract

A hallmark of the infectious cycle for many RNA viruses parasitizing multicellular hosts is the need to invade and successfully replicate in tissues that comprise a variety of cell types. Thus, multicellular hosts represent a heterogeneous environment to evolving viral populations. To understand viral adaptation to multicellular hosts, we took a double approach. First, we developed a mathematical model that served to make predictions concerning the dynamics of viral populations evolving in heterogeneous environments. Second, the predictions were tested by evolving vesicular stomatitis virus *in vitro* on a spatially structured environment formed by three different cell types. In the absence of gene flow, adaptation was tissue-specific, but fitness in all tissues decreased with migration rate. The performance in a given tissue was negatively correlated with its distance to the tissue hosting the population. This correlation decreased with migration rate.

Introduction

All environments vary spatially and temporally to some extent. Populations respond to this variability by usually evolving to any extreme of the spectrum of adaptation: specialist or generalist. The advantages of generalism are not well understood; it has been suggested that evolution should favour specialists because there are trade-offs that limit the fitness of generalists in any of the alternative environments or because evolution proceeds faster with narrower niches (Woolhouse *et al.*, 2001). Environmental homogeneity promotes the evolution of specialist genotypes and reduces genetic variability for fitness, whereas environmental heterogeneity has quite the opposite effect (Bell, 1997; Kassen & Bell, 1998). It is widely accepted that adaptation to a specific environment is often coupled with fitness losses in alternative environments simply because mutations that are beneficial at first might be deleterious as an alternative (Kawecki, 1994). This antagonistic pleiotropy could limit

the range of adaptation and promotes the evolution of specialization (Putuyma & Moreno, 1988). In this sense, environmental heterogeneity has been suggested as a main force maintaining diversity (Bell, 1997). Despite this importance, experimental tests of the role of environmental heterogeneity in evolving populations are scarce (for a recent review, see Kassen, 2002).

RNA viruses represent an excellent model to address the above questions. Viruses radiate by expanding their host range, which is the cellular environment where a virus replicates. Host range may be described in terms of host genotypes, host species, target cell (tissues) or even the ability to overcome antivirals or immune responses. Here, we are interested in a very common observation in virology: during the infection of a multicellular host, viral populations replicate as compartmentalized units, each corresponding to a specific tissue (Zhu *et al.*, 1996; Maggi *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997; van't Wout *et al.*, 1998; Frost *et al.*, 2001). Gene flow between compartments, although restricted, is quite common as a consequence of the homogenizing role played by the blood stream (Wong *et al.*, 1997; van't Wout *et al.*, 1998; Frost *et al.*, 2001). It has been experimentally demonstrated that different cell types impose different selective restrictions that determine the extent and specificity of viral

Correspondence: Santiago F. Elena, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida de los naranjos s/n, 46022 València, Spain.
Tel.: +34 963 877 895; fax: +34 963 877 859;
e-mail: sfelena@ibmcp.upv.es

adaptation (Holland *et al.*, 1991; Novella *et al.*, 1999; Weaver *et al.*, 1999; Crill *et al.*, 2000; Turner & Elena, 2000; Cooper & Scott, 2001). Adaptation is tissue-specific, since fitness improvements in a cell type do not correlate with fitness improvements in alternative cell types (Turner & Elena, 2000). Hence, we have evolution in homogeneous cell-types selected for specialist viruses. By contrast, when the whole viral population alternated between cell types, natural selection improved fitness in every cell type to the same extent as when adaptation happened to each one individually (Novella *et al.*, 1999; Weaver *et al.*, 1999; Turner & Elena, 2000). Thus, we have evolution in temporally fluctuating heterogeneous environments selected for generalist viruses. Nevertheless, it is important to point out that the latter experiments did not reflect the case of migration between heterogeneous patches of a fraction of a population, followed by competition with the resident population, but the transfer of a whole population to an empty new cell type. For homogeneous environments, migration between nonempty patches increased the metapopulation's average fitness and reduced genetic differences among patches as a conse-

quence of the spread of beneficial mutations across the metapopulation proportionally with the frequency of migration (Miralles *et al.*, 1999b).

The aim of our study was to extend previous experiments on viral population patchiness (Miralles *et al.*, 1999b) by introducing environmental heterogeneity. In this sense, the present experimental design simulates more effectively the evolution of a viral population colonizing a multicellular host containing different cell tissues and the spread of viruses between tissues at different frequencies. We placed three culture flasks, each one containing one of three different cell types, in the vertices of a triangle (Fig. 1). Once the cytopathic effect was completed, viruses from each flask were sampled, diluted and mixed when necessary, and used to infect a new flask. Migration between tissues took place in a clockwise fashion at four different rates, covering a wide range (from 0 to 50% immigrants per transfer). After approximately 100 generations of evolution, each flask was sampled and the resulting viral populations competed against the ancestral viral stock on each cell type. From the competition experiments, we estimated the fitness of the evolved populations relative

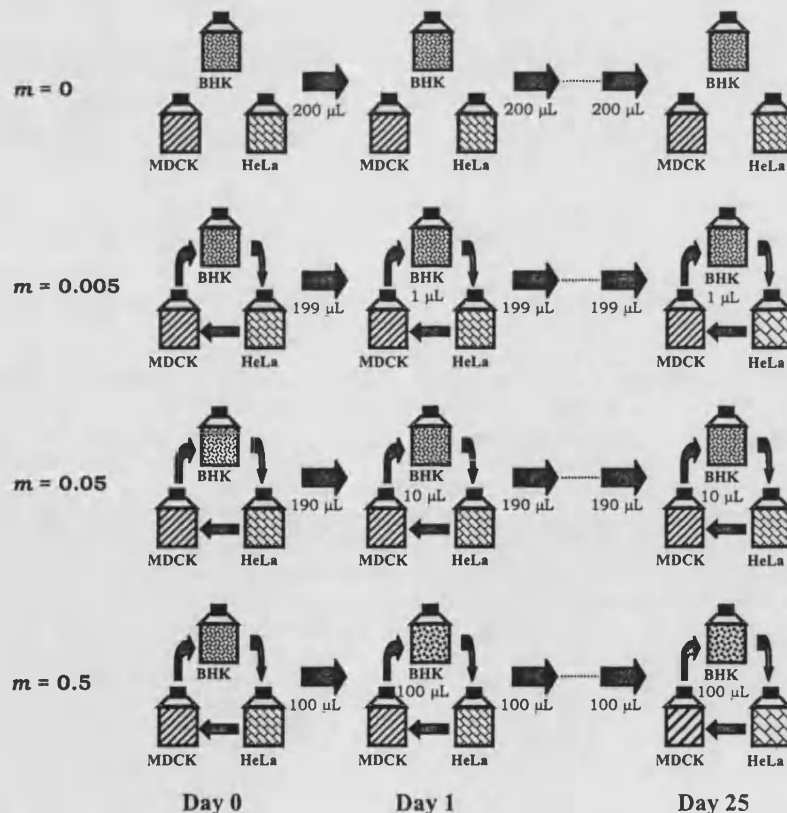


Fig. 1 Schematic representation of the experimental design. Large arrows represent a batch transfer between flasks. Small arrows represent the migration between adjacent flasks. The actual volumes transferred, after the corresponding dilutions (see 'Experimental populations' section), are indicated. Each cell type is represented by a different filling in the flasks.

to the ancestral one as a measure of the degree of adaptation to each cell type. A mathematical model was developed to describe the dynamics of viral populations under the experimental set-up. The model was useful to make testable predictions about the outcome of the experiment as well as to help in understanding the experimental results.

A mathematical model of viral migration among heterogeneous cellular environments

The model developed here accounts for the temporal and spatial peculiarities of our experiment (Fig. 1) and, consequently, can be divided into two different steps: (1) the growth of and competition between coexisting viral genotypes in a given tissue and (2) the random sampling of the final population and subsequent migration among tissues.

At any moment, the viral population within a tissue could be composed of four different genotypes, *C*, *B*, *H* and *M*. *C* represents an ancestral genotype (MARM *C* in our laboratory experiments), *B* represents a hypothetical mutant genotype beneficial on baby hamster kidney (BHK-K) cells (see Materials and methods for a definition of each cell type used in the experiments), *H* corresponds to a hypothetical mutant genotype beneficial in human epithelial carcinoma (HeLa) cells and *M* represents a hypothetical mutant beneficial in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. Every mutant enjoys an increased replication rate in their own cell type but pays a certain cost in the alternative ones. The growth of each genotype and the competition among them within a tissue were modelled according to the following set of differential equations, which are a modification of those successfully used in the past to describe the evolution of competing viral populations by Solé *et al.* (1998) and Miralles *et al.* (2001):

$$\frac{dx_{i,T}}{dt} = \frac{x_{i,T}}{K_T} \left[r_{i,T}(K_T - x_{i,T}) - \sum_{j \neq i} r_{j,T} x_{j,T} \right] - (1 - e^{-\mu_D}) x_{i,T} + \mu_B e^{-\mu_B} x_{C,T} \quad (1)$$

where $x_{i,T}$ represents the number of viruses of the *i* genotype ($i = C, B, H$ and *M*), $r_{i,T}$ their growth rate and K_T the carrying capacity (i.e. final viral yield) in the *T*-cell type ($T = \text{BHK-K, HeLa and MDCK}$). The first term in the equation is a generalization of Lotka-Volterra's competition equations (Bulmer, 1994) for four competitors, but adapted to the case of viral populations (Solé *et al.*, 1998). The second term incorporates the effect of deleterious mutations arising when the $x_{i,T}$ individuals replicate. The third term incorporates the production of individuals $x_{i,T}$ by beneficial mutation during the replication of individuals of genotype *C*. This last term equates zero when the equation is written for $i = C$ because *C* genotypes cannot be created by beneficial mutation.

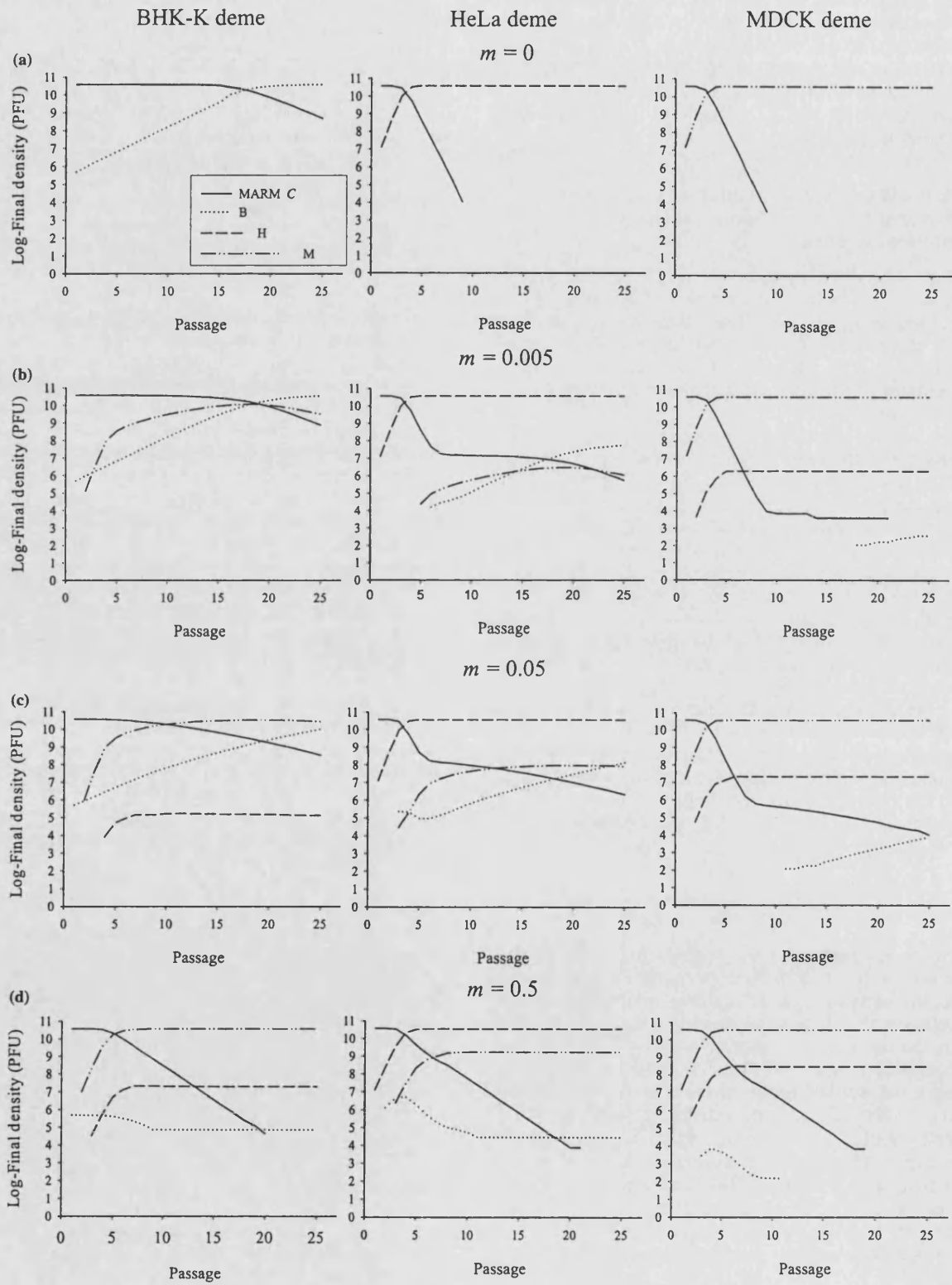
The three different tissues were rearranged in a triangle and migration among them took place in a clockwise fashion. At each passage, tissues were infected with X_T particles that came from two different sources. A fraction, $1 - m$, came from the same type of tissue but another fraction, m , came from the tissue occupying the previous corner in the triangle:

$$X_T = (1 - m)K_T + mK_{T-1} \quad (2)$$

How many viruses in X_T belong to each one of the four genotypes (*C*, *B*, *H* and *M*) depends on how many individuals of each genotype were present at populations *T* and $T - 1$, and these numbers, indeed, are described by eqn 1.

To explore the behaviour of the model, we performed the computer simulation shown in Fig. 2. Instead of using arbitrary values for the parameters, we put our simulations in a biological context by using empirically determined parameters. The growth rate parameters used were adapted from the fitness determinations reported in Turner & Elena (2000) and are presented in Table 1. The simulation began with the three tissues inoculated with $1.5 \times 10^5 - 1 = 149\,999$ plaque-forming units (PFU) of MARM *C* and 1 PFU of the corresponding beneficial mutant. Then, the population grew until reaching a carrying capacity of $K_T = 3.75 \times 10^{10}$ PFU, equal for all three cell types. The composition of the population was tracked over time. At every next 25 passages, the initial population size was set to $X_T = 10^5$ PFU, with the proportion of resident and immigrant virus being determined by eqn 2. Therefore, what we simulated was a beneficial mutation present on each cell type and we tracked its fate in the entire metapopulation. Deleterious mutations arose according to a Poisson process with an average mutation rate $\mu_D = 1.2$ per genome and per generation (Elena & Moya, 1999). For simplicity, deleterious mutations were all considered lethal; therefore, the fraction of genotypes that do not reproduce each generation due to the presence of at least one deleterious mutation is given by $1 - e^{-\mu_D}$. The probability of a *C* genotype producing *de novo* one of the three beneficial mutations considered was also Poisson distributed with an average mutation rate $\mu_B = 6.4 \times 10^{-8}$ per genome and per generation (Miralles *et al.*, 1999a). Similarly, the fraction of genotypes that carry one of the three beneficial mutations produced by recurrent mutation is $\mu_B e^{-\mu_B}$. For simplicity, double mutants were neglected.

Fig. 2 Computer simulations of the competition-migration model. The first column corresponds to the dynamics of each genotype (see text) on BHK-K cells, the second column to the dynamics on HeLa cells and the third column to the dynamics on MDCK cells. Each row corresponds with an increasing frequency of migration per passage: (a) no migration, $m = 0$, (b) $m = 0.5\%$ immigrants, (c) $m = 5\%$ immigrants and (d) $m = 50\%$ immigrants.



**Table 1** Fitness parameters used in the simulations shown in Fig. 2 (adapted from Turner & Elena, 2000). The mutants *B*, *H* and *M* were adapted to BHK-K, HeLa, and MDCK, respectively.

Virus	Cell type where fitness was estimated		
	BHK-K	HeLa	MDCK
MARM C (ancestral)	0.9493	0.7828	0.7717
<i>B</i>	1	0.8822	0.5037
<i>H</i>	0.8017	1	0.6376
<i>M</i>	0.9680	0.7509	1

Numerical analysis of the model

Figure 2 shows the results of the simulations. Passage number is represented on the *x*-axis, whereas the log-transformed final density of each viral genotype at the end of the passage is represented on the *y*-axis. Several conclusions can be drawn from the plots. In the absence of migration (first row), a mutant's frequency increased proportionally to its beneficial effect. With the parameters used, *H* and *M* viruses reached fixation after 25 transfers. By contrast, despite becoming the most abundant genotype, the *B* virus did not completely outcompete the ancestral *C* virus, which still represents 1.3% of the total population. When migration took place, dynamics become more complex, although general trends are still appreciable. First, the mutants spread out on the entire metapopulation, increasing the polymorphism of local populations. Second, as it happened in the case of no migration, the rate at which a given mutant increased frequency in the tissue wherein it was beneficial was proportional to its beneficial fitness effect.

Analysing the evolution of each genotype separately, it is interesting to notice that the ancestral *C* (solid line) did not disappear from the metapopulation when $m \leq 5\%$; instead, it remained present on BHK-K and HeLa cells. For $m = 0.5\%$, the *C* was displaced after 21 passages in MDCK cells. At the highest migration rate, however, the ancestral *C* virus was always eliminated. In BHK-K the density of the ancestral *C* genotype declined monotonically, whereas in the HeLa and MDCK cell types the density declined in a step-like fashion. The mutant *B* (dotted line) still got numerically dominant in BHK-K cells for the lowest migration rate, but its abundance decreased as migration rate increased. It was the second most abundant genotype in HeLa cells for $m \leq 5\%$ but not for the highest migration rate. Its abundance in MDCK was always low, becoming transient at the highest migration rate. The mutant *H* (dashed lines) became numerically dominant soon on HeLa cells regardless of the migration rate imposed. Afterwards, this population exported this variant at a rate proportional to m , reaching also high frequencies in all other tissues. Especially interesting, its frequency in BHK-K cells was even higher than the corresponding beneficial *B*

variant when $m = 50\%$. Finally, the mutant *M* (dotted-dashed line) has a similar behaviour; it reached numerical dominance in MDCK cell regardless of the migration rate imposed. Afterwards, it was exported to BHK-K cells where it became the second most abundant genotype at $m = 0.5\%$ (although an equilibrium density was not reached after 25 passages) and the most abundant one at the higher migration rate. At the highest migration rate, it became the second most abundant genotype also in HeLa cells. For $m = 50\%$, both *H* and *M* reached equilibrium densities, whereas *B* only reached an equilibrium density in BHK-K and HeLa cells.

Analysing each tissue separately, BHK-K cells constituted a permissive environment (first column in Fig. 2). All three beneficial genotypes reached densities high enough to survive the sampling phase of the experiment. Furthermore, with the exception of $m = 50\%$, also the *C* genotype was still present at the end of the experiment. For HeLa cells the picture was similar; this cell type supported the coexistence of all three beneficial mutants. In MDCK cells only the *M* virus had fitness higher than the ancestral *C* (fourth column in Table 1). Hence, it would be expected that these two genotypes would dominate the MDCK population. However, due to the incoming virus from HeLa cells, the *H* virus reached densities always higher than the ancestral *C*. Accordingly, the density of *H* virus on MDCK increased with migration rate.

Figure 2 shows that the abundance of a beneficial mutant in its own environment decreases with increasing migration rates. The reason for this decline is two-fold: (1) it is constantly being removed by migration and (2) immigrants are arriving which are not well adapted to this environment. Table 1 shows that adaptation was tissue-specific; therefore, immigrants would be characterized by a low fitness in the local cell type. Consequently, the mean fitness for the population would be decreased proportionally to the rate at which immigrants arrived. Population fitness in the *j*th cell type (\bar{W}_j) can be computed using the expression $\bar{W}_j = \sum_{i=1}^4 p_{ij} W_{ij}$, where p_{ij} stands for the frequency of the *i*th genotype present in the *j*th cell type (computed from Fig. 2) and W_{ij} is the fitness of each mutant on the corresponding cell type (taken from Table 1). As it is apparent from Table 2, fitness in a certain cell type always decreases with migration rate. For the smallest migration rate, the reduction in fitness compared with the nonmigration case was 0.30% for BHK-K populations, 0.02% for HeLa populations and <0.01% for

Table 2 Fitness estimated for each population on its home cell type (\pm SEM) in the simulation experiment.

<i>m</i>	BHK-K	HeLa	MDCK
0	0.9993 \pm 0.0057	1.0000 \pm 0.0000	1.0000 \pm 0.0000
0.005	0.9963 \pm 0.0111	0.9998 \pm 0.0048	1.0000 \pm 0.0027
0.05	0.9763 \pm 0.0144	0.9990 \pm 0.0137	0.9998 \pm 0.0087
0.5	0.9679 \pm 0.0038	0.9885 \pm 0.0523	0.9971 \pm 0.0321

MDCK populations. For the intermediate migration rate, reductions in fitness were larger: 2.30% for BHK-K populations, 0.10% for HeLa populations and 0.02% for MDCK populations. Finally, for the largest migration rate, fitness reduction was even larger: 3.14% for the BHK-K, 1.15% for the HeLa and 0.29% for the MDCK populations. Hence, simulation results allow us to make the following first prediction: *The fitness of a viral population in its home cell type decreases with migration rate.*

Figure 2 also shows that the density of a mutant in a certain cell type decreases with the distance of this cell type to its home cell type. (The distance between two tissues was quantified as the number of counter-clockwise steps necessary to go from the first to the second.) Hence, we expected that the performance of a viral population in a particular cell type would also decrease with distance as a consequence of two factors (1) the number of viruses adapted to a given cell type decreases with distance (Fig. 2) and (2) tissue-specific beneficial mutations accumulated in the meantime might be deleterious in the tissue of interest (Table 1). Our simulations support this expectation. After computing population fitness, as indicated above, and averaging the three values obtained for the same distances from home, we found negative correlations with distance for all migration rates (Table 3). Furthermore, inspection of these correlation coefficients suggests that the magnitude of the correlation decreased with migration rate. Hence, based on these results, we make the following two predictions: (1) *the fitness of a viral population in any cell type different from its home type decreases with the distance between tissues and (2) this effect vanishes as migration rate increases.*

These three predictions will be experimentally tested in the rest of this paper.

