



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Sortida del virus de l'hepatitis A dels hepatòcits: implicacions en la selecció d'antivirals

Montserrat de Castellarnau Serra

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.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de Doctorat Biotecnologia
Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística
Facultat de Biologia

Sortida del virus de l'hepatitis A dels hepatòcits: implicacions en la selecció d'antivirals

Memòria presentada per Montserrat de Castellarnau Serra per optar al grau
de Doctora per la Universitat de Barcelona

V. i P. de la directora i tutora

V. i P. del director

Rosa M. Pintó Solé

Albert Bosch Navarro

La doctoranda

Montserrat de Castellarnau Serra
Barcelona, Juny 2018

“Intelligence is the ability to adapt to change”

Stephen Hawking

La present Tesi Doctoral ha estat finançada a través d'una beca FPI-MICINN del Ministerio de Economía y Competitividad de España, i amb l'ajut de l'Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària-UB (INSA-UB).

AGRAÏMENTS

Aquestes ara sí són les últimes línies que escric en aquesta tesi. Encara no ho tinc assimilat, però ha arribat el final d'una etapa. Una etapa en la qual he crescut molt tan a nivell personal com professional, i ara vull donar les gràcies a tots el que d'alguna manera hi han contribuït al llarg d'aquests anys.

Gràcies **Rosa** i **Albert**, gràcies per confiar en mi i donar-me aquesta oportunitat, per tot el que m'heu ensenyat, per les hores dedicades, la paciència, el recolzament i sobretot gràcies per haver-me ensenyat a persistir fins al final en els moments de desesperació. Gràcies **Susana**, per la teva proximitat, per ajudar-me sempre que ho he necessitat, pel recolzament, els consells i els moments compartits al llarg d'aquests anys.

Aurora, ja ho tenim!!! Vam començar i ara acabem aquesta etapa juntes, no podia tenir millor persona amb qui viure tot el que comporta una tesi. Milions de gràcies per tot, les aventures dins i fora del laboratori, els viatges, dinars, sopars, festes, xerrades..., és tant que no acabaria mai d'escriure, sense tu no hauria estat el mateix amiga. Ets una gran persona, no canviïs mai. **Anna**, mai et donarem prou les gràcies per tot el que has fet per nosaltres, et desitjo el millor en la teva nova etapa, t'ho mereixes. Gràcies per tot el que hem compartit aquests anys dins i sobretot a fora del laboratori, m'emporto

una gran amiga. **Ceci**, mi *argentoyanki* favorita, mi amiga del alma, que bonito fue conocerte y compartir parte de esta tesis contigo. ¡Gracias por todo lo vivido, seguiremos amiga! **Diemlan**, la última incorporación, gracias por los momentos compartidos dentro y fuera del lab, por las risas, las charlas y tu amistad. **Cris**, gràcies per ajudar-me sempre que ho he necessitat i per tots els consells i recolzament al llarg d'aquests anys. **Albert** (Junior), moltes gràcies per estar sempre disposat a donar un cop de mà, per les estones compartides, les xerrades i el recolzament en tot moment. Gràcies també a la resta de gent del grup amb qui he compartit aquests anys i m'han ajudat en algun moment, gràcies **Mari** per l'interès i ajuda tot i la distància, **Fran**, **Lucia**, **Nerea** i **Noemi**. Gràcies a tots els alumnes de pràctiques que han passat pel grup al llarg d'aquests anys, en especial a la **Maria**, la **Muriel**, les **Martes**, la **Cris**, l'**Arnau** i el **Ferran**, gràcies per l'ajuda i molta sort en les vostres noves etapes!

Ale i **Manu**, gràcies compis de lab!! que macos sou i quina sort he tingut de compartir el lab 3 amb vosaltres. Manu gracias por el detalle semanal del *Timeout*, por las charlas y todos los momentos. **Ale**, ets entranyable, no canviïs! **Pedro**, tú también que estas muy solito en el 4, gracias por tanto amigo!

Gràcies **Microlloros**! Aquesta petita família que em creat al llarg d'aquests anys! Viatges, sopars,

dinars, excursions, cases rurals, festes, múltiples manifestacions..., han fet d'aquesta etapa una de les millors de la meua vida. **Carmina**, gràcies per sempre treure'm un somriure! **David**, sort ha tingut el meu pc de tu! **Natalia**, que difícil la teua bioinformàtica! **Alberto**, que paciència per aguantarnos! **Eva**, que bones les teves paelles! **Edu**, ara no sabia si posar-te amb els del grup o aquí, que guai que siguem compis! **Sandra**, segueix sent com tu dius "como te sale ser"! **Martus**, qui ens ho havia de dir eh! **Xavi**, l'últim i el primer, t'adoro! Moltíssimes gràcies a tots, sou fantàstics!

Laura Guerrero i **Bofi**, a vosaltres també! Moltes gràcies per tot, sou estupendes!

Geno, Gala, Sara, gràcies per les estones compartides, gaudiu molt d'aquesta etapa que vosaltres ara comenceu, val la pena!

Vull donar les gràcies també a l'**Alex**, l'**Ayalke**, el **Pablo**, la **Yexe**, la **Eli** (compi de les nostres estimades Garrigues), l'**Aiora**, la **Raquel**, la **Júlia**, la **Laura Sala**, l'**Elena**, la **Maryuri**, la **Silva Cervero**, la **Mònica...**, i segur que m'oblido algú, per tot el compartit aquests anys. A la gent de secretaria del departament, **Mónica**, **Manolo**, **Bea**, **Rosario**, **Susana**, gracias por hacer que todo sea más fácil, por las charlas y todos los momentos.

A la gent d'Irsicaixa amb qui vaig aprendre a estimar la ciència, el **Miguel Angel**, la **Maria**, la **Mariona**, l'**Ester**, la **Glòria**, i especialment a tu **Sandra**, moltes gràcies per tot el que em vau ensenyar.

Donar les gràcies també a tots els amics de fora del departament, **Montse**, **Arturo**, **Ànnia**, **Jordi**, **Xeic**, **Laura**, **Anna**, **Silvia**, **Melissa**, **Robert**, **Aina...**, i una llarga llista! Gràcies per l'estimació, els ànims, per tot el que hem viscut i per estar sempre al meu costat.

Molt especialment, a la meva mare. Sense tu mai hauria arribat fins aquí, moltes gràcies mama. A la meva família, gràcies per haver confiat sempre en mi, per l'estima, el suport i per fer-me costat sempre, ens els bons i els mals moments. Sense vosaltres no hauria sigut possible, gràcies de tot cor. A la meva família política, en especial a l'**Oscar** i la **Mari**, muchas gracias por el cariño, el apoyo y la confianza, sois maravillosos.

A tu, **Dani**, que més que ningú has patit la tesi. Gràcies per fer-me costat incondicionalment, per aguantar aquests darrers mesos, per cuidar-me i animar-me sempre. Ets el millor company de vida que puc tenir.

A tots vosaltres, gràcies.

ÍNDIX

ABREVIACIONS	v
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 Història de l'hepatitis A.....	3
1.2 El virus de l'hepatitis A.....	4
1.3 Organització genòmica.....	5
1.4 Característiques i estructura de les partícules víriques.....	7
1.5 Cicle biològic de l'HAV.....	12
1.5.1 Entrada del virus a la cèl·lula.....	15
1.5.2 Traducció i replicació genòmica.....	18
1.5.3 Sortida del virus fora de la cèl·lula.....	22
1.6 Resposta immune i mecanismes d'evasió.....	23
1.7 Manifestacions clíniques.....	26
1.8 Epidemiologia.....	30
1.9 Estratègies per al control i la prevenció de l'hepatitis A.....	32
1.9.1 Antivirals.....	35
1.10 Estudis i adaptació de l'HAV a cultiu cel·lular.....	36
1.11 Aplicacions biotecnològiques de la producció d'HAV en cultiu cel·lular.....	39
1.11.1 Producció de vacunes.....	40
1.11.2 Diagnòstic.....	42
2. OBJECTIUS	45
3. ANTECEDENTS	49
4. RESULTATS	63
4.1 Naturalesa de les partícules víriques alliberades a sobrenedants de cultiu cel·lular en els models cel·lulars FRhK-4 i Huh7-AI.....	65

4.2	Microscòpia confocal quantitativa de les poblacions HM175-L0 i HM175-HP de l'HAV amb la proteïna cel·lular ALIX en el model cel·lular Huh7-AI.....	69
4.2.1	Anàlisi quantitatiu de la colocalització de les poblacions HM175-L0 i HM175-HP en la línia cel·lular Huh7-AI.....	73
4.3	Expressió relativa d'ALIX durant la infecció amb les poblacions HM175-L0 i HM175-HP de l'HAV en el model cel·lular Huh7-AI.....	80
4.4	Implicacions del silenciament gènic d'ALIX en les cèl·lules Huh7-AI en l'alliberament de les partícules víriques de les poblacions HM175-L0 i HM175-HP a sobrenedant cel·lular.....	85
4.5	Biogènesi de les partícules pseudoembolcallades (eHAV) i nues (HAV) durant el cicle biològic del virus de l'Hepatitis A <i>in vitro</i> en el model cel·lular hepàtic Huh7-AI polaritzat.....	91
4.6	Alteració molecular de la via de sortida del virus de l'HAV com a base per a l'obtenció de potencials drogues antivirals multidiana.....	102
4.6.1	Efecte de les potencials drogues antivirals sobre les fases inicials del cicle del virus de l'HAV.....	108
4.6.2	Efecte de les potencials drogues antivirals sobre l'IRES del virus de l'HAV.....	111
4.6.3	Estudi de la capacitat d'inducció d'autofàgia no canònica de la monensina mitjançant microscòpia confocal de la proteïna cel·lular LC3b en el model cel·lular Huh7-AI.....	115
5.	DISCUSSIÓ	119
6.	CONCLUSIONS	135
7.	MATERIAL I MÈTODES	139
7.1	Cèl·lules i virus.....	141
7.1.1	Poblacions víriques.....	141
7.1.2	Línies cel·lulars.....	142
7.1.3	Obtenció de suspensions víriques de la soca parental HM175-L0 i la soca HM175-HP.....	145
7.1.4	Replicació del virus parental HM175-L0 i del mutant HM175-HP en cèl·lules Huh7-AI.....	146

7.1.5	Obtenció de suspensions concentrades de partícules virals	147
7.1.6	Quantificació del títol infeccions de les suspensions d'HAV: càlcul de la TCID ₅₀ /ml	147
7.1.7	Recompte de la viabilitat cel·lular	149
7.2	Gradients isopícnics de densitat d'iodixanol-sacarosa	150
7.3	RT-PCR a temps real del virus de l'HAV	152
7.4	Microscòpia electrònica de transmissió (TEM)	153
7.4.1	Tinció negativa.....	154
7.5	Microscòpia de colocalització confocal.....	155
7.5.1	Ús del software d'anàlisi	156
7.5.2	Immunofluorescència indirecta de doble marcatge per al virus de l'HAV i la proteïna cel·lular ALIX.....	158
7.5.3	Immunofluorescència indirecta de doble marcatge per al virus de l'HAV i la proteïna cel·lular LC3b.....	160
7.6	Quantificació relativa de l'expressió d'ALIX en cèl·lules Huh7-AI	161
7.6.1	RT-qPCR ALIX i GAPDH	161
7.7	Silenciament gènic d'ALIX.....	164
7.8	Polarització de cèl·lules Huh7-AI <i>in vitro</i>	166
7.8.1	Immunofluorescència indirecta de doble marcatge per cèl·lules Huh7-AI polaritzades.....	167
7.8.2	Infecció de monocapes polaritzades de cèl·lules Huh7-AI en sistemes de <i>transwell</i>	169
7.8.3	Mesura de la permeabilitat amb FITC-Dextrà.....	170
7.9	Mesura de la citotoxicitat de les drogues en cèl·lules Huh7-AI...	171
7.10	Assaig d'alteració molecular de la via de sortida del virus de l'HAV com a base per a l'obtenció de potencials drogues antivirals multidiana	172
7.10.1	Assaig d'inhibició de les fases inicials del cicle de l'HAV en cèl·lules Huh7-AI	173

7.11 Anàlisi de l'activitat de l'IRES mitjançant l'ús de vectors bicistrònics.....	174
7.11.1 Transformació d'E. coli DH5 α competents.....	176
7.11.2 Preparació de plasmidis a concentracions elevades	177
7.11.3 Seqüenciació de Sanger	178
7.11.4 Transfecció transitòria de cèl·lules Huh7-AI amb plasmidis bicistrònics.....	180
7.11.5 Addició de les potencials drogues antivirals	181
7.11.6 Mesura de l'activitat bioluminescent.....	181
7.12 Immunofluorescència indirecta de doble marcatge per l'estudi de l'efecte de la monensina en cèl·lules Huh7-AI.....	183
7.13 Anàlisi estadístic	183
8. BIBLIOGRAFIA	185

ABREVIACIONS

3D ^{pol}	RNA polimerasa RNA dependent
5'NTC	Regió 5' no codificant
ACIP	<i>Advisory Committee on Immunization Practices</i>
AGMK	Cèl·lules de ronyó de mono verd africà
ALIX	<i>ALG-2-interacting protein X</i>
AMD	Actinomicina D
ASGPR	Receptor hepatocel·lular asialoglicoproteïc
CaCo-2	Línia cel·lular contínua de carcinoma de còlon humà
CPE	Efecte citopàtic
cre	Element cis-regulador
CV-1	Cèl·lules de ronyó de mono <i>Cercopithecus aethiops</i>
eHAV	Partícules de l'HAV pseudoembolcallades
eIF4G	Factor d'iniciació eucariota 4 gamma
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i>
FBS	Sèrum fetal Boví
FBSi	Sèrum fetal Boví inactivat
FLuc	<i>Firefly luciferase</i>
FRhK-4/-6	Línia cel·lular contínua de ronyó fetal de mico rhesus
HAV	Virus de l'hepatitis A
HAVcr-1	Receptor cel·lular 1 de l'HAV
HepG2	Línia cel·lular contínua de carcinoma de fetge humà
huHAVcr-1	Receptor cel·lular humà 1 de l'HAV
Huh7	Línia cel·lular contínua de carcinoma de fetge humà
Huh7-AI	Sublínia cel·lular derivada de la Huh7 adaptada a l'HAV
IgA	Immunoglobulina A
IgG	Immunoglobulina G

IgM	Immunoglobulina M
INF	Interferó
IRES	Lloc intern d'entrada del ribosoma
MAb	Anticòs monoclonal
MEM	Medi essencial mínim
MOI	Multiplicitat d'infecció
MRC-5	Cèl·lules diploides humanes derivades de fibroblasts de teixit pulmonar
mRNA	RNA missatger
MVB	Cossos multivesiculars
NCR	Regió no codificant
NEAA	Aminoàcids no essencials
OMS	Organització Mundial de la Salut
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PtdSer	Fosfatidilserina
RLuc	<i>Renilla luciferase</i>
RNA	Àcid ribonucleic
RT	Retrotranscripció
RT-qPCR	PCR a temps real
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TCID ₅₀	Dosi que provoca efecte citopàtic en el 50% de les monocapes cel·lulars
tRNA	RNA de transferència
UMV	Vacunació massiva universal
<i>wt</i>	<i>wild type</i>

1. INTRODUCCIÓ



1.1 Història de l'hepatitis A

Les primeres referències registrades d'icterícia epidèmica, el que avui es coneix com hepatitis, daten del segle V abans de Crist. Tal com descriu Hipòcrates (460-350 a. C.) en els seus tractats mèdics, les epidèmies d'icterícia en la regió mediterrània eren conegudes durant aquesta època. La primera referència fiable que es troba d'icterícia epidèmica la recull Cleghorn en *Epidemic Diseases of Minorca 1744-1749* [1], tot i que des del segle XVIII fins a finals del XIX, degut al desconeixement de la seva etiologia, l'hepatitis es va relacionar amb una obstrucció mecànica del conducte biliar en lloc d'associar-se a inflamació i dany hepàtic.

A finals del segle XIX apareixen les primeres descripcions del que en aquell moment s'anomenà hepatitis sèrica, Heilter i Flindt varen publicar que la icterícia era conseqüència d'una infecció generalitzada que arribava al fetge a través de la sang i que podia tenir lloc tan de forma esporàdica com epidèmica [2]. El 1923, a partir de dades de 63 brots que van tenir lloc als E.E.U.U entre els anys 1812 i 1922, Blumer va recollir el patró que seguia la icterícia epidèmica [3]. En aquesta mateixa època, Willcox ja va relacionar l'origen de la malaltia amb una infecció gastrointestinal que es podia adquirir per aliments i aigua contaminats.

Amb les dades obtingudes en estudis realitzats amb voluntaris durant i després de la Segona Guerra Mundial és va establir la naturalesa vírica dels agents infecciosos i es van poder demostrar també les diferents etiologies de l'hepatitis sèrica i infecciosa. El 1947 MacCallum va introduir ja el terme hepatitis A per l'hepatitis infecciosa i hepatitis B per a la sèrica [4,5].

Al 1967 Krugman va demostrar que ambdós tipus d'hepatitis presentaven vies d'infecció i períodes d'incubació diferents i que no presentaven immunitat creuada, donat que podien ser transmeses al mateix pacient, aquests fets van confirmar que l'hepatitis sèrica i la infecciosa són entitats clíniques i epidemiològiques diferenciades [6]. També a finals de la dècada de 1960, Deinhardt va poder estudiar en detall les alteracions bioquímiques i histopatològiques que es produeixen com a conseqüència de la infecció en aconseguir propagar el virus causant de l'hepatitis A en micòtits (*Callitrichidae*) [7].

El 1973, gràcies a la microscòpia electrònica de femtes d'individus infectats, Feistone va ser el primer en identificar les partícules sense embolcall d'uns 28 nm que corresponen als virions del virus de l'hepatitis A (HAV) [8]. Aquest fet va facilitar l'estudi de les característiques generals del virus i va donar lloc al desenvolupament d'assaigs específics per al diagnòstic [9–11]. Molts d'aquests estudis es van dur a terme amb la soca HM-175 de l'HAV, la qual va ser aïllada a partir d'un brot que va tenir lloc a Melbourne, Austràlia, l'any 1976 [12], i amb les variants d'aquesta soca adaptades a replicar en cultiu cel·lular [13,14].

