

El virus de l'hepatitis A i el seu codi genètic

Lluís Aragonès Marimon

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia



El virus de l'hepatitis A i el seu codi genètic

Memòria presentada per en
Lluís Aragonès Marimon
per a optar al grau de Doctor
per la Universitat de Barcelona

Vist-i-plau dels directors		El doctorand
Dr. Albert Bosch Navarro	Dra. Rosa M ^a Pintó Solé	Lluís Aragonès Marimon

Programa de doctorat: *Microbiologia Ambiental i Biotecnologia*
2003-2005

“La societat avança perquè la gent es mor”
Anònim (però per mi molt important)

Agraïments

A molta gent li agrada escriure una frase d'algun personatge històric, d'algun pensador, d'algun polític. Jo això ho trobo molt tòpic, però no deixo de pensar que posar una frase sempre queda molt bé. Així doncs, quan un dia una persona que en podríem dir anònima, però molt propera, va deixar anar aquesta frase, vaig pensar que aquesta era la frase que volia posar. D'aquesta manera vull fer dos homenatges: un a la persona que em va dir aquesta frase; i l'altre, a tota la gent que fa possible que la societat avanci, perquè tant o més important que la gent que aporta noves idees, és la gent que les accepta.

I m'agradaria seguir amb els agraïments de la mateixa manera que ho va fer en una conferència aquell que cada 1 de novembre fa una visita als meus avis. No m'agradaria seguir sense dir que jo mai no hagués arribat a fer aquesta tesi, i probablement cap tesi, sense l'ajuda d'aquell que fa de la cuina el seu laboratori. Potser una altra tesi hagués estat possible, però aquesta de ben segur que no sense l'ajuda d'aquells que asseguren ser companys de carrera d'una mateixa persona abans nomenada, tot i que es porten 11 anys de diferència. Tampoc no vull deixar d'agrair l'ajuda que em van donar a l'inici dos dels pocs campions dels *Micromachines*, especialment al Quevedo del segle XXI, conseller no només a l'inici, sinó fins ben entrada la tesi. També la dona d'aquell que un dia va ser el meu defensor, la mallorquina adoptada, i aquella que no va deixar triar al seu marit el nom del seu fill. Més important que els que t'ajuden a començar, són els que t'ajuden a seguir: qui fa però no fa vacances a l'agost, les meves companyes de laboratori estival, tant qui intenta fer la cançó de l'estiu amb mi com aquella que no, i també qui de vegades s'oblida de les vacances de Nadal, però mai de les festes del seu poble. També vull mencionar la que mai no destituïria a Guardiola. Tampoc no em puc oblidar de tots els *guiris* que han passat pel laboratori; alguns han estat anys i altres han estat només dies. Tots tenen el seu petit espai, però no puc deixar de mencionar qui m'ha fet reviure tots els dibuixos que mirava de petit. I de tota la gent que m'ha ajudat a completar la tesi qui més es mereix la menció especial és aquella que s'enfadarà perquè el seu nom no surt en aquests agraïments.

Però la tesi també ha rebut el consell, de vegades, de gent una mica aliena al laboratori. Sense els seus petits trucs bacteriològics i de biologia molecular s'hagués fet més feixuga, com també ho hagués estat sense la seva col·laboració en la disbauxa. A alguns us deixaré de mencionar, però m'agradaria que tots us veiéssiu representats en aquest text. Gràcies al meu company d'excursions nocturnes (o millor, hauria de dir d'excursió nocturna), a la lladre de soques, al meu company de pràctiques que ell sabrà quines pràctiques són, a la meva *jefa* durant dues setmanes a l'any, al cantant de la sala d'estudi, al que també va poder gaudir de Sant Julià. Als meus companys de lavabo, i el que aguanta els meus rotllos de bàsquet, a l'anti-Hereu que fa servir el tramvia, i també al senyor (senyor perquè té una edat i se l'ha de respectar) que demana el vot. A la meua companya de cel·la prop del monestir de Montserrat, i qui va canviar de nom quan va començar la tesi. També, al senyor fora de servei, a aquells que alguns dies van ser els meus companys de piscina i en general a tota la gent que ens tanca la porta a l'hora de dinar. També vull nombrar als qui una vegada els hi vaig regalar uns calçotets, al que mai no es pot quedar amb ell, a qui té debilitat pels ponts, a qui espero algun dia poder-la manar tot i ser més gran que jo, a qui odia Barcelona, a qui destapa la no seguretat d'algunes vitrines de bioseguretat i al reusenc amb el que he comprovat que realment el món és un mocador. Ell és el millor exemple que els ganxets són bona gent, paraula de pelacanyes.

Ha arribat també el torn d'agrair a la gent que mai no clonarà un gen, però també mereix que la citi: qui va renovar la beca cada any gràcies a mi, i aquell qui espero que visqui 93485 dies (i ja t'ho dic, he comptat els anys de traspàs), per demostrar-li que estava equivocat, al Jägermeister de la teoria basquetbolística i als amics okupes i aquelles que es deixen okupar. Tampoc no puc oblidar amb qui comparteixo la meua entesitis (i moltes més coses), a veure si te la quedes per sempre! I com no, tots aquells (alguns ja heu sortit abans però no per això no mereixeu doble menció, o triple fins i tot!) que algun dia m'han ofert el seu llit per dormir, especialment allà on parlen *raro*. Realment aquests petits viatges han ajudat molt més del que us penseu. I evidentment, a qui més li he d'agrair és a qui li encanta fer trencaclosques. Sense els seus trencaclosques la vida seria, segur, més fàcil, però també molt més avorrida.

Hi ha gent que no esteu nombrats, però igualment us tinc en consideració, però la meva capacitat d'imaginació i paciència és limitada. Tampoc no volia fer-me pesat amb els agraïments. Potser pensareu que estic una mica sonat, però què se'n pot esperar d'una persona que la primera paraula que va aprendre a dir no va ser ni *papa* ni *mama*, sinó *guaita*.

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. L'HEPATITIS A	3
1.1.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE LA MALALTIA.....	3
1.1.2. EPIDEMIOLOGIA DE LA MALATIA.....	5
1.2. EL VIRUS DE L'HEPATITIS A	7
1.2.1. TAXONOMIA	7
1.2.2. ORGANITZACIÓ GENÒMICA	8
1.2.3. ESTRUCTURA DEL VIRIÓ	11
1.2.4. CICLE BIOLÒGIC.....	15
1.2.5. VACUNES ANTI-HAV	16
1.3. REPLICACIÓ EN QUASIESPÈCIES VIRALS	19
1.4. EL CODI GENÈTIC I L'ÚS DE CODONS	22
1.4.1. LA SELECCIÓ SOBRE L'ÚS DE CODONS.....	22
1.4.2. L'ÚS DE CODONS EN VIRUS.....	26
1.4.3. L'ÚS DE CODONS EN L'HAV.....	27
<u>2. OBJECTIUS</u>	<u>31</u>
<u>3. PUBLICACIONS</u>	<u>35</u>
3.1. EL CODI GENÈTIC I EL CICLE BIOLÒGIC DEL VIRUS	39
3.1.1 ARTICLE 1	41
3.2. EL CODI GENÈTIC I LA PRESSIÓ IMMUNE.....	49
3.2.1. ARTICLE 2.....	51
3.2.2. DADES SUPLEMENTÀRIES A L'ARTICLE 2	67
3.3. EL CODI GENÈTIC I LA CINÈTICA DE TRADUCCIÓ	71
3.3.1. ARTICLE 3.....	73
<u>4. RESUM DE RESULTATS I DISCUSSIÓ</u>	<u>137</u>
4.1. EL CODI GENÈTIC I EL CICLE BIOLÒGIC DEL VIRUS	139
4.2. EL CODI GENÈTIC I LA PRESSIÓ IMMUNE.....	142
4.3. EL CODI GENÈTIC I LA CINÈTICA DE TRADUCCIÓ	148
<u>5. CONCLUSIONS</u>	<u>157</u>
<u>A. ANNEXES.....</u>	<u>A-1</u>
A.1. ARTICLES COMPLEMENTARIS A LA TESI	A-3

1. Introducci3

1.1. L'hepatitis A

1.1.1. Característiques generals de la malaltia

La malaltia de l'icterícia aguda es troba documentada des de l'època de Grècia i Roma¹, però el causant no va ser identificat per primer cop fins l'any 1973 a partir de mostres de femtes².

La via principal de transmissió és la via fecal-oral, mitjançant el consum d'aigua i aliments contaminats o el contacte directe a través de fomites. Amb menys freqüència, però amb una tendència a l'increment, també s'han descrit casos de transmissió parenteral, a través de transfusions¹, l'ús de drogues injectables³ o l'administració de productes derivats de sang⁴, i també transmissió via sexual en relacions homosexuals masculines^{5,6}

La infecció pel virus de l'hepatitis A (HAV) és particularment freqüent en nens i joves, on en la majoria de casos la malaltia és asimptomàtica. A mida que augmenta l'edat de la persona infectada, la severitat dels símptomes incrementa. El període d'incubació és de 15 a 50 dies, amb un promig d'uns 30 dies. El virus s'excreta a les femtes des d'1-2 setmanes abans de l'inici dels símptomes, i fins una setmana després de la finalització d'aquests. Els símptomes poden incloure febre, malestar, anorèxia, cansament, nàusees, vòmits, diarrea, miàlgia, icterícia i orina fosca. A nivell bioquímic, es dona un increment de bilirrubina en sang i orina acompanyat d'un augment del nivell de transaminases en sang (500-5000 U/L).^{7,8}

¹ Cuthbert JA (2001). Hepatitis A: Old and New. Clin. Microbiol. Rev. 14:38-51

² Feinstone SM, Kapikian AZ and Purcell RH (1973) Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. Science 182:1026-1028

³ Ngui SL, Granerod J, Jewes LA, Crowcroft NS and Teo (2008) Outbreaks of Hepatitis A in England and Wales associated with two co-circulating Hepatitis A Virus strains. J. Med. Virol. 80:1181-1188

⁴ Rosenberg SA, Lotze MT and Muul LM (1987) A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin 2 alone. N. Engl. J. Med. 316:889-897

⁵ Stene-Johansen K, Tjon G, Schreier E, Bremer V, Bruisten S, Ngui SL, King M, Pintó RM, Aragonès L, Mazick A, Corbet S, Sundqvist L, Blystad H, Norder H and Skaug K (2007) Molecular epidemiological studies show that Hepatitis A Virus is endemic among active homosexual men in Europe. J. Med. Virol. 79:356-365

⁶ Tjon G, Xiridou M, Coutinho R, Bruisten S (2007) Different transmission patterns of Hepatitis A virus for two main risk groups as evidenced by molecular cluster analysis. J. Med. Virol. 79:488-494

⁷ Koff RS (1998) Hepatitis A. The Lancet 341:1643-1649

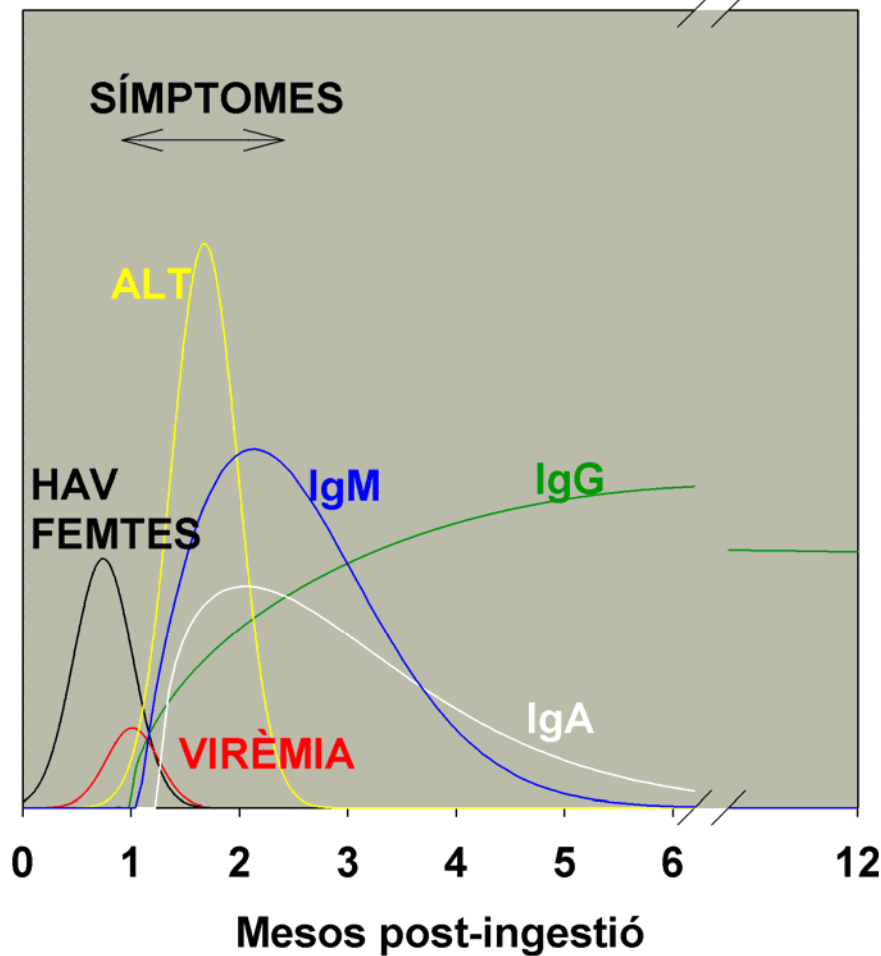


Fig.1.1.2. Esquema de l'evolució dels símptomes, dels aspectes serològics i dels aspectes vírics de la malaltia (adaptat de Stapleton et al⁹)

El desenvolupament més comú de la malaltia és la recuperació i la seroconversió, que ofereix al pacient immunitat de per vida enfront a una nova infecció per l'HAV. A vegades l'HAV pot induir complicacions extrahepàtiques severes com la vasculitis, la crioglobulinèmia, la colestasis o l'artritis¹⁰. L'hepatitis deriva en hepatitis fulminant en un 0,1% dels casos en menors de 40 anys, mentre que en un 7% en gent més gran de 60 anys¹¹. D'altra banda també es pot donar una hepatitis recurrent, quan, unes setmanes després de la recuperació del pacient aquest torna a presentar símptomes d'hepatitis i HAV en femtes. El curs de l'hepatitis recurrent és la recuperació i seroconversió com l'hepatitis normal⁷.

⁸ Koff RS (1993) Viral hepatitis. A: Schiff L, Schiff ER, Eds. Diseases of the Liver. Philadelphia: JB Lippincott. pp 492-577

⁹ Stapleton JT, Lemon SM (1994) Infectious hepatitis, 5th Ed. Philadelphia: Lippincott & Co. pp790-797

¹⁰ Bader TF (1995) Viral Hepatitis. Seattle: Hogrefe and Humber Publishers p248

¹¹ Crowcroft NS, Wash B, Davison KL and Gungabissoon U (2001) Guidelines for the control of hepatitis A virus infection. Commun. Dis. Public. Health 41:213-227

1.1.2. Epidemiologia de la malaltia

Els països amb deficients o baixes condicions sanitàries presenten un nivell de seroprevalença al voltant del 100%, doncs l'hepatitis A és hiperendèmica i pràcticament tots els nens són infectats pel virus abans dels 10 anys¹². En canvi en les societats industrialitzades trobem que la proporció d'individus immunes a l'HAV disminueix com més jove és la població. Això és degut a què la millora de les condicions higièniques. En el cas concret de Catalunya, les franges de població inferiors a 40 anys presenten una prevalença d'anticossos anti-HAV de menys del 50%¹³. Com a exemple de país amb seroprevalença molt baixa, tenim Suècia, on només el 2% dels més joves de 55 anys tenen anticossos contra l'HAV.¹⁴ El fet que la població adulta no es trobi immunoprotegida contra l'HAV, fa que el nombre de brots en persones adultes incrementi¹⁵. Les persones adultes no immunoprotegides són susceptibles de patir la malaltia si viatgen a països on l'hepatitis A és hiperendèmica. La taxa de morbiditat i mortalitat de l'hepatitis A en viatgers és 500 vegades superior al còlera, 10 vegades superior a les febres tifoïdals i 3 vegades superior a l'hepatitis B¹⁶. Aquests viatgers constitueixen una via d'entrada d'HAV. Tenint en compte això i la gravetat de la malaltia en persones d'avançada edat, s'ha reflexionat sobre la idoneïtat d'incloure la vacuna anti-HAV¹⁷ dins el calendari vacunal. En el cas de Catalunya, es va iniciar una prova pilot de vacunació universal d'una combinació de vacunes anti-HAV i anti-HBV en pre-adolescents¹⁸. Les primeres conseqüències observades han estat: una reducció de la incidència d'hepatitis A en la població catalana de 5,51/100000 persones-any (1992-

¹² Das K, Jain A, Gupta S, Kapoor S, Gupta RK, Chakravorty A and Kar P (2000) The changing epidemiological pattern of Hepatitis A in an urban population of India: Emergence of a trend similar to the European countries. *Eur. J. Epidemiol.* 16:507-510

¹³ Oviedo M, Muñoz MP, Domínguez A and Carmona G (2006) Estimated Incidence of Hepatitis A Virus Infection in Catalonia. *Ann. Epidem.* 16:812-819

¹⁴ Bottiger M, Christenson B and Grillner L (1997) Hepatitis A immunity in Swedish population: a study of seroprevalence of markers in the Swedish population. *Scand. J. Infect. Dis.* 29:99-102

¹⁵ Hollinger FB and Emerson SU (2001) Hepatitis A: Fields Virology, 4th Ed. Eds: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B and Straus SD. Philadelphia:Lippincott Williams and Wilkins. pp 799-840

¹⁶ Cristina J, Costa-Mattioli M (2007) Genetic variability and molecular evolution of Hepatitis A virus. *Virus Res.* 127:151-157

¹⁷ Westblom IV, Gudipoti S, De Rowse BR, Madkiff BR and Belshoe RB (1994) Safety and immunogenicity of an inactivated Hepatitis A vaccine: Effect dose and vaccination schedule. *J. Infect. Dis.* 169:996-1001

¹⁸ Domínguez A, Salleras L, Carmona G and Batalla J (2003) Effectiveness of a program of mass Hepatitis A vaccination in preadolescents. *Vaccine* 21:698-701

1998) a 2,98/100000 persones-any (1999-2005)¹⁹; i en el cas concret de Barcelona una reducció en el percentatge de detecció d'HAV en aigües residuals²⁰. Programes de vacunació anti-HAV similars als de Catalunya també s'han dut a terme a Israel, alguns estats dels EUA i la regió de la Puglia italiana^{21,22}, mentre que a d'altres països s'està estudiant la seva introducció, com és el cas del Canadà²³. Altres estratègies adoptades han estat la vacunació de grups de risc, com és el cas dels indis americans²⁴, els aborígens de Queensland²⁵ o els amsterdamesos que viatgen a països de risc²⁶. Tots els programes de vacunació han vingut acompanyats d'una reducció en la incidència de la malaltia. Una reducció de la incidència de la malaltia també s'ha produït en regions on cap programa de vacunació s'està duent a terme, com és el cas del País Basc²⁷. Així doncs, són necessaris estudis més extensos, per a conèixer quin percentatge de la reducció de la incidència és deguda a la vacunació i quin percentatge a la millora de les condicions higièniques. En qualsevol cas sembla ser que la tendència general és a la d'anar incrementant la població a la que s'hauria de vacunar, com en el cas d'Espanya, on recentment s'ha passat d'aconsejar només la vacunació a la població de Ceuta i Melilla²⁸, a incloure també els grups de risc²⁹.