Materials and methods

Viruses and host cells

The two clones employed in the present study were derived from the Mudd-Summer strain of the vesicular

stomatitis virus Indiana serotype. MARM C had an Asp₂₅₉ to Ala substitution in the G surface protein. This substitution allowed replication under monoclonal antibody (mAb) I₁ concentrations that neutralized the wild-type (Vandepol *et al.*, 1986). All experiments were done with MARM C. The other virus clone was a mAb I₁-sensitive, surrogate wild-type. This wild-type was employed as a common competitor during the competition experiments. To avoid further genetic change in the wild-type clone, a large volume with a high titre ($\sim 10^{10}$ PFU mL⁻¹) was produced and kept at -80 °C in 1 mL aliquots. The fitness of MARM C relative to wild-type has been previously determined, always giving a relative value of one (Holland *et al.*, 1991; Miralles *et al.*, 1999a,b; Turner & Elena, 2000; Quer *et al.*, 2001). Thus, the mutation conferring the MARM phenotype can be considered to be selectively neutral in the competition assay environment.

Three mammalian host cells were used: BHK-K, HeLa and MDCK cells. BHK-K cells were originally derived from fibroblasts, cells that live in the spaces between other cells and secrete the proteins of the extracellular matrix; the HeLa cells were derived from tumour tissues of the human cervix; MDCK were taken from epithelial cells covering the bounding cavities of canine kidney tubules (Adams, 1990).

Cell monolayers were grown in Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) containing either, 5% heat-inactivated new-born bovine calf serum and 0.06% proteose peptone 3 (BHK-K), or 10% heat-inactivated foetal calf serum (HeLa and MDCK). Cells were grown in 25 cm² plastic flasks, containing 5 mL of supplemented medium, to a density of $\sim 10^5$ cells cm⁻². Cells were incubated at 37 °C, 95% relative humidity and 5% CO₂ atmosphere.

Experimental populations

Figure 1 shows a schematic representation of our experimental design, which fully matches the one used in our previous simulations. We followed a design similar to the one described in Miralles *et al.* (1999b) but with four major differences. First, we used only three patches. Second, now each patch was constituted of a different cell type. Third, we used four different migration rates, 0, 0.5, 5 and 50% immigrants per daily transfer. Fourth, we waited 48 h before sampling the populations to allow for exhaustion of HeLa and MDCK cells. (At the beginning of the experiment, MARM C replicated slowly in these cell types.) Each flask simulated a tissue within a body. After 2 days of infection and completion of the cytopathic effect, the number of virus particles was about 5×10^9 mL⁻¹. On the first day, three flasks for each of the four migration rates were infected with equal samples of the original MARM C clone. These three isolated populations were ordered in a triangle (metapopulation) and migration always occurred in a clockwise direction

Table 3 Correlation between the fitness in a given cell type and its distance to the cell type from where the population was isolated. The strength of this correlation was assessed using Pearson's correlation coefficient. Each fitness value represents the average of the three estimates obtained for equidistant cell types.

Distance from home cell type	Migration rate			
	0	0.005	0.05	0.5
0	0.9998	0.9987	0.9917	0.9845
1	0.8288	0.8249	0.7973	0.7907
2	0.6866	0.7010	0.8066	0.8540
Correlation coefficient	-0.7585	-0.7649	-0.6200	-0.4216

from BHK-K → HeLa → MDCK and back to BHK-K. Every 48 h post-infection, and until the end of the experiment, a sample of the supernatant from each flask was taken and diluted 10^{-4} -fold in fresh DMEM. In order to infect the next flask, we always added 200 μ L of diluted virus to the corresponding fresh monolayer. So as to avoid the appearance of defective interfering particles, the multiplicity of infection under this regime of batch transfers was kept as low as ~ 0.04 virus per cell. The difference between the four migration regimes is based on whether the sample comes from the same *i*-flask or from the migration of virus from the neighbouring *i* - 1-flask into the population resident in the *i*-flask at the appropriate proportion. After 45 min of adsorption, inocula were removed and fresh media added. Each evolution line was maintained for a total of 25 transfers, the equivalent of ~ 100 generations of RNA(+)-mediated replication (Miralles *et al.*, 2000). This basic design was three-fold replicated.

Fitness assays

We used the method described in Holland *et al.* (1991). In brief, a MARM population was mixed 1 : 1 with wild-type and the mixture was used to infect a cell monolayer as described above. Progeny was collected after 48 h, diluted 10^4 -fold and used to initiate the next competition transfer by infection of a fresh monolayer. At least two competition passages were carried out for each fitness estimate. The ratio of MARM C to wild-type was determined by plating with and without mAb I₁ in the overlay agarose medium at each transfer. These determinations gave the proportion of MARM C to wild-type at transfer *t*, R_t . The fitness of MARM C relative to wild-type was estimated as $W = 1 + (b/\ln D)$, where *b* is the regression coefficient of the $\ln R_t$ as a function of transfer and *D* is the dilution factor (Levin *et al.*, 2000).

In order to assess the extent to which each evolved population was adapted to the three cell types, fitness was independently estimated in all three. Hence, for each population, we had three different fitness estimates.

Experimental results

Extent and specificity of adaptation in the absence of migration

First, we were interested in testing whether adaptation took place to each cell type in the absence of migration. Effectively, adaptation was tissue-specific, as described elsewhere (Holland *et al.*, 1991; Novella *et al.*, 1999; Weaver *et al.*, 1999; Crill *et al.*, 2000; Turner & Elena, 2000; Cooper & Scott, 2001). Figure 3 shows the average fitness (with standard errors) across replicates for each end-point population measured in its home and in every alternative environment. We analysed these data using a mixed ANOVA model wherein cell types of isolation and

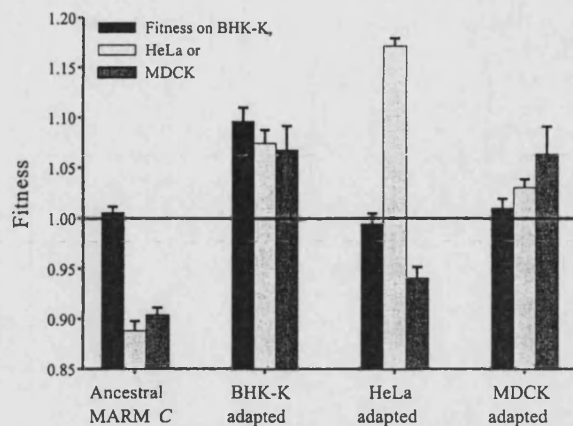


Fig. 3 Specificity of the adaptation to each cell type during evolution in the absence of migration between tissues. Fitness was measured on each cell type. Error bars represent one standard error of the mean ($n = 9$).

competition were treated as orthogonal fixed factors and the experimental replicate was treated as a random factor nested within the interaction of the two fixed factors. Three major conclusions can be drawn. First, significant differences were detected among viral populations evolved on different cell types ($F_{2,23} = 6.7478$, $P = 0.0049$). Second, the fitness estimates depended upon the cell type wherein fitness was assayed ($F_{2,23} = 13.9072$, $P = 0.0001$). Third, fitness differences among viral populations evolved on different cell types depended on the cell type used for the competition experiments ($F_{4,23} = 20.8345$, $P < 0.0001$). Figure 3 suggests that this significant interaction might be due to evolved populations performing better in their home cell type than in the alternative ones. To address whether this possibility was statistically supported by data, we ran one-way ANOVAs using competition cell type as a fixed factor and, whenever differences between competition cell types were found, Tukey's *post hoc* tests to define significant homogeneous groups. By doing so, we found that the only case where fitness was significantly higher in the home cell type than in both alternative cell types was for HeLa-adapted populations (three homogeneous groups HeLa > BHK-K > MDCK; Tukey's $P = 1$). Hence, we conclude that virus evolved on HeLa cells paid a much higher cost in alternative cell types than a virus evolved in any other tissue. Any mutation required for the virus to efficiently replicate on HeLa seems to be detrimental in any alternative environment. In other words, in the absence of migration, HeLa selected for very specialist viruses. On the other hand, mutations responsible for adaptation to BHK-K were not detrimental to the alternative environments and the virus can be considered as generalist (a single homogeneous group BHK-K = HeLa = MDCK; Tukey's $P = 0.6730$). MDCK

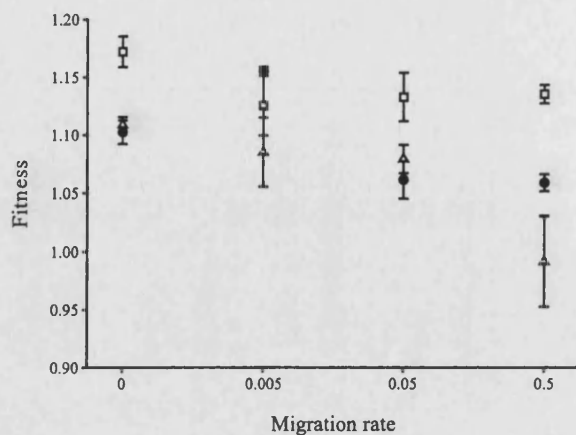


Fig. 4 Effect of migration rate on the magnitude of viral adaptation to the cell type from which the viral population was isolated. A significant negative correlation was obtained. Error bars correspond with one standard error of the mean ($n = 3$). Black circles correspond to BHK-K-evolved populations, white squares to HeLa-evolved populations and grey triangles to MDCK-evolved populations.

cells were intermediate, as previously reported by Turner & Elena (2000): they selected viruses significantly less fit on BHK-K but not significantly worse on HeLa (two homogenous groups BHK-K < HeLa = MDCK, Tukey's $P \geq 0.3286$).

Does migration rate affect the degree of adaptation to each tissue?

Our simulation model predicted that the fitness of a viral population in its own cell type should decrease with migration rate. To test this prediction, Fig. 4 shows the relationship between the fitness measured in the cell type where a viral population was isolated and the migration rate. Clearly, migration between tissues had a negative effect on the adaptation to a given cell type. The larger the migration rate, the less locally adapted the population was (partial correlation coefficient controlling for the cell type of isolation $r = -0.6331$, 33 d.f., one-tail $P < 0.0001$). This result confirms the first prediction we made from the simulations.

Does the distance to a certain cell type affect the performance on it?

Our simulations allowed us to make two predictions regarding the fitness of a viral population in a given tissue located away from its home tissue. First, we predicted that fitness in a tissue should be a decreasing function of distance from the home tissue. To test this prediction, Fig. 5a shows the correlation with distance for the four different migration rates. A significant partial correlation coefficient (controlling for migration

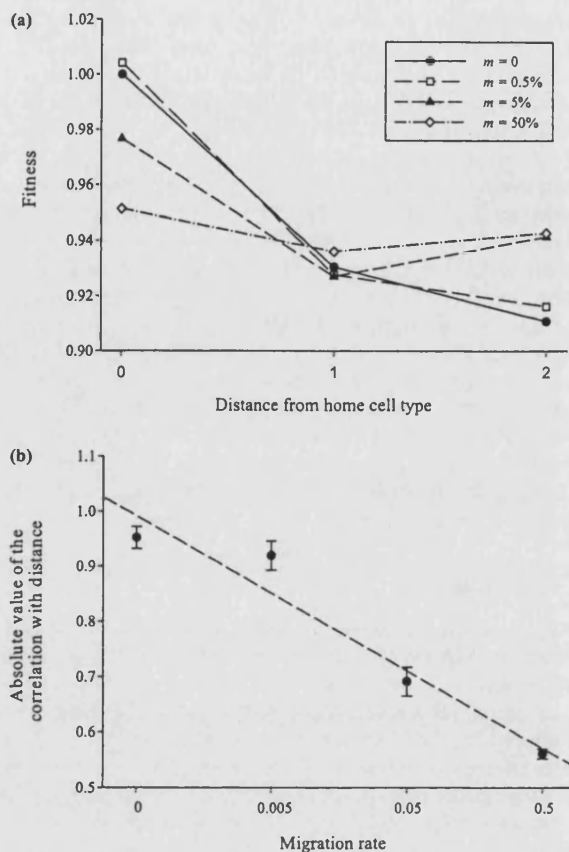


Fig. 5 (a) Effect of the distance from a given cell type on the fitness of a viral population in that cell type. Fitness decreased with distance. Distance was defined as the number of intermediate patches between a given cell type and the patch where the population was isolated (in a counter-clockwise way). Different migration rates (m) are represented by different symbols as indicated in the inner box. For clarity, error bars for each mean value are not presented. (b) Migration reduces the correlation with distance. Plot shows the absolute value of the correlation between fitness and distance as a function of the migration rate rank. Error bars represent the standard error of the correlation coefficient.

rate) between the fitness of each evolved viral population on every cell type and the distance to them suggests that, overall, population fitness on a given cell type decreases with the distance from it ($r = -0.7654$, 33 d.f., one-tail $P = 0.0015$), as we hypothesized. However, a Tukey's *post hoc* test (using distance as a fixed factor in a one-way ANOVA) shows that environmental effects can be partitioned into two groups: the environment where the viral populations evolved and away from it ($P \geq 0.9766$). Hence, we cannot discard the possibility that the above correlation was entirely driven by a difference between fitness at the own cell type and at different cell types.

Simulations also predicted that the correlation with distance should decrease as migration rate increases. Figure 5a already suggests that the absolute value of the correlation with distance decreases with migration rate. This trend is shown in Fig. 5b and, indeed, it was statistically significant ($r = -0.9675$, 2 d.f., one-tail $P = 0.0163$), confirming the prediction drawn from our simulation model. By increasing migration rate, more and more viruses adapted to the cell type of interest would spread over the entire metapopulation, increasing the average population fitness on that environment and, hence, reducing the negative correlation with distance. In this sense, high migration rates create generalist populations constituted by individuals specialized in different environments.

Discussion

In the present study, we explore how the degree of viral adaptation is jointly affected by population structure and environmental heterogeneity. These two issues had been already addressed separately. Several studies have shown that viral populations readily adapt to heterogeneous temporally fluctuating environments (Novella *et al.* 1999; Weaver *et al.*, 1999; Turner & Elena, 2000). A common feature of all these studies is the fact that a viral population evolved under such conditions becomes a generalist without paying fitness costs in any of the alternating environments. By contrast, viral populations evolved in a constant cell environment become specialist, paying fitness costs in any alternative environment (Holland *et al.*, 1991; Novella *et al.*, 1999; Weaver *et al.*, 1999; Crill *et al.*, 2000; Turner & Elena, 2000; Cooper & Scott, 2001). The present results agree well with the previous ones. Migration among heterogeneous cell environments selects for generalist viruses with increased fitness in all the alternative cell types. By contrast, in the absence of migration, viral populations became specialist for their host cell type. This result supports the general view that migration must be sufficiently low relative to the strength of selection to generate local adaptation to each patch of the environment (Brown & Pavlovic, 1992; Holt, 1996; Kawecki, 2000). Actually, the conditions for the coexistence of specialists in a heterogeneous environment are very restrictive. If the selective differences among patches are not so large, as it is the case here for BHK-K and MDCK cells, the balance of production from each patch must be roughly equal in order to maintain diversity (Maynard Smith & Hoekstra, 1980; van Tienderen, 1991). This implies that there must be a lot of opportunities for generalists to evolve in heterogeneous environments, even if selection favours specialization to the most productive patch in the short term.

In contrast, fewer experiments had been carried out for testing the role of metapopulation structure in viral evolution. Miralles *et al.* (1999b) found that migration among homogeneous patches increased the overall

fitness, but decreased the variance among patches. Our choice of migration rate values might be considered as arbitrary and, perhaps, far from those expected to be important in the real world. It would be desirable to test many more migration rates, but then the size of the experiment makes it untreatable. However, in order to put our conclusions in a real context of parameters, we can assume the following experiment. Let us imagine an individual infected by a variant of any virus. This individual moves into a population where the resident variant is different. Assuming that the viral load per infected individual is a constant, then the rate of migration is $m = 1/N$, where N is the host population size. Clearly, for populations of moderate size, the migration rate is well below our lowest value of $m = 0.005$. The problem is still the lack of information about a true value for migration rate in natural populations. In a pioneering study done by Grassly *et al.* (1999) with HIV-1, migration rate was indirectly inferred from sequence data to be as high as $m = 0.0039$ per day (averaging estimates from subtypes A and B and genes *env* and *gag*), a value in the same order of magnitude of our lower migration rate.

A different picture can be drawn for migration among tissues within an infected individual. In this case, it is logical to believe that migration rates must be much higher. However, in contrast with the growing experimental evidence for viral heterogeneity among tissues and organs, the proper analyses to infer gene flow are still under way. Nevertheless, qualitative conclusions about the magnitude of within-patient migration can be drawn. Delwart *et al.* (1998) analysed HIV-1 clones isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and non-spermatozoal semen mononuclear cells (NSMC) from five patients. In all five patients analysed, they found that isolates from both cell types clustered together significantly, indicating a continuous incorporation of variants from one tissue into the other. Furthermore, some significant clusters were exclusively formed by isolates from NSMC, some others by a majority of isolates from NSMC, but also containing few PBMC isolates. This last observation could be a reflection of the role played by blood cells in the spread of variants through the entire body. Similar results were obtained by van't Wout *et al.* (1998) also with isolates of HIV-1 from different organs. They also found significant clusters containing isolates from different tissues. Poss *et al.* (1998) made an excellent and detailed study about the degree of differentiation between HIV-1 isolated from PBMC and cervical secretions. They found a significant phenetic structure for sequences from these two cellular origins. In addition, for all the patients analysed, they found that variants isolated from mucose, at any time point, were different from samples taken at the preceding time points, indicating a continuous input of variants from a different reservoir. All of these examples clearly suggest that the migration rate among organs within patients should be

quite large and within the range of values employed in our study.

Our simulations make two assumptions that may clearly be an oversimplification. For instance, we assumed that selection only took place by direct competition between coexisting genotypes in a given cell type. In other words, we are assuming that all four genotypes were able to replicate in all three different cell types. In this sense, different cell types only represent a form of soft selection. In real populations, however, hard selection can also be acting as a consequence of an extrinsic mortality determined by the different environmental conditions represented by each cell type (Chao *et al.*, 2000). If a certain proportion of the immigrating population dies off immediately after arriving to a certain cell type as a consequence of its inability to replicate, the total amount of selection (hard + soft) experienced by the viral population would be larger than we assumed in our simulations. Hence, the rate of evolution and the extent of adaptation will be greater than we expected. Another critical assumption is our consideration of only four predefined competing genotypes. Due to the extremely variable nature of RNA viral populations, it is highly likely that many more variants would coexist, making competition even stronger.

Our simulation study suggests the existence of a negative correlation between viral fitness in each cell type and the spatial distance to it. However, our experimental results only gave partial support to this prediction. Such negative correlation between distance and virulence-related traits is not rare in epidemiological literature. For instance, it has recently been reported in field data from the recent outbreak of foot-and-mouth disease virus in the UK (Keeling *et al.*, 2001) that the transmission kernel decreases with distance. In this particular case, the spatial heterogeneity among farms was in terms of animal species composition and migration took place by means of frequent local movements with occasional long jumps.

Acknowledgments

We thank Drs Rees Kassen, Cecilio López-Galíndez, Rosario Miralles, Paul E. Turner and Susanna K. Remold for stimulating discussions and valuable comments, and O. Cuesta for excellent technical support. This work was supported by grant BMC2001-3096 from the Spanish DGES and by a pre-doctoral fellowship to J.M.C. from the MCyT.

References

- Adams, R.L.P. 1990. *Cell Culture for Biochemists*. Elsevier, Amsterdam.
- Bell, G.A.C. 1997. Experimental evolution in *Chlamydomonas*. I. Short-term selection in uniform and diverse environments. *Heredity* **78**: 490–497.
- Brown, J.S. & Pavlovic, N.B. 1992. Evolution in heterogeneous environments: effects of migration on habitat specialization. *Evol. Ecol.* **6**: 360–382.
- Bulmer, M. 1994. *Theoretical Evolutionary Ecology*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Chao, L., Hanley, K.A., Burch, C.L., Dahlberg, C. & Turner, P.E. 2000. Kin selection and parasite evolution: higher and lower virulence with hard and soft selection. *Q. Rev. Biol.* **75**: 261–275.
- Cooper, L.A. & Scott, T.W. 2001. Differential evolution of eastern equine encephalitis virus populations in response to host cell type. *Genetics* **157**: 1403–1412.
- Crill, W.D., Wichman, H.A. & Bull, J.J. 2000. Evolutionary reversals during viral adaptation to alternating hosts. *Genetics* **154**: 27–37.
- Delwart, E.L., Mullins, J.I., Gupta, P., Learn, G.H. Jr., Holodniy, M., Katzenstein, D., Walker, B.D. & Singh, M.K. 1998. Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen. *J. Virol.* **72**: 617–623.
- Elena, S.F. & Moya, A. 1999. Rate of deleterious mutation and the distribution of its effects on fitness in vesicular stomatitis virus. *J. Evol. Biol.* **12**: 1078–1088.
- Frost, S.D.W., Dumaurier, M.J., Wain-Hobson, S. & Brown, A.J.L. 2001. Genetic drift and within-host metapopulation dynamics of HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 6975–6980.
- Futuyma, D.J. & Moreno, G. 1988. The evolution of ecological specialization. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **19**: 207–233.
- Grassly, N.C., Harvey, P.H. & Holmes, E.C. 1999. Population dynamics of HIV-1 inferred from gene sequences. *Genetics* **151**: 427–438.
- Holland, J.J., dela Torre, J.C., Clarke, D.K. & Duarte, E.A. 1991. Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J. Virol.* **65**: 2960–2967.
- Holt, R.D. 1996. Adaptive evolution in source-sink environments: direct and indirect fitness effects of density-dependence on niche evolution. *Oikos* **75**: 182–192.
- Kassen, R. 2002. The experimental evolution of specialists, generalists and the maintenance of diversity. *J. Evol. Biol.* **15**: 173–190.
- Kassen, R. & Bell, G. 1998. Experimental evolution in *Chlamydomonas*. IV. Selection in environments that vary through time at different scales. *Heredity* **80**: 732–741.
- Kawecki, T.J. 1994. Accumulation of deleterious mutations and the evolutionary cost of being a generalist. *Am. Nat.* **144**: 833–838.
- Kawecki, T.J. 2000. Adaptation to marginal habitats: contrasting influence of the dispersal rate on the fate of alleles with small and large effects. *Proc. R. Soc. Lond. B* **267**: 1315–1320.
- Keeling, M.J., Woolhouse, M.E.J., Shaw, D.J., Matthews, L., Chase-Topping, M., Haydon, D.T., Cornell, S.J., Kappey, J., Wilesmith, J. & Grenfell, B.T. (2001). Dynamics of the 2001 UK foot and mouth epidemic: stochastic dispersal in a heterogeneous landscape. *Science* **294**: 813–817.
- Levin, B.R., Perrot, V. & Walker, N. 2000. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* **154**: 985–997.
- Maggi, F., Fornai, C., Vatteroni, M.L., Giorgi, M., Morrica, A., Pistello, M., Cammarota, G., Marchi, S., Cicciorossi, P., Bionda, A. & Bendinelli, M. 1997. Differences in hepatitis C virus quasispecies composition between liver, peripheral blood mononuclear cells and plasma. *J. Gen. Virol.* **78**: 1521–1525.