1.2 El virus de l'hepatitis A

Durant dècades el virus de l'hepatitis A (HAV) ha estat considerat un virus no embolcallat i l'únic representant del gènere *Hepatovirus* (família *Picornaviridae*, ordre *Picornavirales*) [15]. Recentment s'han descobert 13 noves espècies d'*Hepatovirus* en diversos mamífers petits (pertanyents als ordres *Rodentia*, *Chiroptera* i *Eulipotyphla*)[16]. Aquests darrers anys també s'ha descrit que el virus surt de la cèl·lula embolcallat en membranes de la pròpia cèl·lula, aquesta nova via de sortida ha suposat un nou paradigma en

la biologia de l'HAV [17]. Les membranes d'aquestes partícules no presenten glicoproteïnes codificades pel virus, per aquest motiu se'ls anomena partícules pseudoembolcallades (eHAV) [18]. El virus circula per la sang aprofitant l'avantatge que li confereixen aquestes membranes en front a la neutralització per anticossos. Per altra banda, les partícules excretades a femta es troben lliures d'aquesta envolta, són estables a pH baix i resistents al calor i la dessecació, aquestes característiques li permeten al virus sobreviure a l'ambient [19].

Aquesta dualitat de fenotip, pseudoembolcallat i protegit en front la neutralització per anticossos dins de l'hoste i nu però estable en el medi ambient, li proporciona unes oportunitats úniques per a la propagació dins i entre els hostes [20].

1.3 Organització genòmica

El genoma del virus de l'hepatitis A consisteix en un RNA de cadena senzilla i polaritat positiva amb una longitud d'unes 7,5 kilobases aproximadament [9]. No conté *cap* i es troba unit covalentment a una proteïna VPg (codificada a la regió 3B) en el seu extrem 5'. Consta d'una regió 5' no codificant (5'NCR), d'entre 734-740 nucleòtids, que conté l'IRES (lloc intern d'entrada del ribosoma), un únic marc de lectura obert (ORF, d'entre 2.225-2.227 nucleòtids) i una regió 3' no codificant (3'NCR, d'entre 40-80 nucleòtids) que acaba amb una cua de poli-A. L'IRES és determinant en l'inici de la traducció. Dins de la família *Picornaviridae*, l'IRES de l'HAV (de 450 nucleòtids), es considera tan diferent a l'IRES dels altres membres de la família com per ser l'únic representant del grup III en la classificació d'IRES dels picornavirus [21-23]. Aquest IRES resulta ser molt poc eficient dirigint la traducció [24,25] (**Figura 1**).

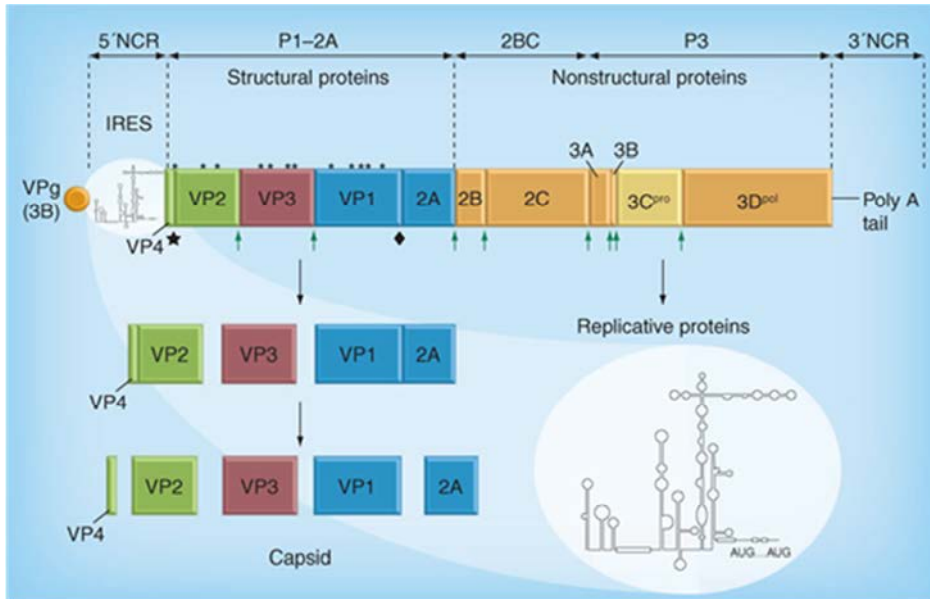


Figura 1. Organització genòmica i processament proteolític de la poliproteïna de l'HAV. El virus de l'hepatitis A posseïx un genoma de RNA de cadena senzilla i polaritat positiva que conté un únic marc obert de lectura i codifica per una poliproteïna. S'observa la regió 5' no codificant (5'NCR) que inclou l'IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), les tres regions codificants principals (P1, P2 i P3) i la regió no codificant a 3' (3'NCR) que conté una cua de poli-A. La poliproteïna és processada majoritàriament per la proteasa 3C_{pro} en els punts marcats a la figura amb fletxes verdes i per dues proteases cel·lulars desconegudes. Una d'aquestes escindiria 2A de la càpsida en un pas més tardà en la morfogènesi (símbol diamant) i l'altra produiria el tall entre VP4 i VP2 (símbol estrella) en l'últim pas de maduració de la càpsida. Imatge extreta de [26].

El terç amino terminal de la regió codificant (P1) conté la informació per produir les proteïnes de la càpsida, la resta (P2 i P3) codifiquen per proteïnes no estructurals, requerides per la replicació del virus: 2B, 2C, 3A, 3B (la proteïna VPg), 3C_{pro} (una cisteïna-proteasa responsable de la majoria dels talls post-traduccional de la poliproteïna) i 3D_{pol} (la RNA polimerasa RNA dependent) (**Figura 1**).

1.4 Característiques i estructura de les partícules víriques

La càpsida de l'HAV, de simetria icosaèdrica, està formada per 60 còpies de les proteïnes VP2, VP3 i VP1. La unitat bàsica de la càpsida és el protòmer, amb un coeficient de sedimentació de 5S, el qual presenta una còpia de cadascuna de les proteïnes (**Figura 2**). Els protòmers s'uneixen de 5 en 5 per donar lloc als pentàmers, que presenten un coeficient de sedimentació de 14S. La unió de 12 pentàmers dona lloc a la càpsida buida, amb un coeficient de sedimentació de 70S. Finalment, la càpsida buida incorpora l'àcid nucleic i esdevé un virus infecciós, amb un coeficient de sedimentació de 125S prèviament al tall de VP0 en VP2 i VP4 i de 150S després del tall.

Fins els darrers anys es dubtava que VP4, extremadament petita en l'HAV en comparació amb la resta de picornavirus i essencial per a la formació del virió, es trobés en les partícules madures del virus [27]. Però, recentment s'ha detectat VP4 en virions madurs mitjançant cristal·lografia de rajos X [28]. La determinació estructural mitjançant rajos X també ha revelat característiques de la superfície externa de l'HAV diferents a les observades en altres picornavirus. La superfície de la càpsida de l'HAV és bastant llisa; no presenta ni butxaca hidrofòbica a VP1, ni factor de butxaca (una molècula no proteica que es troba en alguns enterovirus i rinovirus, que s'uneix a la càpsida donant-li estabilitat). Aquest fet, junt amb l'extrema resistència que presenta el virus a la degradació per pH baix i temperatures elevades, suggereix que ha adoptat un mecanisme de desencapsidació diferent als descrits fins al moment en picornavirus [29].

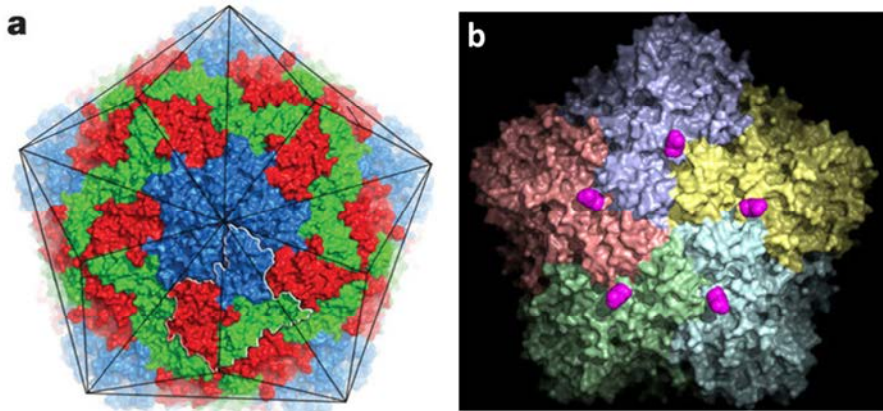


Figura 2. Estructura de la càpsida de l'HAV. **a.** Superfície accessible de l'HAV (VP1, blau; VP2, verd; VP3, vermell). Les línies negres representen els diferents costats de l'icosaedre. **b.** VP1 es produeix inicialment amb una extensió C-terminal de 8 kDa (coneguda com PX) única a l'HAV entre tots els picornavirus. PX és escindit de la partícula completa per una proteasa del hoste desconeguda. Predicció de la posició de PX (en fúcsia), si estigués present en els virions madurs, a la superfície del virus. Imatges extretes de [28].

Els darrers anys s'ha observat que l'HAV tant en cultiu cel·lular com en sang presenta dues poblacions de virus infecciosos que es diferencien segons la seva densitat en gradients d'iodixanol. Per una banda, una població minoritària que correspon a les partícules víriques nues (HAV) amb una densitat d'uns 1.22 g/cm^3 i un diàmetre d'uns 27 nm (**Figura 3 e**), i per l'altra una població majoritària amb una densitat inferior a 1.10 g/cm^3 que correspon a les partícules víriques pseudoembolcallades (eHAV) (diàmetre de $50\text{-}110 \text{ nm}$) (**Figura 3 a-d**). Moltes d'aquestes partícules pseudoembolcallades (eHAV) poden contenir des d'1, 2 i fins a 4 càpsides, fet que suggereix que l'embolcall és adquirit amb posterioritat a l'ensamblatge de la càpsida [17]. Aquests virions envoltats de membrana tenen una infectivitat equivalent a la de les partícules nues. Els eHAV presenten a més una particularitat en la proteïna VP1 de la càpsida, la qual conserva la extensió a l'extrem carboxil terminal (C-terminal) PX (també anomenada 2A) (**Figura 2 b**). PX té un paper important en l'ensamblatge de

la càpsida [17], de la qual s'escindeix en el moment que la partícula perd la membrana [30].

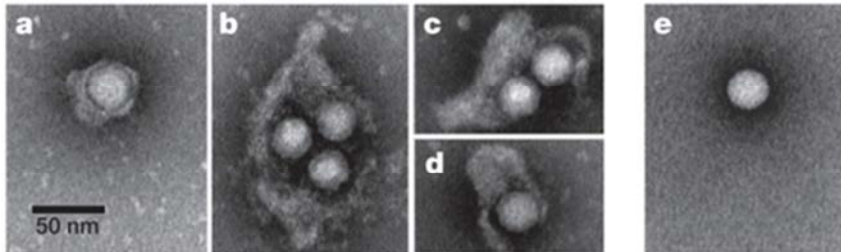


Figura 3. Partícules del virus de l'HAV (a-d). Forma pseudoembolcallada (eHAV). **(e)** Forma nua (HAV). Imatge estreta de [17].

El virus per arribar al seu òrgan diana ha de superar condicions molt adverses. Durant la fase inicial del cicle infecciós, el virió ha de resistir al pH àcid de l'estómac i l'acció de les proteases intestinals i detergents (especialment les sals biliars). Durant el seu trànsit a través de la circulació portal hepàtica, ha d'escapar dels mecanismes de neteja de l'hoste, com l'eliminació per unió a eritròcits [31], la càpsida d'HAV presenta una conformació a pH neutre que li permet escapar de la unió a la glicoforina A [32], o la neutralització mitjançant anticossos, la qual li resulta més senzilla en la seva forma pseudoembolcallada (eHAV) [17,20]. Durant la fase de sortida a través de les vies biliars, torna a trobar-se amb proteases i sals biliars, el que indica una vegada més que és un virus altament resistent a pH baix, detergents i proteases [33]. S'ha proposat que l'elevada resistència de l'HAV es deguda a la lenta i controlada cinètica de traducció de les proteïnes estructurals, que permeten un plegament precís, donant lloc a una càpsida altament estable i cohesiva [34].

El virus de l'HAV presenta poca variabilitat antigènica, només s'ha descrit un únic serotip i uns pocs llocs antigènics [26]. Mitjançant els

mutants d'escapament als anticossos i els assajos de competència entre els diferents anticossos monoclonals (MAbs) per a la neutralització del virus, s'han aconseguit definir diferents determinants antigènics. Alguns residus de les proteïnes VP1 i VP3, en la seva conformació nativa, formen un epítop immunodominant [35,36]. Aquest esta format per múltiples epítops discontinus, definits per diferents anticossos monoclonals. S'ha trobat també un altre lloc antigènic independent a VP1, identificat a partir de mutants del residu 221 d'aquesta proteïna, que es reconegut per l'anticòs H7C27 [35,36]. Tant H7C27 com un anticòs policlonal anti-VP3 (103-121) reconeixen el lloc d'unió a la glicoforina A, a través de la qual el virus pot hemaglutinar eritròcits [32]. Existeix un altre epítop, al qual s'uneix l'anticòs 4E7, pel qual encara no s'ha trobat cap mutant d'escapament i no es coneix la seva localització exacta [36]. Utilitzant pèptids sintètics que representen parts de la seqüència primària de les proteïnes de la càpsida es va definir un epítop continu a la proteïna VP3, diferent als mencionats anteriorment [37].

Tenint en compte que l'HAV replica seguint una dinàmica de quasiespècies [38], es probable que la manca de variabilitat antigènica sigui deguda a constriccions estructurals de la càpsida [34,39]. La relació entre l'impacte de l'ús de codons en el plegament de la càpsida i aquestes constriccions estructurals pot contribuir a aquest fenotip antigènicament estable [39]. Una anàlisi de les quasiespècies de l'HAV emergents sota la pressió d'anticossos monoclonals (MAbs) va revelar que un percentatge molt elevat dels canvis d'aminoàcids detectats en VP1 i VP3 eren transicions que mantenien els codons rars, de la mateixa manera, un percentatge més baix d'aquests canvis eren transversions que mantenien la freqüència d'aquests codons. Pel contrari, tan sols percentatges molt baixos d'aquests canvis van ser transicions i transversions que van donar lloc a canvis en la

freqüència dels codons. Aquestes dades, no tan sols van revelar el predomini de les transicions sobre les transversions, sinó que també ressalten la importància de la freqüència dels codons. Tan sols el 31% (VP3) i el 26% (VP1) de tots els possibles canvis d'aminoàcids que mantenen la freqüència de codons rars en els residus específics de la superfície de la càpsida van ser induïts per transicions. Això podria explicar la falta de coincidència entre els residus codificats per codons rars i aquells en els que es van detectar canvis [40].

Els estudis recents de cristal·lografia amb rajos X que han donat a conèixer l'estructura tridimensional de l'HAV han aportat nova informació referent a la càpsida del virus. La càpsida madura és notablement diferent a la de la resta de picornavirus de mamífers (com per exemple els poliovirus o el virus de la febre aftosa), la proteïna VP2 sembla ser que presenta un plegament que fins al moment només s'havia vist en picornavirus primitius d'insectes [28]. Això semblaria concordar amb els últims estudis sobre l'origen de l'HAV, on s'han identificat 12 espècies diferents d'hepatovirus en teixits i excrements de ratpenats, musaranyes, eriçons, rosegadors i fins i tot foques [16,41,42]. Els estudis filogenètics indiquen que aquests virus haurien anat saltant entre les espècies hostes en un passat llunyà, suggerint que es probable que l'HAV s'hagi originat finalment en un petit mamífer insectívor [16].

Tot i la baixa variabilitat antigènica del virus, la seva variabilitat nucleotídica és similar a d'altres picornavirus. En base a l'anàlisi filogenètic de seqüències de la proteïna VP1, l'HAV es troba dividit actualment en 6 genotips (I-VI) [43,44]. Els genotips I-III afecten humans mentre que els genotips IV-VI afecten a simis. El genotip I es subdivideix en diversos subgenotips; a, b i c, i els genotips II i III en a i b [45]. Els genotips I i III són els que s'aïllen amb més freqüència de mostres humanes [46].

1.5 Cicle biològic de l'HAV

La via principal de transmissió de l'HAV és la via fecal-oral, ja sigui a través del contacte persona a persona o per ingestió d'aliments o aigua contaminats [47]. Amb molta menys freqüència també s'han descrit casos on la infecció ha sigut transmesa mitjançant transfusions de sang o hemoderivats procedents de donants que es trobaven en fase de virèmia de la infecció, contacte sexual (pràctiques sexuals oro-anals), l'ús de drogues injectables, tatuatges i pràctiques dentals poc higièniques [45,48,49].

El cicle biològic en l'hoste s'inicia, habitualment, mitjançant la ingestió del virus, un cop en l'aparell digestiu, s'ha suggerit que el virus podria replicar a nivell de mucosa estomacal o intestinal per tal d'amplificar l'inòcul [50]. Posteriorment, el virus és absorbit a través de la mucosa de l'intestí prim fins arribar al torrent sanguini, produint una fase de virèmia. El mecanisme pel qual el virus accedeix al torrent sanguini no es coneix exactament. Estudis *in vitro* amb cèl·lules epitelials intestinals polaritzades suggereixen que el virus surt per la membrana apical, per tant segons aquests resultats un cop ha replicat a intestí els virus serien excretats al lumen [51]. Per explicar el pas del virus al torrent sanguini s'han plantejat dos models. Un d'ells és la transcitosi del virus a l'intestí a través de les cèl·lules M, encarregades de captar antígens a les plaques de Peyer de l'ili terminal, com passa amb els poliovirus [51,52]. L'altre mecanisme consistiria en la transcitosi de partícules víriques associades a IgA a través de l'epiteli intestinal, mitjançant el receptor polimèric d'immunoglobulines (pIgR) [53]. Ambdós models varen ser proposats amb anterioritat al descobriment de la forma pseudoembolcallada de l'HAV (eHAV) coneguda actualment. Estudis recents amb cèl·lules epitelials intestinals polaritzades *in vitro* confirmen que el virus surt a través de la membrana apical però ho

fa en forma de partícula pseudoembolcallada (eHAV), fet que faria replantejar els models descrits anteriorment [54].

Un cop al torrent sanguini, a través de la circulació portal hepàtica arriba al seu òrgan diana, el fetge, on després d'infectar les cèl·lules de kuppfer (macròfags residents al fetge) penetra als hepatòcits on replica massivament [55,56].