¹⁹ Domínguez A, Oviedo M, Carmona G, Batalla J, Bruguera M, Salleras L and Plasencia A (2008) Impact and effectiveness of a mass vaccination programme of preadolescents seven years after introduction. *Vaccine* 26:1737-1741

²⁰ Pintó RM, Alegre D, Domínguez A, El-senousy WM, Sánchez G, Villena C, Costafreda MI, Aragonès L and Bosch A (2007) Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiol. Infect.* 135:270-273

²¹ Wasley A, Fiore A and Bell BP (2006) Hepatitis A in the era of vaccination. *Epidemiol. Rev.* 28:101-111

²² Chodick G, Green MS, Heymann AD, Rosenmann L and Shalev V (2007) The shifting epidemiology of hepatitis A following routine childhood immunisation program in Israel. *Prev. Med.* 45:386-391

²³ Bauch CT, Rao AR, Pham BZ, Krahn M, Gilca V, Duval B, Chen MH and Tricco AC (2007) A dynamic model for assessing universal Hepatitis A vaccination in Canada. *Vaccine* 25:1719-1726

²⁴ Bialek SR, Thoroughman DA and Hu D (2004) Hepatitis A incidence and Hepatitis A vaccination among American Indians and Alaska natives. *Am. J. Public Health* 94:996-1001

²⁵ Hanna JN, Hills SL and Humphreys JL (2004) Impact of Hepatitis A vaccination of indigenous children on notifications of hepatitis A in north Queensland. *Med. J. Aust* 181:482-485

²⁶ Sonder G, Bovee L, Baayen T, Coutinho R and van den Hoek J (2006) Effectiveness of a Hepatitis A vaccination program for migrant children in Amsterdam, The Netherlands (1992-2004). *Vaccine* 24:4962-4968

²⁷ Cilla C, Pérez-Trallero E, Artiella J, Serrano-Bergoechea E, Montes M and Vicente D (2007) Marked decrease in the incidence and prevalence of hepatitis A in the Basque Country, Spain, 1986-2004. *Epidemiol. Infect.* 135:402-408

²⁸ Bernaola Iturbe E, Giménez Sánchez F, Baca Cots M, de Juan Martín F, Díez Domingo J, Garcés Sánchez M, Gómez-Campderá A, Martínón Torres F, Picazo JJ and Pineda Solás V (2007) Vaccination schedule of the Spanish Association of Pediatrics: Recommendations 2007. *An. Pediatr.* 66:62-9

²⁹ Bernaola Iturbe E, Giménez Sánchez F, Baca Cots M, de Juan Martín F, Díez Domingo J, Garcés Sánchez M, Gómez-Campderá A, Martínón Torres F, Picazo JJ and Pineda Solás V (2008) Immunization schedule of the Spanish Association of Pediatrics: Recommendations 2008. *An. Pediatr.* 68:63-9

1.2. El virus de l'Hepatitis A

1.2.1. Taxonomia

Anteriorment es va classificar l'agent causal de l'hepatitis A, com a *Enterovirus* 72², dins la família Picornaviridae, però degut a les moltes característiques que el distingien de la resta de picornavirus posteriorment es va classificar dins un nou gènere, *Hepatovirus*³⁰. Actualment tot i els nous virus descrits, l'HAV segueix sent un virus amb característiques úniques dins la família (veure Fig 1.2.1).

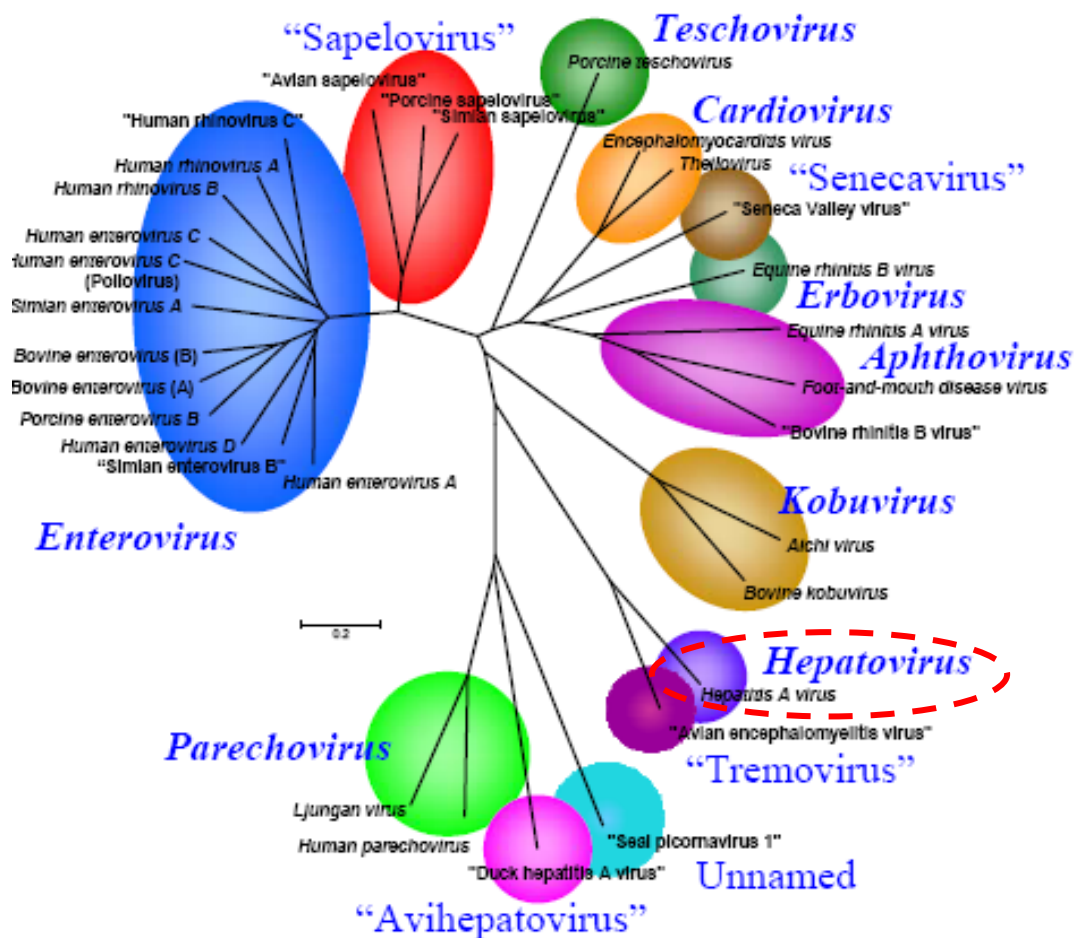


Fig.1.2.1 Arbre filogenètic dels diferents gèneres i espècies dins la família picornavirus presentat pel 'Picornaviridae study group' al '2008 European Study Group on the Molecular Biology of Picornavirus meeting'.

³⁰ van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, Mc Geoch DJ, Pringle CR and Wickner RB. Eds. (2000) Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press.

El virus de l'Hepatitis A (HAV) pertany a la família Picornaviridae, i com a tal el seu àcid nucleic és un RNA de cadena senzilla i polaritat positiva^{31,32}, contingut a l'interior d'un virió nu, d'estructura icosaèdrica i de mida d'entre 27 i 32 nm¹. La càpsida està formada per 60 còpies de les proteïnes víriques, VP2, VP3 i VP1. En canvi però, a diferència de la resta de picornavirus, la proteïna VP4 no s'ha trobat a la càpsida dels virions madurs³³. La càpsida de l'HAV es caracteritza especialment per presentar una gran estabilitat, que li permet resistir condicions extremes de temperatura i pH³⁴.

1.2.2. Organització genòmica

Com a picornavirus que és l'HAV, presenta una organització genòmica semblant a aquests. El seu àcid nucleic (ssRNA+) té una mida aproximada de 7.4 Kb, on es poden diferenciar les regions 5' i 3' no codificants, la regió P1 que codifica per les proteïnes estructurals VP0, VP3 i VP1 i les regions P2 i P3 que codifiquen per proteïnes no estructurals (Fig. 1.2.2.).

La regió 5' no codificant (5'NCR) està formada per uns 700 nucleòtids de l'extrem 5' del genoma. És la regió més conservada del genoma, tot i això presenta una regió variable rica en pirimidines, i conté l'IRES (lloc d'entrada del ribosoma). L'IRES d'HAV és del tipus III³⁵ i presenta una eficiència molt baixa per iniciar la traducció³⁶. L'IRES és reconegut pel ribosoma i altres factors cel·lulars per a iniciar la traducció a partir d'un dels dos codons d'inici, normalment el segon³⁷. Al extrem 5' terminal es troba unida la proteïna vírica VPg. Aquesta regió sembla estar relacionada, juntament

³¹ Coulepis AG, Tannock GA, Locarnini SA and Gust ID (1981) Evidence that the genome of Hepatitis A virus consists of single-stranded RNA. *J Virol* 37:473-477

³² Siegl G, Frösner GG, Gauss-Müller V, Tratschin JD and Deinhardt F (1981) The physicochemical properties of infectious Hepatitis A virions. *J Gen Virol* 57:331-341

³³ Lemon SM and Robertson BH (1993) Current perspectives in the virology and molecular biology of Hepatitis A virus. *Semin Virol* 4:285-295

³⁴ Sholz E, Heinring U and Flehmig B (1989) Acid stability of Hepatitis A virus. *J Gen. Virol.* 70:2481-2485

³⁵ Brown EA, Zajac AJ and Lemon SM (1994) In vitro characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of Hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of Encephalomyocarditis virus. *J.Virol.* 68:1066-1074

³⁶ Whetter LE, Day SP, Elroy-Stein O, Brown EA and Lemon SM (1994) Low efficiency of the 5' nontranslated region of Hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *J.Virol.* 68:5253-5263

³⁷ Tesar M, Harmon SA, Summers DF and Ehrenfeld E (1992) Hepatitis A virus polyprotein synthesis initiates from two alternative AUG codons. *Virology* 186:609-618

amb altres regions, amb l'adaptació del virus a cultiu cel·lular i amb capacitat de virulència³⁸.

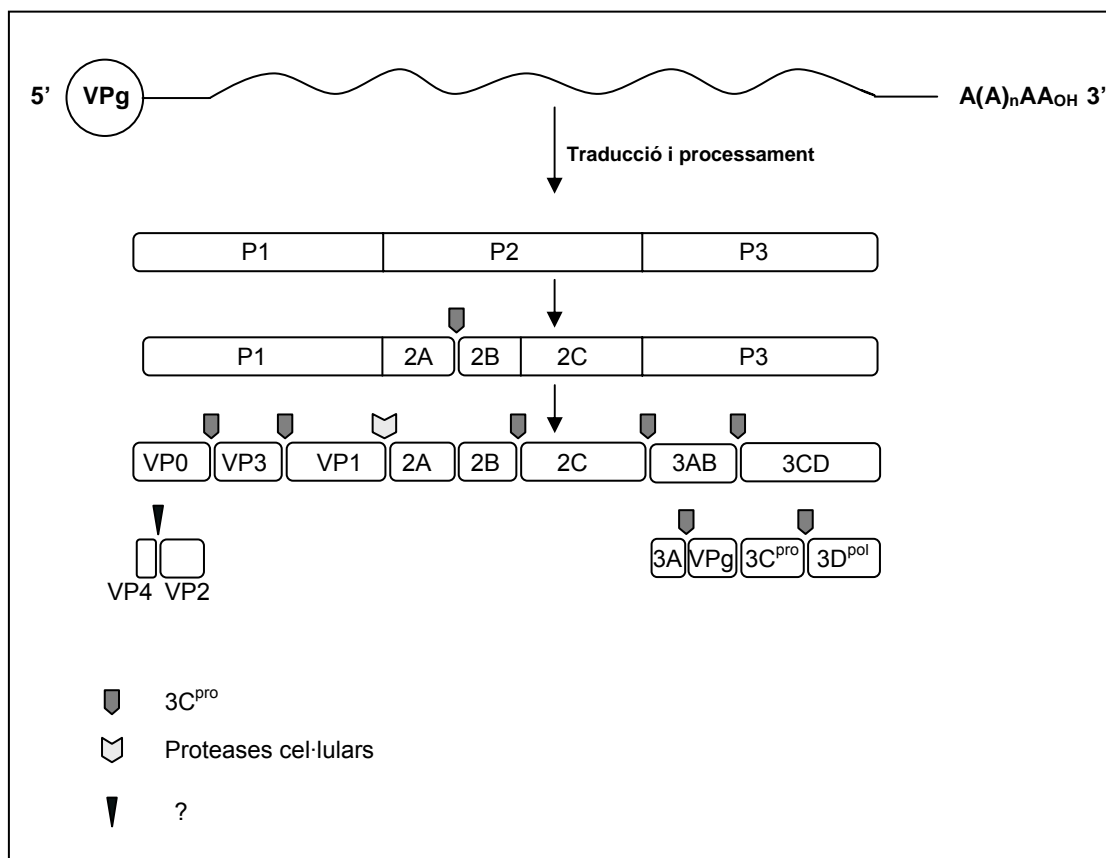


Fig.1.2.2. Organització genòmica i processament de la poliproteïna de l'HAV^{39,40,41}

La regió codificant presenta una única pauta oberta de lectura que codifica per una poliproteïna de 2.227 aminoàcids en el cas de la soca tipus HM175. Aquesta poliproteïna, formada per les regions P1, P2 i P3, és processada donant lloc a les proteïnes víriques madures. El processament proteolític de la poliproteïna s'inicia amb el tall entre la regió 2A i la regió 2B, separant P1-2A de P2-P3. Aquest tall el du a terme *in cis* la proteasa 3C, codificada a la regió P3. Després la proteasa 3C també realitza, *in trans*, la resta de tallaments de la poliproteïna (Fig. 1.2.2.) excepte el tall entre VP1 i 2A i el

³⁸ Brown EA, Day SP, Jansen RW and Lemon SM (1991) The 5' nontranslated region of Hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro. J. Virol. 65:5828-5838

³⁹ Graff J, Richards OC, Swiderek KM, Davis MT, Rusnak F, Harmon SA, Jia XY, Summers DF and Ehrenfeld E (1997) Hepatitis A virus capsid protein VP1 has a heterogeneous terminus. J Virol. 73:6015-6023

⁴⁰ Martin A, Bénichou D, Chao SF, Cohen LM and Lemon SM (1999) Maturation of the Hepatitis A virus capsid protein VP1 is not dependent on processing by the 3C_{pro} proteinase. J. Virol. 73:6220-6227

⁴¹ Bishop NE (1999) Effect of low pH on the Hepatitis A virus maturation cleavage. Acta Virol. 43:291-296

tall de VP0 en VP2 i VP4. En el primer cas s'ha postulat que aquest tall té lloc per l'acció de proteases cel·lulars^{39,40} i en el cas del tall de VP0 degut a un processament autocatalític o bé per l'efecte del pH⁴¹.

La regió P1 codifica per les proteïnes estructurals VP4, VP2, VP3 i VP1. La regió VP4, a diferència dels altres picornavirus, no està miristilada, i tot i no trobar-se formant part dels virions madurs, es necessària per la formació de la càpsida. La regió P2 està formada per 2A, 2B i 2C. La regió 2A és necessària per a la formació del pentàmer i té una funció estructural⁴², un altre tret diferencial respecte altres picornavirus. En *Enterovirus* i *Rhinovirus* la proteïna 2A indueix *shutoff* o silenciament de la traducció cel·lular. En el cas d'*Aphthovirus* aquest *shutoff* el realitza la proteasa L. S'han vist evidències que aquestes proteases digereixen el factor d'iniciació de traducció cel·lular eIF4G⁴³, mentre que l'HAV requereix d'aquest factor per a la traducció del seu RNA⁴⁴. Això implica que l'HAV ha de competir per la síntesi de proteïnes amb la cèl·lula hoste, mentre que els picornavirus amb inducció de *shutoff* poden dirigir tota la maquinària traductora cap a la síntesi de les seves proteïnes. D'altra banda, s'ha vist que les regions 2B i 2C són importants per a l'adaptació del virus a la replicació en cultiu cel·lular¹⁵. La regió P3 es troba dividida en les regions 3A, 3B, 3C i 3D. La regió 3B codifica per la proteïna VPg, mentre que la regió 3C, com s'ha comentat abans, codifica per la proteasa i la 3D per la polimerasa. En canvi la funció de la proteïna 3A és desconeguda¹⁵.

La regió 3' no codificant (3'NCR), té una longitud de 40 a 80 nucleòtids i presenta gran variabilitat entre soques, que pot ser per sobre del 20 %⁴⁵.

⁴² Probst C, Jecht M and Gauss-Müller V (1999) Intrinsic signals for the assembly of Hepatitis A virus particles: role of structural proteins VP4 and 2A. *J. Biol. Chem.* 274:4527-4531

⁴³ Liebig HD, Seipelt J, Vassilieva E, Gradi A and Kuechler E (2002) A thermosensitive mutant of HRV2 2A proteinase: evidence for direct cleavage of eIF4GI and eIF4GII. *FEBS Lett.* 560:51-55

⁴⁴ Ali IK, McKendrick L, Morley SJ and Jackson RJ (2001) Activity of the Hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G. *J. Virol.* 75: 7854-7863

⁴⁵ Cohen JL, Rosenblum B, Ticehurst JR, Daemer RJ, Feinstone SM and Purcell RH (1987) Complete nucleotide sequence of an attenuated Hepatitis A virus: comparison with wild-type virus *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:2497-2501

1.2.3. Estructura del virió

El virió de l'HAV està format per les proteïnes VP1, VP2 i VP3. La unitat bàsica de la càpsida és el protòmer, amb coeficient de sedimentació 5S, el qual presenta una còpia de cadascuna de les proteïnes (Fig 1.2.3a.A.). L'estructura tridimensional de l'HAV encara no està resolta, doncs no s'ha aconseguit cristal·litzar. Així doncs, la informació que se'n té és basada en estudis indirectes, i també en moltes ocasions s'extrapola segons la informació obtinguda de les cristal·litzacions d'altres picornavirus. En el cas de *Rhinovirus* i alguns *Enterovirus* es forma una depressió anomenada canó a l'eix quinari de simetria, i en molts casos el virus l'utilitza per a unir-se al receptor cel·lular⁴⁶. Els *Aphthovirus* i *Cardiovirus* no presenten canó, sinó que tenen cinc petites depressions o *pits* que envolten aquest eix quinari de simetria^{47,48}. Els aminoàcids que es troben a l'interior del canó o el pit són molt conservats, i els aminoàcids que l'envolten són els llocs neutralitzants⁴⁹. Per homologia amb els altres picornavirus, la càpsida de l'HAV estaria formada per 60 protòmers amb un número de triangulació de 3 ($T=3$) (Fig 1.2.3a.B). Cada proteïna presentaria una estructura terciària de 8 làmines β antiparal·leles (classificades de la B fins la I). Aquestes làmines estarien connectades a través de *loops*, que són les regions més superficials de la càpsida i contenen els llocs antigènics^{50,51}.