- Maynard Smith, J. & Hoekstra, R. 1980. Polymorphism in a varied environment: how robust are the models? *Genet. Res.* **35**: 45–57.
- Miralles, R., Gerrish, P.J., Moya, A. & Elena, S.F. 1999a. Clonal interference and the evolution of RNA viruses. *Science* **285**: 1745–1747.
- Miralles, R., Moya, A. & Elena, S.F. 1999b. Effect of population patchiness and migration rates on the adaptation and divergence of vesicular stomatitis virus quasispecies populations. *J. Gen. Virol.* **80**: 2051–2059.
- Miralles, R., Moya, A. & Elena, S.F. 2000. Diminishing returns of the population size in the rate of RNA virus adaptation. *J. Virol.* **74**: 3566–3571.
- Miralles, R., Ferrer, R., Solé, R.V., Moya, A. & Elena, S.F. 2001. Multiple infection dynamics has pronounced effects on the fitness of RNA viruses. *J. Evol. Biol.* **14**: 654–662.
- Novella, I.S., Hershey, C.L., Escarmis, C., Domingo, E. & Holland, J.J. 1999. Lack of evolutionary stasis during alternating replication of an arbovirus in insect and mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **287**: 459–465.
- Poss, M., Rodrigo, A.G., Gosink, J.J., Learn, G.H., de Vange Panteleeff, D., Martin, H.L. Jr., Bwayo, J., Kreiss, J.K. & Overbaugh, J. 1998. Evolution of envelope sequences from the genital tract and peripheral blood of women infected with clade A human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **72**: 8240–8251.
- Quer, J., Hershey, C.L., Domingo, E., Holland, J.J. & Novella, I.S. 2001. Contingent neutrality in competing viral populations. *J. Virol.* **75**: 7315–7320.
- Solé, R.V., Ferrer, R., González-García, I., Quer, J. & Domingo, E. 1998. Red Queen dynamics, competition, and critical points in a model of RNA virus quasispecies. *J. Theor. Biol.* **198**: 47–59.
- Turner, P.E. & Elena, S.F. 2000. Cost of host radiation in an RNA virus. *Genetics* **156**: 1465–1470.
- Vandepol, S.B., Lefrancois, L. & Holland, J.J. 1986. Sequence of the major antibody binding epitopes of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus. *Virology* **148**: 312–325.
- van't Wout, A.B., Ran, L.J., Kuiken, C.L., Kootstra, N.A., Pals, S.T. & Schuitemaker, H. 1998. Analysis of the temporal relationship between human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. *J. Virol.* **72**: 488–496.
- van Tienderen, P.H. 1991. The evolution of generalists and specialists in spatially structured heterogeneous environments. *Evolution* **45**: 1317–1331.
- Weaver, S.C., Brault, A.C., Kang, W. & Holland, J.J. 1999. Genetic and fitness changes accompanying adaptation of an arbovirus to vertebrate and invertebrate cells. *J. Virol.* **73**: 4316–4326.
- Wong, J.K., Ignacio, C.C., Torriani, F., Havlir, D., Fitch, N.J.S. & Richman, D.D. 1997. In vitro compartmentalization of human immunodeficiency virus: evidence from the examination of *pol* sequences from autopsy tissues. *J. Virol.* **71**: 2059–2071.
- Woolhouse, M.E., Taylor, L.H. & Haydon, D.T. 2001. Population biology of multihost pathogens. *Science* **292**: 1109–1112.
- Zhu, T., Wang, N., Carr, A., Nam, D.S., Moor-Jankowski, R., Cooper, D.A. & Ho, D.D. 1996. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J. Virol.* **70**: 3098–3107.

Received 11 September 2002; revised 13 December 2002; accepted 27 February 2003

Capítulo III:

Dinámicas evolutivas en presencia de antivirales

Uno de los aspectos más destacados en virología es la enorme dificultad que supone la lucha contra las enfermedades virales. Parece increíble que los organismos más simples de este planeta sean al mismo tiempo de los más difíciles de combatir. En el caso de bacterias, se ha descubierto un gran número de antibióticos capaces de impedir su proliferación de forma efectiva (Goto *et al.*, 1963; Marinelli *et al.*, 1963; Stuart y Bruins, 1963). Sin embargo, no ocurre lo mismo en el caso de las infecciones virales. Una buena explicación a este hecho radica en las numerosas trabas que implica el tratar de distinguir los mecanismos en los que están implicados los virus de aquellos que afectan al hospedador. No obstante, en los últimos años se han obtenido diversos compuestos con capacidad antiviral, si bien los estudios *in vitro* que dan fe de su eficacia vienen seguidos de cuantiosos ensayos preclínicos con objeto de descartar una potencial toxicidad sobre los hospedadores.

La mejor alternativa en la búsqueda de antivirales está en la utilización de moléculas que sirven para una función única en el virus, sin análogos en el hospedador (Coen, 1991). Estos agentes pueden actuar a distintos niveles en el proceso de infección. En una etapa temprana, diversos factores pueden actuar en la adsorción, la penetración y el desensamblaje de las partículas virales. En estas etapas es requerida la interacción de estructuras específicas del virus con las membranas celulares, por lo que existen ciertas dianas para agentes antivirales.

Dentro del mecanismo de replicación, también es posible encontrar distintos agentes que afecten a polimerasas o quinasas implicadas en este proceso. Además, existe una estrategia más refinada en la búsqueda de antivirales y que se basa en el diseño de compuestos que interactúan con dianas específicas virales, no presentes en las proteínas celulares (Colonno, 1992; von Itzstein *et al.* 1993). De cualquier manera, e independientemente de la vía que se siga en la obtención de antivirales, el largo camino que va desde los ensayos *in vitro* hasta las pruebas preclínicas y la licencia final, suele concluir con mucha frecuencia en la demostración de la ineficacia de muchos de estos productos en la lucha contra las enfermedades virales (Stevens *et al.*, 1973; Myers *et al.*, 1975).

3.1. Antivirales sintéticos

El virus de la gripe (serotipo A) es inhibido por dos sustancias, la amantadina y la rimantadina, que son capaces de impedir la replicación de este virus a concentraciones permisivas *in vivo* (Skehel *et al.*, 1978; Aoki *et al.*, 1985). Sin embargo, se ha observado que durante la administración del tratamiento, tanto *in vitro* como *in vivo*, se produce una rápida emergencia de virus resistentes (Hayden *et al.*, 1989; Hayden y Hay, 1992), si bien estas variantes no parecen conferir una ventaja selectiva al virus en ausencia de antivirales, ya que no se han encontrado en la naturaleza.

Por otro lado, los herpesvirus constituyen un grupo ampliamente distribuido y que ha sido objeto de estudio por su gran impacto sobre la salud pública. Dos son las sustancias que podemos destacar, el aciclovir y el ganciclovir, siendo ambos análogos de la guanosina. Tanto uno como el otro son capaces de inhibir la replicación de diversos herpesvirus, pero mientras el aciclovir presenta poca toxicidad sobre el hospedador (Elion *et al.*, 1977; Schaeffer *et al.*, 1978), el ganciclovir es más tóxico, aunque más potente (Mar *et al.*, 1983). De nuevo, el empleo de estas sustancias ha dado lugar a la aparición de resistencias *in vitro* e *in vivo* (Coen y Shaffer, 1980; Field *et al.*, 1980; Erlich *et al.*, 1989; Englund *et al.*, 1990). Sin embargo, mientras que los virus resistentes a aciclovir presentan mutaciones puntuales en el gen de la tirosina quinasa (Darby *et al.*, 1986) o dobles mutantes en este gen y en el de la polimerasa, respecto al ganciclovir todos los mutantes caracterizados hasta la fecha contienen mutaciones en ambos genes (Lurain *et al.*, 1992; Sullivan *et al.*, 1993), lo que da idea de la existencia de ciertas diferencias en el modo de acción de ambas sustancias.

La ribavirina presenta actividad frente a un amplio rango de virus de DNA y de RNA. Se utiliza habitualmente en el tratamiento del virus de la hepatitis C (con interferón), y de otras infecciones endémicas en países tropicales (Snell, 2001). El modo de acción puede variar para distintos virus, si bien no está completamente definido. La ribavirina parece actuar inhibiendo la síntesis de la guanosina trifosfato, que es requerida tanto para la transcripción como para la replicación y el ensamblaje de los transcritos de RNA virales.

También parece actuar inhibiendo de forma competitiva a la polimerasa viral o por mutagénesis letal tras su incorporación durante la replicación viral (Cameron y Castro, 2001; Crotty *et al.*, 2001). Incluso combinaciones de estos mecanismos pueden ser importantes en la inhibición de distintos virus. No se han observado resistencias a ribavirina (Waugh *et al.*, 2002), provocado probablemente por la existencia de múltiples mecanismos de acción.

No cabe duda que el virus más ampliamente estudiado hasta la fecha ha sido el del SIDA, siendo numerosos los grupos que han invertido enormes esfuerzos en este trabajo. El SIDA es provocado por un retrovirus, el HIV-1, y el enorme impacto que tuvo su emergencia a nivel mundial a principios de los años 80 motivó la creación de innumerables proyectos de investigación con objeto de obtener una terapia capaz de detener el avance de la infección. Hasta la fecha, se han descubierto una gran cantidad de productos, fundamentalmente inhibidores de la replicación, pero también otros que afectan a otras enzimas virales. El AZT es el producto más conocido y uno de los primeros que surgieron (Mitsuya *et al.*, 1985). Este antiviral es un análogo de nucleósido y basa su acción en la inhibición de la transcriptasa reversa del virus, aunque los mecanismos moleculares aún no han sido completamente esclarecidos. Otros análogos de nucleósidos, como la didanosina y la zalcitabina, también han sido empleados en la lucha contra el SIDA. Sin embargo, el empleo de todos estos antivirales ha dado lugar a la aparición de resistencias contra todos ellos (Larder *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994). Otro grupo de agentes que actúa sobre la transcriptasa reversa pero que no está relacionado con los nucleósidos, son los llamados inhibidores específicos de la transcriptasa reversa (D'Aquila, 1994). Éste es el caso de la nevirapina, la atervedina o la delarvidina, entre otros, para los cuales se ha descrito la rápida aparición de cepas resistentes. Es precisamente esta emergencia prácticamente inmediata de resistentes lo que ha provocado la aparición de terapias que tratan de combinar la acción de estos dos tipos de agentes.

Las monoterapias se han demostrado poco eficaces en la lucha contra las infecciones virales, y en particular contra el virus del SIDA. Desde hace algunos años, la combinación de terapias parece ser el camino a seguir (Mazzulli y Hirsch, 1993; Caliendo y Hirsch, 1994). Son diversas las razones que aparecen

a favor del uso de terapias combinadas; por ejemplo, cabe esperar que el empleo de dos o más drogas conduzca a una actividad antiviral aditiva o incluso sinérgica, y de esta forma, se aumente la eficacia del tratamiento. Por otro lado, la toxicidad provocada por el uso de estos antivirales puede reducirse debido a que las dosis a aplicar sean menores. Además, la terapia puede dirigirse a distintos niveles del ciclo biológico del virus.

3.2. Interferones

Las infecciones virales desencadenan una serie de respuestas inmunes por parte de los hospedadores. Una de las respuestas primarias es la que llevan a cabo los interferones (IFNs), que presentan un papel relevante tanto en las enfermedades virales como en sus tratamientos (Biron, 1998; Goodbourn *et al.*, 2000; Levy y García-Sastre, 2001). Los interferones constituyen una familia de citoquinas producida por muchos tipos celulares en respuesta a las infecciones virales y a otros estímulos, clasificándose en dos grandes tipos. Los interferones tipo I engloban una superfamilia que abarca cuatro familias estructuralmente relacionadas: INF- α , INF- β , INF- ω y INF- τ . Estos interferones, cuyos miembros difieren dependiendo de la especie animal, son secretados a consecuencia de las infecciones virales en diversos tipos celulares. Los interferones tipo II (IFN- γ) son producidos por células T activadas y por macrófagos en estado de estimulación mitótica o antigénica del sistema inmune, estando implicados en la respuesta inmune específica de antígeno (He y Katze, 2002).

El mecanismo de regulación del sistema de los interferones puede simplificarse de la siguiente manera: una vez los virus infectan las células, algunos productos virales, fundamentalmente el RNA de doble cadena, induce la síntesis de interferón, que es secretado. Estas proteínas se unen a los dominios extracelulares de los receptores específicos de la superficie celular, con la consiguiente activación de una vía de señalización intracelular que provoca la expresión de un gran número de genes. Los productos de estos genes inhiben diversas etapas de la replicación viral, mediando de este modo los efectos pleiotrópicos de los interferones (Sen y Ransohoff, 1993).

Los interferones no sólo contribuyen a la estimulación del sistema inmune (Biron, 2001), sino que además regulan tanto la diferenciación como el

crecimiento celular (Grander *et al.*, 1997). Estas propiedades han hecho de los interferones uno de los productos más empleados en el tratamiento de enfermedades, no sólo provocadas por agentes víricos, sino también de diversos tipos de cáncer (Borden y Parkinson, 1998).

La interacción de los virus con el sistema inmune ha dado lugar a la evolución de diversas estrategias virales para neutralizar los efectos de los interferones. Estas estrategias incluyen la utilización de receptores que actúan como señuelo para impedir la unión de los interferones a sus receptores celulares, así como también la perturbación de las vías de señalización y la inhibición directa de la expresión de numerosos genes mediante represores de la transcripción (Cebulla *et al.*, 1999; Goodbourn *et al.*, 2000; Levy y García-Sastre, 2001).

3.3. Terapias combinadas

La hepatitis C ha sido combatida fundamentalmente mediante el empleo de monoterapias con IFN- α , si bien recientemente han comenzado a utilizarse terapias combinadas IFN- α /Ribavirina. Los pacientes tratados con IFN- α muestran a menudo graves efectos secundarios (Fontaine y Pol, 2001); no obstante, son numerosos los estudios que muestran los beneficios de esta terapia (Romeo *et al.*, 1995; Poynard *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999). La terapia con interferón parece bloquear inicialmente la liberación de las partículas virales, más que la producción de nuevas infecciones, y tras este período inicial, la reducción de los títulos virales vendría provocada por la acción de linfocitos T citotóxicos, que inducirían la muerte de las células infectadas (Neumann *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999). La eficacia de la terapia con IFN- α en el tratamiento de la hepatitis C es relativamente baja. De hecho, este tratamiento sólo tiene éxito en el 10-15% de los pacientes tratados (Fried y Hoofnagle, 1995; Hoofnagle, 1999), ya que la infección reaparece con bastante frecuencia poco tiempo después de la finalización del tratamiento (Garson *et al.*, 1992). La utilización de terapias combinadas ha mejorado un tanto la situación, aumentando hasta el 30-40% el porcentaje de éxito del tratamiento (Battaglia y Haggmeyer, 2000; Davis *et al.*, 1998). Numerosos estudios han mostrado que el empleo de terapias combinadas IFN- α /Ribavirina para el tratamiento de la

hepatitis C, produce mejores resultados que las monoterapias con IFN- α (Braconier *et al.*, 1995; Chemello *et al.*, 1995; Schalm *et al.*, 1997). Sin embargo, el modo en el que la ribavirina actuaría en conjunción con el IFN- α no está en absoluto definido. Querenghi *et al.* (2001), sugieren que la ribavirina puede no exhibir un efecto antiviral directo, sino que desencadenaría una respuesta favorable al interferón por medio de la modulación de la respuesta inmune contra el HCV. Recientemente, se ha observado que la adición de amantadina a la combinación de IFN- α /Ribavirina refuerza el efecto antiviral, induciendo una rápida disminución de la carga viral (Adinolfi *et al.*, 2003). El modo en el que la amantadina actúa de forma sinérgica con el IFN- α y la ribavirina permanece sin esclarecerse. A pesar de esto, se sabe que la amantadina puede inducir la producción de interleuquinas (Wandinger *et al.*, 1999), y es posible que la modificación del sistema inmune del hospedador por la acción de esta sustancia, intensifique el efecto antiviral del interferón y de la ribavirina .

De cualquier manera, parece claro que el uso de terapias combinadas es el camino a seguir en la lucha contra las enfermedades virales, si bien es preciso tener en cuenta que el empleo de estas metodologías puede producir efectos más impredecibles si cabe que el uso de monoterapias.

Mode of Selection and Experimental Evolution of Antiviral Drugs Resistance in Vesicular Stomatitis Virus

José M. Cuevas^{1*}, Andrés Moya¹ & Santiago F. Elena²

¹*Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva and Departament de Genètica, Universitat de València. P.O. Box 22085, 46071 València, Spain.*

²*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC. Campus UPV, Avda. de los naranjos s/n, 46022 València, Spain.*

*To whom correspondence should be addressed: Phone: 34 963 543 686, Fax: 34 963 983 670, E-mail: jose.m.cuevas@uv.es (Enviado a *Antiviral Research*)

Keywords: antiviral drug resistance, α -interferon, combined therapies, compensatory evolution, ribavirine, RNA virus, viral evolution, VSV

Abstract. The possession of an antiviral resistance mutation clearly benefits a virus when the corresponding antiviral is present. But does the resistant virus suffer a cost of resistance (i.e., a reduction in fitness) when the antiviral is absent? If so, then one strategy to control the spread of resistance would be to suspend the use of a particular antiviral until resistant genotypes declined to low frequency. Would an evolutionary history of association between a genotype and a resistance mutation overcome the cost of resistance by evolving adaptations that counteract the harmful side-effects of resistance mutations? As a consequence of this adaptation of viruses to their resistance mutations, it becomes increasingly difficult to eliminate resistant genotypes simply by suspending the use of antivirals. Similarly, are combined therapies more effective against the rise of resistant viruses or against evolutionary compensations? To explore all these questions, we took an experimental evolution approach. After selecting VSV populations able to replicate under increasingly high concentrations of ribavirine and/or α -interferon, we evolved them for more than 100 generations under sub-inhibitory concentrations of the corresponding antivirals, allowing for evolutionary compensation. Our results show that resistance for these two antivirals was not easily achieved, being the selected populations less fit than the ancestral ones both in presence and absence of the antivirals. We speculate about the possibility this result was a consequence of the mutagenic action of these two antivirals that increased the deleterious mutational load. Further evolution in presence of sub-inhibitory concentrations of both antivirals compensated about 98% of the reduction in fitness both for α -interferon and combined therapies. In the case of ribavirine, selected populations were ~1% more fit than the original clones in absence of antivirals. These results emphasize the importance of careful designs of antiviral therapies that take into account the possible emergence of more virulent variants.

Introduction

The likelihood that resistant mutants will emerge, and expand in the population, after treatment with antiviral drugs depends of four main factors (Richman, 1996a): the viral mutation rate; the mutation intrinsic ability of the viral target site with respect to a specific antiviral; the selective pressure of the antiviral drug; and the extent of virus replication. Each one of these factors represents, by itself, an extensive field of investigation in the study against viral diseases, not being easy the establishment of clear separations among them. According to Richman (1996b), the probability of a mutant population emerging against increasing antiviral drug activity follows a bell-shaped distribution. At the beginning of the function, the increase of the selective pressure caused by the antiviral drug activity raises the probability of fixation of new resistance mutations, until reaching the highest point. Beyond this point, the probability of emergence of new resistant mutations diminishes, together with virus replication, down to zero. One of the main goals of the chemotherapy of viral infections is precisely the identification of drug regimens that inhibit completely the virus replication (Richman, 1996a).

Several studies have shown that the presence of drug-resistant mutants in isolates obtained from patients with no prior drug exposure is a phenomenon quite common (Nájera *et al.* 1994, 1995; Kozal *et al.* 1996). It is logical to expect that the selective pressure promoted by the drug treatment contributes to the expansion of these pre-existing mutants. In that sense, several groups using a variety of different inhibitors, have observed that within one to two weeks following initiation of therapy, the plasma virus declines to about 1% of its initial value, increasing again in a rapid way as resistant mutants spread out (Ho *et al.* 1995; Nowak *et al.* 1995; Schuurman *et al.* 1995; Wei *et al.* 1995).

Taking into account these previous results, the most suitable and maybe the only way in order to overcome viral diseases, have to accomplish the complete suppression of virus replication. Nowadays, the answer to this trouble is mainly addressed using combinations of drugs, and with two strategies. The first, convergent therapies, where two drugs targeting the same viral protein are used. In this case, mutations induced by one drug may sensitize the virus to the other one, or may prevent the emergence of viable mutants (Chou *et al.* 1993; Larder *et al.* 1995). The emergence of cross-resistant virus variants may become a serious problem on this class of therapy (Dulioust *et al.*

1999). The second group of therapies employs two drugs whose targets are completely different. Several studies have shown the benefits of combination therapies against monotherapies in HIV-1 (Kojima *et al.* 1995; Mansky *et al.* 2002).