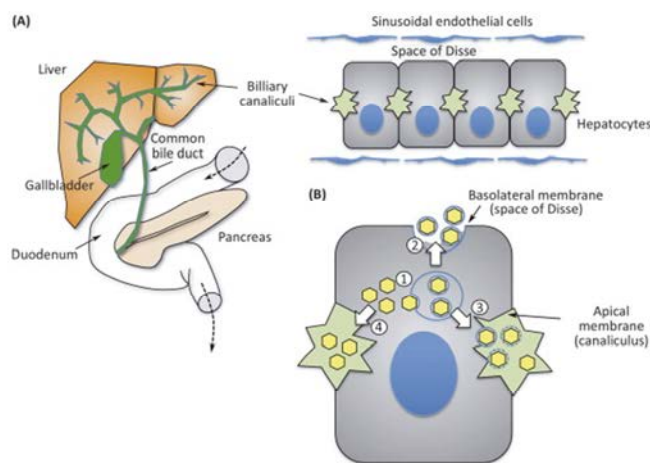


Figura 4. Cicle enterohepàtic de l'HAV. (A) La replicació de l'HAV es produeix principalment en els hepatòcits polaritzats (dreta). El virus surt a través de la membrana apical al canalicul biliar, arribant al duodè a través del conducte biliar, per després ser excretat en femta (esquerra) o reabsorbit a intestí cap a fetge. En menor mesura, el virus també es pot alliberar a través de la membrana basolateral (Espai de Disse) i arribar a sang a través dels sinusoides hepàtics (a la dreta). (B) (1) HAV pseudoembolcallat (hexàgons grocs dins de cercles blaus) (2) és probable que surti a través de la membrana basolateral i arribi a la circulació sistèmica. Els virus que s'extreuen a les femtes no tenen embolcall, per tant, (3) podrien sortir dels hepatòcits a través de la membrana apical i perdre l'embolcall per l'acció de les sals biliars o bé (4) per algun mecanisme independent que donés lloc al transport apical de l'HAV no embolcallat. Imatge extreta de [57].

Encara que el mecanisme que utilitza el virus per arribar fins a fetge té molts interrogants, el model acceptat fins al moment es basa en l'existència d'un cicle enterohepàtic (Figura 4. A), en el qual la progènie vírica és secretada per l'hepatòcit a través dels canalicles biliars des d'on

arriba a les vies biliars i novament a l'intestí. Des d'aquí els virus poden ser excretats a la femta o bé reabsorbits i transportats de nou cap al fetge, el que constitueix un cicle enterohepàtic, que continua fins que els anticossos neutralitzants o altres mecanismes l'interrompen [53]. S'ha proposat que aquestes reinfeccions del fetge es donen gràcies a la formació d'uns complexos HAV/IgA, fins que grans quantitats d'IgG desplacen la IgA dels mateixos [53]. En aquest model, les reinfeccions dependrien de com es desenvolupi la resposta d'IgG i podrien ser la causa dels casos de recidives i d'aquells en els quals la malaltia es perllonga més temps del habitual. En aquests casos, les IgA anti-HAV ajudarien al virus a arribar al fetge inclús en presència d'IgG neutralitzants [58]. Això, junt amb el fet que la IgA pugui ajudar a l'HAV a entrar als hepatòcits [59] i la possible transmissió duta a terme per IgA a nivell de l'epiteli intestinal [53], ha portat a postular que aquest tipus d'immunoglobulina juga un paper de transportador del virus en el cicle enterohepàtic, com ja s'ha comentat anteriorment [53].

El canvi de paradigma en la biologia de l'HAV que s'ha produït al descriure la forma pseudoembolcallada del virus [17], ha tingut fortes implicacions especialment en el cicle biològic del mateix [57]. La forma pseudoembolcallada de l'HAV podria afavorir la persistència del virus en sang ja que aquestes partícules no són neutralitzades pels anticossos anti-HAV [17,20,57]. Aquestes partícules pseudoembolcallades presents en sang haurien sortit a través de la membrana basolateral de l'hepatòcit fins l'espai de Disse, on es troben els sinusoides hepàtics. Segons aquest nou model de cicle enterohepàtic, les partícules nues excretades a femta podrien provenir de dues vies diferents, d'una banda partícules pseudoembolcallades que perdrien l'embolcall al sortir per la membrana apical de l'hepatòcit degut a l'acció de les sals biliars, d'altra banda podrien sortir de l'hepatòcit com a partícules nues per la membrana apical utilitzant algun mecanisme

independent [57] (**Figura 4. B**). Aquestes partícules pseudoembolcallades (eHAV) facilitarien la propagació del virus entre els hepatòcits; els virus sortirien a través de la membrana basolateral fins espai de Disse, on podrien entrar als hepatòcits subjacents [57].

1.5.1 Entrada del virus a la cèl·lula

Tal com s'ha comentat anteriorment, el virus de l'hepatitis A replica en hepatòcits, tot i que s'han detectat antígens del virus en altres cèl·lules i òrgans de primats, com les cèl·lules de kupffer [55], cèl·lules epitelials de les criptes intestinals i cèl·lules de la lamina propria de l'intestí prim [50]. Per a la interacció del virus amb la superfície de la cèl·lula i l'entrada a la mateixa s'han suggerit diferents mecanismes.

D'una banda, s'ha descrit que TIM-1 (*T-cell Immunoglobulin and Mucin-1*) pot actuar com a receptor cel·lular per l'HAV (HAVcr-1, *Hepatitis A Virus cellular receptor 1*). TIM-1 és una glicoproteïna transmembrana que fa possible l'entrada de l'HAV en cèl·lules de ronyó de mico (*African green monkey kidney cells*) [60]. La regió N-terminal del domini extracel·lular del receptor HAVcr-1, anomenada D1, és rica en cisteïnes i presenta homologia amb la superfamília de les immunoglobulines. La segueix la regió *TSP-rich*, que és rica en treonina, serina i prolina, trets que són característics de les glicoproteïnes tipus mucines [60,61]. Aquesta molècula s'expressa en una gran varietat de teixits, per això es creu que serien necessaris coreceptors per a la unió i l'entrada de l'HAV al fetge. La proteïna humana TIM-3 (*T-cell Immunoglobulin and Mucin-3*, que presenta una homologia significativa amb l'huHAVcr-1, l'homòleg humà de HAVcr-1 [62]) s'ha suggerit com a possible coreceptor ja que promou l'entrada del virus a les cèl·lules diana, però sense actuar ell mateix com a receptor del virus [63]. D'altra banda, en un

altre mecanisme d'entrada que s'havia proposat, les partícules infeccioses de l'HAV recobertes d'IgA s'unirien a l'ASGPR (receptor d'asialoglicoproteïna, el qual es troba principalment al fetge), que les internalitzaria [59]. En ratolins on s'inocula el virus lligat a IgA per via intravenosa i intraperitoneal, els complexos HAV-IgA arriben al fetge en major quantitat que el virus lliure [58]. Tenint en compte que la IgA és un lligand natural de l'HAVcr-1 i que aquesta unió potencia la unió entre el virus i el receptor HAVcr-1, ambdós mecanismes podrien explicar com el virus entra als hepatòcits envoltat d'IgA [64].

No obstant això, estudis realitzats recentment amb les dues formes conegudes actualment del virus, nuca (HAV) i pseudoembolcallada (eHAV) [17], han demostrat que TIM-1 no és essencial en l'entrada del virus en humans, simis i múrids [65]. Està descrit que TIM-1 gràcies a la seva capacitat per interaccionar amb la fosfatidilserina (PtdSer), present a les membranes dels virus, facilita l'adherència i la subseqüent entrada a la cèl·lula de molts virus embolcallats [66,67]. Estudis *in vitro* en cèl·lules Vero de ronyó de mico, mostren com TIM-1 sí que semblaria facilitar tant l'adherència com l'entrada del virus pseudoembolcallat respecte el nu, tot i no ser essencial per cap de les dues formes del virus [65]. En canvi, en cèl·lules Huh7.5 (cèl·lules hepàtiques humanes), TIM-1 no semblaria facilitar l'adherència ni l'entrada del virus pseudoembolcallat respecte el nu, i per tant tindria un paper poc important i no seria essencial ni per l'adherència ni per l'entrada de cap de les dues formes del virus. Aquesta diferència entre ambdós tipus cel·lulars es podria explicar degut a que TIM-1 s'expressa molt més al ronyó que al fetge [62]. El que sí semblaria ser igual entre hepatòcits i cèl·lules de ronyó *in vitro* seria una significativa millor entrada del virus nu respecte l'embolcallat [65]. En múrids tampoc semblaria que TIM-1 ni TIM-4 siguin essencials per la replicació ni la

patogènesis de l'HAV, no obstant TIM-1 podria promoure la disseminació del virus al fetge i les lesions hepàtiques [65].

Contràriament, altres estudis *in vitro* també recents mostren que en cèl·lules AGMK de ronyó de mico el receptor HAVCR1 (TIM-1) és el receptor principal tan per la forma pseudoembolcallada (eHAV) com per la nua (HAV) del virus de l'HAV. Pel que fa a les cèl·lules Vero de ronyó de mico suggereixen que ambdós formes del virus podrien utilitzar el receptor TIM-1 per igual, però que hi hauria un receptor alternatiu addicional. En canvi, en les cèl·lules hepàtiques Huh7, el receptor TIM-1 l'utilitzaria només la forma pseudoembolcallada del virus (eHAV) i per la nua (HAV) i hauria un receptor addicional [68]. Pel que fa al receptor mHavcr1 dels múrids, l'equivalent a l'HAVCR1 en humans, suggereixen que aquest també és el receptor funcional tan per la forma pseudoembolcallada com per la nua de l'HAV [68].

Alternativament, la determinació estructural de l'HAV mitjançant rajos X ha revelat que la superfície de la càpsida de l'HAV és bastant llisa, tal com s'ha comentat anteriorment no presenta la butxaca hidrofòbica a VP1, que seria el lloc on encaixa el receptor d'altres picornavirus com per exemple enterovirus [28]. Això podria portar a especular que l'HAV podria entrar a les cèl·lules per un mecanisme d'entrada completament diferent al de la resta de picornavirus [65,69].

L'entrada a la cèl·lula semblaria ser mitjançant la via endocítica fins a l'endosoma tardà o el lisosoma. En el cas dels virus pseudoembolcallats (eHAV) l'entrada seria molt més lenta degut a la necessitat d'arribar fins al lisosoma perquè es degradi la seva membrana gràcies a l'acidificació i deixi la càpsida accessible per al receptor [17,18]. Les partícules nues (HAV) no

es veuen afectades per la cloroquina, un inhibidor de l'acidificació del lisosoma, aquest fet corrobora que aquestes no requereixen d'aquesta acidificació endosomal, per tant semblaria que poden interaccionar amb el receptor en els endosomes més temprans [17,18,65,69]. A més a més l'exposició del virus a condicions àcídiques provoca canvis conformationals en les partícules del HAV, donant lloc a partícules més hidrofòbiques, i ajuda al clivatge de VP0, el que converteix els provirions en virions [70]. La desencapsidació en l'HAV és un procés molt lent, almenys en estudis *in vitro* amb soques adaptades a cultiu cel·lular, en comparació amb la majoria de picornavirus (varies hores en front a 30-60 minuts) [71,72]. A més, la cinètica de desencapsidació del virus es asincrònica. Això pot ser degut a que normalment en els inòculs existeix una barreja de partícules víriques infeccioses (virions i provirions) que presenten diferents temps de desencapsidació entre ells [71]. Per altra banda, la proteïna VP4 de la càpsida, que a diferència del que passa en altres picornavirus no requereix ésser miristilada [73], és capaç de produir porus en els liposomes que presenten una composició lipídica similar a la dels endosomes tardans, fet pel qual s'ha proposat que aquesta podria ajudar al genoma del virus a sortir del endosoma [74].

1.5.2 Traducció i replicació genòmica

Independentment de la via d'entrada que el virus utilitzi, i un cop finalitzada la desencapsidació, l'RNA del virus, que es troba en el citoplasma de la cèl·lula, ha de ser traduït (**Figura 5**). El mecanisme de traducció que utilitza l'HAV, és cap-independent gràcies a l'IRES (lloc intern d'entrada del ribosoma) situat a la regió 5' no codificant el qual permet reclutar les subunitats ribosomals i els factors necessaris per la formació del complex

d'iniciació de la traducció. L'HAV presenta un IRES tipus III molt poc eficient a l'hora de dirigir la traducció [21,24].

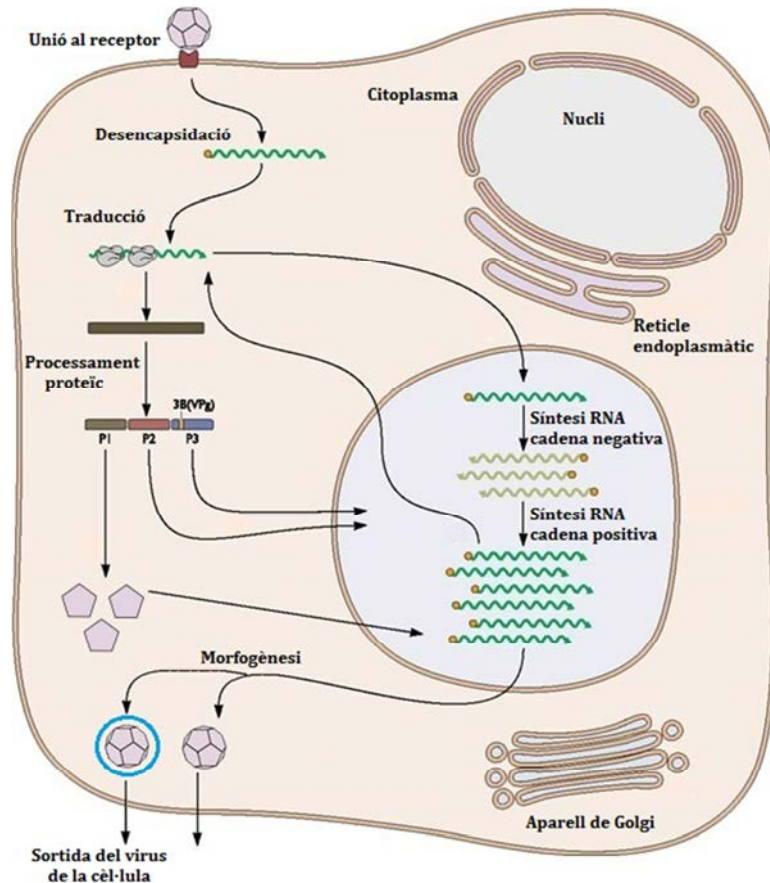


Figura 5. Esquema del cicle de replicació de l'HAV. Imatge adaptada de [75].

A diferència dels altres picornavirus, l'HAV no provoca un tall proteolític en el factor d'iniciació eucariota 4G (eIF4G) per interferir en la síntesi de proteïnes cel·lulars, això fa que tingui que competir amb els mRNA cel·lulars a l'hora de traduir el seu genoma [24,34,76,77]. Aquest fet podria explicar el pobre i lent creixement de l'HAV en cultiu cel·lular. Davant d'aquesta situació de competència entre el virus i la cèl·lula, l'HAV

ha adoptat una estratègia de traducció diferent, optant per un ús de codons deoptimitzat respecte al de la cèl·lula hoste, per tal de minimitzar aquesta competència pels tRNAs i la maquinària traduccional. Fruit d'aquesta deoptimització en l'ús de codons, el virus utilitza codons rars, que són aquells que s'aparellen amb tRNAs poc abundants. L'HAV utilitza molts codons rars ja que utilitza com a rars els que són rars per la cèl·lula i que, per tant s'aparellen amb tRNA que es troben en concentracions baixes en la cèl·lula, però també els que la cèl·lula utilitza freqüentment, ja que els tRNA amb els que s'aparellen aquests últims tampoc estan disponibles per al virus [34,40].

La traducció dona lloc a una única poliproteïna que és processada co- i post-traduccionalment. Aquest processament és necessari per alliberar les proteïnes estructurals i no estructurals i per a que es pugui donar la replicació genòmica i l'ensamblatge de la càpsida. El primer processament proteolític té lloc entre les proteïnes 2A i 2B per part de la proteasa 3Cpro, donant lloc a P1-2A [78,79]. Seguidament, P1-2A s'ensambla com a pentàmer al citoplasma i és processada per la mateixa proteasa viral, originant les proteïnes VP0 (el que després serà VP2 i VP4), VP3 i VP1-2A [80,81]. Les proteïnes no estructurals també són processades per la proteasa 3Cpro. A mesura que avança el procés de morfogènesi, té lloc el tall de VP1-2A dut a terme per proteases cel·lulars (s'ha descrit que la proteasa lisosomal catepsina L es capaç de tallar VP1-2A *in vitro* [82]) i s'allibera la proteïna VP1 madura. Aquest pas no sembla ser essencial per a la formació de les partícules, però sí per a què aquestes siguin altament infeccioses [83,84]. Aquest tall genera petites diferències al extrem C-terminal d'VP1, per aquest motiu semblaria que existeixen una barreja de diferents VP1 entre els virions madurs [85]. Actualment, amb el nou paradigma en la biologia del virus de l'hepatitis A, s'ha descrit que la

proteïna VP1 forma part de la càpsida dels virions nus, mentre que VP1-2A es troba en els virus pseudoembolcallats (eHAV), de tal manera que la dissociació de VP1 i 2A es produiria un cop el virus hagués perdut la pseudomembrana (17,18). El tall d'VP0, que dona lloc a VP4 i VP2, i dona lloc als virions madurs incrementant la seva infectivitat, es dona per una activitat proteolítica desconeguda fins al moment [86] (**Figura 1**).

L'RNA genòmic es utilitza com a motlle per la RNA polimerasa RNA dependent vírica (3D), per la producció de còpies complementàries de sentit negatiu. La replicació del genoma víric es duu a terme en complexos de replicació que consisteixen en membranes cel·lulars reordenades que contenen proteïnes víriques i cel·lulars. Aquests complexos s'han descrit com xarxes vesícula-tubulars i existeix controvèrsia amb el seu origen, uns les situen al reticle endoplasmàtic [87,88] i d'altres suggereixen la membrana mitocondrial externa com a possible lloc on es dona la replicació [89]. En aquests complexos es dona la transcripció del genoma víric en RNA antisentit, que a la vegada fa de motlle per a la producció de nous genomes que serviran per començar nous cicles de replicació i/o sintetitzar més proteïnes víriques. Aquestes transcripcions, com s'ha descrit anteriorment, les du a terme la 3Dpol amb l'ajuda d'altres proteïnes, tan víriques com cel·lulars, i l'element cis-regulador (*cre*, de *cis-acting* RNA element, una petita forquilla de RNA localitzada a prop del extrem 5' de la seqüència codificant 3Dpol, a diferència d'altres picornavirus on es situa a VP1 [90]. La replicació comença amb la nucleotidització d'una tirosina de la proteïna VPg (3B) per part de la 3Dpol, utilitzant l'element *cre* com a motlle, fet que proporciona un grup hidroxil lliure que pot ser prolongat per la RNA polimerasa viral.