⁴⁶ Chapman MS and Rossmann MG (1993) Comparison of surface properties of Picornaviruses: strategies for hiding the receptor site from immune surveillance. *Virology* 195:745-756

⁴⁷ Acharya R, Fry E, Stuart D, Fox G, Rowlands D and Brown F (1990) The structure of Foot-and-mouth disease virus: implications for its physical and biological properties. *Vet. Microbiol.* 23:21-34

⁴⁸ Verdager N, Schoehn G, Ochoa WF, Fita I, Brookes S, King A, Domingo E, Mateu M, Stuart D and Hewat EA (1999) Flexibility of the major antigenic loop of Foot-and-Mouth Disease Virus bound to a Fab fragment of a neutralising antibody: structure and neutralisation. *Virology* 255: 260-268

⁴⁹ Rossmann MG and Palmenberg AC (1988) Conservation of the putative receptor attachment site in Picornaviruses. *Virology* 164:373-382

⁵⁰ Luo M, Rossmann MG and Palmenberg AC (1988) Prediction of three-dimensional models for foot-and-mouth disease virus and hepatitis A virus. *Virology* 166:503-514

⁵¹ Harrison SC (2001) Principles of virus structure: Fields Virology, 4th Ed. Eds: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B and Straus SD. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp 53-85

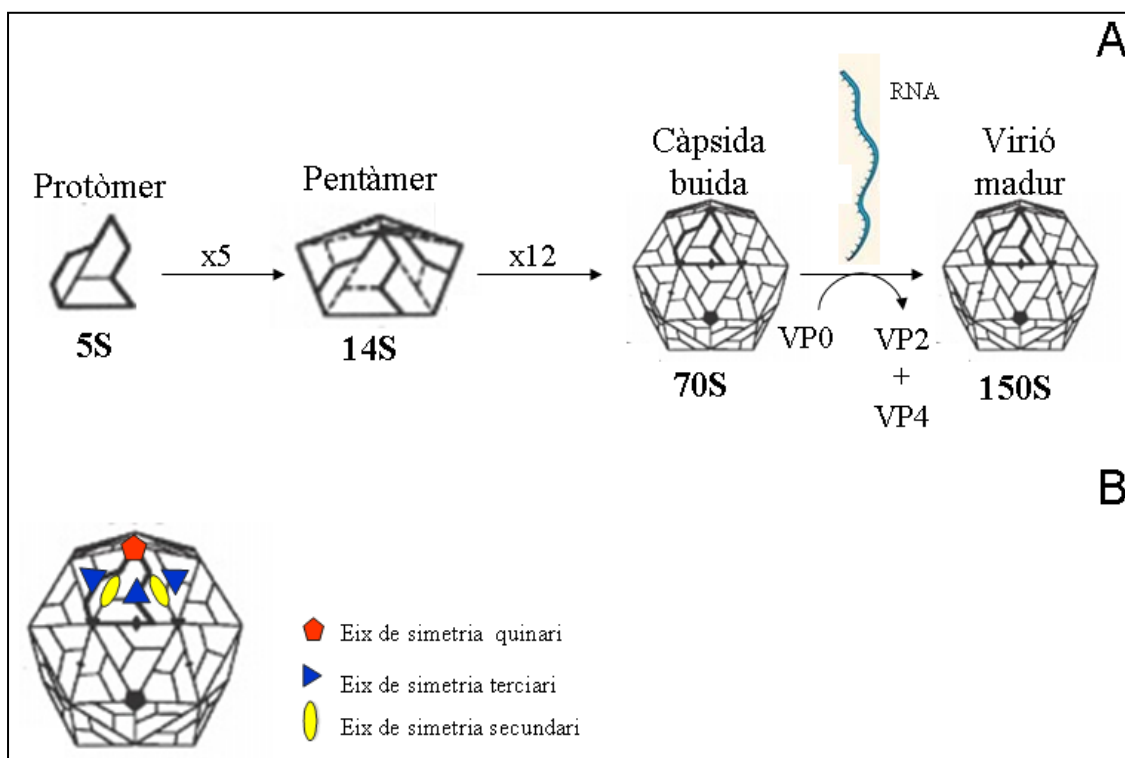


Fig.1.2.3a. Estructura icosaèdrica de la càpsida dels picornavirus

A. Morfogènesi de la càpsida vírica a partir d'un protòmer format per una còpia de VP1, VP2 i VP3, adaptat de Racaniello et al ⁵²

B. Representació esquemàtica d'una partícula vírica amb els diferents eixos de simetria.

Els protòmers s'unirien de 5 en 5 per a formar els pentàmers, amb un coeficient de sedimentació 14S. La unió de 12 pentàmers donaria lloc a una càpsida buida, amb coeficient de sedimentació 70S. Posteriorment s'hi incorporaria l'àcid nucleic per a formar el virus infecciós, amb coeficient de sedimentació de 150S, un cop s'hagués digerit VP0, en VP2 i VP4⁵³.

En el cas de l'HAV s'han generat models (Fig.1.2.3b) per comparació amb altres picornavirus amb l'ajuda de mutants d'escapament a anticossos monoclonals generats contra la càpsida de l'HAV. Mitjançant els mutants d'escapament als anticossos i assajos de competència entre els diferents anticossos monoclonals per a la neutralització

⁵² Racaniello V (2001) *Picornaviridae: The viruses and their replication*. Fields Virology, 4th Ed. Eds: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B. and Straus SD. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp 685-721

⁵³ Pintó RM, Guix S, González-Dankaart JF, Caballero S, Sánchez G, Guo KJ, Ribes E and Bosch A (2002) Hepatitis A virus polyprotein processing by *Escherichia coli* proteases. J. Gen. Virol. 83:359-368

del virus, s'ha aconseguit definir tres epítops antigènics discontinus. Un és el dit epítop immunodominant, ja que la gran majoria d'anticossos es creu que s'uneixen a aquest epítop. Els virus que perdien una part o la totalitat del reconeixement pels anticossos dirigits contra aquest epítop presenten canvis en els aminoàcids Pro-65, Asp-70, Ser-71 o Gln-74 de VP3, o Ser-102, Asn-104, Lys-105, Val-171, Ala-176 o Gln-232 de VP1^{54,55,56}, que en els models d'estructura de la càpsida queden molt allunyats entre sí (veure Fig. 1.2.3b). Això porta a creure que l'estructura de la càpsida és tal que un canvi de residu en un punt generaria un canvi d'estructura en un altre punt de la càpsida. Per altra banda, un altre epítop antigènic seria el lloc d'unió a glicoforina A⁵⁷, pel qual competeixen l'anticòs H7C27 i la glicoforina A per a unir-se al virus. De virus que perden reconeixement per part d'H7C27 se n'han obtingut dos tipus diferents, uns amb canvi en la Lys-221 de VP1⁵⁸ i l'altre amb canvi en la Ser-114 de VP1⁵⁹, aquest últim només amb una resistència parcial a l'anticòs. Finalment pel tercer epítop, al qual s'uneix l'anticòs 4E7, no s'ha pogut aïllar cap mutant d'escapament, i per tant no es coneix la localització exacta en la càpsida⁵⁴.

Tradicionalment les úniques variants antigèniques naturals conegudes de l'HAV eren soques de simi que presentaven substitucions en l'Asp-70 de VP3 i la Ser-102 de VP1. Posteriorment es van detectar canvis en l'Asp-70 de VP3, Ser-102 i Ser-114 de VP1 en soques provinents de malalts d'hepatitis A⁶⁰. Recentment s'han detectat noves variants antigèniques en pacients IgM⁺ αHAV, una presentava una substitució en la Val-

⁵⁴ Ping LH and Lemon SM, (1992) Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J.Virol.* 66:2208-2216

⁵⁵ Ping LH, Jansen RW, Stapleton JT, Cohen JI, and Lemon SM (1988) Identification of an Immunodominant Antigenic Site Involving the Capsid Protein VP3 of Hepatitis A Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:8281-8285

⁵⁶ Nainan O, Brinton M, Margolis H (1992) Identification of Amino Acids Located in the Antibody Binding Sites of Human Hepatitis A Virus. *Virology* 191: 984-987

⁵⁷ Sanchez G, Aragonés L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A and Pintó RM (2004) Capsid Region Involved in Hepatitis A Virus Binding to Glycophorin A of the Erythrocyte Membrane. *J.Virol.* 78:9807-9813

⁵⁸ Ping LH and Lemon SM, (1992) Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J.Virol.* 66:2208-2216

⁵⁹ Cox EM, Emerson SU and Lemon SM (1991) Use of oligonucleotide-directed mutagenesis to define the immunodominant neutralization antigenic site of HAV: *Vaccines 90:Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS*. Eds: Brown F, Chanock RM, and Ginsberg HS. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 169-173

⁶⁰ Day SP, Sharpe D, and Stapleton JT (1991) Evaluation of the human B lymphocyte response to hepatitis A virus: *Viral hepatitis and liver disease*. Eds: Hollinger FB, Lemon SM, and Margolis HS. Philadelphia: Williams and Wilkins, pp. 69-71

72 de VP3 que causava la pèrdua de reconeixement per part de l'anticòs K34C8⁶¹. En canvi, una altra presentava una deleció de 15 aminoàcids (VP1 95-109)⁶² i noves variants que presenten deleccions estan essent detectades més recentment^{63,64}. L'observació d'HAV amb deleccions no és un fet nou, doncs ja s'havia observat anteriorment en certes variants adaptades a cultiu cel·lular, que presentaven una deleció de 6 aminoàcids^{65,66}.

Tot i que s'han pogut aïllar variants antigèniques de l'HAV, només s'ha detectat un serotip de l'HAV¹⁵, mentre que d'altres virus de la mateixa família presenten un gran nombre de serotips. A mode d'exemple, poliovirus presenta 3 serotips⁶⁷, rinovirus 101⁶⁸, i en altres membres de la família menys estudiats com els teschovirus, se n'han detectat 11⁶⁹. Tot i l'existència d'un únic serotip, recentment s'ha demostrat que el virus replica en estructura de quasiespècies⁷⁰. Per tant, probablement la manca de variabilitat antigènica és deguda a constriccions estructurals de la càpsida⁷¹, que podria guardar relació amb l'elevada estabilitat d'aquesta.

⁶¹ Sanchez G, Pintó RM, Vanaclocha H and Bosch A (2002) Molecular Characterization of Hepatitis A Virus Isolates from a Transcontinental Shellfish-Borne Outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 40:4148-4155

⁶² Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercof R, Casane D, Colina R, Garcia L, Vega I, Glikman G, Romanowsky V, Castello A, Nicand E, Gassin M, Billaudel S and Ferre V (2002) Molecular Evolution of Hepatitis A Virus: a New Classification Based on the Complete VP1 Protein. *J.Virol.* 76:9516-9525

⁶³ Gharbi-Khelifi H, Sdiri K, Harrath R, Fki L, Hakim H, Berthomé M, Billaudel S, Ferre V and Aouni M (2007) Genetic analysis of HAV strains in Tunisia reveals two new antigenic variants. *Virus Genes* 35:155-159

⁶⁴ comunicació personal H. Norder, Karolinska Institute, Estocolm, Suècia

⁶⁵ Graff J, Normann A, Feinstone SM and Flehmig B (1994) Nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus GBM in comparison with two cell culture-adapted variants. *J.Virol.* 68: 548-554

⁶⁶ Beneduce F, Pisani G, Divizia M, Pana A and Morace G (1995) Complete nucleotide sequence of a cytopathic Hepatitis A virus strain isolated in Italy. *Virus Res.* 36:299-309

⁶⁷ Pallansch MA and Roos RP (2001) Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses *Fields Virology*, 4th Ed. Eds: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B and Straus SD. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins pp. 723-797.

⁶⁸ Laine P, Savolainen C, Blomqvist S and Hovi T (2005) Phylogenetic analysis of human Rhinovirus capsid protein VP1 and 2A protease coding sequences confirms shared genus-like relationships with human Enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 86:697-706

⁶⁹ Zell R, Dauber M, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D and Wurm R (2001) Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. *J.Virol.* 75:1620-1631

⁷⁰ Sánchez G, Bosch A, Gomez-Mariano G, Domingo E and Pintó RM (2003) Evidence for quasispecies distributions in the human Hepatitis A virus genome. *Virology* 315:34-42

⁷¹ Sánchez G, Bosch A and Pintó RM, (2003) Genome Variability and Capsid Structural Constraints of Hepatitis A Virus. *J.Virol.* 77: 452-459

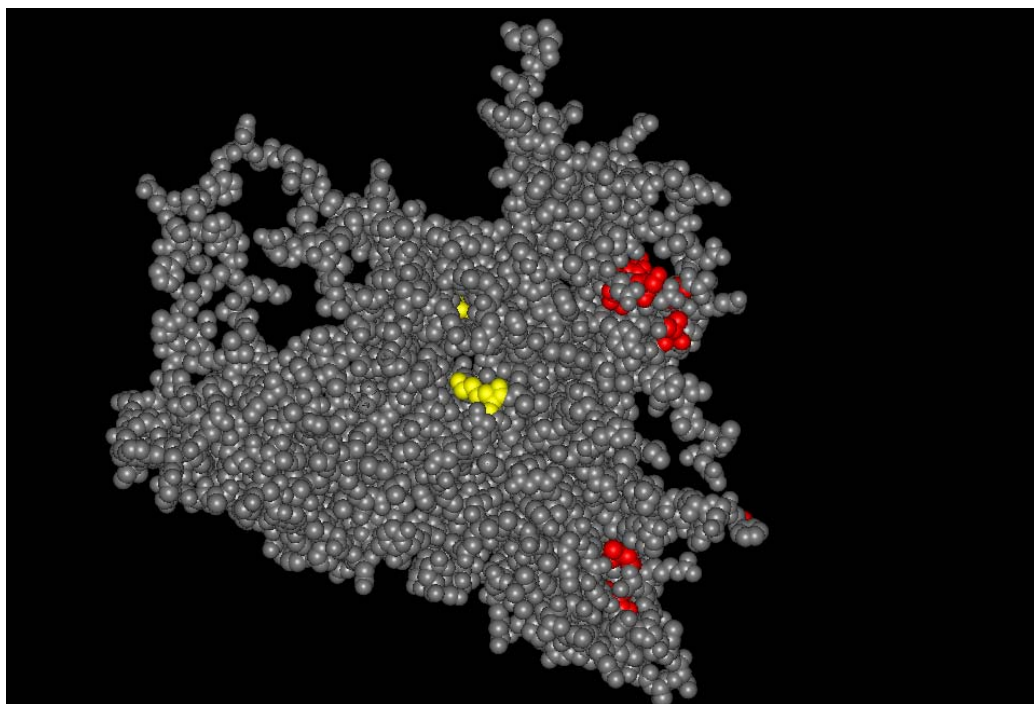


Fig.1.2.3b. Representació d'un model de monòmer de l'HAV cedit per Ming Luo (University of Alabama, Birmingham, E.E.U.U.). En vermell els residus pertanyents al epítot immunodominant i en groc els pertanyents a l'epítot d'unió a glicoforina A.

Gran varietat d'estudis han demostrat l'elevada estabilitat de l'HAV a diferents condicions. Per exemple l'HAV fou l'únic virus que mantingué part de la infectivitat entre diferents picornavirus tractats 24 hores a $\text{pH}=1$ ³⁴. També s'ha provat la seva resistència a la inactivació per temperatura⁷² i a la dessecació⁷³. El complex cicle biològic de l'HAV explicaria la selecció d'aquesta resistència del virus a una gran varietat d'agents.

1.2.4. Cicle biològic

La principal via d'infecció és la via fecal-oral, tot i que com ja s'ha comentat anteriorment, recentment se n'han descrit d'altres. Hi ha certs aspectes del cicle biològic des de que el virus és ingerit fins que és excretat en femtes que encara són obscurs, però les dades actuals suggereixen que després de la ingesta del virus, aquest arriba a l'estómac i a l'intestí, on és adsorbit i arriba al fetge a través de la vena porta¹. Al fetge es produeix la replicació vírica dins els hepatòcits. La progènie és alliberada a la bilis,

⁷² Parry JV and Mortimer PP (1984) The heat sensitivity of Hepatitis A virus determined by a single tissue culture method. J. Med. Virol. 14:277-283

⁷³ Abad FX, Pintó RM and Bosch A (1994) Survival of enteric viruses on environmental fomites. Appl. Environ. Microbiol. 60:3704-3710

des d'on arribarà al tracte gastrointestinal i serà excretat a femtes o fins i tot, alguns virus podrien ser reabsorbits i tornar a fer el mateix cicle de vena porta-hepatòcit-intestí¹ (Fig.1.2.4.). Alguns autors creuen que l'HAV podria replicar a nivell d'intestí abans d'arribar al fetge⁷⁴.

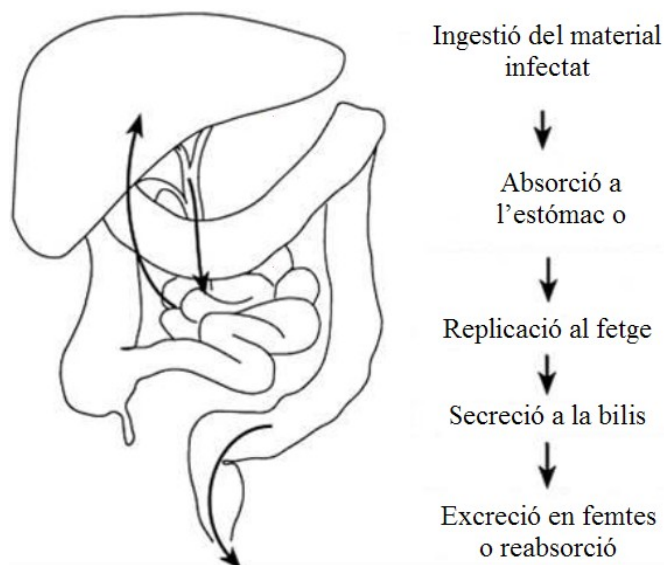


Fig.1.2.4. Esquema del cicle de l'HAV en l'hoste humà

1.2.5. Vacunes anti-HAV

Actualment existeixen quatre formulacions diferents de vacunes inactivades de l'HAV al mercat: HAVRIX[®] (GlaxoSmithKline) a partir de la soca HM-175⁷⁵, VAQTA[®] (Merck) a partir de la soca CR326⁷⁶, AVAXIM[®] (Aventis Pasteur) a partir de la soca GBM⁷⁷ i EPAXAL[®] (Berna Biotech.) amb la soca RG-SB incorporada en un virosoma format per fosfolípids i glicoproteïnes del virus de la grip⁷⁸. També existeix TWINRIX[®] (GlaxoSmithKline), que és la combinació de HAVRIX[®] amb la vacuna d'antigen recombinant del virus de l'hepatitis B. S'ha demostrat en totes les vacunes

⁷⁴ Asher LV, Binn LN, Mensing TL, Marchwicki RH, Vassell RA and Young GD (1995) Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J. Med. Virol.* 47:260-268

⁷⁵ Ashur Y, Adler R, Rowe M and Shouval D (1999) Comparison of immunogenicity of two Hepatitis A vaccines –VAQTA and HAVRIX- in young adults. *Vaccine* 17:2290-6

⁷⁶ Wasley A, Fiore A and Bell BP (2006) Hepatitis A in the era of vaccination. *Epidemiol. Rev.* 28:101-111

⁷⁷ Castillo de Febres O, Chacon de Petrola M, Casanova de Escalaona L, Naveda O, Naveda M, Estopinan M, Bordones G, Zambrano B, Garcia A and Dumas R (1999) Safety, immunogenicity and antibody persistence of an inactivated Hepatitis A vaccine in 4-15 year old children. *Vaccine* 18:656-64

⁷⁸ Ambrosch F, Wiedermann G, Jonas S, Althaus B, Finkel B, Glück R and Herzog R (1997) Immunogenicity and protectivity of a new liposomal Hepatitis A vaccine. *Vaccine* 15: 1209-1213

una eficàcia de protecció superior al 94%^{75,76,79}, però el cost de la vacuna és força elevat, situant-se al voltant dels 60\$ per dosi⁸⁰. Els costos elevats de producció, són en gran manera causats per la baixa producció d'HAV en cultiu cel·lular⁸¹. Cal tenir en compte a més que calen almenys dues dosis per a conferir la protecció desitjada de la vacuna. Tot i que en diversos llocs del món s'han iniciat proves pilot de vacunació universal, cal que el cost de la vacuna sigui inferior a 7\$ o que la incidència d'hepatitis A fos per sobre de 40/100000 persones/any, per a què la vacunació universal sigui econòmicament efectiva⁸². Així doncs sembla necessari una reducció del cost de la vacuna si es vol implantar una vacunació universal contra l'HAV⁸³. D'altra banda estudis de cost-eficàcia de vacunació únicament en grups de risc sí que donen resultats econòmicament viables amb els paràmetres actuals^{84,85}, així com en regions amb alta incidència^{86,87}.

Existeix també una vacuna viva atenuada de l'HAV sota H2⁸⁸ (Pukang Biotechnological Co.), que amb una sola dosi dona una protecció al voltant del 95%, però per aconseguir aquesta protecció cal que sigui administrada via parenteral. El seu ús només ha estat aprovat a la Xina, el país de fabricació. Gràcies a les característiques de dosi única i cost inferior a les vacunes inactivades, juntament amb els resultats

⁷⁹ Bauch CT, Rao AR, Pham BZ, Krahn M, Gilca V, Duval B, Chen MH and Tricco AC (2007) A dynamic model for assessing universal Hepatitis A vaccination in Canada. *Vaccine* 25:1719-1726

⁸⁰ Lee KK and Blodget JB (2000) Screening travellers for Hepatitis A antibodies. *West. J. Med.* 175:325-329

⁸¹ Lemon SM (1985) Type A viral hepatitis. New developments in an old disease. *New Engl. J. Med.* 313:1059-1067

⁸² O'Connor JB, Imperiale TF, and Singer ME (1999) Cost-effectiveness analysis of Hepatitis A vaccination strategies for adults. *Hepatology* 30:1077-1081

⁸³ Postma MJ, Bos JM, Beutels P, Schilthuis H and van de Hoek JAR, (2004) Pharmaco-economic evaluation of targeted Hepatitis A vaccination for children of ethnic minorities in Amsterdam (The Netherlands). *Vaccine* 22:1862-1867

⁸⁴ Bayas JM, González A, Vilella A, San-Martín M, Bertran MJ and Adell C (2001) Cost analysis of two strategies for preventing Hepatitis A virus infection in Spanish travellers to developing countries. *Epidemiol. Infect.* 127:347-351

⁸⁵ Rein DB, Hicks KA, Wirth KE, Billah K, Finelli L, Fiore AE, Hoerger TJ, Bell BP and Armstrong GL (2007) Cost-effectiveness of routine childhood vaccination for Hepatitis A. *Pediatrics* 119:e12-21

⁸⁶ Valenzuela MT, Jacobs RJ, Arteaga O, Navarrete MS, Meyerhoff AS and Innis BL (2005) Cost-effectiveness of universal childhood Hepatitis A vaccination in Chile. *Vaccine* 23:4110-4119

⁸⁷ Lopez E, Derbag R, Coudeville L, Baron-Papillon F and Armoni J (2007) The cost-effectiveness of universal vaccination of children against hepatitis A in Argentina: results of a dynamic health-economic analysis. *J. Gastroenterol.* 42:152-160

⁸⁸ Mao JS, Dong DX, Zheng HY, Chen NL, Zhang XY, Huang XY, Xie RY, Zhou TJ, Wan ZJ and Wang YZ (1989) Primary study of attenuated live Hepatitis A vaccine (H2 strain) in humans. *J. Infect. Dis.* 159:621-624

epidemiològics esperançadors observats a la Xina, s'ha obert la possibilitat del seu ús a la Índia⁸⁹.