A classical example of combined therapy is represented by the treatment of the hepatitis C virus (HCV) with interferons and ribavirine (Neau *et al.* 2003; Tsubota *et al.* 2003; Sreenarasimhaiah *et al.* 2003). Interferons are a family of cytokines, with two main types, type I and type II. Type I include α -IFN, β -IFN, ω -IFN, and τ -IFN. Type II IFN is γ -IFN. Interferons are induced in mammalian cells as a response to virus infection, being secreted to circulation, and activating a global antiviral state. Moreover, IFN have pleiotropic effects on cell growth, cell motility, and cell functions. However, IFN has been proved to be ineffective in most treated individuals (Fried and Hoofnagle 1995; Hoofnagle 1999). The use of ribavirine, a guanine nucleotide analogue, in combination with α -IFN, has improved the results on HCV treatment (Braconier *et al.* 1995; Schalm *et al.* 1997). In any case, the mechanism of action of ribavirin has not been clearly defined yet. Recently, Querenghi *et al.* (2001) have suggested that ribavirine could promote a favorable answer to α -IFN, by means of the modulation of the immune reaction against HCV. However, Crotty *et al.* (2001) have demonstrated that ribavirine's antiviral activity is exerted through lethal mutagenesis. RNA viruses present high mutation frequencies, being close to the edge of error catastrophe (Eigen, 1971). Ribavirine can force an increase in mutation rate, pushing the RNA viruses into error catastrophe (Lee *et al.* 1997; Loeb *et al.* 1999; Crotty *et al.* 2000). In fact, although a wide variety of mutagens is known, they usually cause severe side effects in humans at the necessary doses (Holland *et al.* 1990; Lee *et al.* 1997). Therefore, the search for new nucleoside analogues specific for incorporation by RNA-dependent RNA polymerases is highly necessary. In the meantime, it is important to investigate the use of combined therapies, which can yield synergistic effects on viral diseases (Klein, 2003; Fuchizaki, 2003).

There is a point that has not being taken adequately into account in the fight against viral diseases, is the cost of the antiviral resistance. In absence of drugs, resistant variants are generated and maintained at very low frequencies (Ribeiro, 1998; Ribeiro and Bonhoeffer, 2000). When treatment begins, the total viral load falls, as a consequence of the elimination of the sensitive strains. The resistant strains, however, spread out in the population because of its selective advantage. This process implies

generally a cost in the population fitness (Goudsmit *et al.* 1996; Imamichi *et al.* 2000) that makes them inferior competitors to sensitive genotypes in the absence of antivirals. If so, then a strategy for containing the spread of resistance would be to suspend the use of a particular antiviral until resistant genotypes had declined to low frequency. Nonetheless, the efficacy of this strategy depends, in part, on the cost of antiviral resistance to the virus. Assuming that some sensitive virus survive antiviral treatment (or colonize after the treatment has ended), the amount of time necessary to reduce the abundance of resistant virus to a specific low level is inversely proportional to the cost of resistance. For example, it would take ten times as long to eliminate a population of resistant virus when the cost of resistance is only 1% as compared to when the cost of resistance is 10%. Thus, the efficacy of controlling the spread of antiviral resistance by suspending the usage of an antiviral is critically dependent on the relative fitness of the resistant and sensitive genotypes in the absence of antiviral. However, there is an important qualification to this conclusion. That is, it is implicitly assumed that the resistance mutation was put into a naïve virus, one which has no evolutionary history of association with the resistance mutation. An important question, therefore, is whether the cost of resistance can be reduced or even eliminated by allowing the virus to adapt to the resistance mutation.

Materials and methods

VSV clones. In this experiment we used two different clones derived from a clone of the Mudd-Summer strain of the VSV Indiana serotype. One of them, MARM C, presents an Asp₂₅₉→Ala substitution in the G surface protein. This substitution allows the mutant to replicate under mAb I₁ concentrations that neutralize the other clone, surrogate wild-type (Vandepol *et al.*, 1986). Both clones were adapted to mouse L-929 cells by thirty-five diluted passages (120 generations) before challenging them with any antiviral. To avoid any further genetic change, large volumes with a high titre (10⁹ pfu/mL) were produced and kept at -80°C in 1 mL aliquots. Wild-type and MARM C L-929 adapted populations were named as JMC1 and JMC2, respectively, and were used to initiate the resistance experiments.

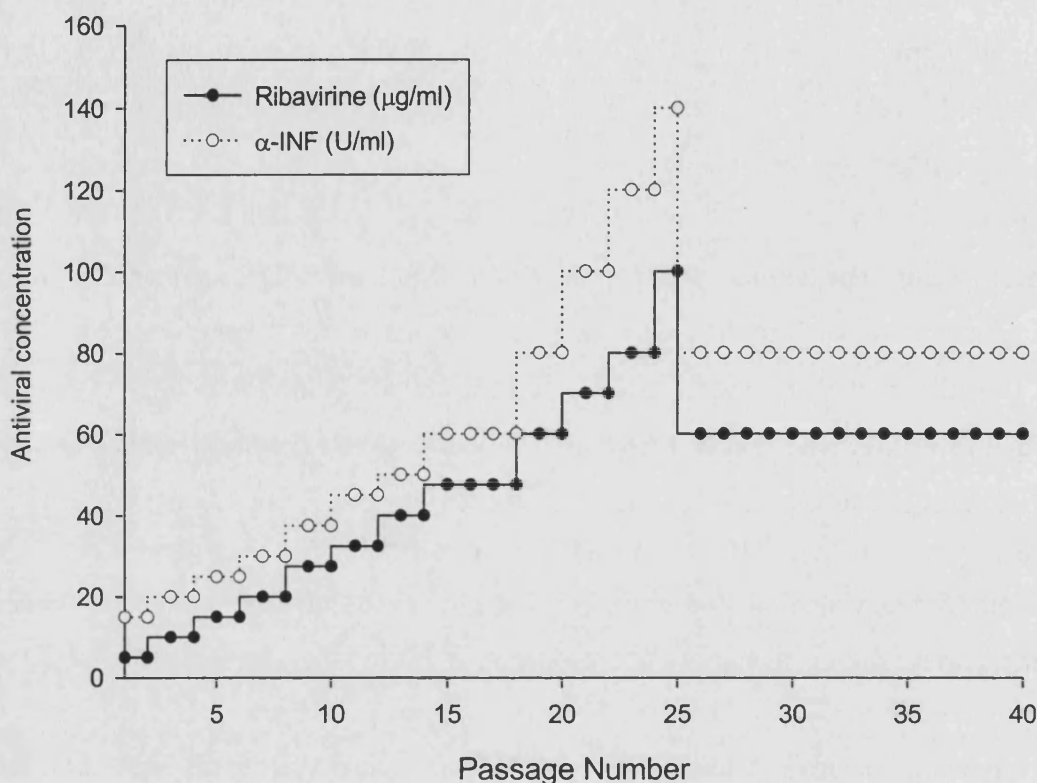
Cell lines and culture conditions. Mouse L-929 cells were grown as monolayers under Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) containing 10% heat inactivated fetal calf serum. Cells were grown in 25 cm² plastic flasks for infections or in 100 cm² plates for routine maintenance. Cells were incubated at 37 °C,

95% relative humidity, and 5% CO₂ atmosphere. After infection, viral particles were enumerated by plaque-assays using confluent cell monolayers under DMEM solidified with 0.4% agarose.

Antiviral drugs. Ribavirin (Sigma) and α -IFN (Calbiochem) were employed. Ribavirin was prepared from solid product, at three different concentrations (5 mg/mL; 500 μ g/mL, and 5 ng/mL). α -IFN was diluted from the commercial product, at three concentrations (2000 U/mL; 200 U/mL, and 10 U/mL). To avoid natural variation in interferon efficiency, all the α -IFN used along these experiments belonged to the same batch.

Experimental populations. Mix populations of JMC1 and JMC2 were used to initiate one population in each of the following three treatments: ribavirine (named as JMC1R and JMC2R), α -IFN (named as JMC1I and JMC2I), and Ribavirin/ α -IFN combination (named as JMC1C and JMC2C). At the beginning of the experiment, each population was allowed to infect a L-929 cell monolayer that was treated for 15 h with the corresponding therapy. After 45 min incubation to allow virus adsorption, excess virus was removed and each mixture was incubated for an additional 23 h period in presence of the corresponding therapy. The propagation cycle was repeated using a diluted sample of the resulting viral progeny and a newly grown cell monolayer treated with the corresponding therapy. A total of 40 cycles were conducted for each population, with two different stages (Figure 1). During the first 25 cycles, increasing concentrations of the antiviral drugs were used: In ribavirine therapy, the increase was from 5 μ g/mL (cycle 1, $\sim LC_{15}$; i.e., the concentration of ribavirine that allowed the replication of 15% of the viruses in the original clone) up to 100 μ g/mL (cycle 25, $\sim LC_5$); in the α -IFN therapy, the increase was from 15 U/mL ($\sim LC_5$) up to 140 U/mL ($> LC_1$); in the combined therapy, the increase was equivalent to the sum of the single treatments (from $\sim LC_3$ up to $> LC_1$). During the second stage (the last 15 cycles) a fix concentration was used for each therapy: 60 μ g/mL for ribavirine treatment ($\sim LC_6$), 80 U/mL for α -IFN therapy ($> LC_1$), and the sum of both of them for the combined therapy ($> LC_1$). In all cases, cells were pre-treated for 15 h with an identical concentration of the corresponding antiviral. After pre-treatment, the solution was removed and the monolayers infected with the corresponding virus populations. These two stages include the phase I of the experiment.

Figure 1. Change in the concentration of antiviral, for single therapies, throughout the forty passages of experimental evolution. For the combined therapy, the concentrations employed correspond with the sum of both lines.



In order to determine changes in resistance levels for these six selected populations, they were subjected to a probit curve analysis, using several antiviral concentrations. The probit analysis for ribavirine was done by subjecting all the samples to increasing ribavirine concentrations (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 20, 30 and 40 µg/mL). Similarly, the concentrations employed in the probit analysis for α-IFN were 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 and 140 U/ml. Finally, the concentrations for the analysis probit for the combined therapy were 0, 5, 10, 15, 20, 30, and 40 µg/mL of ribavirine and 0, 5, 10, 15, 20, 30, and 40 U/mL of α-IFN.

From the results obtained on the probit analyses (Table 1), a second evolution experiment was initiated in presence of sub-inhibitory concentrations (LC_{95}) of antiviral, including the phase II. The respective concentrations required to inhibit only 5% of the population growth were 70 pg/mL of ribavirine, 0.1 U/mL of α-IFN, and the addition of these two concentrations for the combined therapy. Each one of the six populations was

used to found five replicate populations in their respective therapies. In addition, other three replicate populations from each population were evolved in the absence of antiviral drugs. A total of 30 infectious cycles, as described above, were conducted for each one of the 48 populations.

Table 1. Concentrations of each antiviral that correspond with lethal doses of 5% and 50% (with 95% confidence intervals) for ancestral clones and for populations isolated at the end of the first phase of the experiment.

	Ribavirine therapy				α -INF therapy				Combined therapy			
	LC_{50}	CI 95%	LC_5	CI 95%	LC_{50}	CI 95%	LC_5	CI 95%	LC_{50}	CI 95%	LC_5	CI 95%
JMC	0.03997	0.03026-0.05166	46.38995	35.07669-62.95138	1.15164	1.03172-1.2775	13.45495	12.91738-13.99046	6.21372	3.49821-8.08809	17.32825	14.36198-23.87937
JMCR	0.05122	0.03079-0.08333	59.44171	36.2401-99.97724	0.87374	0.77300-0.98105	10.20822	9.62740-10.80050	3.11835	0.96409-5.83573	8.69616	4.37104-15.60165
JMCI	0.01774	0.00895-0.03412	20.58642	10.97128-39.33522	0.94282	0.83693-1.05515	11.01527	10.43894-11.59929	2.72922	0.83722-4.88859	7.61100	4.04260-12.27178
JMCC	0.00284	0.00161-0.00485	3.29423	2.04218-5.38803	0.62851	0.55116-0.71160	7.34310	6.87380-7.82343	2.21294	0.54519-4.56262	6.17125	2.59775-11.60670

This experimental design simulates the following realistic biological situation: after a host becomes infected with a virus, the viral population reached a polymorphic steady-state distribution. At this moment, antiviral therapy is given to the host. Due to the pharmacological properties of the antiviral drugs, concentration in target tissues increases with time until reaching a maximum (phase I in our experimental design). After suppression of the treatment, the concentration decreases with time until complete extinction (phase II in our design).

Estimate of fitness components. To infer fitness components for each experimental population, growth curve analyses were performed. As controls, the two original populations (JMC1 and JMC2) and the six selected populations were analyzed simultaneously. Four types of growth curves were done for each population: in presence of 15 μ g/mL of ribavirine ($\sim LC_{11}$), in presence of 20 U/mL of α -IFN ($\sim LC_2$), the combination of both ($> LC_1$), or without any treatment. These antiviral concentrations were chosen in order to assure the replication of the selected populations, whose viability was largely decreased after the phase I of our experimental design. After infection, samples were taken at 4, 8, 12, and 16 hpi (hours post-infection) for the

curves without treatment, and at 5, 10, 15, and 20 hpi for the other three curves. Growth-curves were done in triplicate. Time series data were fitted to a growth model of exponential rise to a maximum density (Elena, 2001). The natural logarithm of the inferred yield at 15 hpi was used as an estimate of fitness (y).

Results

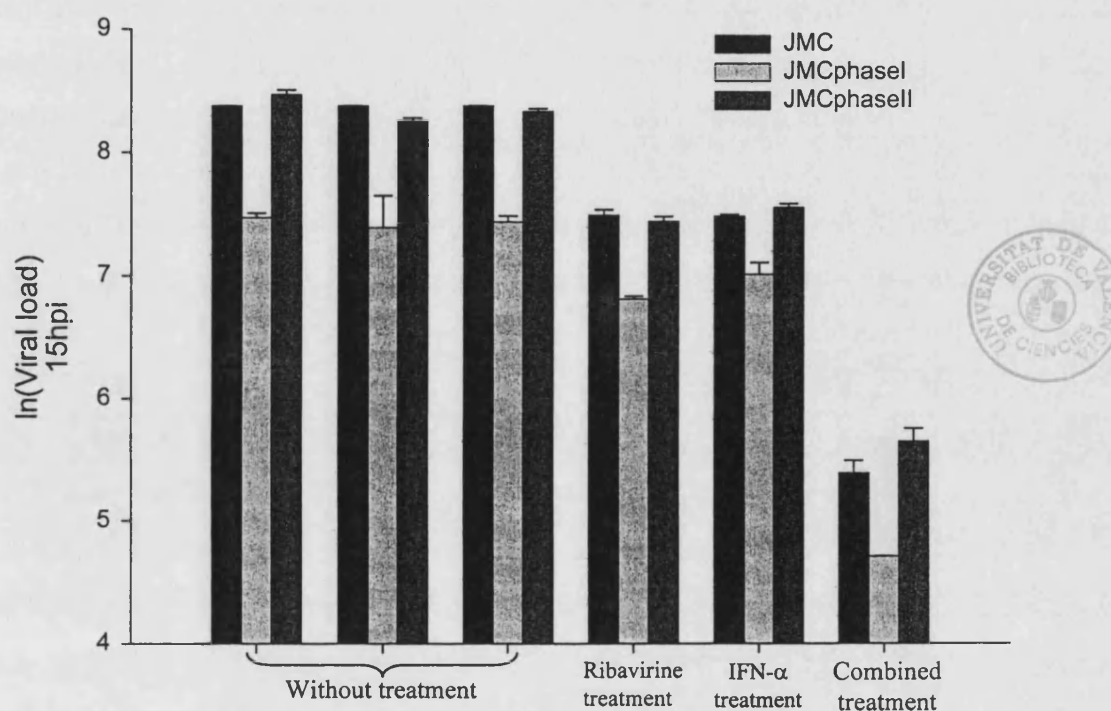
Synergy between ribavirine and α -INF. Prior to any other analysis with the evolved populations, we examined which was the effect of the antivirals on the ancestral JMC1 and JMC2 clones. To do so, we fitted the fitness values determined in absence of treatment and after the three therapies to the standard two-ways ANOVA model $y_{ijk} = \mu + R_i + I_j + (RI)_{ij} + \xi_{ijk}$, where μ represents the grand-mean fitness, R_i the effect associated with ribavirine therapy, I_j the effect associated with α -INF therapy, $(RI)_{ij}$ the interaction between the two antivirals, and ξ_{ijk} is the residual error corresponding to the ijk th determination. On average, the fitness of these clones in absence of antiviral drugs was 8.3765 ± 0.0704 (\pm SEM). In presence of ribavirine, the average fitness was 7.4883 ± 0.0526 . This 10.6% reduction in fitness was statistically significantly ($F_{1,18} = 574.6767$, $P < 0.0001$). The average fitness in presence of α -INF was significantly reduced in a similar extent (7.4812 ± 0.0524 ; $F_{1,18} = 580.1527$, $P < 0.0001$). More interestingly, the reduction associated with the combined therapy was larger than expected if both antivirals acted independently (5.3903 ± 0.0685 ; test of the interaction term: $F_{1,18} = 93.6529$, $P < 0.0001$), a result that gives support to the idea that ribavirine potentiates the antiviral activity of α -INF (Querenghi *et al.*, 2001).

The effect of replication under increasing antiviral concentration

Replication in increasing concentrations of antiviral failed to select resistance mutants and had negative fitness effects. The first question we addressed was whether the viral populations passed 40 times under increasing concentrations of antivirals became resistant to them. This being true, selected populations should show higher fitness than their corresponding ancestors (JMC1 and JMC2) in presence of the corresponding antiviral drug. However, our results did not support this expectation (Figure 2). For ribavirine therapy, ancestors are, on average, 9.1% fitter than the selected populations ($t_1 = 10.5860$; one-tail $P = 0.0300$). Similar results were obtained for the α -IFN therapy, although in this case the 6.3% difference in fitness was not statistically significant ($t_1 = 4.3186$; one-tail $P = 0.0724$). For the combined therapy, the

difference in fitness was much larger (12.6%) and significant ($t_1=7.6193$; one-tail $P = 0.0415$).

Figure 2. Fitness of ancestral clones and evolved populations (after the first phase of the experiment and at the very end) measured in four different conditions: (i) in absence of antivirals, (ii) in presence of ribavirine, (iii) in presence of α -INF, and (iv) in presence of both antivirals. The concentrations employed are described in Material and Methods.



Reduced replication ability in absence of antiviral. According with the hypothesis of a fitness cost associated with resistance to antiviral drugs, we expected that in absence of the antiviral, selected populations should be less fit than the ancestral clones. However, as we have shown in the above paragraph, there was not significant increase in the degree of resistance and, by contrast, what we observed was a negative fitness effect associated with replication in presence of antivirals. Nonetheless, the comparison between ancestral and selected in absence of antivirals is still important, since it will demonstrate whether the mutations accumulated by the selected populations were deleterious only in presence of the antiviral or, by contrast, they had a general negative impact on fitness. The fitness for ribavirine-treated populations was, on average, 10.9% lower than that of ancestral viruses, a difference statistically significant ($t_1 = 25.4413$;

one-tail $P = 0.0125$). For the α -INF treated populations, fitness was 11.8% lower, although in this case the difference was not significant ($t_1 = 3.8494$; one-tail $P = 0.0809$). Finally, for the populations passed in presence of both antivirals, fitness was significantly lower too (11.3%; $t_1 = 19.3484$; one-tail $P = 0.0164$). In conclusion, whatever the nature of the mutations accumulated during the treatment with increased concentrations of antivirals, they are of general deleterious effects regardless they are evaluated in presence or in absence of antiviral.

Evolution in presence of sub-inhibitory concentrations of antiviral

Selection of genotypes with increased resistance at high LC . We expected that populations evolved in presence of sub-inhibitory concentrations of the antivirals maintained the same fitness than their respective ancestrals JMCxR, JMCxI and JMCxC ($x = 1, 2$) when the antiviral were present in the environment or, alternatively, they would increased fitness because selection would act in two different ways: (i) purging the deleterious load accumulated during the phase I of the evolution experiment and (ii) increasing the frequency of mutations beneficial in the phase II. By treating each JMCxR-evolved population as a single observation, the grand mean fitness was 9.25% greater than the value obtained for the original JMCxR populations when growth curves were done in presence of ribavirine at LC_{11} (paired t -test: $t_9 = 16.5369$; 1-tailed $P < 0.0001$). Similarly, for the case of the populations evolved in presence of α -INF, fitness increased 7.74% compared with the JMCxI populations when it was evaluated in presence of α -INF at LC_2 (paired t -test: $t_9 = 23.9324$; 1-tailed $P < 0.0001$). Finally, the increase in fitness associated with evolution under sub-inhibitory concentrations of the combined therapy were much larger, 20.01%, and also significant (paired t -test: $t_9 = 9.1413$; 1-tailed $P < 0.0001$).

As we shown before, the fitness of JMCxR, JMCxI, and JMCxC populations was reduced compared with their respective ancestral JMC1 and JMC2. Now, we seek to determine whether the fitness increases observed in the phase II of our experiment fully compensated for the fitness decline observed in the first phase. To do so, we compared the fitness estimates obtained for the 10 evolved populations with JMC1 and JMC2 in presence of the corresponding antiviral therapy. In the case of the ribavirine therapy, the grand mean fitness across evolved populations was not significantly different from the ancestrals (paired t -test: $t_9 = 1.1191$; 1-tailed $P = 0.1460$). By contrast, the populations evolved in presence of α -INF were, on average, 0.96% fitter than the

ancestrals. Despite this small figure, the difference was statistically significant (paired t -test: $t_9 = 2.0964$; 1-tailed $P = 0.0328$). The populations evolved under combined therapy experienced the largest increase in fitness compared with the ancestrals (4.98%; paired t -test: $t_9 = 2.0299$; 1-tailed $P = 0.0365$). At face value, these results suggest that complete compensation occurred during evolution in presence of sub-inhibitory concentrations of each therapy. Furthermore, increased replication ability was achieved by those populations evolved in presence of α -INF and, more specially, in presence of the combined therapy.