Per a la formació de la càpsida vírica les dues regions terminals de la proteïna precursora P1-2A tenen funcions diferents. Per una banda, 2A intervé en l'ensamblatge dels protòmers per formar pentàmers. En molts picornavirus la formació de la càpsida semblaria dependre de la N-miristilació d'VP4 [91,92], en canvi per l'HAV semblaria que aquesta no és necessària [73]. Existeixen dos models d'ensamblatge en picornavirus: un d'ells proposa que els pentàmers es condensen al voltant del RNA víric [93,94], mentre que l'altre suggereix que primer es forma una càpsida buida a partir de l'ensamblatge dels pentàmers i després l'RNA penetra dins ella [95]. No se sap encara el que passa a l'HAV. Un cop formada, la càpsida de l'HAV, com ja s'ha comentat anteriorment, és altament estable i cohesiva. Aquestes característiques són degudes molt probablement a la baixa velocitat de traducció, deguda a les acumulacions de codons rars que facilita el plegament adequat de les proteïnes [77,96].

1.5.3 Sortida del virus fora de la cèl·lula

La via de sortida del virus de l'HAV sembla dependre del tipus de cèl·lula infectada. En cèl·lules CaCo-2 diferenciades (cèl·lules derivades de carcinoma de colon, que cultivades en unes condicions específiques es diferencien i polaritzen de forma similar a les cèl·lules epitelials del intestí prim [97]) els virus surten de la cèl·lula gairebé exclusivament a través de la membrana apical [51]. En un altre estudi realitzat amb hepatòcits humans polaritzats *in vitro*, més del 95% de la progènie vírica sortia a través de la membrana basolateral, essent minoritària la sortida de virus a través de la membrana apical [98]. Estudis més recents realitzats també amb hepatòcits humans polaritzats *in vitro* no concorden amb que el 95% de progènie vírica surti per la membrana basolateral, sinó que la sortida seria més equilibrada entre les dues membranes [54].

S'ha suggerit que el virus podria utilitzar una via pròpia de la cèl·lula per al transport de proteïnes mitjançant vesícules o un mecanisme específicament hepatocel·lular de transport de proteïnes que forma part de la secreció de bilis. Segons els últims estudis el virus sortiria de la cèl·lula embolcallat (eHAV) mitjançant un procés que depèn de proteïnes cel·lulars associades al complex ESCRT (*Endosomal Sortin Complexes Required for Transport*) via els cossos multivesiculars (MVB) [17,18,57] (**Figura 6**). No obstant això, els mecanismes tan de sortida com d'entrada del virus de l'HAV continuen essent objecte de controvèrsia i investigació.

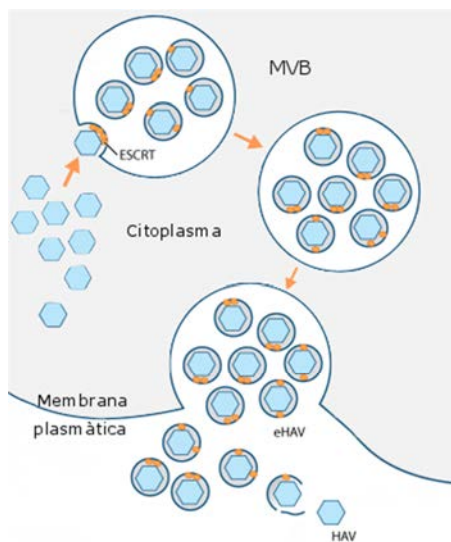


Figura 6. Sortida de l'HAV de la cèl·lula. Imatge adaptada de [18].

1.6 Resposta immune i mecanismes d'evasió

Els virus indueixen la síntesi d'interferó (IFN) per part de la cèl·lula. El receptor endosomal tipus Toll 3 (TLR3, *Toll-like Receptor 3*) i les helicases citosòliques tipus RIG-I (*Retinoic acid-Inducible Gene I*) detecten els RNA vírics i activen vies de senyalització que influeixen en la síntesi

d'IFN a través de les proteïnes adaptadores específiques TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta*) i MAVS (*Mitochondrial Antiviral-Signaling protein*), respectivament. En estudis utilitzant com a models animals els ximpanzés, s'ha vist que la resposta a IFN tipus I intrahepàtica que provoca l'HAV és molt limitada (no hi ha pràcticament expressió d'*ISG, IFN-Stimulated Genes*,) [99]. Aquesta baixa resposta podria ser deguda, almenys en part, a l'habilitat de dos precursors de la proteasa viral 3C^{pro}, 3ABC i 3CD, per amb la seva activitat proteolítica dur a terme el clivatge de MAVS i TRIF respectivament. Aquest clivatge interromp l'activació de factors reguladors de l'expressió d'IFN de tipus I [89,100]. S'ha descrit que la proteasa viral 3C^{pro} madura també s'encarrega del clivatge de NEMO (*NF-kappa-B Essential Modulator*), un factor necessari per a l'expressió d'IFN- β i l'activació de NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [101]. Les cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (pDC) produeixen grans quantitats d'IFN tipus I quan reconeixen virus via els receptors TLR7 (*Toll-like Receptor 7*) i TLR9 (*Toll-like Receptor 9*) [102] o els àcids nucleics vírics en el citoplasma [103]. Aquestes produeixen quantitats substancials d'IFN tipus I en co-cultius amb cèl·lules infectades per HAV, i són els virions pseudoembolcallats (eHAV) els que estimulen aquesta producció d'IFN [104]. No obstant, s'ha observat en models animals de ximpanzés, com aquestes cèl·lules (pDC) es troben al fetge només al final de la primera setmana de la infecció per l'HAV i després desapareixen. No s'han detectat al fetge cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (pDC) en el moment de la màxima replicació del virus i major inflamació aguda [20,104], el qual podria ser una altra causa per aquesta baixa producció d'IFN provocada per l'HAV [99].

La resposta immune humoral i cel·lular específica contra l'HAV comença al voltant de les 4-5 setmanes després de la infecció. En el

moment que es presenten símptomes, es detecten en sang IgM, IgA i IgG. L'aparició d'anticossos contra l'HAV coincideix amb un descens en la virèmia i en la quantitat de virus excretats a femta. Els títols d'IgM arriben a un màxim durant el primer mes de la malaltia i disminueixen fins a nivells indetectables en uns tres mesos, aproximadament [105]. Durant la fase aguda de la malaltia es detecten cèl·lules secretores d'anticossos que produeixen IgM, tan específiques com no específiques contra el virus [106]. Els nivells d'IgA en sang arriben als seus nivells màxims uns 50 dies després de l'exposició al virus i poden durar fins a 5 anys [107]. La major part d'aquestes IgA es troben al torrent sanguini i són secretades al tracte intestinal mitjançant la ruta del pIgR, però una fracció significativa sí que pot passar als intestins via bilis mitjançant el receptor hepatocel·lular d'asialoglicoproteïna (ASGPR). El paper neutralitzant de la IgA secretada al tracte intestinal sembla ésser limitant [108]. Les IgG tenen un gran paper neutralitzant i persisteixen en l'organisme durant molts anys, proporcionant-li protecció en front a reinfeccions [109]. L'anàlisi d'IgG anti-HAV serveix per determinar l'estat immune de l'individu després d'haver estat infectat per l'HAV o vacunat vers el mateix.

Les partícules pseudoembolcallades (eHAV) no són reconegudes pels anticossos anti-HAV què neutralitzen als virus nus. Sembla que les membranes d'aquestes partícules tenen que trencar-se per a que el virus pugui ésser neutralitzat. Aquesta neutralització molt probablement es dona en els endosomes tardans o lisosomes, on degut a la baixada del pH es produeix el trencament de l'envolta del virus, al final del procés d'entrada del virus a la cèl·lula [17,20].

El dany hepàtic agut i la disminució de la virèmia s'han relacionat amb la resposta citotòxica dels limfòcits T CD8+. No obstant, recentment

s'ha adjudicat un paper més rellevant als limfòcits T CD4+ en la resposta immune de l'HAV, ja que en estudis amb ximpanzés aquestes cèl·lules mostren una resposta més precoç, amplia i funcional que la de les cèl·lules CD8+ [110]. Al llarg de la fase aguda de la malaltia causada per l'HAV, la mort per apoptosi dels limfòcits T reguladors (Treg) augmenta i la seva activitat supressora del sistema immune es veu atenuada. Fins al moment la severitat del dany hepàtic sempre s'havia relacionat amb la resposta dels limfòcits Treg, però estudis recents mostren una correlació inversa entre la freqüència i funció dels limfòcits Treg i el dany hepàtic [111]. La inhibició de les cèl·lules T reguladores per part de l'HAV contrasta amb el que passa en la majoria de patògens, que activen aquestes cèl·lules per minimitzar el dany tissular provocat pel sistema immune, prevenint així l'eliminació del patogen i facilitant la cronificació de la infecció [112]. S'ha descrit també que les interaccions entre la càpsida de l'HAV i el receptor HAV-cr1 podrien modular la funció dels limfòcits Treg [112] i possiblement també l'activitat citotòxica de les cèl·lules NKT [113], tot i que el rol de les cèl·lules NK (*Natural Killer*) i NKT (*Natural Killer T*) en la infecció de l'HAV és encara molt poc conegut [20,69].

1.7 Manifestacions clíniques

L'hepatitis A, com el seu nom indica, és una inflamació aguda del fetge produïda pel virus de l'hepatitis A. L'espectre clínic de la infecció pot anar des d'una infecció asimptomàtica fins a una hepatitis fulminant, el virus no produeix una infecció crònica i per tant tampoc es dona una cronificació de la inflamació hepàtica. La infecció per l'HAV és més freqüent en nens i joves. La infecció en nens menors de 6 anys és majoritàriament asimptomàtica, no obstant sembla que els nens podrien ser més susceptibles del que es pensava a desenvolupar símptomes clínics quan són infectats per soques

del genotip IIIA [114]. Les manifestacions clíniques depenen de l'edat del pacient, en augmentar l'edat de la persona infectada, els símptomes apareixen amb major freqüència. En menors de 6 anys, el 80-95% de les infeccions per HAV són asimptomàtiques, mentre que el 70-95% dels adults infectats desenvoluparan els símptomes de la malaltia, que acostumen a durar varies setmanes i en alguns casos poden requerir hospitalització [115,116]. El fet que la severitat de la malaltia depengui, en part, de l'edat de la persona infectada podria estar relacionat amb la resposta dels anticossos IgA, que no arriben al seu màxim fins a la pubertat [58].

En la malaltia causada per l'HAV es poden diferenciar quatre fases: incubació, prodròmica, aguda i convalescència. El període d'incubació és asimptomàtic, tot i haver-hi replicació vírica, i pot variar de 2 fins a 7 setmanes. La fase prodròmica, és caracteritzada per l'aparició de símptomes de caràcter inespecífic (febre, malestar, inapetència, cansament, nàusees, dolor abdominal, vòmits, diarrea i miàlgia) i té una durada aproximada d'entre 5 i 7 dies abans de l'aparició de la icterícia (fase aguda). Aquests símptomes, excepte la inapetència i el malestar, tendeixen a disminuir amb l'arribada de la icterícia [117]. La fase aguda (ictèrica) es caracteritza per una orina fosca degut a la bilirubina, deposicions pàl·lides i esgrogueïment de la pell i les membranes mucoses. La icterícia no s'observa en tots els casos d'hepatitis A simptomàtics. La durada d'aquest període és d'entre 4 i 22 dies, durant el qual es pot detectar un increment de les transaminases en sang (500-5000 U/L) [117]. Els símptomes clínics solen durar menys de dos mesos, només en alguns casos (1.5-15%) la malaltia pot allargar-se i donar lloc a recidives fins a 6 mesos després de l'inici dels símptomes. El curs de la malaltia depèn de múltiples factors com: les condicions fisiològiques pròpies de cada individu, la quantitat de progènie vírica, la quantitat

d'anticossos IgA i IgG produïts com a resposta al virus i l'activitat dels limfòcits encarregats de controlar la infecció [58].

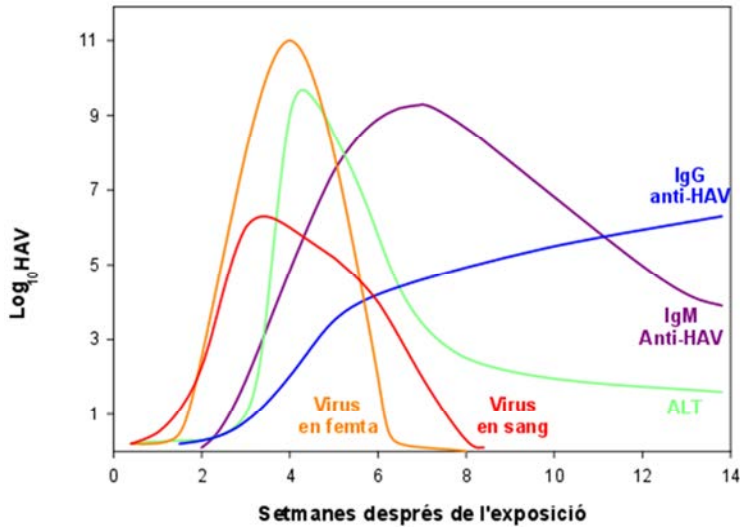


Figura 7. Evolució dels títols virals i les manifestacions clíniques durant la infecció per hepatitis A. Imatge adaptada de [26].

Es poden detectar virus en sèrum des d'abans de l'aparició dels primers símptomes fins una mitja de 6 setmanes després de l'inici dels mateixos arribant a valors màxims de 10^6 còpies genòmiques/ml [118,119]. En femta es poden arribar a detectar fins 10^{11} còpies genòmiques/g just abans de l'inici dels primers símptomes, coincidint amb el moment en el qual l'individu és més contagiós. El període de contagi de la malaltia comença al voltant de 2-3 setmanes abans de l'aparició dels primers símptomes i es manté fins 1-2 setmanes després [26] (**Figura 7**). Tot i que la virèmia acaba poc després del desenvolupament de l'hepatitis, el virus es segueix excretant en femtes 1 o 2 setmanes més i persisteix en el fetge durant mesos, per tant la cinètica d'eliminació del virus en aquest òrgan és diferent de la de la sang i l'intestí [99]. L'alanina aminotransferasa (ALT),

l'aspartat aminotransferasa (AST), la fosfatasa alcalina i la bilirubina total s'acostumen a trobar elevades en pacients simptomàtics, encara que tan sols l'ALT és específica per hepatitis [120] (**Figura 7**).

L'hepatitis fulminant és una complicació poc comuna de l'hepatitis A que es dona en menys del 0.5% dels casos [121]. En l'hepatitis fulminant, la ràpida necrosi hepàtica porta a l'encefalopatia hepàtica i la coagulopatia. Un percentatge molt elevat dels pacients que la pateixen degut a la infecció per hepatitis A moren o requereixen un transplantament de fetge urgent, considerant-se la taxa de supervivència d'un 60% [122]. L'hepatitis fulminant s'ha associat amb nivells significativament alts de bilirubina i baixos de RNA víric en sèrum, fets que suggereixen que la insuficiència hepàtica relacionada amb el virus de l'hepatitis A és deguda a la forta resposta immunològica, responsable de la reducció observada en la càrrega viral, més que a un efecte directe del virus [123]. La predisposició a patir manifestacions més severes de la malaltia s'ha associat a una inserció de sis aminoàcids en el receptor HAVcr-1 [113]. D'altra banda també s'han associat com a possibles factors vírics relacionats amb l'hepatitis fulminant, mutacions a la regió 5' no codificant del genoma del virus [124].

No obstant això, el desenvolupament més comú de la malaltia és la recuperació i la seroconversió, que ofereix al pacient immunitat de per vida enfront una nova infecció per l'HAV. La fase de convalescència té una durada d'unes quatre setmanes.

En els casos on sembla augmentar la taxa de mortalitat és en pacients que presenten hepatitis B o C cròniques o altres problemes hepàtics. Tot i que, estudis realitzats amb pacients que presenten hepatitis C crònica

mostren conclusions contradictòries referents al augment del risc d'insuficiència hepàtica fulminant i la mort [125,126].

1.8 Epidemiologia

El virus de l'hepatitis A infecta cada any al voltant de 1.5 milions de persones [116]. Aquesta dada està probablement molt subestimada degut als casos asimptomàtics d'hepatitis A i a les limitacions en el control epidemiològic. Tan sols un percentatge del total d'infeccions simptomàtiques són declarades com a hepatitis A degut a diferents motius: que els individus malalts no sempre busquen assistència mèdica, que el diagnòstic no sempre és el correcte o que la informació no arriba a les autoritats sanitàries corresponents [116].

La infecció per l'HAV es dona per contacte persona-persona i majoritàriament és adquirida per transmissió fecal-oral, com a resultat de l'exposició a aigua i aliments contaminats. L'HAV al ser força resistent a temperatures extremes, pH baixos i a agents químics i físics, té l'habilitat de sobreviure en moltes superfícies ambientals, la pell humana, aliments i aigües residuals [19,127-129].

La prevalença de la infecció per HAV és major en regions subdesenvolupades, on el subministrament d'aigua acostuma a ser inadequat i les condicions higièniques i sanitàries baixes. En aquestes regions la prevalença pot arribar a sobrepasar el 90% a l'edat de 10 anys [116,130]. Per tant, el patró epidemiològic d'un país o regió dependrà del grau de desenvolupament socioeconòmic, higiènic i sanitari del mateix.

En les regions industrialitzades, degut a una millora en les condicions higièniques i sanitàries, s'ha produït un desplaçament de la corba de seroprevalença cap a edats més avançades (des del 10% a l'adolescència mitja fins al 70% en l'edat adulta avançada [116]), de tal manera que actualment hi ha un gran nombre d'individus en risc d'infecció durant l'adolescència i l'edat adulta (per exemple, al viatjar a països on l'hepatitis A és endèmica o mitjançant el consum d'aliments provinents d'aquestes regions). Aquest fet comporta un increment en la morbiditat, mortalitat i els costos associats a la malaltia (tractament, personal sanitari i serveis a càrrec de les institucions sanitàries, dies laborals perduts, intervencions addicionals de les autoritats sanitàries en els casos de brots, etc.) [131]. L'augment general dels casos / incidència de l'HAV registrats en els països de la EU / EEA des del 2011 [132] indica un nou risc associat als moviments de població i la globalització, així com a grups de població potencialment vulnerables, com ara homes que tenen relacions sexuals amb homes [45,133-136].