L'opció d'usar pèptids sintètics com a vacunes anti HAV és complicada degut al caràcter conformacional de la majoria d'epítops⁹⁰. Tot i això s'han pogut obtenir pèptids sintètics immunogènics de 2 epítops continus⁹¹. S'ha pogut comprovar que aquests epítops són capaços d'induir la síntesi d'anticossos neutralitzants de la infectivitat vírica *in vitro*. Però no s'ha comprovat la seva eficàcia protectora contra la infecció *in vivo*. Una altra aproximació és la d'expressar els gens de les subunitats de la càpsida en sistemes d'expressió heteròlegs, tant en *Escherichia coli*^{92,93}, com en baculovirus⁹⁴, però es necessiten grans quantitats d'antígen per a produir una lleu resposta immune. En sistemes d'expressió heteròlegs també s'ha provat de produir càpsides buides (Virus-Like Particles) tant en *Escherichia coli*^{53,95}, en baculovirus⁹⁶ i mitjançant l'ús de vectors derivats del virus Vaccinia⁹⁷, però la producció és baixa en tots els casos. En el cas de la producció sota el control de Vaccinia, la majoria és en forma de pentàmers (subunitat 15S de coeficient de sedimentació), que no mantenen les característiques immunològiques de la càpsida sencera (subunitat 70S de càpsides buides). Una altra aproximació ha estat usar virus vius quimera portadors d'antígens d'HAV. S'han construït dos sistemes: un utilitzant poliovirus i l'altre utilitzant el virus Vaccinia. En el cas de l'ús de poliovirus com a virus portador tampoc no s'obtingué una resposta

⁸⁹ Bhavé S, Barduar A, Madan Z, Jha R, Bhura S, Chaudhari J and Pandit A (2006) Evaluation of immunogenicity and tolerability of a live attenuated vaccine in Indian children. *Indian Pediatrics* 43:983-987

⁹⁰ D'Hondt E (1992) Possible approaches to develop vaccines against Hepatitis A. *Vaccine* 10:S48

⁹¹ Pintó RM, González-Dankaart JF, Sánchez G, Guix S, Gómara MJ, García M, Haro I and Bosch A (1998) Enhancement of the immunogenicity of a synthetic peptide bearing a VP3 epitope of Hepatitis A. *FEBS Letters* 438:106-110

⁹² Powdrill TF and Johnston JM (1991) Immunologic priming with recombinant Hepatitis A virus capsid proteins produced in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 65:2686-2690

⁹³ Johnston JM, Harmon SA, Binn LN, Richards OC, Ehrenfeld E and Summers DF (1988) Antigenic and immunogenic properties of a Hepatitis A virus capsid protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 157:1203-1211

⁹⁴ Harmon SA, Johnston JM, Ziegelhoffer T, Richards OC, Summers DF and Ehrenfeld E (1988) Expression of Hepatitis A virus capsid sequences in insect cells. *Virus Res.* 10:273-280

⁹⁵ Sánchez G, Caballero S, Guix S, Bosch A and Pintó RM (2003) Antigenic Hepatitis A virus structures may be produced in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1840-1843

⁹⁶ Rosen E, Stapleton JT and McLinden J (1993) Synthesis of immunogenic Hepatitis A virus particles by recombinant baculoviruses. *Vaccine* 11:706-712

⁹⁷ Winokur PL, McLinden JH and Stapleton JT (1991) The Hepatitis A virus polyprotein expressed by a recombinant vaccinia virus undergoes proteolytic processing and assembly into virus-like particles. *J. Virol.* 65:5029-5036

antigènica satisfactòria en animals⁹⁸. En canvi l'ús de Vaccinia recombinant portador dels antigens d'HAV sí que donà lloc a una resposta immunològica protectora enfront l'HAV en micos tamarins⁹⁹. No obstant, l'ús de Vaccinia és perillós per a immunodeprimits, així com tampoc es coneix l'eficàcia d'aquesta vacuna en individus seropositius contra Vaccinia. Així doncs sembla ser que els futurs desenvolupaments per a una vacuna més econòmica i més segura passen per l'optimització de la producció de VLPs (Virus-Like Particles) en sistema d'expressió heteròlegs, o un increment de la producció del virus en cultiu cel·lular.

1.3. Replicació en quasiespècies virals

La teoria de quasiespècies la desenvolupà Manfred Eigen l'any 1971¹⁰⁰ com a model de replicació amb baixa fidelitat de còpia de les primeres formes de vida a la Terra. Més endavant, s'aplicà la teoria als virus RNA¹⁰¹, doncs també tenien les característiques d'elevada progènie, temps curts de replicació, i una elevada taxa de mutació d'entre 10^{-3} i 10^{-5} deguda a la manca d'activitat correctora de la polimerasa¹⁰².

Una quasiespècie es defineix com a un conjunt de genomes virals propers genèticament, sobre el conjunt dels quals actua la selecció natural. Mai existeix una seqüència única, i cada genoma individual és esporàdic ja que la mutació, la competició i la selecció són esdeveniments ininterromputs¹⁰³. A més a més, el nombre de seqüències de la població és superior a l'invers de la taxa de mutació, per tant la mutació és un fet molt freqüent.

⁹⁸ Lemon SM, Barclay W, Ferguson M, Murphy P, Wood D, Katrak K, Sangar D and Minor PD (1992) Immunogenicity and antigenicity of chimeric Picornaviruses which express Hepatitis A virus (HAV) peptide sequences: evidence for a neutralization domain near the amino terminus of VP1 of HAV. *Virology* 188:285-295

⁹⁹ Karayiannis P, O'Rourke S, McGarvey MJ, Luther S, Waters J, Goldin R and Thomas HC (1991) A recombinant Vaccinia virus expressing Hepatitis A virus structural polypeptides: characterization and demonstration of protective immunogenicity. *J. Gen. Virol.* 72:2167-2172

¹⁰⁰ Eigen M (1971). Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* 58:465-523

¹⁰¹ Domingo E, Sabo D, Taniguchi T and Weissmann C (1978) Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* 13:735-744

¹⁰² Drake JW (1993) Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:4171-4175

¹⁰³ Domingo E and Holland JJ (1997) RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Rev. Microbiol.* 51:151-178

En una quasiespècie es defineix la seqüència màster o dominant, com la seqüència més representada a la població, i la seqüència consens com a la seqüència mitja de la població¹⁰⁴. L'objectiu d'una quasiespècie és la d'ocupar al màxim el seu espai de seqüència (espai imaginari que representa totes les seqüències d'una quasiespècie viral). Com més ampli és l'espai de seqüència, major capacitat d'adaptació a una gran varietat d'ambients¹⁰⁵. Aquest increment d'espai de seqüència l'aconsegueixen gràcies a l'elevada taxa de mutació, així com la recombinació. Mitjançant la recombinació els virus RNA poden explorar espais de seqüència difícils d'explorar per acumulació de mutacions, així com també rescatar genomes de parentals debilitats. El fenomen de la recombinació és comú en els virus RNA, podent ser tant homòloga com no homòloga¹⁰⁶. La recombinació en alguns casos pot donar lloc a genomes amb delecions¹⁰⁷.

Degut a l'elevada taxa de mutació, la gran majoria de descendents dels virus RNA tenen baix *fitness* associat. Però gràcies a l'alta taxa de replicació es produeixen també un nombre considerable de virus amb *fitness* alt. Quan es dona un coll d'ampolla, és poc probable la presència de virus d'alt *fitness* en la població, per ser menys freqüents, i es produeix una pèrdua de *fitness* general en la població^{108,109}. La pèrdua de *fitness* deguda a successius colls d'ampolla és conegut com a *Muller's ratchet*¹¹⁰, degut a l'efecte de pèrdua de *fitness* sense remei. La taxa de mutació a la que repliquen els virus RNA és propera al que se'n diu el llindar d'error. Per sobre d'aquest llindar d'error els virus no són capaços de mantenir tampoc els genomes viables i per tant la població perd *fitness* i s'extingeix per excés de mutacions deletèries¹¹¹. Aquest fet

¹⁰⁴ Eigen M, McCaskill J and Schuster P (1988) Molecular quasi-species. J. Phys. Chem. 92:6881-6891

¹⁰⁵ Domingo E, Escarmís C, Sevilla N, Moya A, Elena SF, Quer J, Novella IS, Holland JJ (1996) Basic concepts in RNA evolution. FASEB J. 10:859-864

¹⁰⁶ Nagy PD and Simon AE (1997) New insights into the mechanisms of RNA recombination. Virology 235:1-9

¹⁰⁷ Gmyl AP, Belousov EV, Maslova SV, Khitrina EV, Chetberin AB and Agol VI (1999) Nonreplicative RNA recombination in Poliovirus. J. Virol 73:8958-8965

¹⁰⁸ Chao L (1990) Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. Nature 348:454-455

¹⁰⁹ Clarke DK, Duarze EA, Moya A, Elena SF, Domingo E, Holland JJ (1993) Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. J. Virol. 67:222-228

¹¹⁰ Muller, HJ (1964) The relation of recombination to mutational advance. Mutat. Res. 1:2-9

¹¹¹ Holland JJ, Domingo E, de la Torre JC and Steinhauer DA (1990) Mutation frequencies at defined single codon sites in Vesicular Stomatitis virus and Poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. J. Virol 64:3960-3962

s'aprofita actualment per al disseny de drogues que permetin tractar certes malalties causades per virus RNA¹¹².

L'aspecte de la teoria que contrasta més amb les teories genètiques clàssiques és el que es coneix com a *survival of the flattest* per contra del *survival of the fittest* de la genètica de poblacions. Si es representa l'espai de seqüència d'una població en una pla bidimensional i el *fitness* de cadascuna de les seqüències en l'alçada (Fig.1.3). Segons la genètica de poblacions, la població dominant seria la de la seqüència màster amb més *fitness*. En canvi, segons la teoria de quasiespècies és beneficiós que les seqüències properes a la màster tinguin també un *fitness* considerable, essent més important aquest fet que el *fitness* de la pròpia seqüència màster. Això és degut a la gran taxa de mutació, fent que la majoria de virus de la progènie siguin mutants propers a la seqüència màster. Així doncs, és profitós per a la població que aquests mutants siguin també viables. Tornant a la representació gràfica, aquesta quasiespècie tindria forma de turó, més pla (*flatter*) que un pic vertical¹¹³.

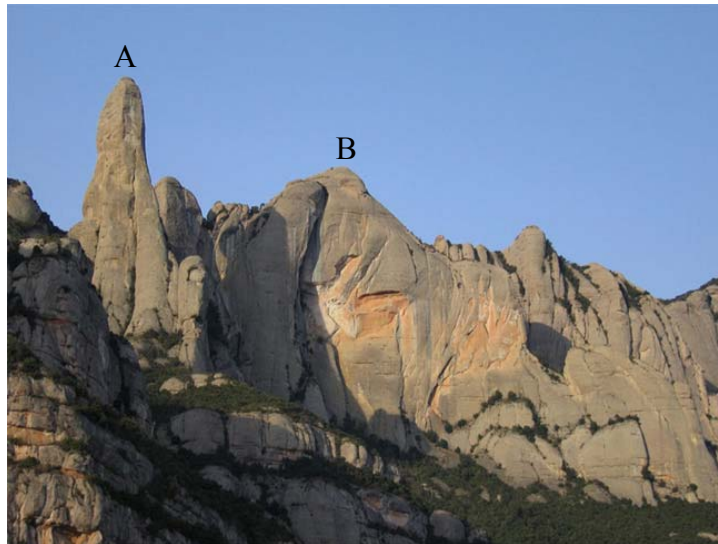


Fig.1.3. Representació de la quasiespècie amb seqüència màster d'alt *fitness*, però mutants propers de baix *fitness* (A) i de la quasiespècie amb seqüència màster de *fitness* intermig, però més plana que l'anterior i per tant més ben adaptada (B).

¹¹² Domingo E, Escarmís C, Lázaro E, Manrubia SC (2005) Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Res.* 107:129-139

¹¹³ Codoner FM, Daros JA, Sole RV and Elena SF (2006) The fittest versus the flattest: experimental confirmation of the quasispecies effect with subviral pathogens. *PLoS Pathog.* 2:e136

Un altre aspecte característic dels virus RNA és la supressió de variants d'alt fitness per una variant de menor fitness, però que es troba en major proporció a la població. Això és degut a la síntesi en *trans* de l'RNA genòmic i les proteïnes de la càpsida. Si la proporció de la variant d'alt fitness és baixa, la probabilitat que la càpsida d'alt fitness encapsidi el genoma que l'ha codificat és molt baixa¹¹⁴.

1.4. El codi genètic i l'ús de codons

1.4.1. La selecció sobre l'ús de codons

Els canvis sinònims de nucleòtids no comporten cap canvi en la seqüència de proteïnes, i per tant tradicionalment s'havien proposat com a llocs neutres a la selecció^{115,116}. Però ràpidament es formà un debat sobre el neutralisme d'aquestes mutacions, doncs les concentracions dels diferents tRNAs que carreguen un mateix aminoàcid són diferents i per tant la taxa de síntesi proteica seria dependent del codó sinònim codificant^{117,118}. Els detractors de la teoria neutralista van trobar en la combinació de diferents estudis de laboratori i en la disponibilitat d'un gran nombre de seqüències de DNA la demostració experimental de les seves teories¹¹⁹, doncs l'ús de codons no es produïa a l'atzar, demostrant-se en *Escherichia coli*¹²⁰ i en general en totes les bacteries de creixement ràpid¹²¹. A més a més s'ha observat una correlació positiva entre el grau de biaix en l'ús de codons i el nivell d'expressió gènica¹²², així com el fet que els codons majoritaris són aquells que s'aparellen amb els tRNAs més abundants¹²³, i també una correlació entre els codons majoritaris i el nombre total de

¹¹⁴ de la Torre JC and Holland JJ (1990) RNA virus quasispecies can suppress vastly superior mutant progeny. J. Virol. 64:6278-6281

¹¹⁵ King JL and Jukes TH (1969) Non-Darwinian evolution. Science 164:788-797

¹¹⁶ Kimura M (1970) Evolutionary rate at the molecular level. Nature 217:624-626

¹¹⁷ Clarke B (1970) Darwinian evolution of proteins. Science 168: 1009-1111

¹¹⁸ Richmond RC (1970) Non-Darwinian evolution: a critique. Nature 225:1025-1028

¹¹⁹ Akashi H (2001) Gene expression and molecular evolution. Curr. Opin. Genet. Dev. 11: 660-666

¹²⁰ Ikemura T (1981) Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNA and the occurrence of the respective codon in its protein genes. J. Mol. Biol. 146: 1-21

¹²¹ Rocha E (2004) Codon usage bias from tRNA's point of view: Redundancy, specialization, and efficient decoding for translation optimization. Genome Research 14: 2279-2286

¹²² Sharp PM and Li WH (1987) The codon optimization index a measure of directional synonymous codon usage bias and its potential applications. Nucleic Acids Res. 15:1281-1295

¹²³ Ikemura T (1985) Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. Mol. Biol. Evol. 2:13-34

gens del seu tRNA homòleg al genoma¹²⁴. Això ha donat lloc a la teoria de la selecció traduccional (*translation selection*).

Un altre aspecte força estudiat és l'efecte que podria tenir l'ús de codons en el plegament proteic^{125,126}. Tenint en compte que el plegament es produeix al mateix moment de la traducció¹²⁷, la distribució de codons rars (aquells utilitzats menys d'un 30 % respecte el sinònim més abundant⁷¹) regularia el plegament de la proteïna durant la traducció¹²⁸. Fins i tot s'ha observat una tendència dels codons rars a agrupar-se, fet que disminuiria dràsticament la traducció, però d'altra banda acumulacions necessàries per a un correcte plegament proteic¹²⁹. L'ús d'un codó molt rar també pot portar, però, a la incorporació d'un aminoàcid erroni si el ribosoma no troba l'aminoacil-tRNA complementari¹³⁰. S'ha observat també el fet que hi ha codons que apareixen més freqüentment en hèlix α , d'altres que tendeixen a trobar-se en làmines β ¹³¹ i fins i tot alguns codons es troben més freqüentment a les regions N-terminal i d'altres a les C-terminal de les estructures secundàries de les proteïnes¹³². Així doncs, sembla ser que la selecció genètica inclou també l'optimització d'un patró de codons en l'mRNA que reguli la cinètica de traducció¹³³. Això ha donat lloc a la teoria de la selecció per a una sintonització fina de la cinètica de traducció (*fine-tuning translation kinetics selection*).

¹²⁴ Kanaya S, Yamada Y, Kudo Y, Ikemura T (1999) Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. *Gene* 238:143-155

¹²⁵ Xie T and Ding DF (1998) The relationship between synonymous codon usage and protein structure. *FEBS letters* 434:93-96

¹²⁶ Komar AA, Lesnik T and Reiss C (1999) Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation. *FEBS letters* 462:387-391

¹²⁷ Kolb VA, Makeyev EV, Kommer A and Spirin AS (1995) Cotranslational folding of proteins *Biochem. Cell Biol.* 73:1217-1120

¹²⁸ Trifonov EN and Makhoul CH (2002) Distribution of rare triplets along mRNA and their relation to protein folding. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 20:1-7

¹²⁹ Chou T and Lakatos G (2004). Clustered bottlenecks in mRNA translation and protein synthesis. *Phys. Rev. Lett.* 93:1-4

¹³⁰ Robinson M, Lilley R, Little S, Emtage JS, Yarranton G, Stephens P, Millican A, Eaton M and Humphreys G (1984) Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 12:6663-6671

¹³¹ Gu W, Zhou T, Ma J, Sun X and Lu Z (2003) Folding type specific secondary structure propensities of synonymous codon usage. *IEEE Trans. Nanobioscience* 2:150-157

¹³² Oresic M and Shalloway D (1998) Specific correlations between relative synonymous codon usage and protein secondary structure. *J.Mol.Biol.* 81:31-48

¹³³ Adzhubei AA, Adzhubei IA, Krashennnikov IA and Neidle S (1998) Non-random usage of degenerate codons is related to protein three-dimensional structure. *FEBS letters* 399:78-82

La selecció de l'ús de codons es va demostrar fàcilment i va ser àmpliament acceptat en bacteries i llevats, però quan es van realitzar estudis sobre el biaix de l'ús de codons en eucariotes superiors es va veure que també podia explicar-se per una mutació diferencial. Això vol dir la tendència a fer un tipus de mutacions més que unes altres¹³⁴. L'existència d'un ús de codons esbiaixat en la gran majoria d'organismes estudiats és evident i significativa, però es desconeix amb exactitud quina part correspon a la mutació diferencial i quina a la selecció per la taxa de traducció¹³⁵. Diversos factors regularien el grau de selecció. Un seria el tamany efectiu de la població (N_e). Un tamany efectiu elevat és necessari per a què la selecció moduli l'ús de codons¹³⁶. Un altre factor és el temps de generació, doncs l'optimització de la traducció és efectiva per a un organisme com *Escherichia coli* que divideix varies vegades en una hora, però de poc valor, per exemple, en humans¹³⁷. Mitjançant algoritmes de Monte Carlo via cadenes de Markov basats en genomes de 126 organismes diferents, que engloben gairebé tot l'arbre evolutiu, s'ha construït un paisatge de la selecció de l'ús de codons (Fig.1.4.1). Aquest paisatge té com a variables el nombre de gens de tRNA i el tamany del genoma¹⁴⁰ (relacionat amb el temps de generació i el tamany efectiu de la població).