Evolutionary compensation of fitness costs. Now, we want to determine whether the decrease in fitness observed for the JMCxR, JMCxI, and JMCxC populations in absence of antiviral was eliminated by the subsequent history of evolution of the genomes. To do so, we ran growth-curve experiments in absence of therapy for each one of the 15 evolved populations (Figure 2). Results clearly showed that fitness costs were compensated. In the case of ribavirine-evolved populations, the average fitness of the evolved end-point populations was 11.9% greater than that estimated for the mutations after the first phase of the evolution experiment (paired t -test: $t_9 = 30.0724$, 1-tailed $P < 0.0001$). However, the relevant comparison is between the evolved populations and their corresponding ancestral, JMC1 or JMC2. Also in this case the average fitness was improved, although to a lesser stage (1.09%; paired t -test: $t_9 = 2.4521$, 1-tailed $P = 0.0183$). By contrast, the results obtained for the populations evolved under α -INF therapy were slightly different: whereas the average fitness significantly increased compared with the populations after the first phase of the experiment (10.36% better; paired t -test: $t_9 = 9.3884$, 1-tailed $P < 0.0001$), it still was significantly lower than that of the ancestrals (1.43% worse; paired t -test: $t_9 = 5.3586$, 1-tailed $P = 0.0002$). The results for the combined therapy were similar to those obtained for the α -INF therapy: 10.71% better than the populations after the first phase of the experiment (paired t -test: $t_9 = 35.5899$, 1-tailed $P < 0.0001$) but still 0.55% worse than the ancestrals (paired t -test: $t_9 = 2.0422$, 1-tailed $P = 0.0358$). In conclusion, evolution under sub-inhibitory concentrations of antivirals compensates for the deleterious fitness effects associated with replication in presence of high concentrations of the same antivirals. In this sense, α -INF seems to impose a stronger burden, since compensation was not complete in any therapy that incorporates it. By contrast, the cost imposed by ribavirine was fully compensated and, more interestingly, fitness was increased beyond the ancestral value.

Discussion

Influence of therapies on ancestral populations. A differentiation between single and combined therapies can be made. Regarding single therapies, there are no apparent differences on fitness between both therapies. This result was a bit unexpected, since the targets at which the therapies act are different. α -IFN causes a generalized response at cellular level, whereas ribavirine is a mutagenic agent. Comparing combined and single therapies, we found that a synergy between ribavirine and α -IFN exists. This synergy has been previously postulated (Querenghi *et al.*, 2001) and gives further support to the validity of combined therapies.

Absence of resistant populations. At the end of the first phase of our evolution experiment, intended to selecting resistance-mutants to high concentrations of antivirals, we have not obtained, apparently, fully resistant populations in any case. In contrast, all treated populations were worse than their corresponding ancestors, both in presence and in absence of antiviral. In the case of ribavirine, this is not completely unexpected, since it has not been reported the emergence of resistance against ribavirine before (Waugh *et al.*, 2002). In relation with resistance against α -IFN, Novella *et al.* (1996) found a slight resistance on *in vitro* studies with VSV. If we consider these previous results, the lack of emergence of resistant mutants is not such an unexpected situation.

On the other side, it is important to explain the fitness losses observed on selected populations. A first and easy answer to this finding is the presence of a bottleneck effect that would set on the Muller's ratchet (Duarte *et al.*, 1992). Antiviral treatments cause large reductions in viral load that might be so drastic as to effectively introduce a bottleneck. Moreover, in the case of ribavirine, its mutagenic effect can further contribute to increase the mutational load, and hence, the genetic burden (Crotty *et al.*, 2001).

The evolution in sub-inhibitory doses facilitates the compensation of fitness losses. Perhaps the most interesting finding was in relation with the compensation of the deleterious effects accumulated along the first phase of our experiment. At one hand, we assume the existence of numerous deleterious mutations accumulated by populations passed in presence of high concentrations of antivirals. At the other hand, the evolution in antiviral sub-inhibitory doses imposes soft selection on the evolving populations that allowed fitness increases. Hence we hypothesize that, throughout the second phase of our evolution experiment, compensatory mutations emerged, together with beneficial

mutations, which improve fitness in a rapid way. At the end of this process, regardless the antiviral that was present in the evolution media, every single population was better than their immediate antecessor in presence of high concentrations as well as in absence of the corresponding antiviral drug. Furthermore, if compared with the original clones, the populations evolved in media containing α -INF were significantly fitter in presence of the antiviral, but significantly worse when the antiviral was removed from the environment. By contrast, populations evolved in presence of ribavirine improved, on average, fitness even relative to the ancestral clones. In other words, for some therapies (ribavirine in our case) compensation is achieved much more easily than for others (α -INF and combined). We believe this stronger burden imposed by α -INF is a consequence of its multi-target way of action. These findings are extremely interesting in relation to the rational design of antiviral therapies. A good design of antiviral treatments must take into account some precautions, like the maintenance of elevated antiviral concentrations for extended periods of time in order to avoid the emergence of compensating effects. Otherwise, fitter and more virulent populations can appear throughout or after the treatment. Also, our results suggest that an appropriate therapy would combine both α -INF and ribavirine in a first phase in order to push the viral populations near to extinction and then, in a second phase, supply only α -INF as a prophylactic measure to avoid for evolutionary compensation.

Crotty *et al* (2001) obtained clear evidences of the accumulation of mutations at increasing ribavirine concentrations. In a near future, we would test the mutational burden hypothesis depicted above by sequencing some regions along the genome for each population, as a way to detect the plausible mutational effect exerted by ribavirine, in contrast to the effects caused by α -IFN.

Evolutionary cost-reduction is not restricted to viruses. The proliferation of antiviral-resistant viruses provides an especially dramatic example of biological evolution because of its rapidity as well as its medical importance. However, the evolution of resistance functions, the cost associated with resistance functions and the subsequent amelioration of these costs can be seen in other circumstances as well. The clearest example is the evolution of resistance against antibiotics in bacterial strains (reviewed in Lenski 1997). For example, Schrag *et al.* (1996) examined mutations in the *rpsL* gene of *Escherichia coli* that confer resistance to streptomycine. In the absence of antibiotic, cells that carry these mutations are handicapped in competition with

otherwise isogenic cells that are sensitive to streptomycin. The streptomycin-resistant mutants have altered ribosomes and a lower rate of peptide-chain elongation, which may account for the cost of resistance. Schrag *et al.* (1997) also sought to determine if the cost of antibiotic resistance could be reduced by allowing the bacteria to evolve. After less than 200 generations of evolution in the absence of antibiotic, they found that the cost of resistance was substantially reduced. This cost-reduction was achieved without any significant change in the level of streptomycin resistance. Schrag *et al.* further demonstrated that this cost-reduction was achieved by secondary mutations outside the *rpsL* gene, and that these secondary mutations restored the rate of peptide-chain elongation to a level close to that of the streptomycin-sensitive progenitor. Thus, evolving populations of bacteria tend to compensate for the deleterious side-effects of their resistance genes.

In a different context, populations of bacteria readily adapt to the presence of virulent phages in their environments by mutations that prevent phage adsorption (Lenski and Levin 1985). In the absence of phage, however, resistant genotypes are usually inferior competitors to their sensitive counterparts. Lenski (1988) allowed populations of phage T4-resistant *E. coli* to evolve for 400 generations in the absence of phage. Despite a substantial cost of resistance, the evolving bacterial populations did not revert to sensitivity (probably because the mutations were deletions that could not be easily reverted). Instead, other mutations were selected in the evolving bacterial populations that reduced the cost of resistance by about 50%, and they did so without diminishing the extent of resistance itself.

Evolutionary reductions in the cost of resistance functions are also not limited to microbes. McKenzie *et al.* (1982) described a compelling example of this phenomenon in an insect pest. For more than ten years, the insecticide diazinon was used successfully to control the Australian sheep blowfly. A mutation that conferred resistance eventually appeared and diazinon-resistant flies subsequently became prevalent. At first, the resistant flies developed more slowly and had reduced survival relative to their sensitive progenitors in absence of insecticide, indicating a cost of resistance. After a few more years of continued usage of diazinon, however, a second mutation appeared in the fly population that eliminated the cost of resistance. Diazinon-resistant flies that had this second mutation were as fit as sensitive flies, even in the absence of diazinon. Thus, the opportunity to control the spread of resistance by temporally suspending the use of diazinon was lost.

It should be clear from these additional examples in other biological systems that a reduction in the cost of antiviral resistance is not some mysterious or unexpected phenomenon. Instead, cost-reduction is a simple and general manifestation of the tendency for organisms to undergo genetic adaptation by natural selection. Just as organisms may adapt to overcome adverse aspects of their external environment (e.g., by becoming resistant to antivirals), so too many they adapt to overcome adverse aspects of their physiology and molecular biology (e.g., by reducing harmful side-effects of resistance).

Acknowledgements

We are indebted with Rafael Sanjuán for fruitful discussion. This research was supported by grant BMC2001-3096 from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (A.M.). J.M.C. acknowledges a fellowship from the same source.

References

- Braconier, J. H., O. Paulsen, K. Engman, and A. Widell.** 1995. Combined alpha-interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis-C: a pilot-study. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **27**:325-329.
- Chow, Y. K., M. S. Hirsch, D. P. Merrill, L. J. Bechtel, J. J. Eron, J. C. Kaplan, and R. T. D'Aquila.** 1993. Use of evolutionary limitations of HIV-1 multidrug resistance to optimize therapy. *Nature* **361**:650-654.
- Cooper, L. A. and T. W. Scott.** 2001. Differential evolution of eastern equine encephalitis virus populations in response to host cell type. *Genetics* **157**:1403-1412.
- Crill, W. D., H. A. Wichman, and J. J. Bull.** 2000. Evolutionary reversals during viral adaptation to alternating hosts. *Genetics* **154**:27-37.
- Crotty, S., D. Maag, J. J. Arnold, W. D. Zhong, J. Y. N. Lau, Z. Hong, R. Andino, and C. E. Cameron.** 2000. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine* **6**:1375-1379.
- Crotty, S., C. E. Cameron, and R. Andino.** 2001. RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:6895-6900.
- Duarte, E. A., D. K. Clarke, A. Moya, E. Domingo and J. J. Holland.** 1992. Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**:6015-6019.

- Dulioust, A., S. Paulous, L. Guillemot, A. M. Delavalle, F. Boue, and F. Clavel.** 1999. Constrained evolution of human immunodeficiency virus type 1 protease during sequential therapy with two distinct protease inhibitors. *Journal of Virology* 73:850-854.
- Eigen, M.** 1971. Selforganization of matter and evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* 58:465-523.
- Elena, S. F.** 2001. Evolutionary history conditions the timing of transmission in vesicular stomatitis virus. *Infection, Genetics and Evolution* 1:151-159.
- Elena, S. F.** 2002. Restrictions to RNA virus adaptation: An experimental approach. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81:135-142.
- Fried, M. W. and J. H. Hoofnagle.** 1995. Therapy of hepatitis-C. *Seminars in Liver Disease* 15:82-91.
- Fuchizaki, U., S. Kaneko, Y. Nakamoto, Y. Sugiyama, K. Imagawa, M. Kikuchi, and K. Kobayashi.** 2003. Synergistic antiviral effect of a combination of mouse interferon-alpha and interferon-gamma on mouse hepatitis virus. *Journal of Medical Virology* 69:188-194.
- Goudsmit, J., A. DeRonde, D. D. Ho, and A. S. Perelson.** 1996. Human immunodeficiency virus fitness in vivo: Calculations based on a single zidovudine resistance mutation at codon 215 of reverse transcriptase. *Journal of Virology* 70:5662-5664.
- Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz.** 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373:123-126.
- Holland, J. J., E. Domingo, J. C. de la torre, and D. A. Steinhauer.** 1990. Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *Journal of Virology* 64:3960-3962.
- Hoofnagle, J. H.** 1999. Management of hepatitis C: current and future perspectives. *Journal of Hepatology* 31:264-268.
- Imamichi, T., S. C. Berg, H. Imamichi, J. C. Lopez, J. A. Metcalf, J. Falloon, and H. C. Lane.** 2000. Relative replication fitness of a high-level 3'-azido-3'-deoxythymidine-resistant variant of human immunodeficiency virus type 1 possessing an amino acid deletion at codon 67 and a novel substitution (Thr -> Gly) at codon 69. *Journal of Virology* 74:10958-10964.
- Kawecki, T. J.** 1994. Accumulation of deleterious mutations and the evolutionary cost of being a generalist. *American Naturalist* 144:833-838.
- Kawecki, T. J.** 1998. Red Queen meets Santa Rosalia: Arms races and the evolution of host specialization in organisms with parasitic lifestyles. *American Naturalist* 152:635-651.

- Klein, M. B., N. Campeol, R. G. Lalonde, B. Brenner, and M. A. Wainberg.** 2003. Didanosine, interferon-alfa and ribavirin: a highly synergistic combination with potential activity against HIV-1 and hepatitis C virus. *AIDS* 17:1001-1008.
- Kojima, E., T. Shirasaka, B. D. Anderson, S. Choekijchai, S. M. Steinberg, S. Broder, R. Yarchoan, and H. Mitsuya.** 1995. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) viremia changes and development of drug-related mutations in patients with symptomatic HIV-1 infection receiving alternating or simultaneous zidovudine and didanosine therapy. *Journal of Infectious Diseases* 171:1152-1158.
- Kozal, M. J., N. Shah, N. P. Shen, R. Yang, R. Fucini, T. C. Merigan, D. D. Richman, D. Morris, E. R. Hubbell, M. Chee, and T. R. Gingeras.** 1996. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nature Medicine* 2:753-759.
- Larder, B. A., S. D. Kemp, and P. R. Harrigan.** 1995. Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science* 269:696-699.
- Lee, C. H., D. L. Gilbertson, I. S. Novella, R. Huerta, E. Domingo, and J. J. Holland.** 1997. Negative effects of chemical mutagenesis on the adaptive behaviour of vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* 71:3636-3640.
- Lenski, R. E.** 1988. Experimental studies of pleiotropy and epistasis in *E. coli*. II. Compensation for maladaptative effects associated with resistance to virus T4. *Evolution* 42:433-440.
- Lenski, R. E.** 1997. The cost of antibiotic resistance – from the perspective of a bacterium. In *Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread*. John Wiley & Sons, Chichester, NJ, USA.
- Lenski, R. E., and B. R. Levin** 1985. Constraints on the coevolution of bacteria and virulent phage: a model, some experiments, and predictions for natural communities. *American Naturalist* 125:585-602.
- Loeb, L. A., J. M. Essigmann, F. Kazazi, J. Zhang, K. D. Rose, and J. I. Mullins.** 1999. Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:1492-1497.
- MacKenzie, J. A., M. J. Whitten and M. A. Adena.** 1982. The effect of genetic background on the fitness of the diazinon resistance genotypes of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Heredity* 49:1-9.
- Mansky, L. M., D. K. Pearl, and L. C. Gajary.** 2002. Combination of drugs and drug-resistant reverse transcriptase results in a multiplicative increase of human immunodeficiency virus type 1 mutant frequencies. *Journal of Virology* 76:9253-9259.

- Nájera, I., D. D. Richman, I. Olivares, J. M. Rojas, M. A. Peinado, M. Perucho, R. Nájera, and C. López-Gálíndez. 1994. Natural occurrence of drug-resistance mutations in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *AIDS Research and Human Retroviruses* 10:1479-1488.
- Nájera, I., A. Holguin, M. E. Quiñones-Mateu, M. A. Muñoz-Fernández, R. Nájera, C. López-Gálíndez, and E. Domingo . 1995. Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *Journal of Virology* 69:23-31.
- Neau, D., T. Galperine, E. Legrand, V. Pitard, M. Neau-Cransac, J. F. Moreau, J. M. Ragnaud, M. Dupon, H. Fleury, and M. E. Lafon. 2003. T-lymphocyte populations in hepatitis C and HIV co-infected patients treated with interferon-alfa-2a and ribavirin. *HIV Medicine* 4:120-126.
- Novella, I. S., D. K. Clarke, J. Quer, E. A. Duarte, C. H. Lee, S. C. Weaver, S. F. Elena, A. Moya, E. Domingo, and J. J. Holland. 1995. Extreme fitness differences in mammalian and insect hosts after continuous replication of vesicular stomatitis virus in sandfly cells. *Journal of Virology* 69:6805-6809.
- Novella, I. S., M. Cilnis, S. F. Elena, J. Kohn, A. Moya, E. Domingo, and J. J. Holland. 1996. Large-population passages of vesicular stomatitis virus in interferon-treated cells select variants of only limited resistance. *J. Virol.* 70:6414-6417.
- Nowak, M. A., S. Bonhoeffer, C. Loveday, P. Balfe, M. Semple, S. Kaye, M. Tenant-Flowers, and R. Tedder. 1995. HIV results in the frame. Results confirmed. *Nature* 375:193.
- Querenghi, F., Q. Yu, G. Billaud, G. Maertens, C. Trepo, and F. Zoulim. 2001. Evolution of hepatitis C virus genome in chronically infected patients receiving ribavirin monotherapy. *Journal of Viral Hepatitis* 8:120-131.
- Ribeiro, R. M., S. Bonhoeffer, and M. A. Nowak. 1998. The frequency of resistant mutant virus before antiviral therapy. *AIDS* 12:461-465.
- Ribeiro, R. M. and S. Bonhoeffer. 2000. Production of resistant HIV mutants during antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:7681-7686.
- Richman, D. D. 1996a. Antiviral drug resistance: issues and challenges, p. 1-9. In D. D. Richman (ed.), *Antiviral drug resistance*. Wiley, J. & sons Ltd., San Diego, USA.
- Richman, D. D. 1996b. The implications of drug resistance for strategies of combination antiviral chemotherapy. *Antiviral Research* 29:31-33.
- Schalm, S. W., B. E. Hansen, L. Chemello, A. Bellobuono, J. T. Brouwer, O. Weiland, L. Cavalletto, R. Schvarcz, G. Ideo, and A. Alberti. 1997. Ribavirin enhances the efficacy but not the adverse effects of interferon in chronic hepatitis C. Meta-analysis of individual patient data from European centers. *Journal of Hepatology* 26:961-966.

- Schrag, S. J., V. Perrot and B. R. Levin.** 1996. Adaptation to the fitness cost of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. Proceedings of the Royal Society of London, Series B **264**:1287-1291.
- Schuurman, R., M. Nijhuis, R. van Leeuwen, P. Schipper, D. de Jong, P. Collis, S. A. Danner, J. Mulder, C. Loveday, C. Christopherson, S. Kwok, J. Sninsky, and C. A. B. Boucher.** 1995. Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). Journal of Infectious Diseases **171**:1411-1419.
- Sreenarasimhaiah, J., A. Jaramillo, J. Crippin, M. Lisker-Melman, W. C. Chapman, and T. Mohanakumar.** 2003. Concomitant augmentation of type 1 CD4(+) and CD8(+) T-cell responses during successful interferon-alpha and ribavirin treatment for chronic hepatitis C virus infection. Human Immunology **64**:497-504.
- Tsubota, A., Y. Hirose, N. Izumi, and H. Kumada.** 2003. Pharmacokinetics of ribavirin in combined interferon-alpha 2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C virus infection. British Journal of Clinical Pharmacology **55**:360-367.
- Turner, P. E. and S. F. Elena.** 2000. Cost of host radiation in an RNA virus. Genetics **156**:1465-1470.
- Vandepol, S. B., L. Lefrancois, and J. J. Holland.** 1986. Sequences of the major antibody binding epitopes of the indiana serotype of vesicular stomatitis virus. Virology **148**:312-325.
- Wei, X. P., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn, M. S. Saag, and G. M. Shaw.** 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature **373**:117-122.
- Waugh, S. M. L., D. Pillay, D. Carrington, and W. F. Carman.** 2002. Antiviral prophylaxis and treatment (excluding HIV therapy). Journal of Clinical Virology **25**:241-266.
- Whitlock, M. C.** 1996. The Red Queen beats the jack of all trades: The limitations on the evolution of phenotypic plasticity and niche breadth. American Naturalist **148**:S65-S77.

Discusión

magnitud de la eficacia de dicha mutación. En esta situación, el dato de mayor relevancia consiste en la disminución de la tasa de adaptación a medida que aumenta el tamaño poblacional. En el capítulo 1, la obtención de la secuencia consenso nos permite observar cómo los cambios de eficacia, consecuencia de la evolución de las distintas poblaciones virales, tienen su reflejo a nivel molecular. En este punto, cabe destacar que el empleo de secuencias consenso provoca la pérdida de una parte de la información, cuya importancia es difícil de determinar. Nuestros datos de secuencia contienen únicamente aquellos cambios que se han fijado en la población o que están próximos a la fijación. Las variantes que se encuentran en baja frecuencia, bien por tener una existencia transitoria o bien porque aún no han alcanzado una frecuencia apreciable en su camino hacia la fijación, no son detectadas. De cualquier modo, podemos asumir que la secuencia consenso refleja con suficiente fidelidad la variabilidad genética entre poblaciones. La pretensión de obtener un número lo suficientemente grande de clones para cada muestra y que sea representativo de la variabilidad existente, resultaría enormemente costoso, no sólo por la cantidad de trabajo, sino fundamentalmente por el coste económico. Hay que tener en cuenta que el interés fundamental de este experimento radica en la secuenciación completa del genoma de VSV, lo cual limita hasta cierto punto la cantidad de muestras y de réplicas susceptibles de analizar. Independientemente de todas estas consideraciones, los resultados obtenidos parecen confirmar que el uso de secuencias consenso es suficiente para inferir, al menos a grandes rasgos, los procesos evolutivos acaecidos en las poblaciones virales. Hasta la fecha, los trabajos en los que se recurre a la secuenciación tienen distintos objetivos, como son llevar a cabo inferencias filogenéticas (Llewellyn *et al.*, 2000; Le Gall-Recule *et al.*, 2003), o genotipado de aislados virales y estudios epidemiológicos (Rodríguez *et al.*, 1993). Además, estos estudios suelen abarcar fracciones relativamente pequeñas de los genomas virales. Novella *et al.* (1999) dan un paso más, secuenciando una región que comprende aproximadamente el 40% del genoma total, para distintas muestras de VSV adaptadas a ambientes constantes y cambiantes. Desafortunadamente, los resultados obtenidos no permiten extraer conclusiones definidas, motivado en parte por la limitación que supone el análisis de secuencias parciales.