Estudis seroepidemiològics actuals, demostren que la prevalença d'anticossos anti-HAV varia geogràficament. Les regions més desenvolupades i amb un nivell d'ingressos més elevat (Europa Occidental, Austràlia, Nova Zelanda, Canadà, Estats Units, Japó, Corea del Sud i Singapur) tenen nivells d'endemicitat de l'HAV molt baixos i una elevada proporció d'adults susceptibles d'infecció [137]. En aquestes regions el risc d'adquirir hepatitis A és molt baix ja que pràcticament el virus no circula, no obstant esporàdicament es produeixen brots d'origen alimentari [116]. Les regions subdesenvolupades amb ingressos baixos (Àfrica subsahariana i algunes parts d'Àsia del Sud) presenten nivells més elevats d'endemicitat i pel contrari gairebé no tenen adolescents i adults amb risc d'infecció. Per tant, en aquestes regions la majoria d'infeccions que es produeixen són

asimptomàtiques [116,137]. En les regions amb ingressos intermedis (algunes regions d'Àsia, Llatinoamèrica, Europa de l'Est i Orient Mitjà) hi ha una barreja de nivells d'endemicitat baixos i intermedis [137]. En aquestes regions el virus pot circular i existeix una proporció important d'adults susceptibles a la infecció [116], és per això que en aquestes regions es produeixen brots a escala comunitària de manera regular.

1.9 Estratègies per al control i la prevenció de l'hepatitis A

Actualment les estratègies de prevenció contra la infecció estan enfocades principalment en tres camps.

En primer lloc, un sanejament i una higiene personal adequats per tal de prevenir la transmissió del virus via fecal-oral (aigua o aliments contaminats) o per contacte persona-persona.

En segon lloc, la profilaxi pre- i post- exposició amb immunoglobulines anti-HAV que s'obtenen a partir de plasma de donants processat mitjançant el mètode de fraccionament de Cohn [47,138,139]. La injecció intramuscular de la mateixa proporciona protecció pre-exposició en front a la malaltia en una alta proporció d'individus. Una dosi de 0.02 ml/kg confereix protecció menys de 3 mesos, mentre que una dosi de 0.06 ml/kg protegeix de 3 a 5 mesos [47,138]. Pel que fa a la profilaxi post-exposició s'acostuma a administrar immunoglobulina durant els 14 dies posteriors a l'exposició on presenta una efectivitat del 80-90% [138]. La duració de la protecció és curta i dosi depenent. Inclús dosis altes no protegeixen més de 4-6 mesos [117]. És important remarcar que l'administració d'immunoglobulina protegeix enfront els símptomes de l'hepatitis A però

no evita la infecció, particularment quan és administrada post-exposició [140].

En tercer lloc, el més utilitzat actualment per a la profilaxi pre- o post-exposició és la immunització activa mitjançant la vacuna per l'HAV. Aquesta presenta avantatges respecte l'administració d'immunoglobulina, entre els quals el més destacat és la protecció a llarg termini [141]. Tot i així l'administració d'immunoglobulina encara es recomana en el cas de nens menors de dos anys per la persistència d'anticossos anti-HAV adquirits passivament de la mare, els quals podrien interferir amb la immunogenicitat de la vacuna. Actualment es troben al mercat diferents vacunes efectives en front l'hepatitis A, totes elles obtingudes a partir de soques de l'HAV adaptades a cultiu cel·lular. L'adaptació a cultiu cel·lular generalment condueix a l'atenuació de la patogenicitat del virus i s'associa amb un petit nombre de mutacions en les proteïnes no estructurals del mateix [142], especialment a les proteïnes 2B i 2C. Fins al moment es comercialitzen dos tipus de vacunes, les inactivades amb formaldehid i les vacunes amb virus viu atenuat, desenvolupades a l'hemisferi occidental i la Xina, respectivament [143,144]. Ambdós tipus de vacunes cobreixen tots els genotips descrits fins al moment, ja que tal com s'ha comentat anteriorment, tot i la diversitat genètica del virus, n'existeix un únic serotip [26]. A més a més les vacunes inactivades enfront l'HAV indueixen, a més d'anticossos, respostes de proliferació de limfòcits T a llarg termini [145].

Les estratègies d'immunització per a la prevenció de l'hepatitis A depenen de l'epidemiologia de la infecció per HAV en les diferents regions geogràfiques del món. S'ha comprovat que les campanyes de vacunació són efectives alhora de reduir la incidència de la malaltia mitjançant la prevenció de la transmissió [131]. Aproximadament la meitat de les

infeccions per hepatitis A es donen en pacients que no presenten factors de risc, per tant la vacunació exclusiva per a grups d'alt risc no semblaria una bona estratègia per reduir la incidència de la malaltia [146,147].

Els nens tenen majors taxes d'infecció i són el reservori de virus més important dins de la comunitat [148]. De fet, la majoria de brots d'hepatitis A es donen en nens, adolescents i adults joves que viuen en comunitats d'endemicitat intermèdia i s'estenen a altres comunitats [147]. Per això, la vacunació infantil de manera rutinària, no només els protegeix de futures infeccions, sinó que és una manera d'eliminar una de les principals fonts d'infecció en adults, que tal com s'ha comentat, té conseqüències clíniques més greus. L'impacte de les campanyes de vacunació infantil massiva en diferents països i regions (Catalunya (Espanya) [149], Puglia (Itàlia) [149], Israel [150], varis estats d'Estats Units [151], Belarus (Bielorússia) [152]) ha suposat un descens de fins a un 97% en la incidència d'HAV registrada a la regió en particular [139]. Els resultats obtinguts pel que fa a immunogenicitat i seguretat de les vacunes HAV inactivades, així com la relació cost-efectivitat de la intervenció, va conduir a la introducció de la vacunació massiva universal (UMV) en nadons de 12 mesos o més en diversos països [139,153,154].

L'Organització Mundial de la Salut (OMS) recomana que es vacunin els individus amb un risc elevat de contraure la infecció per l'HAV en àrees de baixa endemicitat, així com realitzar campanyes de vacunació infantil massiva en països d'endemicitat intermèdia [116]. Entre els grups de risc de contraure la infecció hi trobem: les persones que viatgen a països amb endemicitat elevada (la taxa d'incidència per viatgers no protegits s'estima en 3 casos per cada 1000 viatgers per mes d'estància en països en vies de desenvolupament [155]), les que treballen amb contacte amb aigües

residuals, els presoners, les persones internades per problemes físics i mentals, els drogoaddictes i les persones promiscues i que mantenen pràctiques sexuals oro-anals [156]. Tot i no formar part de cap dels grups de risc definits, l'ACIP (*Advisory Committee on Immunization Practices*) recomana la vacunació de persones amb hepatopaties cròniques ja que presenten un risc més elevat de patir complicacions (fins i tot de morir) relacionades amb l'hepatitis A [47,157]. És important també completar els programes de vacunació adequats, especialment en la població immunocompromesa, per prevenir l'aparició de variants d'escapament a la vacuna [158].

A dia d'avui no existeixen recomanacions per part d'organismes internacionals en quant a l'administració de dosis de record de la vacuna en front l'hepatitis A. Els anticossos anti-HAV persisteixen en l'organisme durant més de 17 anys, estimant-se una pervivència dels mateixos superior a 25 anys [159].

1.9.1 Antivirals

Encara que la vacuna ha estat i és el millor mètode de prevenció per l'HAV, l'estudi de nous antivirals pot adquirir importància en països desenvolupats on no existeix un programa de vacunació universal. Tot i la manca d'antivirals eficients contra l'HAV, els estudis realitzats fins al moment els classifiquen en dues categories: els que actuen contra el virus directament (*direct-acting antivirals*, DAA) i els que tenen com a diana l'hoste (*host-targeting agents*, HTA) [160].

Tot i que els resultats obtinguts amb les campanyes de vacunació infantil massiva en diferents països i regions són bons [149–152], en les

regions industrialitzades, tal i com s'ha comentat anteriorment, s'ha produït un desplaçament de la corba de seroprevalença cap a edats més avançades [116], donant lloc a un increment en la morbiditat i mortalitat de la malaltia [131]. L'augment de casos registrats en els països de la UE des del 2011 [45,132-136] i l'escassetat en el subministrament de la vacuna, posen de manifest la necessitat de tractaments efectius per la infecció amb l'HAV degut al seu impacte creixent sobre la salut humana.

De les dues categories d'antivirals contra l'HAV, els antivirals d'acció directa (DAA) dirigits específicament a l'HAV inclouen els inhibidors de la proteasa, un inhibidor de la polimerasa i inhibidors de l'IRES [161-172], aquests acostumen a presentar resistències però tenen menys efectes adversos que els antivirals dirigits al hoste (HTA) [160,173], entre els quals destaquen diferents tipus d'interferó, la ribavirina, l'amantadina i varis agents que actuen contra enzims o factors cel·lulars [174-186]. Aquests últims tenen mecanismes d'acció complementaris als efectes dels DAA i acostumen a actuar de forma sinèrgica amb aquests [187], per tant per a controlar eficaçment l'HAV és important desenvolupar tant DAA com HTA.

1.10 Estudis i adaptació de l'HAV a cultiu cel·lular

L'adaptació de virus patògens humans a cultiu cel·lular per mitja de passatges repetits en línies cel·lulars s'ha utilitzat en virologia des de fa dècades. Els passatges del virus en cultius cel·lulars condueixen a la seva atenuació, és a dir a reduir el seu potencial per provocar malalties en humans [142,188,189]. Aquestes soques adaptades a cultiu cel·lular han facilitat l'estudi dels virus i de les malalties que provoquen. A més a més, aquestes soques han contribuït al desenvolupament d'algunes de les

vacunes amb més èxit produïdes fins al moment (com les de la poliomièlitis, xarampió, rubèola i galteres) [190].

El virus salvatge de l'hepatitis A, com passa també amb altres virus de l'hepatitis, és substancialment resistent a la seva propagació en cultiu cel·lular [191]. A diferència d'altres picornavirus, les soques salvatges del virus de l'hepatitis A no multipliquen bé en cap tipus cel·lular durant l'aïllament primari [192], i s'han hagut d'adaptar a multiplicar en varies cèl·lules de primats i no primats, incloent cèl·lules no hepàtiques, abans d'assolir un nivell de replicació vírica adequat per a la producció d'antigen víric amb finalitats industrials (com per exemple vacunes i tests diagnòstics) [193,194].

Entre les cèl·lules de primats on el virus mostra una millor adaptació destaca la línia cel·lular AGMK, cèl·lules renals de mono verd africà (*Chlorocebus aethiops*) [195], i la línia cel·lular contínua de ronyó fetal de mico Rhesus, FRhK-4 [196]. També s'ha aconseguit multiplicar el virus en cèl·lules d'origen humà [197], com per exemple la línia cel·lular MRC-5 [198], que prové de teixit pulmonar i és la utilitzada per a la producció de totes les vacunes inactivades en front l'HAV que es comercialitzen actualment [143]. El creixement de l'HAV en cèl·lules de simi com les CV-1, les BS-C-1 i les Vero (les tres derivades de ronyó de mono verd africà), les FRhK-4 i les FRhK-6 (una altra línia cel·lular obtinguda a partir de ronyó fetal de mico Rhesus) ha sigut variable, depenent de la soca i del passatge del virus, però generalment subòptim [194]. En comparació amb altres picornavirus, el creixement del virus de l'hepatitis A en cultiu cel·lular segueix essent lent, fet que fa que la producció d'antigen per al seu ús en vacunes o tests diagnòstics resulti un procés molt lent i costós [199]. Molts dels passos del cicle de replicació del virus, com la desencapsidació, l'inici

de la traducció, la replicació i la maduració de les partícules, contribueixen a aquesta multiplicació restringida del HAV en cultiu cel·lular [172].

Tal com s'ha comentat anteriorment, s'han associat certes mutacions en el genoma de l'HAV a un major creixement en cultiu cel·lular. Aquestes mutacions es localitzen principalment a la regió P2 (en concret a 2B i 2C [200]) i a la regió 5' no codificant [201,202], tot i que també s'han descrit mutacions en altres parts del genoma [203]. Com s'ha observat en altres virus, les soques de l'HAV adaptades a cultiu cel·lular són atenuades *in vivo* [14,204]. Algunes d'aquestes soques produeixen efecte citopàtic en cultiu cel·lular [13,205,206]. Aquest efecte depèn del tipus de cèl·lula en la que repliqui el virus i es dona principalment en les línies cel·lulars FRhK-4 i BS-C-1. El cicle replicatiu d'aquestes soques és més curt i produeixen una major quantitat de virus respecte les no citopàtiques [13].

Per altra banda, per tal d'estudiar el cicle biològic del virus de l'hepatitis A *in vitro* és preferible utilitzar un model cel·lular més similar a les seves cèl·lules diana, els hepatòcits, com són les línies d'hepatocarcinoma humà HepG2 i Huh-7. Les limitacions de creixement de la soca salvatge de l'HAV (*wt*) han portat al desenvolupament de diversos clons de la línia cel·lular Huh7 per tal de millorar la replicació del virus en cultius cel·lulars d'hepatòcits. Un exemple són les cèl·lules Huh7-AI, una sublínia seleccionada a partir de les cèl·lules Huh7 curades d'una infecció HAV mitjançant el tractament amb interferó. Aquestes són més permissives per a la infecció de l'HAV i tenen una major susceptibilitat en comparació amb les cèl·lules Huh7 parentals, produint un major nombre de partícules infeccioses [207].

1.11 Aplicacions biotecnològiques de la producció d'HAV en cultiu cel·lular

Les dues grans aplicacions de la producció de virus de l'hepatitis A en la indústria biotecnològica són la producció de vacunes i els tests de diagnòstic. Tal com s'ha comentat anteriorment, el virus de l'hepatitis A presenta un creixement molt lent i uns rendiments de producció molt baixos en sistemes de cultiu cel·lular [192], fet que repercuteix negativament a nivell econòmic a la indústria biotecnològica. Per tant, un canvi en qualsevol dels components que conformen el sistema de producció de virus mitjançant cultiu cel·lular (el medi de cultiu, les cèl·lules, el propi virus...) podria millorar el seu rendiment i facilitar els llargs i costos processos de producció a nivell industrial.

Pel que fa a les cèl·lules utilitzades, s'han observat diferències en la productivitat, no només entre les diferents línies cel·lulars, sinó també entre diferents subclons d'una mateixa línia [194,208]. Existeixen mètodes per seleccionar dins d'una població de cèl·lules que pertanyen a una mateixa línia, clons que siguin altament productius [209].

Pel que fa al virus, una manera d'aconseguir que una població vírica augmenti el seu *fitness* (la capacitat d'un virus per produir una progènie infecciosa en un entorn determinat [210]), és transferint repetidament grans quantitats de virus en cultiu cel·lular en un ambient constant [211]. Quan la mida de la població vírica transferida és elevada, té lloc una selecció entre les variants que competeixen de tal manera que augmenta el *fitness* mitjà de la població. Això és pel fet que es van seleccionant gradualment mutacions les quals resulten adaptatives per a la multiplicació *in vitro* [212].

També s'ha intentat afavorir la traducció de l'RNA víric, la qual com s'ha comentat anteriorment es caracteritza per ser força lenta en l'HAV [24,213]. S'han utilitzat inhibidors de la transcripció del mRNA cel·lulars, com el DRB (5,6 diclor-1-B-D-ribofuranosilbenzimidazol, un inhibidor de la RNA polimerasa II), l'ús del qual semblaria augmentar els nivells de producció de l'HAV [214], tot i que no tots els investigadors coincideixen en aquesta afirmació [215]. Amb aquesta finalitat, s'ha utilitzat també l'AMD [96] (actinomicina D, la qual intercalaria al DNA, interferint el progrés de les RNA polimerases cel·lulars [216]).

Recentment, s'ha aconseguit seleccionar una població de l'HAV de creixement ràpid amb un elevat interès biotecnològic [217]. Mitjançant tècniques de seqüenciació massiva ultra-profunda (*deep-sequencing*) de les regions indicatives d'una replicació eficient, s'han identificat variants minoritàries amb un *fitness* elevat dins el conjunt de mutants de la quasiespècie. Seguint una estratègia de creuament molecular (*molecular breeding*) de quasiespècies que contenen individus colonitzadors, en condicions que permetien més d'un cicle de replicació, es van poder seleccionar els individus competidors amb un *fitness* més elevat d'entre els colonitzadors.

1.11.1 Producció de vacunes

Actualment, com ja s'ha comentat anteriorment, es troben comercialitzats dos tipus de vacunes, les inactivades amb formaldehid i les vives atenuades [144,218–222].

A partir de variants del virus d'alta eficiència s'han produït diferents vacunes inactivades: AVAXIM® (Sanofi Pasteur), EPAXAL® (Crucell/Berna

Biotech), HAVRIX® (GlaxoSmithKline) i VAQTA® (MerckSD), a partir de les soques GBM, RG-SB, HM-175 i CR-326, respectivament. Totes elles utilitzen alumini com adjuvant, a excepció d'EPAXAL®, on el virus es troba adsorbit a la superfície de virosomes d'influenza reconstituïts (IRIVs) [221]. També s'han desenvolupat vacunes combinades: Twinrix® (GlaxoSmithKline), basada en la soca HM-175 de l'HAV i l'antigen de superfície del virus de la hepatitis B (HBsAg), que serveix per prevenir les hepatitis A i B [223], i Vivaxim® (Sanofi Pasteur) la qual protegeix enfront l'hepatitis A i la febre tifoide i es basa en la soca GBM de l'HAV i el polisacàrid capsular Vi-AG de *Salmonella typhi* [224]. Aquestes vacunes presenten una elevada eficàcia protectora, un excel·lent perfil de seguretat i un alt grau d'immunogenicitat enfront l'HAV [225], però són necessàries dues dosis de la vacuna i tenen un cost molt elevat. Per a la preparació de totes les vacunes que s'han nomenat, el virus es cultiva en cèl·lules diploides humanes MRC-5, ja que són les que fins al moment han obtingut la llicència per poder ser utilitzades en el procés de producció de virus per a vacunes [198,226]. Per tant, els títols vírics baixos que s'obtenen, sumat als prolongats temps de cultiu necessaris per a aconseguir una producció màxima d'antigen víric (fins a dos setmanes) fan que la producció d'aquestes vacunes resulti molt cara [227].