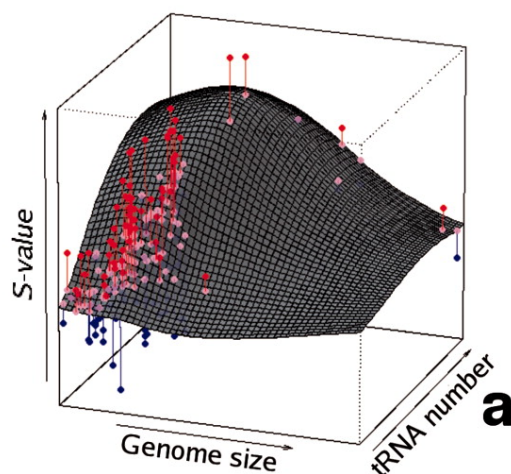


Fig.1.4.1. Regressió dels valors de selecció (*S-value*) ajustada a les còpies gèniques de tRNA i a la mida de genoma. Els punts roses són els valors de selecció de cada organisme predits matemàticament. Els punts vermells són els valors de selecció majors als predits. Els punts blaus són els valors de selecció inferiors als predits¹³⁷.

¹³⁴ Bulmer M (1991) The selection-mutation-drift theory of synonymous codon usage. *Genetics* 129:897-907

¹³⁵ Sharp PM, Stenico M, Penden JF and Lloyd AT (1993) Codon usage: mutational bias, translational selection or both? *Biochem. Soc. Trans.* 21:835-841

¹³⁶ Bulmer M (1991) The selection-mutation-drift theory of synonymous codon usage. *Genetics* 129:897-907

¹³⁷ dos Reis M, Savva R and Wernisch L (2004) Solving the riddle of codon usage preferences: a test for translational selection. *Nucleic Acids Res.* 32:5036-5044

Aquest model mostra matemàticament el que s'havia observat en alguns organismes experimentalment: que els llevats i bacteries de genomes grans tenen una forta selecció per traducció¹²³, que en organismes amb genomes i nombre de tRNAs similars a *Drosophila Melanogaster*¹³⁸ i *Caenorhabditis elegans*¹³⁹ la selecció tindria un efecte intermig en el biaix de l'ús de codons, i que, en genomes bacterians amb pocs gens de tRNA¹⁴⁰ i en grans genomes eucariotes¹⁴¹, la selecció tindria un efecte lleu. Tot i els diferents models i teories que assegurin que la major part de biaix en l'ús de codons en mamífers és degut al biaix mutacional, s'ha pogut veure diversos fets que anirien en contra d'aquestes teories. Un és el fet que els gens humans expressats en un ventall més ampli de teixits tenen un ús de codons més esbiaixat. Un altre que els gens amb l'ús de codons més esbiaixat tenen menor taxa d'evolució sinònima¹⁴². I un tercer fet és que l'humanització de gens heteròlegs (adaptació de l'ús de codons del gen al de la cèl·lula humana) fa que incrementi substancialment l'expressió d'aquests en cèl·lules humanes^{143,144,145}. Aquestes dades, especialment l'augment de síntesi proteica amb l'humanització de gens heteròlegs, fan pensar que també en eucariotes superiors, l'ús de codons regula la síntesi proteica, tot i no tenir un fort pes en la selecció. En el cas humà, un estudi demostra que tot i lleu, existeix una correlació positiva significativa entre la síntesi proteica, l'ús de codons i les còpies gèniques de tRNAs¹⁴⁶, confirmant així la no neutralitat de l'ús de codons per a la síntesi proteica en humans.

D'altra banda, no només s'ha demostrat la selecció d'un ús de codons esbiaixat en favor de l'augment de la velocitat de síntesi proteica, també s'ha demostrat la

¹³⁸ Powell JR and Moriyama EN (1997) Evolution of codon usage bias in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. 94:7784-7790

¹³⁹ Stenico M, Lloyd AT and Sharp PM (1994) Codon usage in *Caenorhabditis elegans*: delineation of translational selection and mutational biases. Nucleic Acids Res. 22:2437-2446

¹⁴⁰ Lafay B, Atherton JC and Sharp PM (2000) Absence of translationally selected synonymous codon usage bias in *Helicobacter pylori*. Microbiology 146:851-860

¹⁴¹ Francino HP and Ochman H (1999) Isochores result from mutation not selection. Nature 400:30-31

¹⁴² Urruria AO and Hurst LD (2001) Codon usage bias covaries with expression breadth and the rate of synonymous evolution, but this is not evidence for selection. Genetics 159:1191-1199

¹⁴³ Zolotukhin S, Potter M, Hauswirth WW, Guy J and Muzyczka N (1996) A humanized green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. J. Virol. 70:4646-4654

¹⁴⁴ Levy JP, Mulclon RR, Zolotukhin and Link CJ (1996) Retroviral transfer and expression of humanized, red-shifted green fluorescent protein gene into human tumor cells. Nat. Biotechnol. 14:610-614

¹⁴⁵ Wells KD, Foster JA, Moore K, Pursel VG and Wall RJ (1999) Codon optimization, genetic insulation, and an rtTA reporter improve performance of tetracycline switch. Transgenic Res. 8:371-381

¹⁴⁶ Lavner Y and Kotlar D (2005) Codon bias as a factor in regulating expression via translation rate in the human genome. Gene 345:127-138

selecció en el sentit contrari, per a alentir la síntesi tot regulant el plegament de la proteïna. Aquest fet s'ha observat en proteïnes d'organismes tant diferents com la Cloramfenicol Acetil Transferasa (CAT) d'*Escherichia coli*¹²⁶ i la Glicoproteïna P humana¹⁴⁷

1.4.2. L'ús de codons en virus

Tenint en compte que sembla ser que la selecció en l'ús de codons deguda a la traducció és més gran a més nombre de gens de tRNA i a menor genoma (Fig.1.4.1), sembla força evident que l'ús de codons pot tenir un paper molt important en virus d'eucariotes superiors. Certament, s'ha pogut observar l'existència d'un biaix en l'ús de codons en la gran majoria de virus estudiats, tant d'RNA¹⁴⁸, com de DNA¹⁴⁹, però també han sorgit veus que volen relacionar el biaix en l'ús de codons dels virus amb la mutació diferencial^{150,151}.

En canvi s'ha pogut comprovar que existeix una relació entre la disponibilitat de tRNAs i l'expressió de les proteïnes de la càpsida dels papilomavirus (HPV)¹⁵². Fins i tot s'ha observat que una vacuna de DNA del gen E7 de HPV16 a la qual se li ha optimitzat l'ús de codons, augmenta la immunogenicitat gràcies a l'augment de l'expressió del gen¹⁵³. També el canvi dels codons rars del gen E5 de HPV16 per codons sinònims més freqüents suposà un augment d'entre 6-9 vegades de síntesi proteica¹⁵⁴. Però no només en papilomavirus s'ha demostrat una relació entre l'ús de codons i el nivell d'expressió proteica. En el cas del virus Epstein-Barr (HHV-4), s'ha observat un ús de codons totalment oposat entre els gens expressats durant la fase de latència i els gens expressats durant la fase de creixement lític. Els gens de latència de

¹⁴⁷ Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM (2007) A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315:525-528

¹⁴⁸ Auewarakul P (2005) Composition bias and genome polarity of RNA viruses. *Virus Res.* 109:33-37

¹⁴⁹ Sewatanon J, Srichatrapimuk S and Auewarakul P (2007) Compositional bias and size genomes of human DNA viruses. *Intervirology* 50:123-132

¹⁵⁰ Jenkins GM and Holmes EC (2003) The extent of codon usage bias in human RNA viruses and its evolutionary origin. *Virus Res.* 92:1-7

¹⁵¹ Shackelton LA, Parrish CR and Holmes EC (2006) Evolutionary basis of codon usage and nucleotide composition bias in vertebrate DNA viruses. *J. Mol. Evol.* 62:551-563

¹⁵² Zhou J, Liu WJ, Peng SW, Sun XY and Frazer I (1999) Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *J. Virol.* 73:4972-4982

¹⁵³ Liu WJ, Gao F, Zhao KN, Zhao W, Fernando GJ, Thomas R and Frazer IH (2002) Codon modified human Papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and anti-tumorous activity. *Virology* 301:43-52

¹⁵⁴ Disbrow GL, Sunitha I, Baker CC, Hanover J and Schlegel R (2003) Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression. *Virology* 311:105-114

HHV-4 són els que presenten l'ús de codons oposat al de l'hoste, per a minimitzar les conseqüències en l'hoste de l'expressió de gens virals en la latència¹⁵⁵. D'altra banda, quan s'optimitza l'ús de codons de vacunes de DNA de HIV també s'observa un augment en l'immunogenicitat¹⁵⁶, de manera similar com ocorre amb vacunes de virus de l'Hepatitis C (HCV)¹⁵⁷. I com a últim exemple entre molts més, també s'ha pogut obtenir un augment de la síntesi proteica quan s'optimitza l'ús de codons del Virus de la Diarrea Porcina Epidèmica (PEDV) per a expressar-lo en *Nicotiana tabacum*¹⁵⁸.

Més recentment s'ha començat a utilitzar l'ús de codons com a eina epidemiològica i evolutiva¹⁵⁹, especialment per relacionar la filogènia dels virus i l'adaptació a diferents hostes^{160,161}.

1.4.3. L'ús de codons en l'HAV

Com ja s'ha explicat anteriorment, l'HAV presenta un IRES tipus III amb una baixa eficiència d'inici de traducció³⁵, i no presenta proteasa que indueixi el *shutoff* cel·lular⁴⁴. Aquestes dues característiques, juntament amb un ús de codons més esbiaixat que el dels altres picornavirus i oposat al de la cèl·lula hoste, fan de l'HAV un virus particular dins aquesta família. L'HAV presenta 15 aminoàcids amb almenys un codó rar, i en total presenta 27 codons rars d'un màxim possible de 41. A més a més els codons rars es troben conservats al llarg dels diferents aïllaments, fent que contribueixin a la invariabilitat del virus⁷¹. En el cas de poliovirus, també s'ha observat que, tot i l'existència de 3 serotips i un ús de codons menys esbiaixat que el d'HAV, els codons

¹⁵⁵ Karlin S, Blaisdell BE, Schachtel GA (1990) Contrasts in codon usage of latent versus productive genes of Epstein-Barr virus: data and hypothesis. *J. Virol.* 64:4264-4273

¹⁵⁶ Young KR, Teal BE, Brooks Y, Green TD, Bower JF; Ross TM (2004) Unique V3 loop sequence derived from the R2 strain of HIV-type 1 elicits broad neutralizing antibodies. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20:1259-1268

¹⁵⁷ Frelin L, Ahlen G, Alheim M, Weiland O, Barnfield C, Liljestrom P and Sallberg M (2004) Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the Hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther.* 11:522-533

¹⁵⁸ Kang TJ, Kang KH, Kim JA, Kwon TH, Jang YS and Yang MS (2004) High-level expression of the neutralizing epitope of Porcine Epidemic Diarrhea virus by a Tobacco Mosaic virus-based vector. *Protein Expr. Purif.* 38:129-135

¹⁵⁹ Ahn I and Son HS (2006) Epidemiological comparison of codon usage patterns among HIV-1 isolates from Asia, Europe Africa and the Americas. *Exp. Mol. Med.* 38:643

¹⁶⁰ Zhou H, Wang H, Huang LF, Naylor M and Clifford P (2005) Heterogeneity in codon usages of Sobemovirus genes. *Arch. Virol.* 150:1591-1605

¹⁶¹ Van Hemert FJ, Berkhout B and Lukashov VV (2007) Host-related nucleotide composition and codon usage as driving forces in the recent evolution of *Astroviridae*. *Virology* 361:447-454

rars limiten la variabilitat del virus¹⁶². En el cas de poliovirus s'han produït virus sintètics, als que se'ls ha incrementat el nombre de codons rars codificats al genoma, observant-se, s'ha observat una disminució del *fitness* replicatiu dels virus sintètics respecte el virus salvatge. Aquesta disminució de *fitness* es pot relacionar amb constriccions amb estructures secundàries importants de l'RNA, doncs el *fitness* replicatiu disminueix amb l'augment de dinucleòtids CG¹⁶³. També es pot associar amb la taxa de traducció, doncs a mesura que es deoptimitza l'ús de codons del virus, tot augmentant el nombre de codons rars, disminueix la producció viral¹⁶⁴. En el cas d'HAV s'ha postulat que en la regió de la càpsida la funció dels codons rars seria la regulació de la síntesi proteica per a assegurar el plegament, doncs la majoria de codons rars conservats es troben a la regió carboxi-terminal de les estructures secundàries de les proteïnes⁷¹. Aquesta funció de regulació de plegament no sembla important en poliovirus, doncs un mutant que manté l'ús de codons tot variant la posició dels codons rars no presenta una producció viríca inferior al salvatge¹⁶⁴. D'altra banda la proteïna 3D d'HAV, també presenta un gran nombre de codons rars, però en aquest cas sí que semblaria que les constriccions d'aquests serien degudes a estructures secundàries de l'RNA⁷¹.

A diferència de la majoria de picornavirus, l'HAV presenta un ús de codons antagònic al del seu hoste. D'aquesta manera, tot i no tenir un IRES eficient, ni induir *shutoff* cel·lular, el virus sintetitza les seves proteïnes tot utilitzant els tRNAs menys utilitzats per la cèl·lula hoste. Això implica una velocitat de síntesi lenta, que per contra propicia un millor plegament⁷¹, donant lloc a virus amb elevada resistència a gran diversitat de condicions, i també a una major infectivitat específica. La infectivitat

¹⁶² Gavrilin GV, Cherkasova EA, Lipskaya GY, Kew OM and Agol VI (2000) Evolution of circulating wild Poliovirus and of vaccine-derived Poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J. Virol.* 74:7381-7390

¹⁶³ Burns CC, Shaw J, Campagnoli R, Jorba J, Vincent A, Quay J and Kew O (2006) Modulation of poliovirus replicative fitness in HeLa cells by deoptimization of synonymous codon usage in the capsid region. *J. Virol.* 80:3259-3272

¹⁶⁴ Mueller S, Papamichail D, Coleman JR, Skiena S and Wimmer E (2006) Reduction of the rate of poliovirus protein synthesis through large-scale codon deoptimization causes attenuation of viral virulence by lowering specific infectivity. *J. Virol.* 80:9687-9696

específica d'HAV és d'1 partícula infecciosa per cada 60 partícules físiques¹⁶⁵, superior a la de poliovirus¹⁶⁴ (1:115), a la de rinovirus¹⁶⁶ (1:800) i la de mengovirus (1:2200)¹⁶⁷

¹⁶⁵ Jansen RW, Newbold JE and Lemon SM (1988) Complete nucleotide sequence of a cell culture-adapted variant of hepatitis a virus: comparison with wild-type virus with restricted capacity for in vitro replication. *Virology* 163:299-307

¹⁶⁶ Lee WM, Monroe SS and Rueckert RR (1993) Role of maturation cleavage in infectivity of Picornaviruses: Activation of an infectious. *J. Virol.* 67:2110-2122

¹⁶⁷ Anderson K and Bond CW (1987) Biological properties of Mengovirus: Characterization of avirulent, hemagglutination-defective mutants. *Arch. Virol.* 93:31-49

2. Obiectius

1. Col·laborar en l'elaboració d'un treball de revisió sobre les estratègies replicatives de l'HAV basades en l'ús de codons i amb implicacions sobre la variabilitat antigènica i la taxa de replicació.

2. Valorar la possibilitat de l'aparició d'un nou serotip mitjançant:
 - L'estudi del grau de variabilitat antigènica que admet la càpsida i la seva dinàmica evolutiva.

 - L'estudi del *fitness* de variants antigèniques respecte la població salvatge

3. Estudiar la lenta cinètica de replicació viral amb vistes a valorar la possibilitat d'augmentar la producció de virus vacunals mitjançant:
 - L'estudi del *fitness* de les poblacions virals quan es produeix un silenciament de la cèl·lula hoste

 - L'estudi de l'evolució molecular de poblacions virals modificant la concentració d'aa-tRNA de la cèl·lula hoste, tant a la zona de la càpsida com a la de les proteïnes no estructurals

 - L'estudi del *fitness* de poblacions adaptades a una disponibilitat d'aa-tRNAs quan es modifica dita disponibilitat

3. Publicacions



Informe de la participació del doctorand en els articles

➤ **Pintó et al (2007). Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res* 127:158-163**

El doctorand ha participat en la recerca d'algunes dades bibliogràfiques, especialment les relacionades amb l'ús de codons, així com amb la obtenció d'algunes de les dades mencionades sobre l'HAV i l'ús de codons.

➤ **Aragonès et al (2008). Hepatitis A Virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: Codon Usage Constraints Limit Capsid Variability. *J Virol* 82:1688-1700**

El doctorand ha dut a terme tota la part experimental del treball que inclou la realització de més de 40 passatges seriat dels virus amb anticossos monoclonals, així com l'aïllament i caracterització genòmica de poblacions víriques resistents a anticossos. Addicionalment ha dut a terme tots els anàlisis de competència entre mutants per determinar el fitness dels mateixos.

➤ **Aragonès et al (sotmés) Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the Hepatitis A virus capsid: an example of the Red Queen dynamics of evolution**

El doctorand ha dut a terme tota la part experimental que ha portat a caracteritzar l'ús de codons singular del virus de l'hepatitis A. Aquest treball ha inclòs la realització de més de 150 passatges seriat, així com la caracterització genòmica a les poblacions adaptant-se a les condicions canviants d'aa-tRNA. Addicionalment ha dut a terme els anàlisis de competència entre poblacions per a determinar el *fitness* d'aquestes.

A més a més, cap dels coautors dels articles ha utilitzat les dades per a l'elaboració de la seva tesi doctoral.

Signat:

Dr. Albert Bosch Navarro

Dra. Rosa M^a Pintó Solé

Barcelona, a de de 200....



Informe del factor d'impacte dels articles presentats a la tesi

Les publicacions que formen part de la tesi doctoral presentada per Lluís Aragonès Marimon, titulada “El virus de l'hepatitis A i el seu codi genètic”, han estat publicades o s'han sotmès en revistes d'interès en el seu camp.

Els articles “Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus” i “Hepatitis A Virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: Codon usage constraints limit capsid variability”, ja publicats, ho han estat a les revistes *Virus research* i *Journal of Virology*, respectivament. Segons dades del 2007 els seus índexs d'impacte són 2.810 (*Virus research*) i 5.332 (*Journal of Virology*). Ambdues revistes són revistes importants en el camp de la virologia, doncs el seu índex d'impacte és superior a la mediana del camp. *Virus research* es troba dins el 2n tercil, mentre que *Journal of Virology* dins el 1r tercil. Cal tenir en compte, també, que *Journal of Virology* és la tercera revista en importància en el camp de la virologia.

L'article restant, “Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the Hepatitis A virus capsid: an example of the Red Queen dynamics of evolution”, s'ha sotmès a la revista *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, d'àmbit general, doncs s'han obtingut resultats innovadors, no només al camp de la virologia sinó per la evolució molecular en general. L'índex d'impacte de dita revista, segons dades del 2007, és de 9.598.

Signat:

Dr. Albert Bosch Navarro

Dra. Rosa M^a Pintó Solé

Barcelona, a de de 200....