Nuestro trabajo supera buena parte de estos inconvenientes, permitiéndonos extraer conclusiones globales, de gran importancia de cara al establecimiento de una correlación entre los valores de eficacia y las distintas variantes de secuencia.

2. Migración entre ambientes heterogéneos.

En el segundo capítulo, nuestro objetivo consiste en someter a una población viral a un fenómeno de migración entre ambientes distintos y con distintas tasas. En este punto, nos podemos preguntar si la elevada variabilidad que caracteriza a las poblaciones virales puede verse afectada significativamente por el efecto de la migración. De nuevo en este apartado, nuestro punto de partida es un trabajo previo de Miralles *et al.* (1999b), donde se estudió el efecto de la migración entre distintas poblaciones virales. Este estudio emplea un sistema celular homogéneo, donde como único soporte se utilizan células BHK. Nuestro trabajo trata de ampliar esta situación, al utilizar tres tipos celulares distintos (células BHK, células MDCK y células HeLa). Con esta modificación, pretendíamos simular una situación análoga a la que se produciría durante un proceso de infección, donde las variantes virales podrían migrar entre los distintos órganos o tejidos del hospedador. Diversos estudios con VIH han mostrado la existencia de compartimentalización en diferentes órganos, si bien se detecta también una cierta mezcla de variantes virales (Becquart *et al.*, 2002; Marras *et al.* 2002). Es probable que la compartimentalización de las secuencias virales observada en pacientes con infección crónica, refleje la diversificación gradual a partir de una variante común dominante, más que la migración preferencial de distintas poblaciones virales (Zhang *et al.* 2002). Aún así, los órganos y tejidos no constituyen compartimentos estancos, sino que la acción del torrente sanguíneo provoca la aparición de fenómenos migratorios entre los distintos órganos del hospedador (Wong *et al.*, 1997; van't Wout *et al.*, 1998; Frost *et al.*, 2001). Otra modificación respecto al trabajo de Miralles *et al.* (1999b), consiste en el análisis de una tasa de migración adicional de menor magnitud (0.005), con objeto de aproximarnos, en la medida de lo posible, a una situación *in vivo* donde el proceso de migración se produciría muy probablemente con bajas frecuencias.

3. Coste de la resistencia a antivirales.

En el tercer capítulo, lo que pretendíamos era tratar de determinar el coste que le supone a una población viral la adquisición de resistencias a antivirales, así como estudiar los posibles procesos de compensación que pudieran surgir a raíz de la aparición de estas resistencias. En este apartado, se sometía a dos poblaciones virales a selección en masa en presencia de tres tratamientos distintos con antivirales (ribavirina, interferón- α , ribavirina + interferón- α). Esta primera dinámica partía de dosis letales que provocaban una inhibición de la replicación de alrededor del 90%, según el tratamiento ($\sim DL_{10}$). Durante los 25 primeros pases, las concentraciones aumentaban de forma creciente y paulatina hasta valores que provocaban entre el 95 y el 99% de mortalidad (DL_5 - DL_1). Los 15 siguientes pases se llevaban a cabo empleando dosis letales que inhibían al menos el 95% de la replicación viral. A lo largo de este proceso, las poblaciones se veían sometidas a una fuerte presión selectiva. Las muestras evolucionadas en esta primera fase de selección fueron sometidas a una segunda dinámica evolutiva, empleando en esta ocasión concentraciones sub-inhedorias, que permitían la replicación del 95% de los virus (DL_{95}). En esta situación, por tanto, la presión selectiva ejercida por el tratamiento antiviral era mucho menor. Cabría esperar que bajo estas condiciones, aparecieran mutaciones compensatorias o beneficiosas que paliaran el coste de la resistencia adquirida en la primera fase del experimento.

4. Restricciones evolutivas de las poblaciones virales.

Llegados a este punto, cabe recordar que las distintas investigaciones desarrolladas en este trabajo están íntimamente relacionadas. No debemos analizar los resultados obtenidos individualmente, sino tratar de fusionar aquellos aspectos comunes en los distintos estudios, como única vía para conseguir una visión global. De esta manera, podremos aproximarnos con mayor rigor a la comprensión de los mecanismos que rigen el comportamiento de las poblaciones virales.

Hay que establecer una distinción primaria entre los trabajos aquí presentados. Por un lado, los resultados obtenidos en los capítulos 2 y 3 de esta investigación, pretenden reflejar cuantitativamente la adaptación sufrida por las poblaciones virales en presencia de una fuerza selectiva. Por otro lado, en el capítulo 1 ya se parte de ese punto, y el objetivo va más allá, tratando de confrontar los valores cuantitativos previos con datos genómicos. Obviamente, las dinámicas poblacionales empleadas en cada estudio presentaban distintos regímenes, y sería de esperar que los procesos de adaptación difirieran en mayor o menor medida. Aún así, podemos tratar de extrapolar los resultados extraídos de la caracterización molecular llevada a cabo en el capítulo 1, en la que las poblaciones virales se ven sometidas a una dinámica particular. Dos son las conclusiones fundamentales que se derivan de este estudio: la existencia de convergencias moleculares y de fenómenos de epistasia. Los fenómenos de epistasia observados nos indican que las mutaciones detectadas no deben ser consideradas únicamente de forma individual, sino que el efecto producido sobre la eficacia puede ser conjunto. En base a nuestros resultados, las epistasias parecen no ejercer un gran efecto sobre la eficacia en VSV, si bien éste es un campo pobremente estudiado en la dinámica de las poblaciones virales, salvo contadas excepciones (Elena, 1999). En este sentido, Lenski *et al.* (1999) llevaron a cabo un estudio de las interacciones entre mutaciones en organismos digitales. La gran cantidad de convergencias moleculares halladas en este estudio no son excepcionales, sino que confirman trabajos anteriores (Bull *et al.*, 1997; Whichman *et al.*, 1999; Fares *et al.*, 2001). En este punto particular, los resultados obtenidos en el capítulo 1 entran en conexión con la investigación realizada en el capítulo 3. Estudios con poblaciones de VIH-1 aisladas de pacientes sometidos a terapias antivirales, han mostrado con frecuencia la aparición de cambios paralelos, a menudo con un orden determinado (Larder *et al.*, 1991; Condra *et al.*, 1996; Martínez-Picado *et al.*, 2000). Estas sustituciones pueden ser responsables, bien del aumento de la resistencia a antivirales, bien de la compensación de los efectos deletéreos provocados por las mutaciones tempranas (Molla *et al.*, 1996; Nijhuis *et al.*, 1999). La evolución convergente puede entenderse tanto desde una concepción neutralista como seleccionista. La teoría neutral considera las convergencias como fenómenos aleatorios, mientras

que la teoría seleccionista plantea dos alternativas no excluyentes. Por un lado, la aparición de convergencias puede ser el resultado de la adaptación a un mismo ambiente. Por otro lado, bajo el punto de vista del modelo de interferencia clonal, la fijación de las mutaciones beneficiosas debería producirse de forma secuencial (Gerrish y Lenski, 1998); primero se fijaría la mutación más beneficiosa, a continuación nuevamente la más beneficiosa, y así sucesivamente. El análisis molecular llevado a cabo en el capítulo 1, nos proporciona resultados finales, pero no nos da información a tiempos intermedios. En consecuencia, no podemos discernir si la fijación de mutaciones se produjo de forma ordenada, pero sí se aprecia claramente una direccionalidad en el proceso de fijación, avalada por las numerosas convergencias observadas. Como hemos comentado anteriormente, en estudios con VIH-1 se ha detectado la existencia de procesos de fijación de mutaciones de forma dirigida, como respuesta en este caso a tratamientos con antivirales. Los problemas evolutivos que llevan a las poblaciones virales a adoptar una solución común son distintos, pero pueden interpretarse como una consecuencia directa de las restricciones adaptativas que presentan. Por tanto, el modelo de interferencia clonal tratado en el capítulo 1 puede presentar consecuencias moleculares similares al estudio desarrollado en el capítulo 3: restringir el espectro potencial de mutaciones que pueden ser viables.

Si consideramos la interferencia clonal como una fuerza que ralentiza la evolución adaptativa de las poblaciones, podemos extraer algunas conclusiones interesantes. El modelo nos dice que a elevados tamaños poblacionales, más se acentúa esta ralentización. En condiciones normales, las poblaciones virales producen elevados tamaños poblacionales, pero el uso de antivirales provoca drásticas disminuciones. En una situación donde una terapia antiviral reduzca el tamaño poblacional uno o varios órdenes de magnitud, cabe esperar que también se vea atenuado el fenómeno de interferencia clonal. En principio, la caída del tamaño poblacional provocada por el uso de antivirales, disminuye la probabilidad de generación de mutantes que confieran resistencia a los antivirales. No obstante, se ha descrito con cierta frecuencia casos en los que esas mutaciones de resistencia se encuentran presentes en las poblaciones naturales, antes de la aplicación de un tratamiento antiviral (Nájera *et al.* 1994,

1995; Kozal *et al.* 1996). En tal situación, la aplicación de un agente antiviral y la subsiguiente reducción en el tamaño poblacional, facilitará una rápida emergencia de variantes resistentes. Esta fijación de mutaciones resistentes, por tanto, no sólo será consecuencia de la exploración del espacio de secuencia por parte de las poblaciones virales, en busca de una mutación de resistencia. También nos encontramos con un factor a tener en cuenta, la atenuación de la interferencia clonal a pequeños tamaños poblacionales. Visto así, la fuerza selectiva impuesta por los antivirales provoca una rápida fijación de mutaciones de resistencia presentes en la población a bajas frecuencias. De este modo, el efecto beneficioso causado por el empleo de terapias antivirales se ve paliado, en cierta medida, por la pérdida del autocontrol al que se someten las poblaciones virales a través del fenómeno de interferencia clonal. Una metodología alternativa en la aplicación de las terapias antivirales podría consistir en el uso de productos antivirales de forma menos masiva, con objeto de conseguir una cierta atenuación de las infecciones, sin llegar a provocar la aparición de resistencias. Obviamente, la aplicación de terapias más permisivas condiciona un mayor grado de replicación y, en consecuencia, se eleva la posibilidad de aparición de mutaciones de resistencia. El uso de terapias combinadas podría contribuir a solucionar este problema, ya que al aumentar el número de dianas de actuación de los productos antivirales, se conseguiría disminuir enormemente la probabilidad de aparición de mutaciones de resistencia. Además, otra ventaja de la utilización de dosis relativamente bajas de antivirales es la atenuación de los efectos secundarios que aparecen frecuentemente en los pacientes tratados. De cualquier manera, un factor a tener en cuenta es la importancia relativa que tienen, por un lado la selección en presencia de antivirales, y por otro, la interferencia clonal. Si la magnitud de la fuerza selectiva generada por tratamientos con antivirales es superior a la que actúa como consecuencia de la interferencia clonal, el tratamiento propuesto perdería su valor. Esta disyuntiva provoca que la determinación de las terapias a emplear siguiendo este punto de vista sea compleja, aunque tal vez pueda aportarnos ventajas adicionales.

El trabajo realizado en el segundo capítulo nos da otra muestra de cómo actúan las restricciones adaptativas en el proceso de evolución de las

poblaciones virales. Ahora es la heterogeneidad ambiental quien infringe la principal restricción, mientras que las distintas tasas de migración empleadas nos dan idea de cómo se produce la dispersión de las poblaciones virales. De nuevo en este apartado nos encontramos con la distinción entre especialistas y generalistas. Se ha observado que los especialistas pagan un coste asociado a su adaptación (Turner y Elena, 2000). Sin embargo, también hay estudios que demuestran que poblaciones virales que presentan alternancia en la infección de distintos tipos celulares, pueden alcanzar niveles de adaptación similares a los que se presentan cuando se produce la adaptación a un sólo tipo celular (Novella *et al.*, 1999; Weaver *et al.*, 1999; Turner y Elena, 2000). En este segundo caso, el coste asociado a la adaptación a distintos ambientes puede compensarse por la aparición, bien de mutaciones compensatorias, bien de mutaciones beneficiosas. Ambos casos pueden explicarse en base a nuestros resultados. Por un lado, nos encontramos con un tipo celular que imponía grandes restricciones adaptativas a nuestras poblaciones virales, es el caso de las células HeLa. Los virus evolucionados en este hospedador pagaban un coste mucho mayor que los evolucionados en otros tipos celulares, promoviéndose por tanto la selección de poblaciones especialistas. Por otro lado, las mutaciones responsables de la adaptación a las células BHK no parecían imponer un coste en los ambientes alternativos, y los virus podían ser considerados como generalistas. Por su parte, las células MDCK presentarían un efecto intermedio entre ambas situaciones, como se había observado anteriormente (Turner y Elena, 2000). El efecto del fenómeno de migración entre los ambientes heterogéneos está de acuerdo con trabajos previos (Crill *et al.*, 2000; Turner y Elena, 2000; Cooper y Scott, 2001). En presencia de migración, se seleccionan poblaciones generalistas, mientras que en su ausencia las poblaciones se especializan. En consecuencia, la migración entre tejidos implica un efecto negativo en la adaptación a un tipo celular dado. Además, la eficacia observada en un tipo celular disminuye a medida que aumenta la distancia a él. Como es de esperar, este efecto de la distancia se ve menguado a medida que aumenta la tasa de migración. De cualquiera manera, estos resultados se han obtenido utilizando unas tasas de migración arbitrarias, si bien distintos estudios apoyan

la validez de nuestro criterio (Delwart *et al.*, 1998; Poss *et al.*, 1998; Grassly *et al.*, 1999).

En la actualidad, hay muchas incógnitas por resolver en la investigación de las poblaciones virales. En conjunto, los estudios desarrollados en esta tesis doctoral nos permiten aprender algo más acerca de los mecanismos evolutivos de los virus de RNA, pero aún queda mucho camino por recorrer. En particular, es importante determinar la unidad de selección, conocer si ésta es la partícula individual o la población en su conjunto. Sólo así podremos empezar a actuar con garantías en la lucha contra las enfermedades virales y en la comprensión del mundo de los virus en general.

Conclusiones

1. El análisis molecular de las poblaciones virales ha permitido extraer una serie de conclusiones :
 - 1.1. Los virus de RNA presentan un enorme potencial para la exploración de su espacio de secuencia, a pesar de lo cual son relativamente pocos los cambios que alcanzan la fijación, debido probablemente a la existencia de restricciones estructurales y funcionales.
 - 1.2. Las sustituciones que se fijan en las poblaciones virales presentan convergencias con relativa frecuencia, lo que nos indica nuevamente que las soluciones adaptativas empleadas por las poblaciones virales están sujetas a numerosas limitaciones. En esta situación, el ambiente puede infringir una direccionalidad marcada en los procesos de adaptación.
 - 1.3. Las poblaciones virales presentan fenómenos de epistasia. En consecuencia, las limitaciones a nivel de secuencia que se han observado pueden compensarse mediante el establecimiento de asociaciones entre distintos cambios, ampliando las posibilidades adaptativas de los virus.
2. Los procesos migratorios pueden contribuir en gran medida a la colonización y dispersión de las poblaciones virales. La migración limitaría la especialización de las poblaciones, aumentando la diversidad genética existente. A nivel de hospedador, la existencia de mecanismos de especialización, conjuntamente con fenómenos migratorios, puede ampliar las posibilidades adaptativas de los virus, y por tanto, su patogénesis.
3. La lucha contra las enfermedades virales se vale de distintos tipos de tratamientos. Los tratamientos combinados parecen ser los más efectivos, si bien siguen existiendo numerosas complicaciones, como la aparición de resistencias. Además, en el momento en que cesa el tratamiento, las poblaciones virales, a pesar de encontrarse atenuadas, son capaces de recuperar niveles de eficacia similares o incluso superiores a los que se presentaban antes del tratamiento.



Bibliografía

- ADINOLFI L.E., UTILI R., TONZIELLO A. & RUGGIERO G. (2003) Effects of alpha interferon induction plus ribavirin with or without amantadine in the treatment of interferon non-responsive chronic hepatitis C: a randomised trial. *Gut* **52**, 701-705.
- ALTER M.J. (1997) Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* **26**, S62-S65
- AOKI F.Y., STIVER H.G., SITAR D.S., BOUDREAULT A. & OGILVIE R.I. (1985) Prophylactic amantadine dose and plasma-concentration effect relationships in healthy-adults. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **37**, 128-136.
- BALL J.K., HOLMES E.C., WHITWELL H. & DESSELBERGER U. (1994) Genomic variation of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). Molecular analyses of HIV-1 in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. *Journal of General Virology* **75**, 867-879.90
- BALTIMOR D., HUANG A.S. & STAMPFER M. (1970) Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus, II. An RNA polymerase in the virion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **66**, 572-576.
- BANERJEE A.K. & BARIK S. (1992) Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA. *Virology* **188**, 417-428.
- BARTON N.H. (1995) Linkage and the limits to natural-selection. *Genetics* **140**, 821-841.
- BATTAGLIA A.M. & HAGMEYER K.O. (2000) Combination therapy with interferon and ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C infection. *Annals of Pharmacotherapy* **34**, 487-494.
- BEBENEK K., BEARD W.A., CASASFINET J.R., KIM H.R., DARDEN T.A., WILSON S.H. & KUNKEL T.A. (1995) Reduced frame-shift fidelity and processivity of HIV-1 reverse- transcriptase mutants containing alanine substitutions in helix-H of the thumb subdomain. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 19516-19523.
- BECQUART P., CHOMONT N., ROQUES P., AYOUBA A., KAZATCHKINE M.D., BELEC L. & HOCINI H. (2002) Compartmentalization of HIV-1 between breast milk and blood of HIV-infected mothers. *Virology* **300**, 109-117.
- BELSHAM G.J. & SONENBERG N. (1996) RNA-Protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiological Reviews* **60**, 499-525.
- BERGSTROM C.T., McELHANY P. & REAL L.A. (1999) Transmission bottlenecks as determinants of virulence in rapidly evolving pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 5095-5100.

- BIRON C.A. (1998) Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Seminars in Immunology* **10**, 383-390.
- BIRON C.A. (2001) Interferons alpha and beta as immune regulators : a new look. *Immunity* **14**, 661-664.
- BORDEN E.C. & PARKINSON D. (1998) A perspective on the clinical effectiveness and tolerance of interferon-alpha. *Seminars in Oncology* **25**, 3-8.
- BORREGO B., NOVELLA I.S., GIRALT E., ANDREU D. & DOMINGO E. (1993) Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth-disease virus in the presence or absence of immune selection. *Journal of Virology* **67**, 6071-6079.
- BRACONIER J.H., PAULSEN O., ENGMAN K. & WIDELL A. (1995) Combined alpha-interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C: a pilot study. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **27**, 325-329.
- BULL J.J. (1994) Perspective - Virulence. *Evolution* **48**, 1423-1437.
- BULL J.J., BADGETT M.R., WICHMAN H.A., HUELSENBECK J.P., HILLIS D.M., GULATI A., HO C. & MOLINEUX I.J. (1997) Exceptional convergent evolution in a virus. *Genetics* **147**, 1497-1507.
- BURCH C.L. & CHAO L. (2000) Evolvability of an RNA virus is determined by its mutational neighbourhood. *Nature* **406**, 625-628.
- BURTON R.S. & FELDMAN M.W. (1981) Population genetics of tigrionus-californicus. 2. Differentiation among neighboring populations. *Evolution* **35**, 1192-1205.
- CALIENDO A.M. & HIRSCH M.S. (1994) Combination therapy for infection due to human- immunodeficiency-virus type-1. *Clinical Infectious Diseases* **18**, 516-524.
- CAMERON C.E. & CASTRO C. (2001) The mechanism of action of ribavirin: lethal mutagenesis of RNA virus genomes mediated by the viral RNA-dependent RNA polymerase. *Current Opinion in Infectious Diseases* **14**, 757-764.
- CEBULLA C.M., MILLER D.M. & SEDMAK D.D. (1999) Viral inhibition of interferon signal transduction. *Intervirology* **42**, 325-330.
- CHAO L. (1990) Fitness of RNA virus decreased by muller ratchet. *Nature* **348**, 454-455.
- CHARLESWORTH B. (1990) Optimization models, quantitative genetics, and mutation. *Evolution* **44**, 520-538.

- CHEMELLO L., CAVALLETTO L., BERNARDINELLO E., GUIDO M., PONTISSO P. & ALBERTI A. (1995) The effect of interferon alfa and ribavirin combination therapy in naive patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* **23**, 8-12.
- CHEYNIER R., HENRICHWARK S., HADIDA F., PELLETIER E., OKSENHENDLER E., AUTRAN B. & WAIN-HOBSON S. (1994) HIV and T-cell expansion in splenic white pulps is accompanied by infiltration of HIV-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cell* **78**, 373-387.
- CHONG L.D. & ROSE J.K. (1993) Membrane association of functional vesicular stomatitis virus matrix protein in vivo. *Journal of Virology* **67**, 407-414.
- CHUMAKOV K.M., POWERS L.B., NOONAN K.E., RONINSON I.B. & LEVENBOOK I.S. (1991) Correlation between amount of virus with altered nucleotide- sequence and the monkey test for acceptability of oral poliovirus vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 199-203.
- CLARK K.A., NEILL S.U., SMITH J.S., WILSON P.J., WHADFORD V.W. & MCKIRAHAN G.W. (1994) Epizootic canine rabies transmitted by coyotes in south Texas. *Journal of American Veterinary Medical Association* **204**, 536-540.
- CLARKE D.K., DUARTE E.A., MOYA A., ELENA S.F., DOMINGO E. & HOLLAND J. (1993) Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. *Journal of Virology* **67**, 222-228.
- CLARKE D.K., DUARTE E.A., ELENA S.F., MOYA A., DOMINGO E. & HOLLAND J. (1994) The red queen reigns in the kingdom of RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 4821-4824.
- COEN D.M. & SCHAFFER P.A. (1980) Two distinct loci confer resistance to acycloguanosine in herpes simplex type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 2265-2269.
- COEN D.M. (1991) The implications of resistance to antiviral agents for herpesvirus drug targets and drug-therapy. *Antiviral Research* **15**, 287-300.
- COLONNO R.J. (1992) Virus receptors: the Achilles' hell of human rhinoviruses. In *Innovations in antiviral development and the detection of virus infection*. Ed Block T. et al. New York: Plenum Press. pp. 61-70.