El segon tipus de vacunes, les atenuades, es basen en les soques H2 i LA-1 [222] i ofereixen també una elevada eficàcia, duració de la protecció i seguretat [228], tot i que les evidències al respecte publicades internacionalment són més limitades que en el cas de les vacunes inactivades [116]. Dues de les principals avantatges d'aquestes vacunes respecte les inactivades són el baix cost i l'administració d'una dosi única [144].

1.11.2 Diagnòstic

El diagnòstic estàndard per a l'hepatitis A es basa en la detecció d'anticossos IgM anti-HAV mitjançant immunoassajos (detectable des de l'aparició dels primers símptomes fins uns mesos més tard). Tanmateix, tot i ser la detecció d'IgM el mètode de referència per confirmar el diagnòstic d'infecció aguda per HAV, la detecció de RNA viral pot ser útil en el diagnòstic de pacients sense anticossos específics per a l'hepatitis A i per a la monitorització de la infecció [229]. Els estudis que utilitzen PCR en temps real han demostrat que l'RNA pot ser detectat no només en les femtes sinó també en mostres de sèrum i saliva anteriors a la detecció d'anticossos i que la virèmia pot estar present durant un període molt més llarg que la fase convalescent de l'hepatitis A [120].

Donat que les immunoglobulines G anti-HAV persisteixen durant anys, la combinació de la detecció d'anticossos IgM anti-HAV i anticossos anti-HAV totals (IgG, IgM i IgA) permet distingir entre una infecció actual o una passada [230]. La detecció d'anticossos anti-HAV totals també es pot utilitzar en estudis epidemiològics de prevalença de la infecció per HAV en una població, així com per avaluar la resposta a la vacunació [120]. Tant els anticossos IgM anti-HAV com els totals, es poden detectar mitjançant immunoassajos.

Les proves clíniques i bioquímiques que avaluen la funció hepàtica no permeten diferenciar l'hepatitis A d'altres formes d'hepatitis víriques agudes [231] per la qual cosa es necessiten aquestes proves serològiques per identificar l'agent etiològic causant de la malaltia. Aquests immunoassajos (enzimàtics i quimiluminiscents, principalment) s'utilitzen

habitualment en els laboratoris clínics en forma de kits comercials basats en l'ús d'antigen del virus obtingut a partir de cultiu cel·lular.

2. OBJECTIUS



- 1.** Estudi del procés de sortida de dues poblacions del virus de l'hepatitis A que difereixen en la seva capacitat productiva: paper de la proteïna cel·lular ALIX.
- 2.** Selecció de drogues multidiària, entrada, inici traducció i sortida, funcionals en hepatòcits humans.

3. ANTECEDENTS



Històricament els virus s'han classificat en dues categories en funció de la presència o absència d'embolcall lipídic [232]. Aquests atributs afecten notablement a la seva estabilitat, transmissió i el seu reconeixement per part del sistema immunològic. El virus de l'hepatitis A (HAV) tradicionalment ha estat classificat com un virus no embolcallat. Els darrers anys però, varis estudis entre els quals destaca el de Feng i col·laboradors el 2013 [17], han demostrat que l'HAV s'allibera de la cèl·lula envoltat de membranes derivades de l'hoste, les quals li confereixen protecció en front la neutralització per anticossos [18,57]. Es podria dir, doncs, que l'HAV existeix en dos fenotips: partícules nues i pseudoembolcallades.

Aquestes partícules amb envolta (eHAV) presenten una gran similitud amb els exosomes [233]. Estudis proteòmics realitzats per clarificar la biogènesi d'aquestes partícules pseudoembolcallades (eHAV) mostren que més d'un 90% de les proteïnes associades amb les partícules d'eHAV han estat identificades també en els exosomes [234,235]. A més a més, les partícules d'eHAV presenten també un enriquiment amb proteïnes que normalment es localitzen al sistema endolisosomal de les cèl·lules [235,236]. Aquests resultats confirmen, una vegada més, que l'eHAV i els exosomes comparteixen un mecanisme comú de biogènesi el qual implica la secreció a través de la via dels cossos multivesiculars (MVB) [17].

Les càpsides virals són reclutades des del lloc de replicació i empaquetament de l'RNA fins als endosomes tardans o MVB, mitjançant un procés de selecció altament específic. Les càpsides són introduïdes en vesícules intraluminals (ILV, o exosomes) a l'interior dels cossos multivesiculars (MVB) en un procés en el qual intervé el complex ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), concretament l'ESCRT-III (**Figura 8**). Les proteïnes del complex ESCRT es troben

involucrades en nombrosos processos de remodelació i escissió de membranes, entre els quals es troba la biogènesi dels MVB [237]. La funció principal de les proteïnes del complex ESCRT consisteix a contreure i tallar colls de membrana, però el mecanisme biofísic mitjançant el qual el coll es separa de la membrana encara es desconeix [238–241]. Tenen també altres funcions addicionals, com la gemmació de membranes i el reclutament de proteïnes de membrana per al seu transport. Aquestes funcions addicionals les desenvolupen els complexos ESCRT-I i ESCRT-II, i la proteïna ALIX (*ALG-2-interacting protein X*) associada a ESCRT. Durant la formació de les vesícules intraluminals a l'interior dels MVB, els complexos ESCRT-I / ESCRT-II i la proteïna ALIX associada a ESCRT, actuen com a dues branques de la via ESCRT que convergeixen en la maquinària d'escissió de membrana formada per les proteïnes ESCRT-III i VPS4 (**Figura 8**). La proteïna VPS4 és una ATPasa associada al complex ESCRT, la qual proporciona l'energia per a la dissolució dels complexos ESCRT-III en la fissió de la membrana [242,243]. Existeix un altre complex anomenat ESCRT-0, que tot i el seu nom, no forma part del complex principal ESCRT. Aquest intervé en el reclutament de proteïnes ubiquitinades i interacciona posteriorment amb ESCRT-I [244].

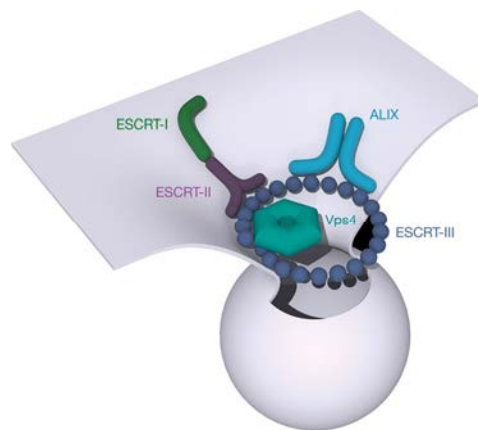


Figura 8. Representació de les dues principals branques del complex ESCRT. La imatge mostra les branques ESCRT-I / ESCRT-II i ALIX del complex ESCRT en la formació d'una vesícula. Imatge adaptada de [243].

Les proteïnes estructurals dels virus embolcallats, interaccionen amb les proteïnes associades al complex ESCRT a través de dominis rics en prolines (*Pro-rich late*): PPXY, P(S/T)AP o (L)YPX_{1/3}L [242,245]. S'ha descrit que els motius YPX_{1/3}L, anomenats *late domains*, són els que intervien en les interaccions amb la proteïna ALIX [246]. La poliproteïna de l'HAV presenta dos motius YPX₃L en tàndem, conservats i separats per 28 residus, situats a la proteïna VP2 de la càpsida (**Figura 9**).

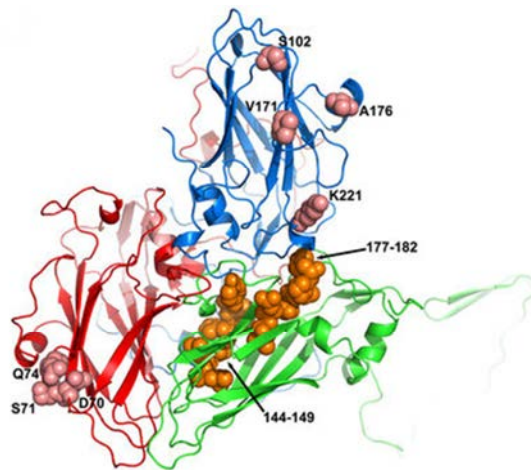


Figura 9. *Late domains* YPX₃L d'interacció amb ALIX. Estructura de l'HAV amb els dominis YPHGLL (residus: 144-149) i YPVWEL (residus: 177-182) destacats en boles taronja. Imatge adaptada de [28].

L'estudi realitzat per Feng i col·laboradors [17], mostra com la substitució de la Tirosina (Y) per una Alanina (A) en els motius YPX₃L, dona lloc a una reducció en l'alliberació de l'eHAV fora de la cèl·lula, sense afectar a la replicació del RNA viral. A més a més, en el primer motiu (YPHGLL, residus: 144-149), aquesta mutació provoca una reducció a nivell intracel·lular de l'antigen de la càpsida, suggerint que els canvis en aquest domini impedeixen l'ensamblatge de la càpsida del virus. En canvi, en el segon motiu (YPVWEL, residus: 177-182), aquesta mutació no provoca la reducció de l'antigen de la càpsida. No obstant, la immunoprecipitació amb

un anticòs anti-ALIX de lisats de cèl·lules transfectades amb RNA viral amb el segon motiu YPVWEL amb la mutació anterior, és negativa. Tot i que molts detalls encara estan per resoldre, les dades obtingudes fins al moment suggereixen que l'HAV utilitza la proteïna ALIX per facilitar el seu embolcallament en les membranes de l'hoste [17].

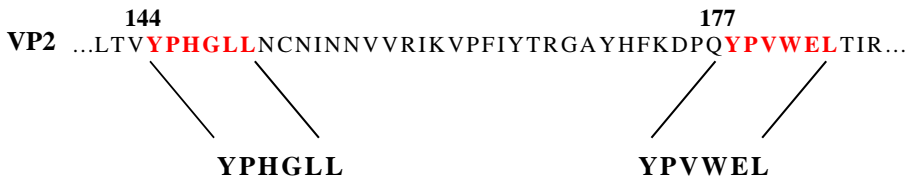


Figura 10. Motius YPX₃L localitzats a la proteïna VP2 de la càpsida l'HAV. Actuen com a dominis d'unió a la proteïna ALIX associada a ESCRT i es troben separats per 28 residus. Imatge adaptada de [17].

Per altra banda, el silenciament de les proteïnes HRS i TSG101, components principals dels complexos ESCRT-0 i ESCRT-I respectivament, no afecta a l'alliberació de l'eHAV [17]. De la mateixa manera, el silenciament de la proteïna CHMP4B del complex ESCRT-III, la qual facilita l'alliberació del virus de la immunodeficiència humana per mitjà de la seva interacció amb ALIX [247], sembla reduir només lleugerament l'alliberació de l'eHAV [17]. Per tant l'alliberament de l'eHAV depèn de proteïnes associades al complex ESCRT però no de tota la maquinària ESCRT, de manera similar al que succeeix en l'alliberació d'altres virus amb envolta [242,248].

Les càpsides de l'HAV es recluten com a *cargo* mitjançant la interacció amb la proteïna ALIX a través dels dos dominis d'unió YPX₃L (*late domains*) de la proteïna VP2 [17] (**Figura 10**). Seguidament, aquestes càpsides són exportades a l'interior de vesícules a través dels MVB fins l'espai extracel·lular [243]. Estudis de proteòmica recents, mostren que tan

ALIX com VPS4 es troben físicament presents en les partícules d'eHAV [18]. Totes dues intervenen en el procés d'alliberament del virus de la cèl·lula, però no en la replicació viral, l'ensamblatge de la càpsida ni l'encapsidació del RNA [17]. La proteïna ALIX es troba involucrada en diversos processos entre els quals destaquen la biogènesi de l'exosoma, la citocinesi i l'alliberament dels lentivirus [246,247,249,250].

Els cossos multivesiculars (MVB) són un tipus d'endosomes tardans que es caracteritzen per presentar una acumulació de vesícules intraluminals al seu interior. Es troben involucrats en els processos d'endocitosi i autofàgia, essent el punt on convergeixen aquestes dues vies i un element important en l'homeòstasi cel·lular [251–254]. El destí final dels MVB pot ser fusionar-se amb els amfisosmes o els lisosomes, donant lloc a la degradació del seu contingut, o bé fusionar-se amb la membrana plasmàtica per al reciclatge (o secreció) del contingut (**Figura 11**) [255,256]. S'ha suggerit que aquestes dues vies possibles de degradació i secreció dels MVB depenen i es troben regulades per l'homeòstasi cel·lular [257]. El virus de l'HAV utilitza la via de secreció, en la qual els MVB amb les vesícules intraluminals (exosomes) que contenen les càpsides del virus es desplacen fins a la membrana plasmàtica. Un cop allí es fusiona la membrana limitant del MVB amb la membrana plasmàtica, i dona com a resultat l'alliberament a l'exterior de la cèl·lula dels exosomes amb les càpsides de l'HAV al seu interior. Aquests exosomes envoltant les càpsides de l'HAV és el que s'ha definit com el fenotip pseudoembolcallat de l'HAV [17,69,235,255].

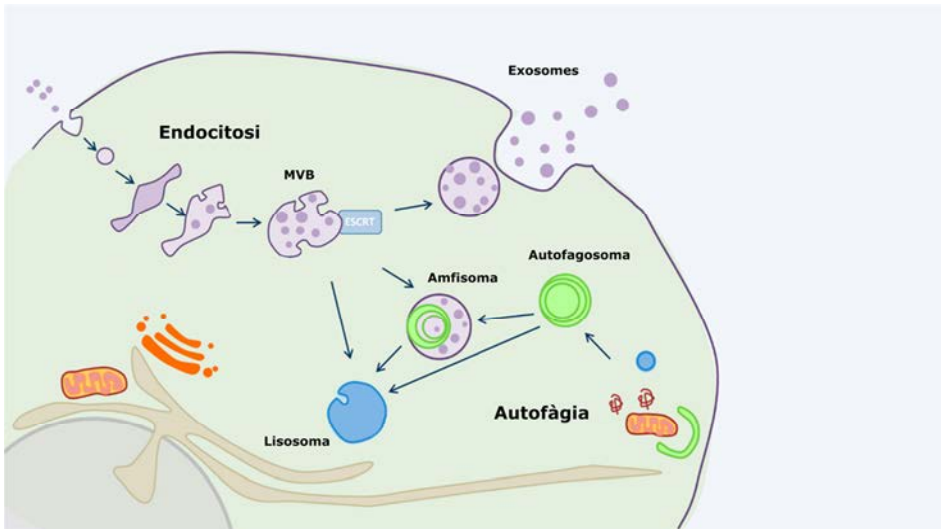


Figura 11. Convergència de les vies d'endocitosi i autofàgia en els cossos multivesiculars (MVB). Imatge adaptada de [256].

La població HM175-HP de l'HAV, obtinguda mitjançant un procés de selecció genòmica i *molecular breeding* [217], es caracteritza per tenir un fenotip de creixement ràpid i rendiments de virus elevats en cultius *in vitro*. Aquests atributs es deuen principalment a que presenta un IRES altament eficient combinat amb un ús de codons optimitzat en la regió VP1 de la càpsida. Els canvis en l'ús de codons donen lloc *per se* a canvis en el plegament de la càpsida. No obstant, degut a que molts d'ells donen lloc a mutacions no sinònimes, no es pot descartar la possibilitat que aquests canvis d'aminoàcids juguin un paper en les funcions de la càpsida. Tot i que les característiques antigèniques i físiques d'aquesta població són similars a les del model parental HM175-L0, la població HP mostra una reducció al voltant del 30% en el reconeixement antigènic per part d'anticossos monoclonals (MAbs, K34C8 i H7C27). No obstant, aquesta població no mostra alteracions en el reconeixement per part d'anticossos policlonals convalescents. Aquests fets suggereixen que els canvis de plegament relacionats amb la traducció i / o els canvis d'aminoàcids mencionats

anteriorment, amaguen parcialment els dos epítops reconeguts per aquests mAbs i deixen més accessibles altres epítops [217].

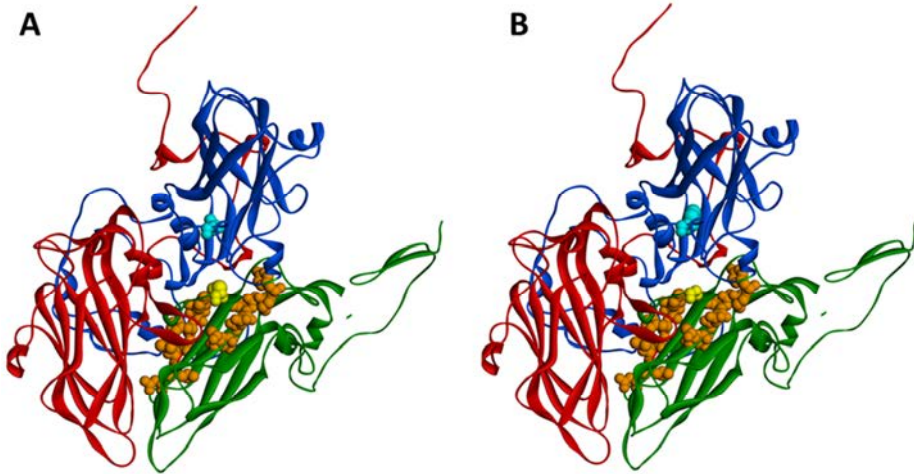


Figura 12. Mutacions presents a la càpsida de la població HM175-HP. En blau, verd i vermell, s'assenyalen les proteïnes estructurals VP1, VP2 i VP3, respectivament. Dominis d'unió a ALIX de la proteïna VP2 en taronja. Residu pròxim al lloc d'unió (posició 134 de VP2), en groc. Residu de VP1 a la posició 123, en blau. **A.** Població HM175-L0 o parental, presenta una serina en el residu 134 de VP2 i una leucina a la 123 de VP1. **B.** Població HM175-HP, presenta una glicina en el residu 134 de VP2 i una fenilalanina a la 123 de VP1.

La càpsida de la població HM175-HP presenta dos canvis no sinònims localitzats en les posicions 123 de VP1 i 134 de VP2 (**Figura 12**). Mentre la posició 123 de VP1 es troba allunyada dels *late domains*, la posició 134 de VP2 es troba molt propera a la tirosina en posició 144 (4.5 Å de distància), el primer residu d'un dels recentment descrits dominis d'unió (*late domains*) a ALIX [17]. La mutació dona lloc a un canvi d'aminoàcid no conservatiu d'una serina (S) a una glicina (G), el qual li confereix més flexibilitat a aquesta regió de la càpsida. Aquesta major flexibilitat podria facilitar la interacció de la proteïna ALIX amb la càpsida fent que la seva sortida de la cèl·lula a través dels cossos multivesiculars fos més eficient. De fet, cal ressaltar que el *late domain* 144-149 es troba molt enterrat a la

superfície de la càpsida (**Figura 13**). Aquesta hipòtesi i el conjunt de característiques d'aquesta població, ens va portar a l'elaboració d'aquest estudi.