3.1. El codi genètic i el cicle biològic del virus

3.1.1 Article 1

Virus Research, 2007, Vol 127 : 158-163

Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus

Rosa M. Pintó^a, Lluís Aragonès^a, M. Isabel Costafreda^a, Enric Ribes^b, Albert Bosch^a

^aVirus Entèrics, Department of Microbiology, University of Barcelona

^bVirus Entèrics, Department of Cell Biology, University of Barcelona

El virus de l'hepatitis A (HAV), prototip del gènere *Hepatovirus*, té vàries característiques biològiques que el diferencien dels altres membres de la família *Picornaviridae*. Entre elles val la pena destacar la necessitat del factor d'iniciació de traducció eIF4G intacte, i per tant la impossibilitat de silenciar la síntesi proteica de la cèl·lula hoste mitjançant els mateixos mecanismes que fan servir altres picornavirus. Com a conseqüència, l'HAV ha de competir de forma ineficient per la maquinària de traducció, explicant-se d'aquesta manera el pobre creixement en cultiu cel·lular. En aquest context de competència entre el virus i la cèl·lula, l'HAV ha adoptat estratègicament un ús de codons altament deoptimitzat de forma natural. S'hauria d'esperar, per tant, una síntesi proteica baixa, incloent la d'aquelles proteïnes involucrades en la replicació de l'RNA que es trobaven en concentracions limitants. Així doncs, una taxa de traducció molt baixa i una taxa de replicació també molt baixa, podrien tenir un cert paper per evitar les defenses de la cèl·lula hoste. D'aquesta manera el virus pot créixer d'una forma quiescent. Aquest fet podria explicar l'elevada infectivitat específica de l'HAV tot i l'ús de codons deoptimitzat de forma natural, fet que indicaria infeccions no abortades per la resposta antiviral de la cèl·lula. A més a més, l'ús de codons deoptimitzat es materialitza en l'ús de codons abundants i codons rars. Diferents agrupacions d'aquests codons rars es presenten a la superfície de la càpsida, jugant un paper decisiu en la sòlida estabilitat del virió de l'HAV. Per tant, és molt probable que la baixa taxa de traducció, deguda a l'acumulació de codons rars, contribueixi al fet que la càpsida viral sigui altament estable. Estabilitat necessària per a completar el complex cicle biològic del virus, que inclou el pas pels conductes biliars, amb altes concentracions de sals biliars, un llarga supervivència fora de l'hoste, el pas per l'estómac, i un complex recorregut des de l'intestí fins arribar altre cop al fetge .

3.2. El codi genètic i la pressió immune

3.2.1. Article 2

Journal of Virology, Feb 2008 Vol 82 (4) : 1688-1700

Hepatitis A Virus Mutant Spectra under the Selective Pressure of Monoclonal Antibodies: Codon Usage Constraints Limit Capsid Variability.

Lluís Aragonès, Albert Bosch and Rosa M. Pintó

Enteric Virus Laboratory, Department of Microbiology, and Institute of Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Spain.

S'ha suggerit que existeixen diferents constriccions estructurals a la càpsida del virus de l'hepatitis A (HAV) com a motiu del fet que no emergeixin nous serotips del virus, tot i donar-se complexes distribucions de mutants, també dites quasiespècies. Els anàlisis d'espectres de mutants de l'HAV sota la pressió immunològica dels anticossos monoclonals (MAbs) K34C8 (lloc immunodominant) i H7C27 (lloc s'unió de la glicoforina) han mostrat unes dinàmiques evolutives diferents. La resistència a cadascun dels MAbs ha estat adquirida, respectivament, per poblacions formades per una barreja complexa de mutants de baix *fitness* o mutants únics amb alt *fitness*. Es van detectar, també, mutants per deleció com a components de l'espectre de mutants: delecions de fins a 61 residus, amb una mitja de 19 residus a la proteïna VP3; i delecions de fins a 83 residus, amb una mitja de 45 residus a la proteïna VP1. A més a més, s'ha observat, en a l'anàlisi de quasiespècies de les poblacions adaptades als MAbs, una clara selecció negativa d'aquelles substitucions que afecten els residus codificats per codons rars de la superfície de la càpsida, confirmant així un cert rol beneficiós de les agrupacions de codons rars. Com que dites agrupacions es troben properes o just a les regions dels epítops, la necessitat de mantenir aquestes agrupacions de codons rars podria prevenir de l'emergència d'un nou serotip.

3.2.2. Dades suplementàries a l'article 2

A banda de les dades presents a l'article, es creu convenient introduir una sèrie de dades que no s'han mostrat a l'article, per a complementar els resultats presentats.

Com ja s'ha comentat, hi ha una tendència clara d'acumular delecions en pauta a les poblacions sota la pressió d'anticossos monoclonals. A la taula 3.2.2.1. es presenten les delecions observades, classificades en pauta o sense pauta, al llarg dels diferents passatges, així com la probabilitat que la distribució (en pauta/sense pauta) sigui a l'atzar. Si aquesta distribució fós a l'atzar, s'hauria d'observar una delecio en pauta per cada dos sense pauta. En el cas de la població cultivada amb anticòs no relacionat sembla que la distribució observada podria ser a l'atzar. En canvi, en el cas de les distribucions observades en les poblacions cultivades en presència d'anticossos monoclonals, s'observa una major proporció, estadísticament significativa, de delecions en pauta. Així doncs s'ha de pensar que en presència d'anticossos monoclonals, existeix una pressió selectiva en favor de les delecions en pauta.

Taula 3.2.2.1. Distribució de les delecions en pauta i sense pauta i probabilitat que aquesta distribució sigui a l'atzar.

	P6	P12	P30	P36	P40	Total	P ^a
FCA							
en pauta	0	0	1	1	0	2	0.23
sense pauta	0	4	1	2	0	7	
H7C27							
en pauta	5	1	2	0	0	8	0.038
sense pauta	0	2	1	3	0	6	
K34C8							
en pauta	0	3	2	5	2	12	0.008
sense pauta	1	1	3	3	0	8	

^a Probabilitat que la distribució observada segueixi una Binomial $B \sim (n, 0.33)$

A la Fig.3.2.2.1. es mostra gràficament les dades d'entropia de Shannon (S_{NA}) representant la complexitat de seqüències aminoacídiques resultants de les seqüències de nucleòtids observades en els anàlisis de quasiespècies dels diferents passatges estudiats. S'observa clarament que mentre al llarg dels passatges cultivats amb anticòs no relacionat es tenen entropies baixes (per sota de 0.2), en el passatges cultivats amb

anticòs monoclonals, es produeix un augment de l'entropia (per sobre de 0.2) que correspon al moment en que les poblacions virals es tornen parcialment resistents a la neutralització de l'anticòs (45%-75%). Quan les població viral es torna totalment resistent (<30%) a l'H7C27, coincideix amb la disminució brusca de l'entropia a VP1, deguda a la fixació de la mutació 1217 (G→D). En canvi, quan la població viral es torna totalment resistent al K34C8, l'entropia es manté igualment elevada.

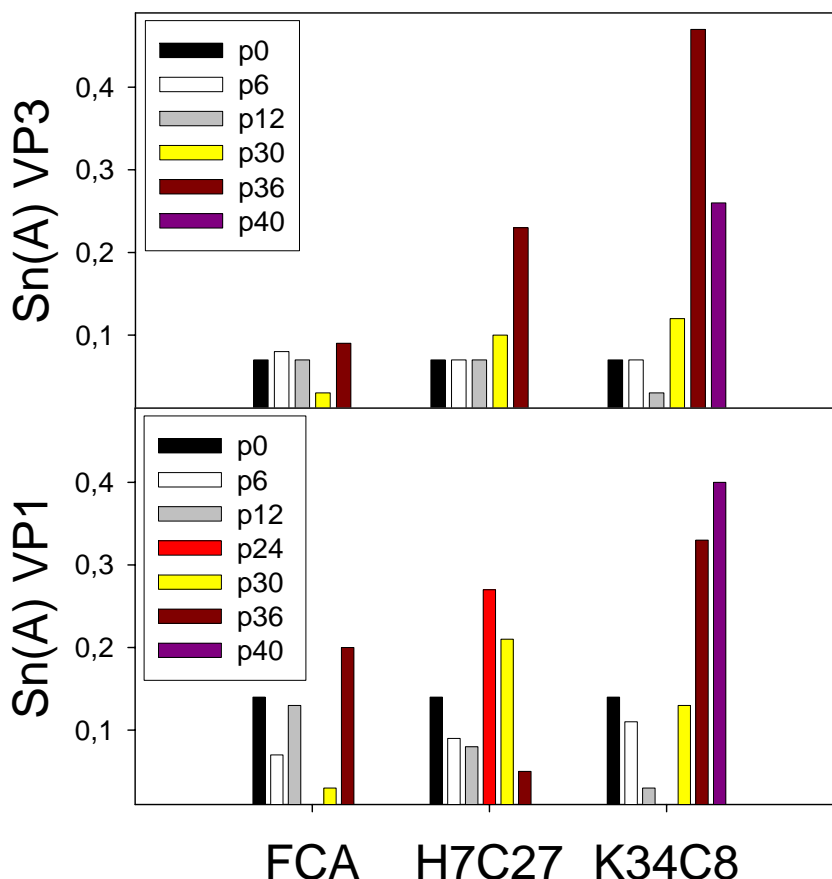


Fig. 3.2.2.1. Evolució de l'entropia de Shannon per les seqüències d'aminoàcids al llarg dels passatges, que dona idea de la complexitat de seqüències. Es calcula seguint la fórmula $S_{NA} = [-\sum_i (q_i \times \ln q_i)] / \ln N$, on q_i és la freqüència de la seqüència d'aminoàcids "i", i N el nombre total de seqüències de l'espectre de mutants.

Com es comenta a l'article, no s'observà cap substitució destacable en cap de les dues regions analitzades posteriorment (VP0 i VP3') a l'anàlisi inicial, ni en presència d'H7C27, ni en presència de K34C8. Només s'observaren algunes substitucions puntuals (Fig.3.2.2.2.), per tant poc representades a la quasiespècie. Ni tampoc s'observà cap deleció.

A

¹¹⁰GIEI¹²⁰QVQINPTPF¹³⁰QQGLICAMVPGDQS¹⁴⁰YGSIAS¹⁵⁰LT¹⁶⁰VYPHGLLN¹⁷⁰CNINNVVRI¹⁸⁰KV¹⁹⁰PF²⁰⁰IYTRGAY²¹⁰HEKDPQ²²⁰YPVWE²³⁰LT
_{N(24)} _{I(24)}
_{D(36)} _{H(36)}

B

¹⁴⁰LFCEVPGNELIDVSGITL¹⁵⁰KQATTAPCAV¹⁶⁰MDITGVQSTLR¹⁷⁰FRV¹⁸⁰PWISDTPY¹⁹⁰RVNRYTKS²⁰⁰A²¹⁰H²²⁰QKGEYTAIG²³⁰KLIVYC
_{L(36)} _{K(36)} _{A(36)} _{F(24)} _{I(24)} _{K(24)} _{C(24)} _{H(36)}
₍₂₄₎₍₂₄₎

Fig. 3.2.2.2. *Substitucions d'aminoàcids detectades en els fragments (A) de VP0 i (B) el segon de VP3, en el passatge 24 sota la pressió d'H7C27 i el passatge 36 sota la pressió de K34C8. El passatge on es troba la substitució s'indica entre parèntesis.*

3.3. El codi genètic i la cinètica de traducció

3.3.1. Article 3

Sotmés a *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*

Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the Hepatitis A virus capsid: an example of the Red Queen dynamics of evolution

Lluís Aragonès, Albert Bosch and Rosa M. Pintó

Enteric Virus Laboratory, Department of Microbiology, and Institute of Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Spain.

El virus de l'hepatitis A (HAV), que és el prototipus del gènere *Hepatovirus*, té diferents característiques biològiques úniques que el diferencien dels altres membres de la família *Picornaviridae*. Entre elles, la necessitat del factor d'iniciació de la traducció eIF4G intacte, i per tant la impossibilitat de silenciar la síntesi proteica de l'hoste mitjançant un mecanisme similar al d'altres picornavirus. En conseqüència, l'HAV ha de competir per la maquinària traduccional de la cèl·lula, podent-se explicar el seu pobre creixement en cultiu cel·lular. En aquest context de competició virus/cèl·lula, l'HAV ha adoptat de forma estratègica un ús de codons altament deoptimitzat respecte el de la cèl·lula hoste. Amb l'objectiu de reoptimitzar l'ús de codons del virus, aquest va ser adaptat a propagar en cèl·lules amb la síntesi proteica reduïda, amb la intenció d'augmentar la disponibilitat de tRNAs per al virus. La resposta immediata al procés d'adaptació fou una pèrdua significativa de *fitness*, que més tard es recuperà, estant associada a una re-deoptimització, en comptes d'una otimització. Concretament, la re-deoptimització es donà a la regió codificant per les proteïnes de la càpsida. Aquests resultats descarten la selecció traduccional, i en canvi suggereixen una sintonització fina de la cinètica de traducció com el mecanisme de selecció inherent al biaix d'ús de codons d'aquesta regió del genoma. A més a més, els resultats mostren una evidència clara de la hipòtesi evolutiva de la *Reina Vermella*, doncs el virus ha hagut d'evolucionar molt per a adaptar el seu ús de codons a les condicions canviants de l'ambient cel·lular, per a recuperar el *fitness* inicial.

4. Resum de resultats i discussió

4.1. El codi genètic i el cicle biològic del virus

Només una part mínima de l'espai de seqüència dels virus pot ser replicada i expressada, però a més a més, el conjunt del cicle infectiu juga un paper molt important en l'adaptació dels genomes i en la modelació del paisatge de l'espai de seqüència de les poblacions virals. És crític pel cicle biològic del virus de l'hepatitis A (HAV) i per la infecció, resistir les condicions de pH àcid de l'estómac, els factors d'eliminació durant la fase virèmica, i l'acció de detergents, especialment de les sals biliars durant l'excreció. Aquest fenotip extremadament resistent només pot ser aconseguit gràcies a una càpsida molt cohesiva, obtinguda amb un plegament molt acurat. Aquesta càpsida cohesiva també explicaria la gran persistència de l'HAV a l'ambient. Fets, com per exemple, un canvi de conformació que faci que el virus s'escapi a la neutralització per anticossos, però que com a contrapartida s'uneixi a eritròcits, contribuiria a explicar el perquè de la baixa freqüència d'aïllament d'aquest tipus de mutants, tot i no presentar cap desavantatge pel que fa a la replicació, ja que serien eliminats del torrent sanguini un cop units als eritròcits.

Els picornavirus utilitzen un mecanisme de traducció IRES-dependent i cap-independent. L'estructura de l'IRES de picornavirus a evolucionat de manera gradual, mitjançant l'addició de dominis i elements que han millorat la funció d'atracció de ribosomes. Així doncs la inhibició de la traducció cel·lular cap-dependent permet als picornavirus utilitzar tota la maquinària cel·lular de traducció per a produir proteïnes virals. En canvi, l'HAV presenta un IRES tipus III, que és poc eficient a l'hora de dirigir la traducció. A diferència també dels altres picornavirus, l'HAV no indueix inhibició de la traducció cel·lular. D'aquesta manera el virus entra en competència amb la cèl·lula per a la maquinària cel·lular de traducció. Així doncs, l'HAV necessita una estratègia de traducció diferent, que passa per un ús de codons antagònic a la cèl·lula que fa que utilitzi codons rars en abundància (Taula 4.1.1). De fet, 15 famílies d'aminoàcids contenen codons rars, amb un total de 27 codons rars. L'ús de codons rars fa, en conseqüència, disminuir la síntesi proteica degut a parades del ribosoma que poden portar a la degradació de l'RNA, la finalització prematura de la cadena polipeptídica, o la incorporació d'aminoàcids incorrectes, especialment quan els codons rars es troben agrupats, com és el cas de l'HAV. Per contra, l'avantatge d'aquestes

parades del ribosoma és el fet d'assegurar un plegament apropiat de la proteïna en síntesi.

Taula 4.1.1. Comparativa de l'ús de codons relatiu en HAV i cèl·lules humanes. En negreta els codons rarament usats per l'HAV.

Aminoàcid	Codó	Ocurrència en:		Aminoàcid	Codó	Ocurrència en:		
		HAV	Cèl·lules humanes			HAV	Cèl·lules humanes	
Arg	AGA	100.0	88	Gly	GGA	100.0	67	
	AGG	29.2	98		GGU	58.4	44	
	CGC	2.7	100		GGG	34.4	68	
	CGU	3.5	42		GGC	28.1	100	
	CGA	3.2	48		Val	GUU	100.0	34
	CGG	0.6	92			GUG	46.3	100
Leu	UUG	100.0	26	GUA	17.7	19		
	UUA	52.0	12	GUC	12.8	53		
	CUU	46.0	25	Lys	AAA	100.0	64	
	CUG	25.3	100		AAG	58.8	100	
	CUA	9.2	15	Asn	AAU	100.0	73	
	CUC	7.0	47	AAC	19.1	100		
Ser	UCU	100.0	71	Gln	CAG	100.0	100	
	UCA	84.5	50	CAA	88.0	33		
	AGU	31.8	50	His	CAU	100.0	65	
	UCC	27.9	95		CAC	22.1	100	
	UCG	4.7	22	Glu	GAA	100.0	65	
	AGC	4.7	100	GAG	76.7	100		
Thr	ACU	100.0	55	Asp	GAU	100.0	75	
	ACA	90.8	63	GAC	19.2	100		
	ACC	18.0	100	Tyr	UAU	100.0	66	
	ACG	4.5	29		UAC	26.5	100	
Pro	CCU	100.0	78	Cys	UGU	100.0	68	
	CCA	89.5	73	UGC	26.5	100		
	CCC	20.0	100	Phe	UUU	100.0	70	
	CCG	1.8	33		UUC	27.0	100	
Ala	GCU	100.0	67	Ile	AUU	100.0	61	
	GCA	60.7	48		AUA	31.7	24	
	GCC	30.7	100		AUC	15.9	100	
	GCG	1.4	25					

Els codons rars també s'han vist relacionats amb la baixa variabilitat antigènica, doncs els agrupaments de codons rars tendeixen a la invariabilitat, tot i replicar el virus en dinàmica de quasiespècies. A més a més, degut a la baixa síntesi proteica, les proteïnes relacionades amb la replicació de l'RNA també es troben en concentracions

limitants. Això fa que la replicació total d'RNA sigui més baixa. Així doncs, tot i que l'HAV presenta una freqüència de mutació similar a altres virus RNA, el reservori absolut de mutants és molt inferior. Per tant, la suma de la baixa replicació de l'RNA, la baixa traducció de les proteïnes de la càpsida, constriccions de codons rars, així com també constriccions estructurals pròpies dels aminoàcids de la càpsida, fa que l'HAV presenti una baixa variabilitat antigènica. Aquest fet, n'és un altre en contraposició amb l'elevada variabilitat antigènica dels virus RNA. En general, els virus RNA presenten una elevada variabilitat que els permet evadir el sistema immune de l'hoste. L'HAV, però, podria afrontar el repte que suposen les defenses de l'hoste des d'un punt de vista totalment oposat.

La lenta síntesi proteica també podria aportar avantatges a nivell de resposta cel·lular. Es creu que la baixa infectivitat específica dels virus RNA en general i els picornavirus en particular és en part deguda a cicles infecciosos avortats per part de les defenses antivirals de la cèl·lula hoste. En canvi, s'ha demostrat que les soques no citopatogèniques de l'HAV no indueixen apoptosi ni síntesi d'interferó β , probablement resultat de la baixa eficiència de replicació i per tant de concentració d'intermediaris RNA de doble cadena. Això vé corroborat per una alta infectivitat específica en el cas de l'HAV. A més el fet que la resposta immune contra HAV no es produeixi fins ben endavant del curs de la infecció podria estar relacionat també amb l'ús de codons rars i una baixa expressió antigènica fins al final del cicle infecció quan la fita de productivitat de progènie ja s'ha aconseguit, d'aquesta manera l'HAV tampoc no necessita generar variabilitat antigènica.

La baixa síntesi es reflexa *in vitro* pel fet d'assolir títols infectius clarament inferiors a altres picornavirus. Com a exemple, l'HAV pot arribar a 10^7 TCID₅₀/ml amb una setmana d'infecció en cèl·lules FRhK-4, mentre que poliovirus pot arribar a 10^9 PFU/ml al cap d'unes hores d'infectar cèl·lules HeLa. Aquesta baixa síntesi es reflexa *in vivo* en una producció de com a màxim 10^{11} partícules per gram de femta, molt inferior a 10^{13} partícules per gram de femta d'altres virus entèrics. Per contra, s'asseguraria el plegament correcte de la proteïna, que de fet, permet una infectivitat específica més alta que no pas la d'altres picornavirus, indicant una millor adaptació a l'ambient cel·lular.