- CONDRA J.H., HOLDER D.J., SCHLEIF W.A., BLAHY O.M., DANOVICH R.M., GABRYELSKI L.J., GRAHAM D.J., LAIRD D., QUINTERO J.C., RHODES A., ROBBINS H.L., ROTH E., SHIVAPRAKASH M., YANG T., CHODAKEWITZ J.A., DEUTSCH P.J., LEAVITT R.Y., MASSARI F.E., MELLORS J.W., SQUIRES K.E., STEIGBIGEL R.T., TEPPLER H. & EMINI E.A. (1996) Genetic correlates of in vivo viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Journal of Virology* **70**, 8270-8276.
- COOPER P.D. (1977) Genetics of picornaviruses. In *Comprehensive virology*. Ed R.R.Wagner. Nueva York: Fraenkel-Conrat,H. pp. 133-207.
- COOPER L.A. & SCOTT T.W. (2001) Differential evolution of eastern equine encephalitis virus populations in response to host cell type. *Genetics* **157**, 1403-1412.
- CRILL W.D., WICHMAN H.A. & BULL J.J. (2000) Evolutionary reversals during viral adaptation to alternating hosts. *Genetics* **154**, 27-37.
- CROTTY S., CAMERON C.E. & ANDINO R. (2001) RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6895-6900.
- CROW J.F. & KIMURA M. (1965) Evolution in sexual and asexual populations. *American Naturalist* **99**, 439-450.
- D'AQUILA R.T. (1994) HIV-1 drug resistance: molecular pathogenesis and laboratory monitoring. In *Clinics in laboratory medicine*. Ed R.Pomerantz. Philadelphia: W.B.Saunders Co. pp. 1-30.
- DARBY G., LARDER B.A. & INGLIS M.M. (1986) Evidence that the active-center of the herpes-simplex virus thymidine kinase involves an interaction between 3 distinct regions of the polypeptide. *Journal of General Virology* **67**, 753-758.
- DAVIS G.L., ESTEBAN-MUR R., RUSTGI V., HOEFS J., GORDON S.C., TREPO C., SHIFFMAN M.L., ZEUZEM S., CRAXI A., LING M.H. & ALBRECHT J. (1998) Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine* **339**, 1493-1499.
- DE JONG M.D., BOUCHER C.A.B., GALASSO G.J., HIRSCH M.S. & KERN E.R. (1995) Consensus symposium on combined antiviral therapy. *Antiviral Research* **29**, 5-29.
- DE LA TORRE J.C. & HOLLAND J.J. (1990) RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *Journal of Virology*. **64**, 6278-6281.

- DE VISSER J. A. G. M., ZEYL C., GERRISH P. J., BLANCHARD J. L. , & LENSKI R. E. (1999) Diminishing returns from mutation supply rate in asexual populations. *Science* **283**, 404-406.
- DELWART E.L., MULLINS J.I., GUPTA P., LEARN G.H., HOLODNIY M., KATZENSTEIN D., WALKER B.D. & SINGH M.K. (1998) Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen. *Journal of Virology* **72**, 617-623.
- DÍEZ J., DÁVILA M., ESCARMÍS C., MATEU M.G., DOMÍNGUEZ J., PÉREZ J.J., GIRALT E., MELERO J.A. & DOMINGO E. (1990) Unique amino-acid substitutions in the capsid proteins of foot-and-mouth-disease virus from a persistent infection in cell-culture. *Journal of Virology* **64**, 5519-5528.
- DOMINGO E., FLAVELL R.A. & WEISSMANN C. (1976) In vitro site-directed mutagenesis: generation and properties of an infectious extra cistronic mutant of bacteriophage Qbeta. *Gene* **1**, 3-25.
- DOMINGO E., SABO D., TANIGUCHI T. & WEISSMANN C. (1978) Nucleotide-sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* **13**, 735-744.
- DOMINGO E., MARTÍNEZ SALAS E., SOBRINO F., DELATORRE J.C., PORTELA A., ORTÍN J., LÓPEZ GALÍNDEZ C., PÉREZ BRENA P., VILLANUEVA N., NÁJERA R., VANDEPOL S., STEINHAUER D., DEPOLO N. & HOLLAND J. (1985) The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral-RNA genome populations - biological relevance - a review. *Gene* **40**, 1-8.
- DOMINGO E. & HOLLAND J.J. (1988) High error rates, population equilibrium, and evolution of RNA replication systems. In *RNA Genetics*. Vol. 3. Eds E.Domingo, J.J.Holland & P.Ahlquist. Boca Ratón, FL.: CRC Press. pp. 3-36.
- DOMINGO E. (1989) RNA virus evolution and the control of viral disease. In *Progress in Drug Research*. Ed E.Jucker. Basel: Birkhauser-Verlag: pp. 93-133.
- DOMINGO E., ESCARMÍS C., MARTÍNEZ M.A., MARTÍNEZ SALAS E. & MATEU M.G. (1992) Foot-and-mouth disease virus populations are quasispecies. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **176**, 33-47.
- DOMINGO E., HOLLAND J., BIEBRICHER C. & EIGEN M. (1995) Quasispecies: the concept and the word. In *Molecular Evolution of the Viruses*. Eds A.Gibbs, C.Calisher & F.García-Arenal. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 171-180.
- DOMINGO E., ESCARMÍS C., MENÉNDEZ-ARIAS L. & HOLLAND J.J. (1999) Viral quasispecies and fitness variations. In *Origin and evolution of viruses*. Eds E.Domingo, R.Webster & J.J.Holland. London: Academic Press. pp. 141-161.

- DRAKE J.W. (1993) Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 4171-4175.
- DRAKE J.W., CHARLESWORTH B., CHARLESWORTH D. & CROW J.F. (1998) Rates of spontaneous mutation. *Genetics* **148**, 1667-1686.
- DRAKE J.W. & HOLLAND J.J. (1999) Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13910-13913.
- DUARTE E., CLARKE D., MOYA A., DOMINGO E. & HOLLAND J. (1992) Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller ratchet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 6015-6019.
- DUARTE E.A., CLARKE D.K., MOYA A., ELENA S.F., DOMINGO E. & HOLLAND J. (1993) Many-trillionfold amplification of single RNA virus particles fails to overcome the muller ratchet effect. *Journal of Virology* **67**, 3620-3623.
- DUARTE E.A., NOVELLA I.S., WEAVER S.C., DOMINGO E., WAIN-HOBSON S., CLARKE D.K., MOYA A., ELENA S.F., DELATORRE J.C. & HOLLAND J.J. (1994) RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. *Infectious Agents and Disease* **3**, 201-214.
- EBERT D. (1998) Experimental evolution of parasites. *Science* **282**, 1432-1435.
- EIGEN M. (1971) Self-organization of matter and evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**, 465-486.
- EIGEN M. & SCHUSTER P. (1977) Hypercycle - principle of natural self-organization .A. Emergence of hypercycle. *Naturwissenschaften* **64**, 541-565.
- EIGEN M. & SCHUSTER P. (1978) Hypercycle - principle of natural self-organization .C. Realistic hypercycle. *Naturwissenschaften* **65**, 341-369.
- EIGEN M., McCASKILL J. & SCHUSTER P. (1988) Molecular quasi-species. *Journal of Physical Chemistry* **92**, 6881-6891.
- EIGEN M. & BIEBRICHER C. (1988) Sequence space and quasispecies distribution. In *RNA Genetics. Vol 3*. Eds E.Domingo, J.J.Holland & P.Ahlquist. Boca Ratón, FL.: CRC Press. pp. 211-245.
- EIGEN M. (1992) *Steps Towards Life*. Oxford: Oxford University Press.
- EIGEN M. (1996) On the nature of virus quasispecies. *Trends in Microbiology* **4**, 216-218.

- ELENA S.F., DÁVILA M., NOVELLA I.S., HOLLAND J.J., DOMINGO E. & MOYA A. (1998) Evolutionary dynamics of fitness recovery from the debilitating effects of Muller's ratchet. *Evolution* **52**, 309-314.
- ELENA S.F. & MOYA A. (1999) Rate of deleterious mutation and the distribution of its effects on fitness in vesicular stomatitis virus. *Journal of Evolutionary Biology* **12**, 1078-1088.
- ELENA S.F., SANJUÁN R., BORDERÍA A.V. & TURNER P.E. (2001) Transmission bottlenecks and the evolution of fitness in rapidly evolving RNA viruses. *Infection, Genetics and Evolution* **1**, 41-48.
- ELION G.B., FURMAN P.A., FYFE J.A., DE MIRANDA P., BEAUCHAMP L. & SCHAEFFER H.J. (1977) Selectivity of action of an anti-herpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5716-5720.
- EMERSON S.U. & YU Y.H. (1975) Both NS and L proteins are required for in vitro RNA synthesis by vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* **15**, 1348-1356.
- ENGLUND J.A., ZIMMERMAN M.E., SWIERKOSZ E.M., GOODMAN J.L., SCHOLL D.R. & BALFOUR H.H. (1990) Herpes-simplex virus resistant to acyclovir - a study in a tertiary care center. *Annals of Internal Medicine* **112**, 416-422.
- ERLICH K.S., MILLS J., CHATIS P., MERTZ G.J., BUSCH D.F., FOLLANSBEE S.E., GRANT R.M. & CRUMPACKER C.S. (1989) Acyclovir-resistant herpes-simplex virus-infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *New England Journal of Medicine* **320**, 293-296.
- ESCARMÍS C., DÁVILA M., CHARPENTIER N., BRACHO A., MOYA A. & DOMINGO E. (1996) Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *Journal of Molecular Biology* **264**, 255-267.
- ESCARMÍS C., CARRILLO E.C., FERRER M., ARRIAZA J.F.G., LÓPEZ N., TAMI C., VERDAGUER N., DOMINGO E. & FRANZE-FERNÁNDEZ M.T. (1998) Rapid selection in modified BHK-21 cells of a foot-and-mouth disease virus variant showing alterations in cell tropism. *Journal of Virology* **72**, 10171-10179.
- ESCARMÍS C., DÁVILA M. & DOMINGO E. (1999) Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet. *Journal of Molecular Biology* **285**, 495-505.
- ESCARMÍS C., GÓMEZ MARIANO G., DÁVILA M., LÁZARO E. & DOMINGO E. (2002) Resistance to extinction of low fitness virus subjected to plaque-to-plaque transfers: diversification by mutation clustering. *Journal of Molecular Biology* **315**, 647-661.

- FARES M.A., MOYA A., ESCARMÍS C., BARANOWSKI E., DOMINGO E. & BARRIO E. (2001) Evidence for positive selection in the capsid protein-coding region of the foot-and-mouth disease virus (FMDV) subjected to experimental passage regimens. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 10-21.
- FENNER F. & CAIRNS J. (1959) Variation in virulence in relation to adaptation to new hosts. In *The Viruses, Vol. 3 Animal Viruses*. Eds F.M. Burnet & W.M. Stanley. New York: Academic Press. pp. 225-249.
- FIELD H.J., DARBY G. & WILDY P. (1980) Isolation and characterization of acyclovir-resistant mutants of herpes-simplex virus. *Journal of General Virology* **49**, 115-124.
- FISHER R.A. (1930) *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford: Oxford University Press.
- FONTAINE H. & POL S. (2001) Side effects of interferon-alpha in treating hepatitis C virus infection. *Transplantation Proceedings* **33**, 2327-2329.
- FRIED M.W. & HOOFNAGLE J.H. (1995) Therapy of hepatitis-C. *Seminars in Liver Disease* **15**, 82-91.
- FRIEDBERG E.C., WALKER G.C. & SIEDE W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, DC: American Society of Microbiology.
- FROST S.D.W., DUMAURIER M.J., WAIN-HOBSON S. & BROWN A.J.L. (2001) Genetic drift and within-host metapopulation dynamics of HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6975-6980.
- FRY J.D. (1993) The general vigor problem: can antagonistic pleiotropy be detected when genetic covariances are positive?. *Evolution* **47**, 327-333.
- FUJITA Y., MISE K., OKUNO T., AHLQUIST P. & FURUSAWA I. (1996) A single codon change in a conserved motif of a bromovirus movement protein gene confers compatibility with a new host. *Virology* **223**, 283-291.
- GALIANA A., MOYA A. & AYALA F.J. (1993) Founder flush speciation in *Drosophila pseudoobscura* - a large - scale experiment. *Evolution* **47**, 432-444.
- GALLIONE C.J., GREENE J.R., IVERSON L.E. & ROSE J.K. (1981) Nucleotide sequences of the messenger-RNAs encoding the vesicular stomatitis virus-N and virus-NS proteins. *Journal of Virology* **39**, 529-535.
- GALL-RECULE G., ZWINGELSTEIN F., LAURENT S., DE BOISSESON C., PORTEJOIE Y. & RASSCHAERT D. (2003) Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation RHDV antigenic variants. *Archives of Virology* **148**, 65-81.

- GAO F., BAILES E., ROBERTSON D.L., CHEN Y.L., RODENBURG C.M., MICHAEL S.F., CUMMINS L.B., ARTHUR L.O., PEETERS M., SHAW G.M., SHARP P.M. & HAHN B.H. (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**, 436-441.
- GARSON J.A., BRILLANTI S., RING C., PERINI P., MIGLIOLI M. & BARBARA L. (1992) Hepatitis-C viremia rebound after successful interferon therapy in patients with chronic non-A, non-B hepatitis. *Journal of Medical Virology* **37**, 210-214.
- GAUSE G.F. (1964) *The Struggle for existence*. New York: Hafner.
- GERRISH P. J. & LENSKI R. E. (1998) The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica* **102/103**, 127-144.
- GOODBOURN S., DIDCOCK L. & RANDALL R.E. (2000) Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology* **81**, 2341-2364.
- GOTO T., HIRATA Y. & KAKISAWA H. (1963) Structure of grifolin an antibiotic from a basidiomycete. *Tetrahedron* **19**, 2079-2083.
- GRANDER D., SANGFELT O. & ERICKSON S. (1997) How does interferon exert its cell growth inhibitory effect? *European Journal of Haematology* **59**, 129-135.
- GRASSLY N.C., HARVEY P.H. & HOLMES E.C. (1999) Population dynamics of HIV-1 inferred from gene sequences. *Genetics* **151**, 427-438.
- HAHN B.H., SHAW G.M., TAYLOR M.E., REDFIELD R.R., MARKHAM P.D., SALAHUDDIN S.Z., WONGSTAAL F., GALLO R.C., PARKS E.S. & PARKS W.P. (1986) Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. *Science* **232**, 1548-1553.
- HAHN C.S., LUSTIG S., STRAUSS E.G. & STRAUSS J.H. (1988) Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 5997-6001.
- HARTL D.L. & TAUBES C.H. (1996) Compensatory nearly neutral mutations: selection without adaptation. *Journal of Theoretical Biology* **182**, 303-309.
- HAYDEN F.G., BELSHE R.B., CLOVER R.D., HAY A.J., OAKES M.G. & SOO W.J. (1989) Emergence and apparent transmission of rimantadine-resistant influenza A virus in families. *New England Journal of Medicine* **321**, 1696-1702.
- HAYDEN F.G. & HAY A.J. (1992) Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **176**, 119-130.



- HAYNES B.F. (1996) HIV vaccines: where we are and where we are going. *Lancet* **348**, 933-937.
- HE Y.P. & KATZE M.G. (2002) To interfere and to anti-interfere: The interplay between hepatitis C virus and interferon. *Viral Immunology* **15**, 95-119.
- HO D.D., NEUMANN A.U., PERELSON A.S., CHEN W., LEONARD J.M. & MARKOWITZ M. (1995) Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**, 123-126.
- HOLLAND J., SPINDLER K., HORODYSKI F., GRABAU E., NICHOL S. & VANDEPOL S. (1982) Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**, 1577-1585.
- HOLLAND J.J. (1987) Defective interfering rhabdoviruses. In *The Rhabdoviruses*. Ed R.R.Wagner. New York: pp. 297-360.
- HOLLAND J.J., DOMINGO E., DELATORRE J.C. & STEINHAUER D.A. (1990) Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *Journal of Virology* **64**, 3960-3962.
- HOLLAND J. (1990) Defective viral genomes. In *Virology*. Eds B.N.Fields, D.M.Knipe, R.M.Chanock, M.S.Hirsch, J.L.Melnick, T.P.Monath & B.Roizman. New York: Raven. pp. 151-165.
- HOLLAND J. J., DE LA TORRE J. C., CLARKE D. K., & DUARTE E. A. (1991) Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *Journal of Virology* **65**, 2960-2967.
- HOLLAND J.J., DELATORRE J.C. & STEINHAUER D.A. (1992) RNA virus populations as quasispecies. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **176**, 1-20.
- HOLMES E.C., ZHANG L.Q., SIMMONDS P., LUDLAM C.A. & BROWN A.J. (1992) Convergent and divergent sequence evolution in the surface envelope glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus type I within a single infected patient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4835-4839.
- HOLMES E.C. & MOYA A. (2002) Is the quasispecies concept relevant to RNA viruses?. *Journal of Virology* **76**, 460-462.
- HOOFNAGLE J.H. (1999) Management of hepatitis C: current and future perspectives. *Journal of Hepatology* **31**, 264-268.
- HOULE D. (1991) Genetic covariance of fitness correlates - What genetic correlations are made of and why it matters. *Evolution* **45**, 630-648.

- HUGHES E.S., BELL J.E. & SIMMONDS P. (1997) Investigation of the dynamics of the spread of human immunodeficiency virus to brain and other tissues by evolutionary analysis of sequences from the p17(gag) and env genes. *Journal of Virology* **71**, 1272-1280.
- IBÁÑEZ A., CLOTET B. & MARTÍNEZ M.A. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 population bottleneck during indinavir therapy causes a genetic drift in the env quasispecies. *Journal of General Virology* **81**, 85-95.
- ITESCU S., SIMONELLI P.F., WINCHESTER R.J. & GINSBERG H.S. (1994) Human immunodeficiency virus type-1 strains in the lungs of infected individuals evolve independently from those in peripheral blood and are highly conserved in the c-terminal region of the envelope v3 loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 11378-11382.
- JACKSON A.O., FRANCKI R.I.B. & ZUIDEMA D. (1987) Biology, structure and replication of plant rhabdoviruses. In *The Rhabdoviruses*. Ed R.R.Wagner. New York: pp. 427-508.
- JAENIKE J. (1990) Host specialization in phytophagous insects. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**, 243-273.
- JENKINS G.M., WOROBEY M., WOELK C.H. & HOLMES E.C. (2001) Evidence for the non-quasispecies evolution of RNA viruses. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 1610.
- KAUFFMAN S.A. (1993) *The Origins of Order: Self-Organisation and Selection in Evolution*. New York/Oxford: Oxford University Press.
- KAWECKI T.J. (1994) Accumulation of deleterious mutations and the evolutionary cost of being a generalist. *American Naturalist* **144**, 833-838.
- KAWECKI T.J. (1998) Red queen meets Santa Rosalia: arms races and the evolution of host specialization in organisms with parasitic lifestyles. *American Naturalist* **152**, 635-651.
- KECK J.G., STOHLMAN S.A., SOE L.H., MAKINO S.J. & LAI M.M.C. (1987) Multiple recombination sites at the 5'-end of murine coronavirus RNA. *Virology* **156**, 331-341.
- KING A.M.Q., SLADE W.R., NEWMAN J.W.I. & McCAHON D. (1980) Temperature sensitive mutants of foot-and-mouth disease virus with altered structural polypeptides.2. Comparison of recombination and biochemical maps. *Journal of Virology* **34**, 67-72.
- KIRKEGAARD K. & BALTIMORE D. (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* **47**, 433-443.

- KOZAL M.J., SHAH N., SHEN N.P., YANG R., FUCINI R., MERIGAN T.C., RICHMAN D.D., MORRIS D., HUBBELL E.R., CHEE M. & GINGERAS T.R. (1996) Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nature Medicine* **2**, 753-759.
- LARDER B.A., DARBY G. & RICHMAN D.D. (1989) HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* **243**, 1731-1734.
- LARDER B.A., COATES K.E. & KEMP S.D. (1991) Zidovudine resistant human immunodeficiency virus selected by passage in cell-culture. *Journal of Virology* **65**, 5232-5236.
- LEE C.H., GILBERTSON D.L., NOVELLA I.S., HUERTA R., DOMINGO E. & HOLLAND J.J. (1997) Negative effects of chemical mutagenesis on the adaptive behavior of vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* **71**, 3636-3640.
- LENSKI R.E., OFRIA C., COLLIER T.C. & ADAMI C. (1999) Genome complexity, robustness and genetic interactions in digital organisms. *Nature* **400**, 661-664.
- LENSKI R.E., ROSE M.R., SIMPSON S.C. & TADLER S.C. (1991) Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2000 generations. *American Naturalist*. **138**, 1315-1341.
- LEVINS R. (1968) *Evolution in Changing Environments*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- LEVY D.E. & GARCIA-SASTRE A. (2001) The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **12**, 143-156.
- LLEWELLYN Z.N., OU X., CHANG G.J., SCHMITT B., SALMAN M.D. & AKKINA R.K. (2000) Genetic analysis of vesicular stomatitis virus New Jersey from the 1995 outbreak in the western United States. *American Journal of Veterinary Research* **61**, 1358-1363.
- LURAIN N.S., THOMPSON K.D., HOLMES E.W. & READ G.S. (1992) Point mutations in the DNA polymerase gene of human cytomegalovirus that result in resistance to antiviral agents. *Journal of Virology* **66**, 7146-7152.
- LYLES D.S., MCKENZIE M. & PARCE J.W. (1992) Subunit interactions of vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein stabilized by binding to viral matrix protein. *Journal of Virology* **66**, 349-358.