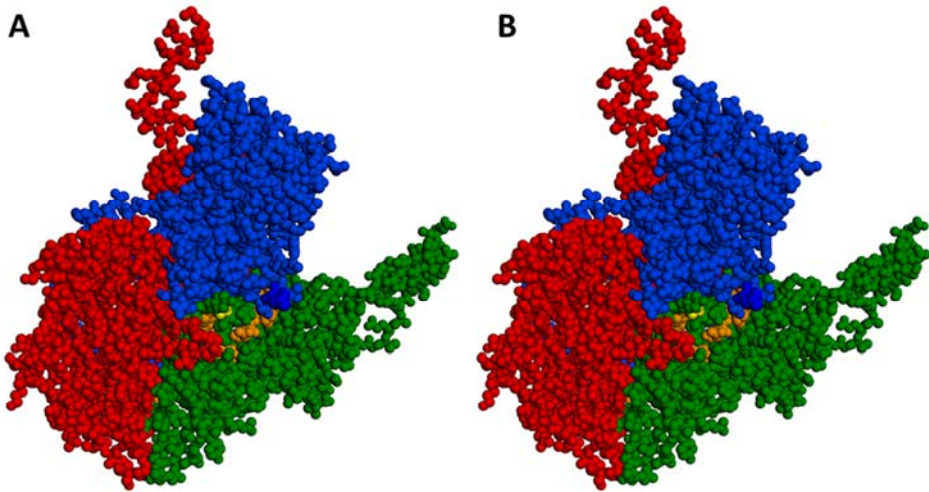


Figura 13. Disposició enterrada dels motius d'unió a ALIX a la càpsida de l'HAV. En blau, verd i vermell, s'assenyalen les proteïnes estructurals VP1, VP2 i VP3, respectivament. Dominis d'unió a ALIX de la proteïna VP2 en taronja. Residu pròxim al lloc d'unió (posició 134 de VP2), en groc. **A.** Població HM175-L0 o parental, presenta una serina en el residu 134 de VP2. **B.** Població HM175-HP, presenta una glicina en el residu 134 de VP2.

El descobriment d'aquesta nova via de sortida de la cèl·lula per part de l'HAV en forma de partícula pseudoembolcallada (eHAV) té importants implicacions especialment en el cicle biològic del virus. Estudis recents mostren que les partícules de l'HAV que circulen en sang es troben embolcallades [17]. Aquest embolcall no només els hi proporciona protecció en front els anticossos neutralitzants sinó que promou la propagació del virus dins del fetge (transmissió cèl·lula – cèl·lula). Per altra banda, els virus excretats en femta són nus i altament estables, facilitant la seva propagació i transmissió a nous hostes (transmissió pacient – pacient). Els factors que controlen la biogènesi d'aquests dos fenotips del virus en humans infectats encara no estan clars. Tal com s'ha comentat a la

introducció, l'HAV podria replicar de forma limitada en el tracte gastrointestinal [50], no obstant el seu lloc principal de replicació és el fetge.

Els hepatòcits són cèl·lules d'origen epitelial altament polaritzades amb dues membranes diferenciades, la basolateral i l'apical, i vies d'exportació de proteïnes molt especialitzades [258,259]. La seva membrana basolateral es troba en contacte amb l'espai de Disse, el qual es comunica amb la sang que circula a través dels sinusoides hepàtics. La membrana apical és més petita i es troba en contacte amb el lumen del canalicle biliar (**Figura 14 A**). Els àcids biliars són secretats pels hepatòcits a través de la membrana apical cap al canalicle i posteriorment circulen cap als conductes biliars més grans per arribar finalment a l'intestí [259]. Les unions estretes (*tight junctions*) que es formen entre els hepatòcits veïns separen les membranes apical i basolateral, segellant la llum canalicular. D'aquesta manera es forma una barrera entre la sang i la bilis la qual impedeix la difusió dels àcids biliars i altres soluts grans.

Actualment, existeixen varies hipòtesis que expliquen perquè els virions pseudoembolcallats (eHAV) es troben en la circulació, mentre que els que s'eliminen a femta ho fan amb el fenotip nu. La hipòtesi més simple suggereix que les membranes de l'eHAV s'eliminen per l'acció detergent dels àcids biliars durant el seu pas a través del tracte biliar (**Figura 14 B**). Fins al moment, els estudis realitzats han demostrat que la membrana de l'eHAV és estable quan s'incuba amb bilis porcina durant dues hores a 37°C [17]. No obstant, es creu que com les concentracions d'àcids biliars són majors i la seva acció detergent és més forta en el canalicle biliar proximal on s'origina la bilis, aquesta podria ser una hipòtesi vàlida [54,259]. Estudis amb concentracions molt elevades d'àcid taurocòlic (930mM TCA), un àcid

present en les sals biliars, mostren la completa conversió d'eHAV a partícules nues (HAV) [54]. No obstant, el fet que la concentració d'àcids biliars dins dels aspirats de vesícula biliar humana tant sols arriba a nivells de 170-180mM [260], fa que aquesta hipòtesi continuï essent controvertida.

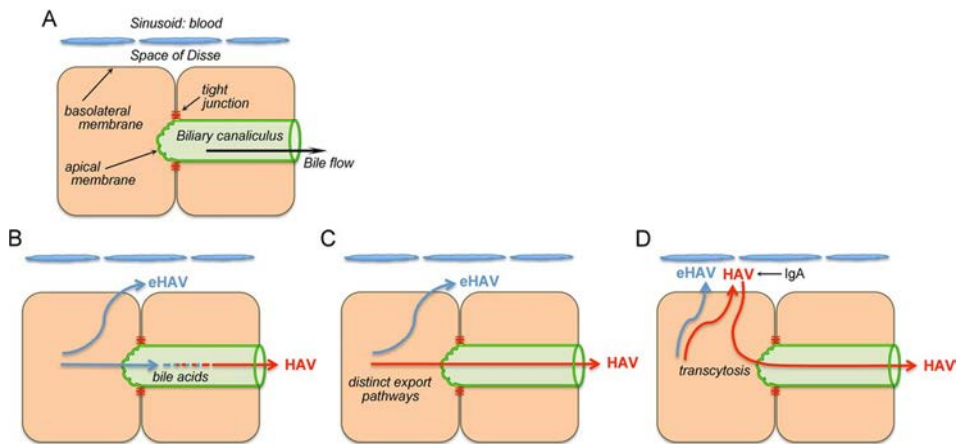


Figura 14. Microanatomia de l'hepatòcit i les tres possibles explicacions per a la presència de les diferents formes de l'HAV en sang (eHAV) i femta (HAV). A. Diagrama simplificat on es mostren dos hepatòcits en relació amb l'espai de Disse i el sinusoid hepàtic en contacte amb la sang, i el canalicle biliar. El canalicle biliar rodeja els hepatòcits en forma de cinturó a través del qual es secreten els virus i la bilis a través de la membrana apical del hepatòcit. La bilis circula des del canalicle fins als conductes biliars més grans i finalment s'elimina a través de la llum del tracte gastrointestinal. **B-D.** Hipòtesis competitives que podrien explicar la presència d'aquestes dos formes del virus en sang (eHAV) i en femta (HAV).

Una hipòtesi alternativa és que les dues formes de sortida del virus dels hepatòcits infectats siguin a través de diferents vies d'exportació. L'eHAV alliberat a la sang a través de la membrana basolateral via els cossos multivesiculars (MVB) i els virions nus a la bilis a través de la membrana apical via els lisosomes (**Figura 14 C**) [261]. Estudis previs mostren com l'HAV es secreta de forma vectorial a partir de cultius de cèl·lules epitelials polaritzades [51,98], però aquests estudis no diferencien entre virus nus i

pseudoembolcallats, deixant oberta la possibilitat d'una alliberació diferencial d'eHAV enfront l'HAV.

No obstant, la tercera hipòtesi suggerida recentment per Counihan i Anderson [262], proposa que tan els virions pseudoembolcallats com els nus s'alliberen a través de la membrana basolateral a l'espai de Disse. Aquests virions nus posteriorment tornen a entrar als hepatòcits i per un procés de transcitosi arriben fins la membrana apical on seran alliberats al tracte biliar (**Figura 14 D**). Més endavant, durant el curs de la infecció, aquesta transcitosi es pot veure potenciada per anticossos IgA que s'uneixen a la càpsida de l'HAV [262]. Tot i que, aparentment pot semblar complicada, aquesta ruta d'exportació apical proposada imita alguns aspectes de la ruta utilitzada pels hepatòcits per al transport de proteïnes apicals [258,259].

La població de creixement ràpid HM175-HP obtinguda pel grup de Virus Entèrics [217], tal com s'ha comentat anteriorment, presenta uns nivells de replicació més elevats que el model parental HM175-L0. Aquesta característica i el fet que semblaria que pot presentar una millor eficiència de sortida de la cèl·lula, poden ser de gran ajuda per estudiar la biogènesi del virus durant el seu cicle biològic. Un millor coneixement sobre el cicle biològic de l'HAV, aportaria informació important per a clarificar les nombroses controvèrsies encara existents al voltant dels mecanismes utilitzats per aquest virus al llarg del seu cicle de vida. Nous descobriments en aquest camp poden ajudar al desenvolupament de noves teràpies antivirals i vacunes per a la prevenció i tractament de l'hepatitis A.

4. RESULTATS



4.1 Naturalesa de les partícules víriques alliberades a sobrenedants de cultiu cel·lular en els models cel·lulars FRhK-4 i Huh7-AI

Degut al canvi de paradigma en la biologia de l'HAV descrit aquests darrers anys, vam decidir estudiar la naturalesa de les partícules víriques produïdes per les poblacions HM175-L0 i HM175-HP en els sobrenedants de cultiu cel·lular en la línia cel·lular FRhK-4. Aquest model cel·lular és el que s'utilitza tradicionalment per a la replicació de l'HAV *in vitro*, i al qual es troben adaptades aquestes dues poblacions [72,217].

Per tal d'estudiar la biologia del virus en un model molt més similar al del seu cicle biològic *in vivo*, es va realitzar el mateix estudi amb la línia cel·lular Huh7-AI. Aquesta línia cel·lular és derivada d'hepatòcits humans i es caracteritza per mostrar una major permissivitat a la infecció amb l'HAV que el seu model parental Huh7 [207].

Es van sembrar cèl·lules en flascons de 80 cm² de superfície, i un cop assolida la confluència es van infectar amb les dues poblacions del virus de l'HAV amb una MOI d'1. Als 10 dies post infecció, els 30 mL de sobrenedant es van concentrar per ultracentrifugació per tal d'analitzar els fenotips presents entre les partícules alliberades.

Per a l'anàlisi del fenotip es van separar les partícules per densitat mitjançant gradients isopícnics d'iodixanol-sacarosa tal i com es detalla en l'apartat 7.2 de material i mètodes. Un cop obtingudes les fraccions, s'analitzava la seva densitat, i es quantificava el virus per RT-qPCR en cadascuna d'elles. Per tal que els resultats fossin representatius, es van realitzar un mínim de tres infeccions independents en flascons de 80 cm² de

superfície amb cadascuna de les poblacions de l'HAV i per cadascun dels models cel·lulars.

En aquests gradients d'iodixanol sacarosa, les partícules nues de l'HAV es troben en el rang de densitat entre 1.20 - 1.25 g / cm³, mentre que les embolcallades es troben entre 1.06 - 1.12 g / cm³ (**Figura 15**). Els resultats obtinguts mostren que el fenotip predominant entre les partícules alliberades en els sobrenedants de cultiu, en ambdues línies cel·lulars i per a les dues poblacions virals, és el pseudoembolcallat (eHAV). Aquest fenotip representa un 98.07% ± 0.38 de les partícules alliberades en els sobrenedants dels dos models cel·lulars amb les dos poblacions de l'HAV estudiades.

Per tal de confirmar aquests resultats, es van agrupar les fraccions corresponents a cadascun dels fenotips del virus, procedents dels diferents gradients d'iodixanol sacarosa, per a les dues línies cel·lulars i per cadascuna de les poblacions de l'HAV. Un cop dialitzades i concentrades, es van sotmetre a tinció negativa per a la seva observació al microscopi electrònic de transmissió (TEM) tal i com es detalla en l'apartat 7.4 de material i mètodes.

L'observació mitjançant microscòpia electrònica confirma la presència d'aquests dos fenotips del virus en els sobrenedants de cultiu de les nostres poblacions de l'HAV en els models cel·lulars FRhK-4 i Huh7-AI (**Figura 15**).

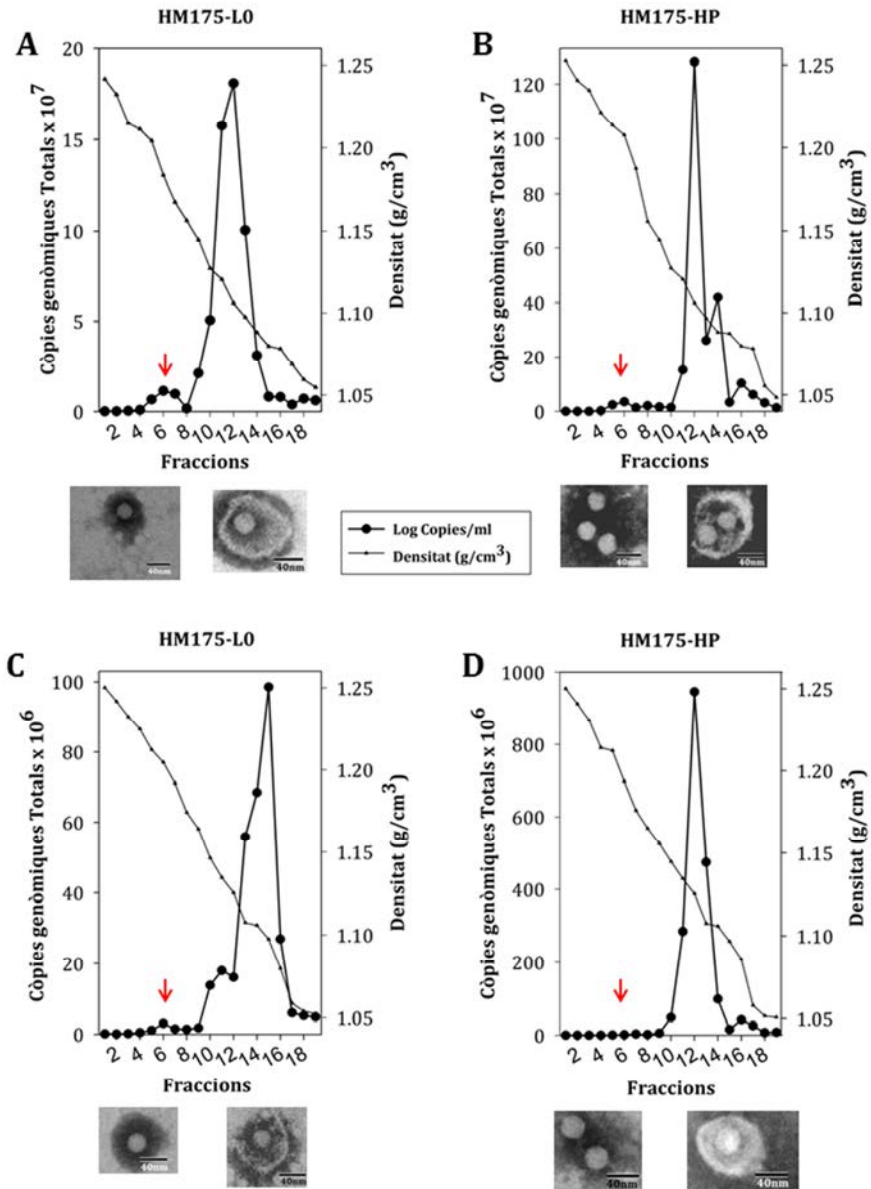


Figura 15. El fenotip pseudoembolcallat de l'HAV (eHAV) és la forma dominant en els sobrenedants de les poblacions HM175-L0 i HM175-HP en les línies cel·lulars FRhK-4 i Huh7-A1. Gradients d'iodixanol sacarosa que mostren els pics de partícules pseudoembolcallades (eHAV) en el rang de menor densitat 1.06-1.12g/cm³, i les partícules nues (HAV) en el rang de major densitat 1.20-1.25g/cm³ (↓). **A i B** Sobrenedant obtingut en cèl·lules FRhK-4. **C i D** Sobrenedant obtingut en cèl·lules Huh7-A1. Es mostren les còpies genòmiques totals en 30 mL de sobrenedant. Imatges de microscòpia electrònica de tinció negativa de la forma pseudoembolcallada (eHAV) i nua (HAV) de l'HAV en les poblacions HM175-L0 i HM175-HP en les corresponents línies cel·lulars. Resultats representatius d'un mínim de tres experiments independents per línia cel·lular i per població del virus.

Per últim, es va quantificar l'abundància dels dos fenotips del virus individualment per a cadascuna de les poblacions de l'HAV, en els sobredants de cultiu a 10 dies post infecció dels dos models cel·lulars per separat. Els resultats mostren un percentatge significativament superior ($p < 0.05$) de partícules pseudoembolcallades (eHAV) en els sobredants de la població HM175-HP respecte la parental L0 en la línia cel·lular Huh7-AI. Aquesta població també mostra un percentatge d'eHAV significativament més alt ($p < 0.05$) en cèl·lules Huh7-AI respecte les cèl·lules FRhK-4. No obstant, no s'observen diferències significatives en el percentatge d'eHAV entre les dues poblacions de l'HAV obtingudes en els sobredants de les cèl·lules FRhK-4 (**Taula 1**).

		HM175-L0	HM175-HP
FRhK-4	eHAV	96.64 ± 0.73 ^{a,A}	97.39 ± 0.70 ^{a,A}
	HAV	3.06 ± 0.73 ^{a,A}	2.61 ± 0.70 ^{a,A}
Huh7-AI	eHAV	97.45 ± 0.40 ^{a,A}	99.82 ± 0.06 ^{b,B}
	HAV	2.55 ± 0.40 ^{a,A}	0.18 ± 0.06 ^{b,B}

Taula 1. Percentatges de partícules pseudoembolcallades (eHAV) i nues (HAV) alliberades a sobredant de cultiu cel·lular de les poblacions HM175-L0 i HM175-HP en les línies cel·lulars FRhK-4 i Huh7-AI. Es mostra la mitjana de tres experiments independents per a cadascuna de les poblacions i línies cel·lulars ± l'error estàndard. Les diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) entre poblacions en una mateixa línia cel·lular s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a≠b en minúscula. Les diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) d'una mateixa població en les diferents línies cel·lulars s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres A≠B en majúscules.