Així doncs, s'ha pogut relacionar la singularitat en l'ús de codons de l'HAV amb diferents aspectes beneficiosos pel cicle biològic del virus: la persistència a l'ambient i a diferents condicions físiques i químiques extremes, que li faciliten l'arribada a l'òrgan diana i l'evasió de la resposta antivírica de l'hoste. Però d'altra banda també s'ha relacionat amb dos aspectes que semblarien perjudicials pel cicle biològic: la baixa variabilitat i la baixa producció. Ambdós s'han estudiat més profundament en els següents apartats.

4.2. El codi genètic i la pressió immune

Com ja s'ha presentat a la introducció diversos mutants d'escapament a anticossos monoclonals havien estat aïllats prèviament, però la dinàmica de la població viral que duia a la selecció d'aquests mutants requeria un estudi més profund. Es va analitzar l'espectre de mutants a diferents passatges de poblacions virals cultivades sota la pressió de dos anticossos monoclonals, H7C27 i K34C8, que representen respectivament el lloc d'unió de la glicoforina A i el lloc immunodominant, respectivament. Com a control es va utilitzar un anticòs no relacionat (FCA).

En el seguiment de l'evolució de la població sota la pressió d'H7C27 no es van detectar mutacions en la seqüència consens fins al passatge 30. En aquest passatge es detectà la substitució G→D al residu 217 de VP1 a la majoria de clons. Aquest residu és molt proper al residu K221, el qual definia el lloc d'unió a H7C27. No obstant, en els passatges previs analitzats P6 i P12, es troben, respectivament, 3 i 4 substitucions aminoacídiques a VP3 i 7 i 3 a VP1, d'un total de 50 clons analitzats a cada passatge i a cada regió. Es dugué a terme també l'anàlisi de l'espectre de mutants al passatge 24 per a conèixer si s'havia donat una quasiespècie complexa prèvia a la selecció de la substitució G→D. S'observaren 14 substitucions aminoacídiques, confirmant l'existència d'una quasiespècie complexa prèvia a la selecció de la variant més adaptada. Quatre de les substitucions es donaren al residu 111, mentre que només 2 al residu 217. Això semblaria indicar un major *fitness* del mutant en 217 que la resta de variants presents a P24 donat que en els passatges no hi havia colls d'ampolla quantitius.

Pel que fa a l'evolució de la població sota pressió de K34C8, cap substitució es va detectar a la seqüència consens, ni a VP3 ni a VP1 en cap dels passatges, però en canvi un espectre complex de mutants es va observar en els passatges P30, P36 i fins i tot en un passatge addicional P40, observant-se quasiespècies molt complexes en tots els casos. La majoria de residus substituïts es trobaven propers a l'eix quinari i l'eix terciari, en el límit entre 2 protòmers.

A les poblacions cultivades amb l'anticòs no relacionat no es varen detectar substitucions a la seqüència consens, i el baix nombre de substitucions observades en els diferents passatges tampoc es concentraven en cap zona determinada de la càpsida.

D'altra banda es varen determinar els límits de neutralització total, neutralització parcial i resistència a l'anticòs d'acord amb les neutralitzacions de les poblacions d'HAV obtingudes amb l'anticòs no relacionat. Aquests foren de >75% per a la neutralització total, entre 45 i 75 % per a la neutralització parcial i <45% per a la resistència. En el cas del virus cultivat amb l'anticòs H7C27 no s'observà una resistència total fins al P30, és a dir quan la substitució al residu 227 de VP1 esdevenia dominant. En canvi, en el virus cultivat amb K34C8, s'observà una correlació negativa entre complexitat de mutants i neutralització (Taula 4.2.1.)

A més a més, es va comprovar el grau de neutralització de les variants antigèniques obtingudes per part de sèrums policlonals. Aquests sèrums foren un sèrum d'un pacient convalescent i un anticòs policlonal generat contra la soca 43c. Les poblacions resistents a H7C27 mostraven una resistència parcial a la neutralització ($64\% \pm 10\%$ i $68\% \pm 6\%$ respectivament), en canvi la població resistent a K34C8 no mostrà un increment significatiu de la resistència a aquests policlonals ($73\% \pm 18\%$ i $82\% \pm 12\%$ respectivament).

Taula 4.2.1. Percentatge de neutralització de la infectivitat de l'HAV pels anticossos monoclonals

Passatge	FCA	H7C27	K34C8
P0	29±14	98±1	95±2
P6	37±14	94±2	93±6
P12	23±18	91±6	96±4
P18	27±15	76±24	86±10
P24	30±16	79±20	73±18
P30	23±18	42±27	68±22
P36	27±15	36±8	52±21
P40	-	-	27±17

D'altra banda, es va trobar un percentatge important (2.4 % a VP3 i 4.0% a VP1) de genomes que presentaven delecions. S'observà una tendència clara i estadísticament significativa d'acumular delecions que mantenien la pauta oberta de lectura en les poblacions cultivades en presència d'anticossos monoclonals. Aquesta tendència contrastava, amb una distribució aleatòria de delecions en pauta i delecions sense pauta que s'observà en absència d'anticossos o amb anticòs no relacionat. Es van identificar diferents punts calents de deleció, que eren repeticions directes als llocs d'inici i final de deleció (Fig.4.2.1.). Aquestes repeticions directes estaven caracteritzades per la riquesa en adenines i uracils. Semblaria doncs, que els mutants per deleció podrien tenir un paper important en l'adaptació a la pressió immunològica, principalment en els estadis inicials d'aquesta adaptació, quan es detecten la majoria de dites delecions.

A

AUGAUGAGAAAUGAAUUUAGGGUCAGUACUACUGCGAAUGUGGUGAAUCUGUCAAAUUUUGAAGAUGCAAGAGCAAAGAUGUCUUUUGCU 90
AUGAUGAGAAAUGAAUUUAGGGUCAGUACUACUGCGAAUGUGGUGAAUCUGUCAAAUUUUGAAGAUGCAAGAGCAAAGAUGUCUUUUGCU 90
AUGAUGAGAAAUGAAUUUAGGGUCAGUACUACUGCGAAUGUGGUGAAUCUGUCAAAUUUUGAAGAUGCAAGAGCAAAGAUGUCUUUUGCU 90
AUGAUGAGAAAUGAAUUUAGGGUCAGUACUACUGCGAAUGUGGUGAAUCUGUCAAAUUUUGAAGAUGCAAGAGCAAAGAUGUCUUUUGCU 90
UUGGAUCAGGAAGAUUGGAAAUCUGAUC CGUCCAGGGUGGUGGGAUCAAAAUUACUCAUUUUACUACUUG----- 180
UUGGAUCAGGAAGAUUGGAAAUCUGAUC CGUCCAGGGUGGUGGGAUCAAAAUUACUCAUUUUACUACUUGGACAUUAUCCAACUUUG 180
UUGGAUCAGGAAGAUUGGAAAUCUGAUC CGUCCAGGGUGGUGGGAUCAAAAUUACUCAUUUUACUACUUGGACAUUAUCCAACUUUG 180
UUGGAUCAGGAAGAUUGGAAAUCUGAUC CGUCCAGGGUGGUGGGAUCAAAAUUACUCAUUUUACUACUUGGACAUUAUCCAACUUUG 180
UUGGAUCAGGAAGAUUGGAAAUCUGAUC CGUCCAGGGUGGUGGGAUCAAAAUUACUCAUUUUACUACUUGGACAUUAUCCAACUUUG 180
----- 270
GCUGCUCAGUUUCCAUUUAAUGCUUCAGCCUCAGUUGGUAACA AAAUUAAAGUUAUUCAGUUGACCCAUAU----- 270
GCUGCUCAGUUUCCAUUUAAUGCUUCAGCCUCAGUUGGUAACA AAAUUAAAGUUAUUCAGUUGACCCAUAU----- 270
GCUGCUCAGUUUCCAUUUAAUGCUUCAGCCUCAGUUGGUAACA AAAUUAAAGUUAUUCAGUUGACCCAUAU----- 270
GCUGCUCAGUUUCCAUUUAAUGCUUCAGCCUCAGUUGGUAACA AAAUUAAAGUUAUUCAGUUGACCCAUAU----- 270
-----UUUUUGGAGAGGUGAUCUUGUCUUUGAUUUUCAA 360
-----UUUUUGGAGAGGUGAUCUUGUCUUUGAUUUUCAA 360
-----GUUUUUUGGAGAGGUGAUCUUGUCUUUGAUUUUCAA 360
AAAAAUCUGACCAAAAUGUAUAACUGCUUUGGCUUCUAUUUGUCAAAUGUUU-----UGUCUUUGAUUUUCAA 360
AAAAAUCUGACCAAAAUGUAUA-----UGUUUUUGGAGAGGUGAUCUUGUCUUUGAUUUUCAA 360
GUUUUCCCA 370
GUUUUCCCA 370
GUUUUCCCA 370
GUUUUCCCA 370
GUUUUCCCA 370

B

CAUCUACAAGUUUUGGGAAGGUCUCAUUUCUUGGCAUUUUACAUCUCAAUUCAAUAAUAAAGAGUACACAUUCCUAUAACCUUGUC 90
CAUCUACAAGUUUUGGGAAGGUCUCAUUUCUUGGCAUUUUACAUCUCAAUUCAAUAAUAAAGAGUACACAUUCCUAUAACCUUGUC 90
CAUCUACAAGUUUUGGGAAGGUCUCAUUUCUUGGCAUUUUACAUCUCAAUUCAAUAAUAAAGAGUACACAUUCCUAUAACCUUGUC 90
CAUCUACAAGUUUUGGGAAGGUCUCAUUUCUUGGCAUUUUACAUCUCAAUUCAAUAAUAAAGAGUACACAUUCCUAUAACCUUGUC 90
CAUCUACAAGUUUUGGGAAGGUCUCAUUUCUUGGCAUUUUACAUCUCAAUUCAAUAAUAAAGAGUACACAUUCCUAUAACCUUGUC 90
UUCAACCUCUAAUCCUCCUCAUGGUUUGCCAUCAACACUGAGGUGGUUUUCAACUUGUUUCAGUUGUAUAGAGGGCCUUAGAUUCUGAC 180
UUCAACCUCUAAUCCUCCUCAUGGUUUGCCAUCAACACUGAGGUGGUUUUCAACUUGUUUCAGUUGUAUAGAGGGCCUUAGAUUCUGAC 180
UUCAACCUCUAAUCCUCCUCAUGGUUUGCCAUCAACACUGAGGUGGUUUUCAACUUGUUUCAGUUGUAUAGAGGGCCUUAGAUUCUGAC 180
UUCAACCUCUAAUCCUCCUCAUGGUUUGCCAUCAACACUGAGGUGGUUUUCAACUUGUU----- 180
AAUUUUUUUACAGGAGCAACUG----- 270
AAUUUUUUUACAGGAGCAACUGAUGUAGAUGGCAUGGCCUGGUUCACUCCAGUAGGUCUUGCCGUUGAUACUCCUUGGGUAGAGAAGGA 270
----- 270
AAUUUUUUUACAGGAGCAACUGAUGUAGAUGGCAUGGCCUGGUUCACUCCAGUAGGUCUUGCCGUUGAUACUCCUUGGGUA----- 270
----- 270
-----UGUCUAUUGACUACAAAACUGCUCUUGGAGCUGUCAGAUUUAAACAAGGAGAACAGGGAGCAUUCAGAUUAGAUUACCAUG 360
GUCAGCUUU-----GACUACAAAACUGCUCUUGGAGCUGUCAGAUUUAAACAAGGAGAACAGGGAGCAUUCAGAUUAGAUUACCAUG 360
-----UCUAUUGACUACAAAACUGCUCUUGGAGCUGUCAGAUUUAAACAAGGAGAACAGGGAGCAUUCAGAUUAGAUUACCAUG 360
-----ACUACAAAACUGCUCUUGGAGCUGUCAGAUUUAAACAAGGAGAACAGGGAGCAUUCAGAUUAGAUUACCAUG 360
-----GUUCUAUUGACUACAAAACUGCUCUUGGAGCUGUCAGAUUUAAACAAGGAGAACAGGGAGCAUUCAGAUUAGAUUACCAUG 360
GUAUUCUUUUUUUAUUGCUGUCUGGAGCACUGGAUGGUUUGGGAGACAAGACAGAUUCUACAUUUGGAUUGGUUUUCUAUUCAGAUUGC 450
GUAUUCUUUUUUUAUUGCUGUCUGGAGCACUGGAUGGUUUGGGAGACAAGACAGAUUCUACAUUUGGAUUGGUUUUCUAUUCAGAUUGC 450
GUAUUCUUUUUUUAUUGCUGUCUGGAGCACUGGAUGGUUUGGGAGACAAGACAGAUUCUACAUUUGGAUUGGUUUUCUAUUCAGAUUGC 450
GUAUUCUUUUUUUAUUGCUGUCUGGAGCACUGGAUGGUUUGGGAGACAAGACAGAUUCUACAUUUGGAUUGGUUUUCUAUUCAGAUUGC 450
GUAUUCUUUUUUUAUUGCUGUCUGGAGCACUGGAUGGUUUGGGAGACAAGACAGAUUCUACAUUUGGAUUGGUUUUCUAUUCAGAUUGC 450
AAAUUACAACAUUCUGAUGAAUACUUUGC 480
AAAUUACAACAUUCUGAUGAAUACUUUGC 480
AAAUUACAACAUUCUGAUGAAUACUUUGC 480
AAAUUACAACAUUCUGAUGAAUACUUUGC 480
AAAUUACAACAUUCUGAUGAAUACUUUGC 480
AAAUUACAACAUUCUGAUGAAUACUUUGC 480

Fig. 4.2.1. Exemple d'alguns genomes amb deleccions detectats en els diferents espectres de mutants de VP3(A) i VPI(B). S'han subratllat les seqüències de repeticions directes idèntiques o molt similars als llocs d'inici i final de deleció.

També es va dur a terme una anàlisi estructural de localització de les substitucions puntuals (Fig.4.2.2.). La majoria de les substitucions es van produir al voltant de residus codificats per codons rars. En el cas de les substitucions superficials, només un 7,7% de les substitucions es donaren en residus codificats per codons rars (quan aquests residus representen el 19% de la superfície estudiada de la càpsida). En canvi, els aminoàcids que es trobaven propers a codons rars, el 49% de la regió de la càpsida estudiada, acumulaven el 77 % de les substitucions. Llavors, es va decidir estudiar dos regions més de la càpsida per cobrir pràcticament tots els agrupaments o *clusters* de residus codificats per codons rars i confirmar el fet d'una selecció negativa de les substitucions en codons rars superficials. Aquestes regions eren una de VP0 i una segona regió de VP3. Tenint en compte les 4 regions estudiades, el 6.2% del total de substitucions es donaren a residus codificats per codons rars (representant el 20% del total de la superfície de la càpsida estudiada). En el cas dels residus propers a codons rars, que representen el 53% d'aquestes regions, s'hi observaren el 75% de les substitucions. Tenint en compte que el 70% de mutacions que donarien a lloc una substitució aminoacídica de residus codificats per codons rars, també donarien lloc a un canvi significatiu de raresa del codó fa pensar que la raresa en aquests punts pot ser necessària per a un plegament correcte de la proteïna. Un altre fet que evidencia les restriccions estructurals de la càpsida es el fet que sota la pressió de l'anticòs no relacionat hi ha diferències mínimes entre el percentatge de residus substituïts a la superfície, i els substituïts a l'interior. Pel que fa a les poblacions seleccionades amb anticossos monoclonals, el percentatge de residus interiors substituïts es mantingué semblant, mentre que augmentà el percentatge de residus de la superfície substituïts. Notar també, que ni a la regió de VP0, ni la segona regió de VP3 estudiada, es va detectar cap substitució destacable, així com tampoc cap mutant per deleció.

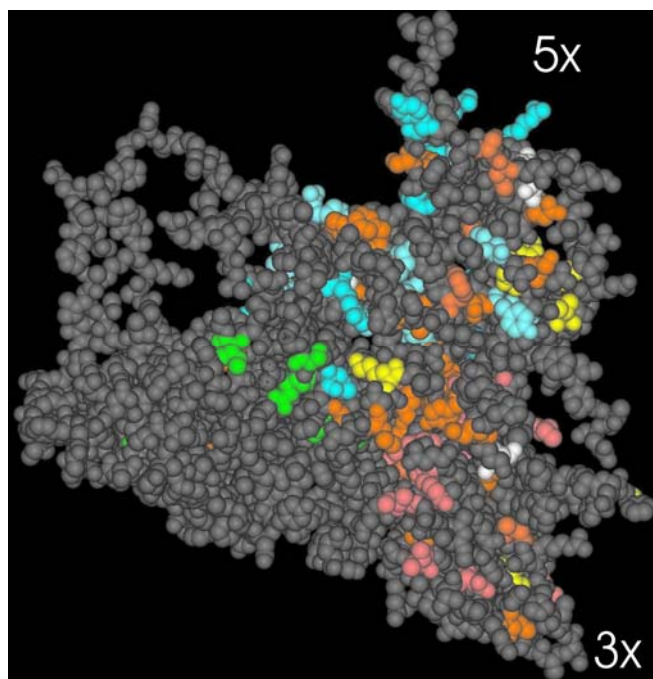


Fig.4.2.2. Model de protòmer d'HAV on es localitzen totes les substitucions observades al llarg dels passatges amb els anticossos H7C27 i K34C8 (taronja) i la localització dels residus codificats per codons rars (verd per VP0, vermell per VP3 i blau per VP1). En els casos que el residu substituït estava codificat per un codó rar, s'ha marcat en blanc. En groc es marquen els residus descrits prèviament

Per a entendre millor perquè la freqüència d'aïllament de variants antigèniques de l'HAV és extremadament baixa, es van realitzar assajos de *fitness* de poblacions de virus procedents de clons biològics resistents als anticossos monoclonals per competència amb la població salvatge. En absència de pressió immune, es van fer dos tipus de competències, una amb multiplicitat d'infecció (MOI) inicial 0.001:1 ó 0.01:1 (salvatge:mutant) i l'altre amb MOI 1:1. El virus salvatge no va ser capaç en cap cas de desplaçar les poblacions resistents a H7C27, mentre que sí ho va fer amb les poblacions resistents a K34C8, fins i tot en la situació inicial adversa de 0.01:1 (salvatge:mutant). Aquest fet apunta a una elevada *fitness* dels mutants resistents a H7C27, i un baix *fitness* dels mutants resistents a K34C8.

Així doncs, sembla que els dos epítops immunològics estudiats tenen característiques diferents. El de la glicoforina A amb una relació directa entre la resistència al anticòs i la selecció d'una substitució aminoacídica i amb un *fitness* similar al salvatge però on canvis a la mateixa regió tindrien *fitness* inferior. D'altra banda, l'epítop immunodominant, amb la selecció d'un complex espectre de mutants,

sense convertir-se cap d'ells dominant, per tant amb *fitness* similar, però inferior al salvatge. Podria ser que fós necessària la formació de càpsides mosaic (amb proteïnes de diferents genomes) per a obtenir una conformació òptima. Aquest fet podria venir relacionat amb el fet que el K34C8 reconeix un epítot que es forma un cop els pentàmers han interaccionat per donar lloc a procàpsides, i que la majoria de substitucions es troben al límit entre dos protòmers. Així doncs, sembla ser que la gran majoria de mutants que podrien escapar a la pressió immune presentarien un *fitness* inferior al salvatge, tot i que una variant, la que presenta la substitució G→D 217, sí que ha demostrat presentar el mateix *fitness* en condicions poc exigents com és el cultiu cel·lular.

En general, sembla que hi ha molts factors que contribuirien a la baixa variabilitat de la càpsida d'HAV i per tant dificulten la generació d'un nou serotip. La variabilitat restringida per residus codificats per codons rars, en podria ser un. Un altre podria ser les restriccions estructurals de la càpsida que limiten la variabilitat aminoacídica, evidenciat pel fet que sota la pressió d'anticòs no relacionat no hi ha diferències entre la taxa de substitució aminoacídica de residus de la superfície i residus de l'interior de la càpsida. I un tercer, la necessitat d'una pressió prolongada per part de l'anticòs (més de 30 passatges, quan altres picornavirus és entre 10 i 20). Aquest factor seria degut a la lenta cinètica de replicació viral que fa que disminueixi el nombre de mutants en una generació.

4.3. El codi genètic i la cinètica de traducció

Com s'ha dit anteriorment, l'HAV presenta un ús de codons altament deoptimitzat, i principalment oposat al de la cèl·lula. Tot i no presentar mecanismes de silenciament de la traducció cel·lular i tenir un IRES molt ineficient, l'HAV sintetitza les proteïnes tot adaptant l'ús de codons per a utilitzar els tRNAs menys utilitzats per la cèl·lula.