- MAGGI F., FORNAI C., VATTERONI M.L., GIORGI M., MORRICA A., PISTELLO M., CAMMAROTA G., MARCHI S., CICCOROSSO P., BIONDA A. & BENDINELLI M. (1997) Differences in hepatitis C virus quasispecies composition between liver, peripheral blood mononuclear cells and plasma. *Journal of General Virology* **78**, 1521-1525.
- MAKINO S., KECK J.G., STOHLMAN S.A. & LAI M.M.C. (1986) High-frequency RNA recombination of murine coronaviruses. *Journal of Virology* **57**, 729-737.
- MANNING J.T. & THOMPSON D.J. (1984) Muller's ratchet and the accumulation of favourable mutations. *Acta Biotheoretica* **33**, 219-225.
- MANZIN A., SOLFOROSI L., PETRELLI E., MACARRI G., TOSONE G., PIAZZA M. & CLEMENTI M. (1998) Evolution of hypervariable region 1 of hepatitis C virus in primary infection. *Journal of Virology* **72**, 6271-6276.
- MAR E.C., CHENG Y.C. & HUANG E.S. (1983) Effect of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine on human cytomegalovirus replication in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **24**, 518-521.
- MARINELLI P., DE CORATO R. & FINELLI L. (1963) In vitro synergic activity of rifomycin SV and chloramphenicol on some strains of enterogenous *Micrococcus pyogenes aureus* and *Escherichia coli*. *Acta Medica Italica di Medicina Tropicale e Subtropicale e di Gastroenterologia* **18**, 341-348.
- MARRAS D., BRUGGEMAN L.A., GAO F., TANJI N., MANSUKHANI M.M., CARA A., ROSS M.D., GUSELLA G.L., BENSON G., D'AGATI V.D., HAHN B.H., KLOTMAN M.E. & KLOTMAN P.E. (2002) Replication and compartmentalization of HIV-1 in kidney epithelium of patients with HIV-associated nephropathy. *Nature Medicine* **8**, 522-526.
- MARTIN J.L., WILSON J.E., HAYNES R.L. & FURMAN P.A. (1993) Mechanism of resistance of human immunodeficiency virus type-1 to 2',3'-dideoxyinosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 6135-6139.
- MARTÍNEZ-PICADO J., DEPASQUALE M.P., KARTSONIS N., HANNA G.J., WONG J., FINZI D., ROSENBERG E., GUNTARD H.F., SUTTON L., SAVARA A., PETROPOULOS C.J., HELLMANN N., WALKER B.D., RICHMAN D.D., SILICIANO R. & D'AQUILA R.T. (2000) Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10948-10953.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ A.M., DOMINGO E. & MENÉNDEZ ARIAS L. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: role of Tyr115 in deoxynucleotide binding and misinsertion fidelity of DNA synthesis. *Embo Journal* **15**, 4434-4442.

- MATLIN K.S., REGGIO H., HELENIUS A. & SIMONS K. (1982) Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *Journal of Molecular Biology* **156**, 609-631.
- MAYNARD SMITH J. (1968) Evolution in sexual and asexual populations. *American Naturalist* **102**, 469-473.
- MAYO M.A. & PRINGLE C.R. (1998) Virus taxonomy - 1997. *Journal of General Virology* **79**, 649-657.
- MAZZULLI T. & HIRSCH M.S. (1993) Combination therapy for HIV-1 infection. In *New directions in antiviral therapy*. Eds J.Mills & L.Corey. New York: Elsevier. pp. 385-414.
- MEYERHANS A., CHEYNIER R., ALBERT J., SETH M., KWOK S., SNINSKY J., MORFELDTMANSON L., ASJO B. & WAIN-HOBSON S. (1989) Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* **58**, 901-910.
- MIRALLES R., GERRISH P. J., MOYA A., & ELENA S. F. (1999a) Clonal interference and the evolution of RNA viruses. *Science* **285**, 1745-1747.
- MIRALLES R., MOYA A. & ELENA S.F. (1999b) Effect of population patchiness and migration rates on the adaptation and divergence of vesicular stomatitis virus quasispecies populations. *Journal of General Virology* **80**, 2051-2059.
- MITSUYA H., WEINHOLD K.J., FURMAN P.A., STCLAIR M.H., LEHRMAN S.N., GALLO R.C., BOLOGNESI D., BARRY D.W. & BRODER S. (1985) 3'-azido-3'-deoxythymidine (BWA509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type-III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 7096-7100.
- MOLLA A., KORNEYEVA M., GAO Q., VASAVANONDA S., SCHIPPER P.J., MO H.M., MARKOWITZ M., CHERNYAVSKIY T., NIU P., LYONS N., HSU A., GRANNEMAN G.R., HO D.D., BOUCHER C.A.B., LEONARD J.M., NORBECK D.W. & KEMPF D.J. (1996) Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nature Medicine* **2**, 760-766.
- MORSE S.S. (1993) *Emerging Viruses*. New York: Oxford University Press.
- MORSE S.S. (1994) The viruses of the future? emerging viruses and evolution. In *The Evolutionary Biology of Viruses*. Ed S.S.Morse. New York: Raven. pp. 325-335.
- MULLER H.J. (1932) Some genetic aspects of sex. *American Naturalist* **8**, 118-138.

- MULLER H.J. (1964) The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research* **1**, 2-9.
- MURPHY F.A. (1996) Virus taxonomy. In *Fields Virology*. Eds B.N.Fields, D.M.Knipe, P.M.Howley, R.M.Chanock & J.L.Melnick. Filadelfia: Lippincott-Raven. pp. 15-57.
- MYERS M.G., OXMAN M.N., CLARK J.E. & ARNDT K.A. (1975) Failure of neutral-red photodynamic inactivation in recurrent herpes simplex virus infections. *New England Journal of Medicine* **293**, 945-949.
- NÁJERA I., RICHMAN D.D., OLIVARES I., ROJAS J.M., PEINADO M.A., PERUCHO M., NÁJERA R. & LÓPEZ-GALÍNDEZ C. (1994) Natural occurrence of drug resistance mutations in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *AIDS Research and Human Retroviruses* **10**, 1479-1488.
- NATHANSON N., MCGANN K.A. & WILESMITH J. (1995) The evolution of virus diseases: their emergence, epidemicity, and control. In *The Molecular Basis of Viral Evolution*. Eds A.Gibbs, C.H.Calisher & F.García-Arenal. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. pp. 31-46.
- NEI M., MARUYAMA T. & CHAKRABORTY R. (1975) Bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**, 1-10.
- NEI M. & GRAUR D. (1984) Extent of protein polymorphism and the neutral mutation theory. *Evolutionary Biology* **17**, 73-118.
- NEI M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- NEUMANN A.U., LAM N.P., DAHARI H., GRETCH D.R., WILEY T.E., LAYDEN T.J. & PERELSON A.S. (1998) Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**, 103-107.
- NEWCOMB W.W., TOBIN G.J., MCGOWAN J.J. & BROWN J.C. (1982) in vitro reassembly of vesicular stomatitis virus skeletons. *Journal of Virology* **41**, 1055-1062.
- NEWMAN C.M., COHEN J.E. & KIPNIS C. (1985) Neo-darwinian evolution implies punctuated equilibria. *Nature* **315**, 400-401.
- NIJHUIS M., SCHUURMAN R., DE JONG D., ERICKSON J., GUSTCHINA E., ALBERT J., SCHIPPER P., GULNIK S. & BOUCHER C.A.B. (1999) Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *Aids* **13**, 2349-2359.

- NOVELLA I.S., DOMINGO E. & HOLLAND J.J. (1995a) Rapid viral quasispecies evolution: implications for vaccine and drug strategies. *Molecular Medicine Today* **1**, 248-253.
- NOVELLA I.S., CLARKE D.K., QUER J., DUARTE E.A., LEE C.H., WEAVER S.C., ELENA S.F., MOYA A., DOMINGO E. & HOLLAND J.J. (1995b) Extreme fitness differences in mammalian and insect hosts after continuous replication of vesicular stomatitis virus in sandfly cells. *Journal of Virology* **69**, 6805-6809.
- NOVELLA I.S., HERSHEY C.L., ESCARMÍS C., DOMINGO E. & HOLLAND J.J. (1999) Lack of evolutionary stasis during alternating replication of an arbovirus in insect and mammalian cells. *Journal of Molecular Biology* **287**, 459-465.
- O'BRIEN S.J., ROELKE M.E., MARKER L., NEWMAN A., WINKLER C.A., MELTZER D., COLLY L., EVERMANN J.F., BUSH M. & WILDT D.E. (1985) Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* **227**, 1428-1434.
- ORR, H. A. (1998) The population genetics of adaptation: the distribution of factors fixed during adaptive evolution. *Evolution* **52**, 935-949.
- ORR, H. A. (2000) The rate of adaptation in asexuals. *Genetics* **155**, 961-968.
- PAL R. & WAGNER R.R. (1987) Rhabdovirus membrane and maturation. In *The Rhabdoviruses*. Ed R.R.Wagner. New York: pp. 75-128.
- PAL R., BARENHOLZ Y. & WAGNER R.R. (1987) vesicular stomatitis virus membrane proteins and their interactions with lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* **906**, 175-193.
- PANDEY V.N., KAUSHIK N., REGE N., SARAFIANOS S.G., YADAV P.N.S. & MODAK M.J. (1996) Role of methionine 184 of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase in the polymerase function and fidelity of DNA synthesis. *Biochemistry* **35**, 2168-2179.
- PARIENTE N., SIERRA S., LOWENSTEIN P.R. & DOMINGO E. (2001) Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *Journal of Virology* **75**, 9723-9730.
- PATHAK V.K. & TEMIN H.M. (1992) 5-azacytidine and RNA secondary structure increase the retrovirus mutation rate. *Journal of Virology* **66**, 3093-3100.
- PEASE C.M., LANDE R. & BULL J.J. (1989) A model of population growth, dispersal and evolution in a changing environment. *Ecology* **70**, 1657-1664.
- PECK J.R. (1994) A ruby in the rubbish: beneficial mutations, deleterious mutations and the evolution of sex. *Genetics* **137**, 597-606.

- PILIPENKO E.V., GMYL A.P., MASLOVA S.V., SVITKIN Y.V., SINYAKOV A.N. & AGOL V.I. (1992) Prokaryotic-like cis elements in the cap-independent internal initiation of translation on picornavirus RNA. *Cell* **68**, 119-131.
- POSS M., RODRIGO A.G., GOSINK J.J., LEARN G.H., PANTELEEFF D.D., MARTIN H.L., BWAYO J., KREISS J.K. & OVERBAUGH J. (1998) Evolution of envelope sequences from the genital tract and peripheral blood of women infected with clade A human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **72**, 8240-8251.
- POWELL J.R. (1978) Founder flush speciation theory - experimental approach. *Evolution* **32**, 465-474.
- POYNARD T., MOUSSALLI J., RATZIU V., REGIMBEAU C. & OPOLON P. (1999) Effect of interferon therapy on the natural history of hepatitis C virus-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Clinics in Liver Disease*. **3**, 869-881.
- QUER J., HUERTA R., NOVELLA I.S., TSIMRING L., DOMINGO E. & HOLLAND J.J. (1996) Reproducible nonlinear population dynamics and critical points during replicative competitions of RNA virus quasispecies. *Journal of Molecular Biology* **264**, 465-471.
- QUERENGHI F., YU Q., BILLAUD G., MAERTENS G., TREPO C. & ZOULIM F. (2001) Evolution of hepatitis C virus genome in chronically infected patients receiving ribavirin monotherapy. *Journal of Viral Hepatitis* **8**, 120-131.
- RODRIGUEZ L.L., LETCHWORTH G.J., SPIROPOULOU C.F. & NICHOL S.T. (1993) Rapid detection of vesicular stomatitis virus new-jersey serotype in clinical samples by using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 2016-2020.
- ROMEO R., RUMI M. & COLOMBO M. (1995) Alpha-interferon treatment of chronic hepatitis-C. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **49**, 111-115.
- ROSE J.K. & SCHUBERT M. (1987) Rhabdovirus genomes and their products. In *The Rhabdoviruses*. Ed R.R. Wagner. New York: pp. 129-166.
- SAAG M.S., HAHN B.H., GIBBONS J., LI Y.X., PARKS E.S., PARKS W.P. & SHAW G.M. (1988) Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo. *Nature* **334**, 440-444.
- SAITO S., KATO N., HIJIKATA M., GUNJI T., ITABASHI M., KONDO M., TANAKA K. & SHIMOTOHNO K. (1996) Comparison of hypervariable regions (HVR1 and HVR2) in positive- and negative-stranded hepatitis C virus RNA in cancerous and non-cancerous liver tissue, peripheral blood mononuclear cells and serum from a patient with hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer* **67**, 199-203.

- SCHAEFFER H.J., BEAUCHAMP L., MIRANDA P.D., ELION G.B., BAUER D.J. & COLLINS P. (1978) 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of herpes group. *Nature* **272**, 583-585.
- SCHALM S.W., HANSEN B.E., CHEMELLO L., BELLOBUONO A., BROUWER J.T., WEILAND O., CAVALLETTO L., SCHVARCZ R., IDEO G. & ALBERTI A. (1997) Ribavirin enhances the efficacy but not the adverse effects of interferon in chronic hepatitis C. Meta-analysis of individual patient data from European centers. *Journal of Hepatology* **26**, 961-966.
- SCHNITZER T.J., DICKSON C. & WEISS R.A. (1979) Morphological and biochemical characterization of viral particles produced by the TSO45 mutant of vesicular stomatitis virus at restrictive temperature. *Journal of Virology* **29**, 185-195.
- SCHUSTER P. & SWETINA J. (1988) Stationary mutant distributions and evolutionary optimization. *Bulletin of Mathematical Biology* **50**, 635-660.
- SCOTT T.W., WEAVER S.C. & MALLAMPALLI V.L. (1994) Evolution of mosquito-borne viruses. In *The Evolutionary Biology of Viruses*. Ed S.S.Morse. New York: Raven Press. pp. 293-324.
- SEN G.C. & RANSOHOFF R.M. (1993) Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Advances in Virus Research* **42**, 57-102.
- SIERRA S., DÁVILA M., LOWENSTEIN P.R. & DOMINGO E. (2000) Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis: influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *Journal of Virology* **74**, 8316-8323.
- SKEHEL J.J., HAY A.J. & ARMSTRONG J.A. (1978) Mechanism of inhibition of influenza virus replication by amantadine hydrochloride. *Journal of General Virology* **38**, 97-110.
- SNELL N.J. (2001) Ribavirin: current status of a broad spectrum antiviral agent. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. **2**, 1317-1324.
- SOLÉ R.V., FERRER R., GONZÁLEZ GARCÍA I., QUER J. & DOMINGO E. (1999) Red Queen dynamics, competition and critical points in a model of RNA virus quasispecies. *Journal of Theoretical Biology* **198**, 47-59.
- STEINHAUER D.A., DELATORRE J.C., MEIER E. & HOLLAND J.J. (1989) Extreme heterogeneity in populations of vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* **63**, 2072-2080.
- STEINHAUER D.A., DOMINGO E. & HOLLAND J.J. (1992) Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* **122**, 281-288.

- STEVENS D.A., JORDAN G.W., WADDELL T.F. & MERIGAN T.C. (1973) Adverse effect of cytosine arabinoside on disseminated zoster in a controlled trial. *New England Journal of Medicine* **289**, 873-878.
- STRAUSS J.H. & STRAUSS E.G. (1994) The alphaviruses : gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews* **58**, 491-562.
- STUART E.E. & BRUINS H.W. (1963) Preincubation immersion of eggs in erythromycin to control chronic respiratory disease. *Avian Diseases* **7**, 287-293.
- SULLIVAN V., BIRON K.K., TALARICO C., STANAT S.C., DAVIS M., POZZI L.M. & COEN D.M. (1993) A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene confers resistance to ganciclovir and phosphonylmethoxyalkyl derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 19-25.
- SWETINA J. & SCHUSTER P. (1982) Model studies on RNA replication.2. Self-replication with errors - a model for polynucleotide replication. *Biophysical Chemistry* **16**, 329-345.
- TEMIN H.M. (1993) The high rate of retrovirus variation results in rapid evolution. In *Emerging Viruses*. Ed S.S.Morse. Oxford: Oxford University Press. pp. 219-225.
- THOMAS H.C., TOROK M.E., FORTON D.M. & TAYLOR-ROBINSON S.D. (1999) Possible mechanisms of action and reasons for failure of antiviral therapy in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* **31**, 152-159.
- TURNER P.E. & ELENA S.F. (2000) Cost of host radiation in an RNA virus. *Genetics* **156**, 1465-1470.
- VAN VALEN L. (1973) A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* **1**, 1-30.
- VAN'T WOUT A.B., RAN L.J., KUIKEN C.L., KOOTSTRA N.A., PALS S.T. & SCHUITEMAKER H. (1998) Analysis of the temporal relationship between human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. *Journal of Virology* **72**, 488-496.
- VANDEPOL S.B., LEFRANCOIS L. & HOLLAND J.J. (1986) Sequences of the major antibody-binding epitopes of the indiana serotype of vesicular stomatitis virus. *Virology* **148**, 312-325.
- VON ITZSTEIN M., WU W.Y., KOK G.B., PEGG M.S., DYASON J.C., JIN B., PHAN T.V., SMYTHE M.L., WHITE H.F., OLIVER S.W., COLMAN P.M., VARGHESE J.N., RYAN D.M., WOODS J.M., BETHELL R.C., HOTHAM V.J., CAMERON J.M. & PENN C.R. (1993) Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza-virus replication. *Nature* **363**, 418-423.

- WAGNER A. & STADLER P.F. (1999) Viral RNA and evolved mutational robustness. *Journal of Experimental Zoology* **285**, 119-127.
- WAGNER R.R. (1987) Rhabdovirus biology and infection: an overview. In *The Rhabdovirus*. Ed R.R.Wagner. New York: pp. 9-74.
- WAGNER R.R. (1991) Rhabdoviridae and their replication. In *Fundamental Virology*. 2. Eds B.Fields & D.Knipe. New York: Raven Press. pp. 489-503.
- WAIN-HOBSON S. (1989) HIV genome variability in vivo. *AIDS* **3** S13-S18
- WAIN-HOBSON S. (1996) Running the gamut of retroviral variation. *Trends in Microbiology* **4**, 135-141.
- WANDINGER K.P., HAGENAH J.M., KLUTER H., ROTHERMUNDT M., PETERS M. & VIEREGGE P. (1999) Effects of amantadine treatment on in vitro production of interleukin-2 in de-novo patients with idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neuroimmunology* **98**, 214-220.
- WAUGH S.M.L., PILLAY D., CARRINGTON D. & CARMAN W.F. (2002) Antiviral prophylaxis and treatment (excluding HIV therapy) . *Journal of Clinical Virology* **25**, 241-266.
- WEAVER S.C., RICOHESSE R. & SCOTT T.W. (1992) Genetic diversity and slow rates of evolution in new-world alphaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **176**, 99-117.
- WEAVER S.C., KANG W.L., SHIRAKO Y., RUMENAPF T., STRAUSS E.G. & STRAUSS J.H. (1997) Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses. *Journal of Virology* **71**, 613-623.
- WEAVER S.C. (1998) Recurrent emergence of Venezuelan equine encephalomyelitis. In *Emerging Infections*.1. Eds W.M. Scheld, D. Armstrong & J.H. Hughes. Washington D.C.: American Society for Microbiology Press. pp. 27-42.
- WEAVER S.C., BRAULT A.C., KANG W.L. & HOLLAND J.J. (1999) Genetic and fitness changes accompanying adaptation of an arbovirus to vertebrate and invertebrate cells. *Journal of Virology* **73**, 4316-4326.
- WEI X.P., GHOSH S.K., TAYLOR M.E., JOHNSON V.A., EMINI E.A., DEUTSCH P., LIFSON J.D., BONHOEFFER S., NOWAK M.A., HAHN B.H., SAAG M.S. & SHAW G.M. (1995) Viral dynamics in human immunodeficiency virus type-1 infection. *Nature* **373**, 117-122.
- WERTZ G.W., DAVIS N.L. & PATTON J. (1987) The role of proteins in vesicular stomatitis virus RNA replication. In *The Rhabdovirus*. Ed R.R.WAGNER. New York: pp. 271-296.

- WHITLOCK M.C. (1996) The red queen beats the jack-of-all-trades: the limitations on the evolution of phenotypic plasticity and niche breadth. *American Naturalist* **148**, S65-S77
- WICHMAN H.A., BADGETT M.R., SCOTT L.A., BOULIANNE C.M. & BULL J.J. (1999) Different trajectories of parallel evolution during viral adaptation. *Science* **285**, 422-424.
- WILKE C.O., WANG J.L., OFRIA C., LENSKI R.E. & ADAMI C. (2001) Evolution of digital organisms at high mutation rates leads to survival of the flattest. *Nature* **412**, 331-333.
- WIMMER E., HELLEN C.U.T. & CAO X.M. (1993) Genetics of poliovirus. *Annual Review of Genetics* **27**, 353-436.
- WONG J.K., IGNACIO C.C., TORRIANI F., HAVLIR D., FITCH N.J.S. & RICHMAN D.D. (1997) In vivo compartmentalization of human immunodeficiency virus: Evidence from the examination of pol sequences from autopsy tissues. *Journal of Virology* **71**, 2059-2071.
- WRIGHT S. (1931) Evolution in mendelian populations. *Genetics* **16**, 97-159.
- ZHANG D., CALIENDO A.M., ERON J.J., DEVORE K.M., KAPLAN J.C., HIRSCH M.S. & D'AQUILA R.T. (1994) Resistance to 2',3'-dideoxycytidine conferred by a mutation in codon 65 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 282-287.
- ZHANG L.Q., ROWE L., HE T., CHUNG C., YU J., YU W.J., TALAL A., MARKOWITZ M. & HO D.D. (2002) Compartmentalization of surface envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 during acute and chronic infection. *Journal of Virology* **76**, 9465-9473.
- ZHU T.F., WANG N., CARR A., NAM D.S., MOORJANKOWSKI R., COOPER D.A. & HO D.D. (1996) Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *Journal of Virology* **70**, 3098-3107.