Es va desenvolupar un sistema de cultiu del virus en un ambient cel·lular amb les concentracions dels tRNAs modificades, tot utilitzant actinomicina D. L'actinomicina D (AMD) és una droga que inhibeix la transcripció del DNA cel·lular, no afectant a l'RNA víric.

Es va treballar amb dues concentracions d'actinomicina D: 0.05 µg/ml i 0.2 µg/ml. El tractament de cèl·lules FRhK-4 amb les dues concentracions d'actinomicina D va induir una reducció del RNA citosòlic total del 40% i el 80% respectivament. També es va quantificar la reducció de l'expressió de dos gens, l'HPRT-I (Hipoxantinafosforibosil transferasa) i el GAPDH (Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenasa), que es va veure reduïda també substancialment. Pel que fa a la toxicitat, amb 0.05 µg/ml s'observà un 100% i un 75% de viabilitat als 4 i 7 dies post-tractament, respectivament. D'altra banda, amb 0.2 µg/ml la viabilitat només fou del 10% i el 0.25 % als 4 i 7 dies post-tractament, respectivament.

Es va estudiar la replicació del virus amb les diferents concentracions, durant més de 150 passatges (Fig 4.3.1.). Als primers passatges, el virus cultivat amb 0.05 µg/ml (Fig 4.3.1.B) mostrà una caiguda sobtada de producció, però que progressivament remuntà fins arribar a nivells similars al virus cultivat amb absència de la droga. No s'aconseguí l'adaptació directa del virus a 0.2 µg/ml, doncs la producció disminuï fins a desaparèixer. Tot i això, després de 65 passatges amb 0.05 µg/ml, sí que s'aconseguí l'adaptació a 0.2 µg/ml (Fig 4.3.1.D), amb una caiguda sobtada de la producció, seguida també, per una recuperació. Per estudiar millor el *fitness* de les poblacions, la població adaptada a 0.05 µg/ml i l'adaptada a 0.2 µg/ml es van tornar a cultivar en les condicions prèvies de 0.0 µg/ml i 0.05 µg/ml d'AMD respectivament (Fig 4.3.1.D.E.). La producció altra vegada va patir una davallada, seguida per una recuperació, aquesta vegada, però, molt més ràpida que durant les condicions anteriors d'adaptació. Com a control es va realitzar el mateix experiment, durant 10 passatges, amb poliovirus, on no només no es produí una caiguda de la producció en condicions d'AMD, sinó que a més a la concentració de 0.2 µg/ml d'AMD, augmentà lleugerament.

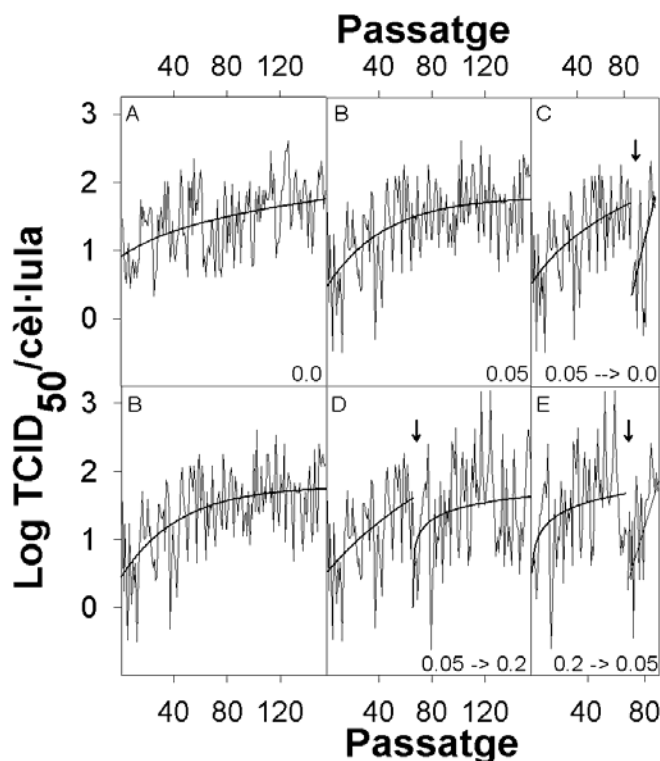


Fig 4.3.1 Títol infeccions de la soca pHM175 43c d'HAV en presència o absència d'AMD. El virus es va fer créixer en absència (A) d'AMD, presència de 0.05 µg/ml d'AMD (B). Al passatge 85 en 0.05 µg/ml d'AMD, el virus es va tornar a passar en absència d'AMD (C). Al passatge 65 de 0.05 µg/ml es va passar a cultivar a 0.2 µg/ml (D). Al passatge 67 en 0.2 µg/ml el virus es tornà a passar a 0.05 µg/ml d'AMD (E)

Es passà llavors a estudiar els canvis genètics que havien permès a les poblacions adaptar-se a les concentracions canviants de tRNAs. Es realitzà tot determinant l'espectre de mutants a diferents passatges d'una regió de VP3, una regió de VP1 i una regió de la polimerasa. Les mutacions es van classificar en aquelles que induïen un canvi a un codó de freqüència similar, un canvi a un codó més freqüent o un canvi a un codó més rar, sempre segons l'ús de codons de la cèl·lula hoste (Fig. 4.3.2.). Les proteïnes estructurals (VP3 i VP1) de les poblacions adaptant-se a l'AMD mostraren una tendència progressiva a acumular mutacions que induïen un canvi a un codó més rar. D'altra banda, en absència d'AMD, la majoria de mutacions induïen un canvi a un codó de freqüència similar a l'original. En canvi, a la regió de la polimerasa, les mutacions induïen canvis cap a un codó més freqüent (45 %) o més rar (55%), tant en presència com en absència de la droga. Aplicant una distribució de Poisson, es poden inferir les mutacions que hi hauria a la càpsida assumint una distribució aleatòria d'aquestes. Mentre que al passatge 5 (P5) durant l'adaptació a 0.05 µg/ml, només un 50% dels genomes presentarien una mutació induint un canvi cap a un codó més rar, del

passatge 38 (P38) en endavant, el 50% dels genomes presentarien almenys 5 mutacions d'aquest tipus. Des d'un altre punt de vista, el percentatge de genomes amb cap mutació d'aquest tipus, passaria del 20% al P5, fins al 0.2% al P85. S'analitzà també el nombre de codons que foren substituïts. La majoria de codons rarament utilitzats pel virus que s'aparellen amb tRNAs abundants a la cèl·lula foren substituïts durant l'adaptació a l'AMD (64%), tots ells canviant a aparellar-se amb més afinitat a un tRNA menys abundant.

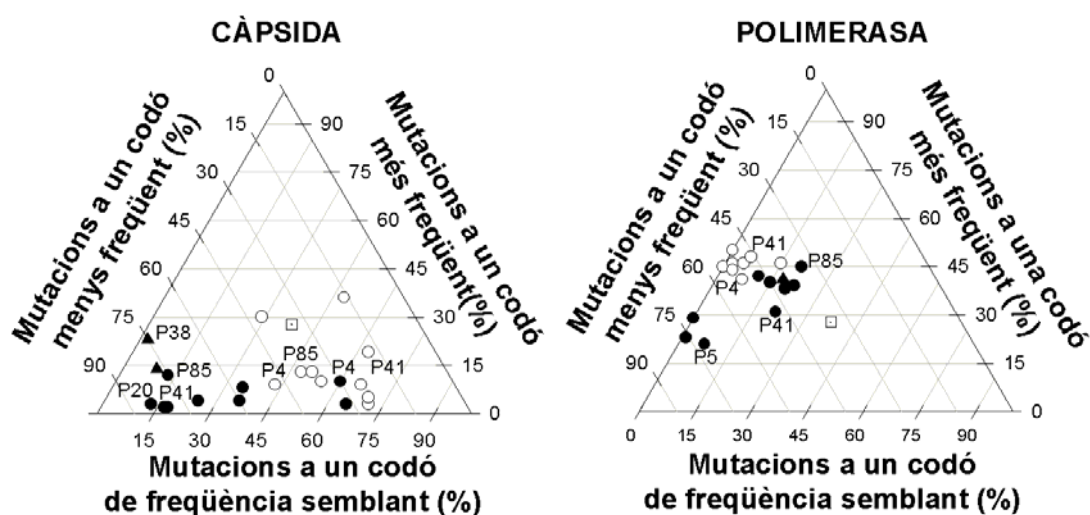


Fig 4.3.2. Representació de les mutacions observades a cada passatge analitzat, segons si el nou codó ha augmentat freqüència, l'ha reduïda o s'ha mantingut en una freqüència similar, segons l'ús de codons cel·lular. Cercles blancs: poblacions creixent en absència d'AMD. Cercles negres: població creixent en 0.05 µg/ml d'AMD. Triangles negres: població creixent en 0.2 µg/ml. Punt enquadrat: Cas teòric de mutació a l'atzar.

Com que la competició es produeix pels tRNAs, un anàlisi més acurat es podia aconseguir mitjançant un anàlisi teòric d'ús d'anticodons. Es van crear taules d'ús d'anticodons a partir de les taules reals d'ús de codons, introduint la possibilitat de múltiples aparellaments codó-anticodó i corregint per l'eficiència d'aquests aparellaments. L'anticodó més freqüent en cada família d'aminoàcids se li donà el valor de 100% i la resta es mesuraren de forma relativa a aquest. Els anticodons es classificaren en tres grups: aquells que la cèl·lula utilitzava menys del 20%, aquells que utilitzava entre el 20 i el 60% i aquells que utilitzava per sobre el 60%. Les poblacions virals replicant en absència d'actinomicina D no van mostrar variacions estadísticament significatives, excepte casos puntuals en el grup d'anticodons inferiors al 20% a la regió de la càpsida en els P41, P44 i P65, i el grup d'anticodons del 20 al 60% a la regió de la

polimerasa dels P41 i P44. En canvi, les poblacions virals replicant en 0.05 µg/ml d'actinomicina D mostraren una tendència significativa i contínua a incrementar l'ús del grup del 20 al 60% i disminuir l'ús del grup per sobre el 60%. Aquesta tendència no s'observà a la zona de la polimerasa. La mateixa tendència, augmentada inclús, s'observà a les poblacions posteriorment cultivades amb 0.2 µg/ml d'AMD. Cinc anticodons entre el grup de >60% foren els que el virus principalment disminuí el seu ús. Durant l'adaptació a 0.2 µg/ml, l'ús d'aquests anticodons disminuí del -7,2 a -10,4%. Per altra banda, sis anticodons del grup 20%-60% foren els que el virus augmentà el seu ús, principalment. L'increment passà del 5,4% al 9,6% durant l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD. Cal fer notar que tots els valors sempre es referencien respecte l'ús en el passatge inicial en absència d'AMD. De forma molt interessant, quan la població adaptada a 0.05 µg/ml es tornà a les condicions originals d'absència d'AMD (P21R), el virus augmentà l'ús del grup d'anticodons usat per sobre el 60% per la cèl·lula i disminuí el del 20-60%. Això es donà gràcies a un lleuger augment (del -6,3% al -2,3%) dels 5 anticodons anteriors del grup >60% i una lleugera disminució (del 6,9% al 3,5%) dels 6 anticodons anteriors del grup 20-60%. Però també gràcies a l'augment de 6 anticodons addicionals del grup de >60% (+7,1%) i la disminució de quatre del grup de 20-60% (-6,3%). Sembla doncs que la població varia tot buscant una dinàmica d'equilibri per a regular la traducció.

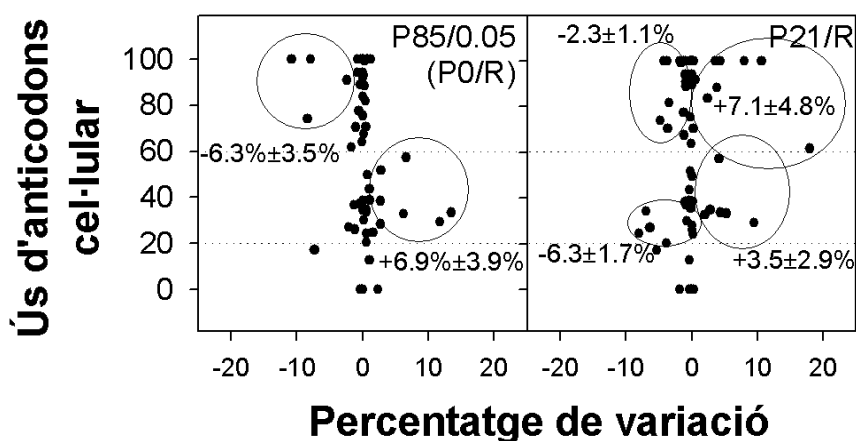


Fig 4.3.2. Variació de l'ús d'anticodons en la regió codificant per la càpsida durant el procés de readaptació de 0.05 µg/ml a absència d'AMD. Es mostra el percentatge de variació de l'ús del virus de cada anticodó individual respecte l'ús de codons cel·lular. A l'esquerra la situació abans de la població adaptada a AMD, i a la dreta la població readaptada a l'absència d'AMD.

També es calculà el Relative Codon Deoptimization Index (RCDI) al llarg del procés d'adaptació. Aquest índex mesura com de diferent és l'ús de codons del virus a l'ús de codons de la cèl·lula hoste. El valor és d' 1 si els dos usos de codons són idèntics i com més diferents són, major es el valor de l'índex. Tot i que l'HAV ja té de per si un ús de codons deoptimitzat, de fet és el més deoptimitzat en la família *Picornaviridae* (taula 4.3.1), les poblacions cultivades amb AMD encara deoptimitzaren més, de forma significativa, la regió de la càpsida. Aquesta deoptimització de la càpsida guarda certa correlació positiva amb la concentració d'AMD que s'ha sotmés al sistema i el nombre de passatges.

Per a confirmar que el que s'havia observat amb l'anàlisi de quasiespècies moleculars de les tres regions específiques, es podia inferir a tot el genoma, es va obtenir la seqüència consens de tot el genoma al P127 de les poblacions cultivades amb absència d'AMD i amb 0.05 µg/ml i el P62 de les cultivades amb 0.2 µg/ml. Nou mutacions diferenciaren la població crescuda amb 0.05 µg/ml de la població control (0.0 µg/ml). Tres d'elles a la càpsida ($\mu=1.3 \cdot 10^{-3}$) i sis a les proteïnes no estructurals ($\mu=1.4 \cdot 10^{-3}$). D'altra banda a la població adaptada a 0.2 µg/ml s'observaren 16 mutacions, una al 5'NCR ($\mu=1.4 \cdot 10^{-3}$), 8 a la càpsida ($\mu=3.4 \cdot 10^{-3}$) i 7 a les no estructurals ($\mu=1.6 \cdot 10^{-3}$). La majoria de mutacions que es donaren a la càpsida (63%) donaren lloc a un canvi a un codó més rar, com ja s'havia vist a l'espectre de mutants. Mentre que a la regió no estructural la majoria induïren un canvi cap a un codó més freqüent (57%). A més a més, l'anàlisi d'anticodons realitzat, també mostrà la mateixa tendència que amb l'estudi de quasiespècies moleculars. Pel que fa a l'anàlisi del RCDI, també s'observà un increment de la deoptimització de la regió de la càpsida (Taula 4.3.1.)

Taula 4.3.1. RCDI de diferents picornavirus i les seqüències consens de virus HAV creixent en absència o presència de 0.05 µg/ml d'AMD i 0.2 µg/ml d'AMD .

Virus	Càpsida	Proteïnes no estructurals	Genoma sencer
PV-I	-	-	1.14
CV-B3	-	-	1.16
RhV-2	-	-	1.37
RhV-14	-	-	1.39
Aichi	-	-	1.39
HAV	-	-	1.70
HAV 0.0	1.732	1.613	1.635
HAV 0.05	1.740	1.614	1.637
HAV 0.2	1.745	1.608	1.635

Per a investigar si l'ús de codons juga un paper important al *fitness* viral en condicions de tRNAs escassos i tRNAs abundants, es van dur a terme experiments de competències a diferents concentracions d'AMD, entre les diferents poblacions obtingudes, tant a inòculs inicials de MOI 0.01:1 com MOI 1:1. La població adaptada a créixer a 0.05 µg/ml, va presentar major *fitness* que la població salvatge en qualsevol competència feta en presència d'AMD. I viceversa, la població salvatge presentava més *fitness* que la població adaptada a 0.05 µg/ml d'AMD en absència de la droga. En presència de 0.2 µg/ml d'AMD, la població adaptada a aquesta concentració també desplaçà, com s'esperava, en qualsevol cas a l'adaptada a 0.05 µg/ml, en presència de 0.2µg/ml d'AMD. En canvi, a 0.05 µg/ml no fou possible en cap cas que la població adaptada a 0.05 µg/ml desplaçés a l'adaptada a 0.2 µg/ml, arribant a un punt d'equilibri entre ambdues amb millors resultats de producció que per separat , com si existís un cert punt de cooperació.

D'aquestes dades es pot concloure que l'HAV adapta el seu ús de codons a un estat permanent de deoptimització. La selecció traduccional selecciona una co-adaptació de l'ús de codons i el contingut de tRNAs, per a obtenir una taxa de traducció alta i acurada. D'altra banda, la selecció d'una cinètica de traducció regulada també selecciona una co-adaptació entre ús de codons i contingut de tRNAs, però per a obtenir una taxa de traducció puntualment lenta i per tant permetent un plegament proteic correcte. En alguns picornavirus s'ha vist que el plegament de la càpsida és depenent de la HSP90 (Proteïna de xoc tèrmic de 90 KiloDaltons), però en el cas de l'HAV no, doncs inhibint dita xaperona no es veu afectada la producció de partícules infeccioses. Així doncs, si no hi hagués cap proteïna implicada, semblaria que el plegament proteic podria venir dirigit per una cinètica de traducció regulada. El fet que l'HAV presenti un ús de codons extremadament deoptimitzat ja apunta a que la selecció traduccional no actua sobre l'evolució del virus. Però el fet que disminueixi la producció de partícules infeccioses tant bon punt s'incrementen els tRNAs disponibles per al virus, i per tant el *fitness*, confirmaria aquesta hipòtesis. Aquest fet és evidenciat amb l'increment de *fitness* un cop es readapta l'ús de codons i d'anticodons. Si la selecció traduccional pogués actuar com a força de la selecció de l'ús de codons, s'hauria observat un tendència a la optimització, en comptes d'una tendència a una major deoptimització.

5. Conclusions

1. La necessitat de mantenir els aminoàcids de la càpsida codificats per codons rars fa que es limiti la variabilitat de la mateixa.
2. La majoria de variants aïllades tenen un *fitness* inferior al virus salvatge.
3. L'HAV perd *fitness* quan es cultiva en condicions de silenciament cel·lular.
4. Si es modifiquen les concentracions dels aa-tRNAs de la cèl·lula hoste, el virus optimitza el gens de la càpside de forma inversament proporcional a la disponibilitat d'aa-tRNAs.
5. Des del punt de vista a valorar l'aparició d'un segon serotip, i per tant l'eficàcia de la vacuna actual, sembla poc probable l'aparició d'aquest segon serotip, però no es pot descartar, especialment si canvia l'epidemiologia de la infecció.
6. Des del punt de vista de l'objectiu d'augmentar la producció de virus vacunals, no s'ha aconseguit augmentar la producció mitjançant la mimetització de les condicions de replicació d'altres picornavirus.

A. Annexes

A.1. Articles complementaris a la tesi

- Sánchez G, Aragonès L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A, Pintó RM (2004) Capside region involved in hepatitis A virus binding to glycoporphin A of the erythrocyte membrane. *J. Virol.* 2004 78:9807-9813
- Pintó RM, Alegre D, Domínguez, A, El-Senousy WM, Sánchez G, Villena C, Costafreda MI, Aragonès L, Bosch A (2007) Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiol. Infect.* 135:270-273
- Stene-Johansen K, Tjon G, Schreier E, Bremer V, Bruisten S, Ngui SL, King M, Pintó RM, Aragonès L, Mazick A, Corbet S, Sundqvist L, Blystad H, Norder H, Skaug K (2007) Molecular epidemiological studies show that hepatitis A virus is endemic among active homosexual men in Europe. *J. Med. Virol.* 79:356-365