El conjunt de resultats suggereix una millor eficiència de sortida en forma de partícula pseudoembolcallada (eHAV) per part de la població HP respecte la L0 en el model cel·lular Huh7-AI. A més a més, les diferències observades entre les dues línies cel·lulars, mostren com aquests percentatges no només depenen de la població de l'HAV sinó que la línia cel·lular hi juga un paper important.

4.2 Microscòpia confocal quantitativa de les poblacions HM175-L0 i HM175-HP de l'HAV amb la proteïna cel·lular ALIX en el model cel·lular Huh7-AI

Com s'ha comentat en els antecedents, la formació d'aquestes partícules pseudoembolcallades a través del complex ESCRT-III es dona mitjançant la proteïna accessòria ALIX, la qual s'encarrega de classificar el *cargo* que s'introdueix dins les vesícules [17,243,255]. Amb les diferències observades entre les dues poblacions del virus en el model cel·lular Huh7-AI, i el major percentatge de partícules pseudoembolcallades mostrat pel mutant HP en aquest model cel·lular respecte el FRhK-4, es va decidir estudiar en profunditat la relació d'aquestes poblacions de l'HAV amb la proteïna cel·lular ALIX utilitzant el model cel·lular Huh7-AI.

Aquest estudi es va fer mitjançant un anàlisi quantitatiu de colocalització per microscòpia confocal, del virus i la proteïna cel·lular ALIX. Es va posar a punt una immunofluorescència indirecta de doble marcatge per a la càpsida del virus i la proteïna ALIX, en els cultius de cèl·lules Huh7-AI a diferents temps post infecció. Els temps post infecció es van establir tenint en compte que la proteïna ALIX intervé en les fases finals del cicle del virus de l'HAV, i valorant la capacitat de replicació d'aquestes poblacions de l'HAV en la línia cel·lular Huh7-AI. Estudis previs, mostraven que tan la població parental L0 com la mutant HP, tenen un nivell de replicació significativament menor en el model cel·lular Huh7-AI respecte el model de FRhK-4, al qual es troben adaptades ($p < 0.01$) (**Figura 16**). Es van establir les 48 i 72 hores com a temps post infecció, amb la finalitat de tenir uns nivells d'antigen viral suficients per ser detectats per immunofluorescència indirecta, i per tal que el virus es trobés en la fase de sortida de la cèl·lula.

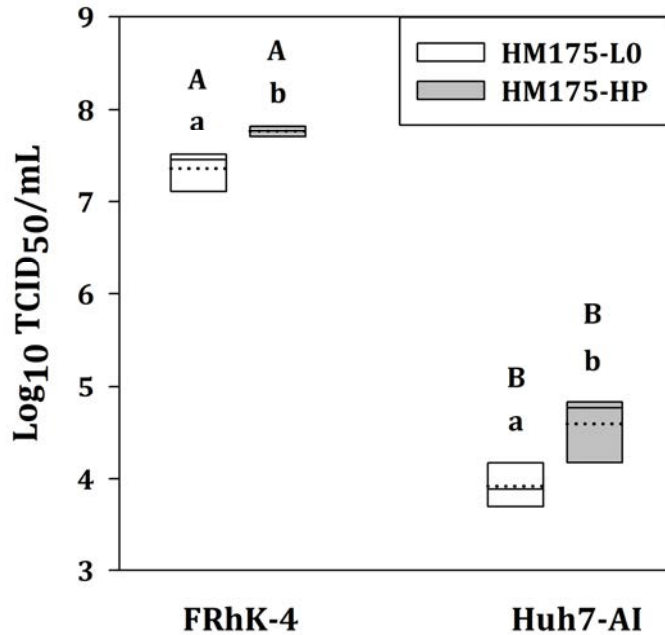


Figura 16. Nivell de replicació de les poblacions HM175-L0 (LO) i HM175-HP (HP) en les línies cel·lulars FRhK-4 i Huh7-AI. Es mostren els títols infecciosos en els sobrenedants de cèl·lules infectades amb una MOI de 0.1 als 7 dies post infecció. Els box plot mostren la distribució de valors del títol infecció, mesurat per TCID₅₀ per mil·lilitre, d'un mínim de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun, per cadascuna de les poblacions de l'HAV i línia cel·lular. El límit inferior de la caixa mostra el percentil 25, dins de la caixa la línia discontinua en punts mostra la mitjana aritmètica i la línia contínua la mediana del grup, el límit superior de la caixa mostra el percentil 75. Les diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) entre poblacions de virus en una mateixa línia cel·lular s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres $a \neq b$ en minúscula. Les diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) d'una mateixa població de virus en les diferents línies cel·lulars s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres $A \neq B$ en majúscules.

Per a l'estudi de colocalització, es van infectar monocapes de cèl·lules Huh7-AI, un cop havien assolit la confluència, amb les dues poblacions del virus amb una MOI de 5. Posteriorment es va realitzar el protocol, detallat a l'apartat 7.5.2 de material i mètodes, d'immunofluorescència indirecta de doble marcatge per a cadascuna d'elles. Per l'anàlisi quantitatiu de la colocalització, es van realitzar tres experiments independents amb dues rèpliques cadascun d'ells i per cadascun dels temps post infecció, escanejant tot el camp microscòpic. Es van establir uns paràmetres fixes per a la presa d'imatges i per al seu

posterior anàlisi quantitatiu mitjançant microscòpia confocal (Veure apartat 7.5 de material i mètodes).

Com a control negatiu de la colocalització es va marcar la proteïna LC3b, característica de les membranes dels autofagosomes. Altres picornavirus, com els poliovirus i alguns enterovirus, s'ha descrit que utilitzen aquestes vesícules per sortir de la cèl·lula [263–268], en canvi, fins el moment, no s'ha trobat LC3b associat a les membranes del fenotip pseudoembolcallat de l'HAV [235].

L'observació de les imatges, de caràcter qualitatiu, ens permet afirmar que hi ha colocalització entre la proteïna cel·lular ALIX i la càpsida de l'HAV tant a 48 com a 72 hores post infecció i per a les dues poblacions de l'HAV. Aquests resultats confirmen que aquestes poblacions de l'HAV utilitzen la via de sortida a través dels cossos multivessiculars (MVB) on ALIX actua com a proteïna accessòria. Destaca especialment com els nivells de replicació de la població L0 a 48 hores post infecció són pràcticament indetectables i es necessari esperar a fases més avançades de la infecció, per poder observar el comportament d'aquesta població (**Figura 17 A i C**). En canvi, la població HP mostra nivells molt més elevats de replicació ja des de les 48 hores post infecció (**Figura 17 B i D**).

A les 72 hores post infecció ja s'observa un augment important d'antigen viral per part de la població L0 respecte les 48 hores (**Figura 17 C**). L'increment d'antigen viral entre les 48 i les 72 dues hores post infecció per a la població HP no es tan marcat com per la L0, confirmant-se una vegada més que és una població de creixement ràpid capaç de produir majors quantitats d'antigen viral a temps curts post infecció (**Figura 17 B i D**).

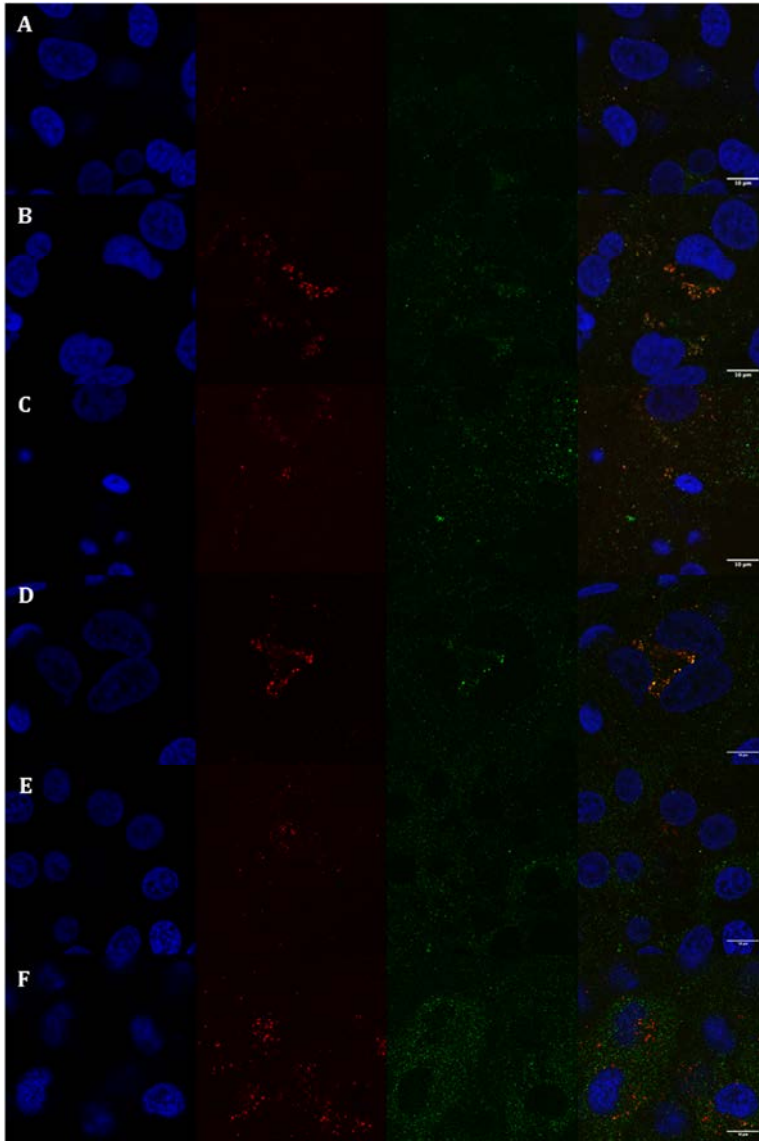


Figura 17. Colocalització del virus de l'HAV amb la proteïna ALIX en cèl·lules Huh7-AI. ALIX, en verd; HAV, en vermell; Nucli, en blau. Les zones de colocalització corresponen als punts entre groc i taronja, degut a la coincidència en l'espai del marcatge verd i vermell. **A.** Cèl·lules infectades amb la població L0 a 48 hores post infecció. **B.** Cèl·lules infectades amb la població HP a 48 hores post infecció. **C.** Cèl·lules infectades amb la població L0 a 72 hores post infecció. **D.** Cèl·lules infectades amb la població HP a 72 hores post infecció. **E, F.** **Control negatiu de colocalització.** LC3b, en verd; HAV, en vermell; Nucli, en blau. **E.** Cèl·lules infectades amb la població L0 a 72 hores post infecció. **F.** Cèl·lules infectades amb la població HP a 72 hores post infecció. Seccions horitzontals XY. Barra d'escala, 10 µm. Talls presos a una distància de 0.12 µm entre ells. Imatges representatives d'un mínim de tres experiments independents amb dues rèpliques cadascun, per població viral i temps post infecció.

El marcatge de la proteïna ALIX mostra un augment entre les 48 i les 72 hores, tan en les cèl·lules infectades amb la població L0 com en les infectades amb la població HP. No obstant, aquest augment sembla més marcat per a la població L0, on a 48 hores post infecció el marcatge és molt baix (**Figura 17 A-D**).

Les imatges del marcatge de la proteïna LC3b i el virus de l'HAV, les quals es van utilitzar com a control negatiu de la colocalització, no mostren coincidència en l'espai de marcatge entre el virus i la proteïna. Aquests resultats evidencien que la proteïna LC3b, característica de la membrana dels autofagosomes, a més de ser un bon control negatiu de colocalització per aquest estudi, no es troba involucrada en la via de sortida del virus de l'HAV (**Figura 17 E i F**).

4.2.1 Anàlisi quantitatiu de la colocalització de les poblacions HM175-L0 i HM175-HP en la línia cel·lular Huh7-AI

Per poder quantificar les diferències observades amb l'anàlisi qualitatiu de les imatges de microscòpia confocal, es va realitzar la deconvolució de les imatges amb el software *Hyugens Essential* tal i com es detalla al apartat 7.5.1 de material i mètodes. Per quantificar la colocalització es van escollir els coeficients de colocalització de Manders, perquè permeten determinar el grau de colocalització encara que els dos antígens tinguin unes intensitats de senyal molt diferents [269]. Seguidament, amb el mateix software, es van calcular els coeficients de colocalització de Manders, M1 (grau de colocalització relatiu del primer marcador respecte el segon marcador) i M2 (grau de colocalització relatiu del segon marcador respecte el primer marcador), i els coeficients

d'overlap, k_1 (grau de contribució del primer marcador en la colocalització) i k_2 (grau de contribució del segon marcador en la colocalització) [269,270]. En el nostre estudi el primer marcador era la càpsida del virus, i el segon la proteïna cel·lular ALIX.

Per al control negatiu de la colocalització, realitzat com s'ha comentat anteriorment, marcant la càpsida del virus de l'HAV i la proteïna cel·lular LC3b, també es van calcular els mateixos coeficients de colocalització. En aquest cas el primer marcador era la càpsida del virus i el segon la proteïna cel·lular LC3b. L'anàlisi quantitatiu del control negatiu de colocalització, ens permet verificar que els valors obtinguts en l'anàlisi quantitatiu de colocalització entre la càpsida del virus i la proteïna ALIX, són reals i no el resultat de la coincidència aleatòria dels punts de llum en la colocalització. Els valors dels coeficients per al control negatiu no poden arribar al 50% del valor mitjà dels obtinguts en el nostre anàlisi de colocalització, i han de ser significativament molt menors als mateixos ($p < 0.01$).

Amb els resultats obtinguts a les 48 hores post infecció, tot i confirmar-se la colocalització, no s'observen diferències significatives entre les poblacions L0 i HP. Les mitjanes del coeficient de Manders M1 de la població L0 i HP, tenen valors de 0.49 ± 0.03 i 0.52 ± 0.03 , respectivament, els quals no mostren diferències significatives entre ells (**Figura 18**). Segons el coeficient de Manders M1, el qual mostra el grau de colocalització relatiu del virus amb ALIX respecte el total de virus de la imatge, o dit d'una altra manera el percentatge de virus que colocalitza amb ALIX, L0 i HP presenten el mateix grau de colocalització amb la proteïna ALIX a les 48 hores post infecció. Tot i que HP produeix molt més antigen víric.

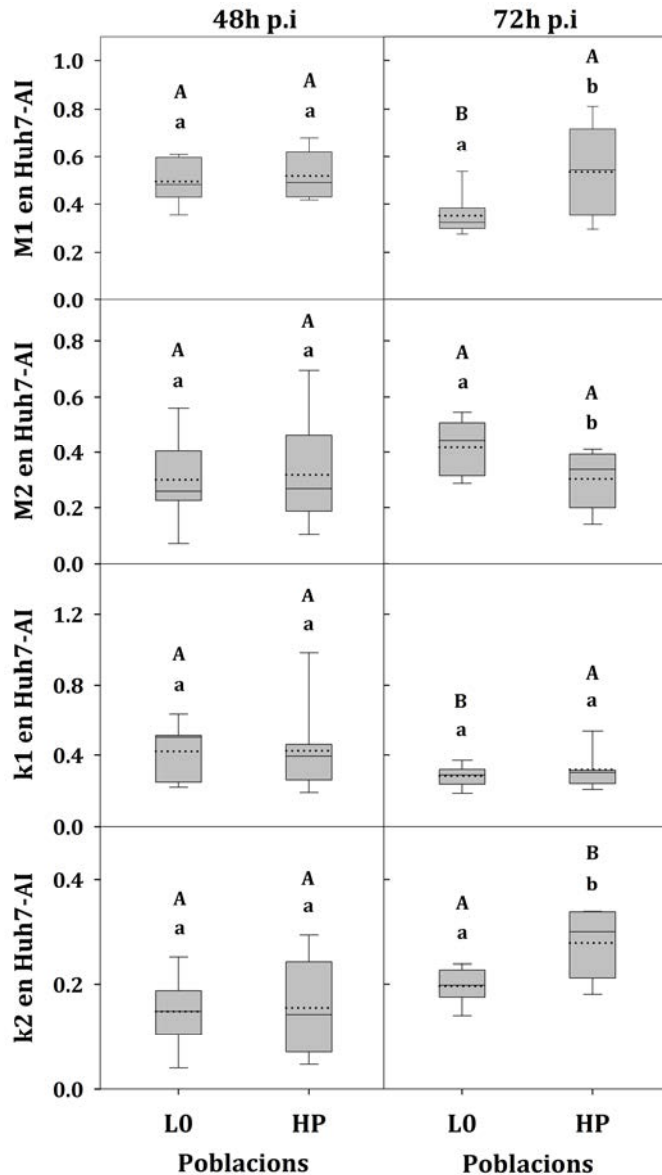


Figura 18. Coeficients de Manders M1 i M2 i d'overlap k1 i k2 a 48 i 72 hores post infecció. Els box plots mostren la distribució dels valors dels coeficients corresponents a l'anàlisi dels 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun per població viral i temps post infecció. El límit inferior de la caixa mostra el percentil 25, dins de la caixa la línia discontinua en punts mostra la mitjana aritmètica i la línia contínua la mediana del grup, el límit superior de la caixa mostra el percentil 75. Els bigotis per sota i per sobre de la caixa mostren els percentils 10 i 90, respectivament. Les diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) entre poblacions de virus en un mateix temps post infecció s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres $a \neq b$ en minúscula. Les diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) d'una mateixa població de virus en els diferents temps post infecció s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres $A \neq B$ en majúscules.

En l'anàlisi a les 72 hores post infecció, el coeficient M1 mostra que les càpsides de la població HP, amb una mitjana de 0.53 ± 0.07 , presenten un grau de colocalització amb la proteïna ALIX significativament major que les de la població L0, la qual mostra una mitjana de 0.35 ± 0.03 ($p < 0.05$) (**Figura 18**). Aquests resultats indiquen que en la població HP hi ha una major proporció de virus colocalitzant amb ALIX que en la població L0.

Si observem les diferències entre temps post infecció veiem com la població L0 presenta una disminució significativa del coeficient M1 a les 72 hores post infecció ($p < 0.05$), mentre que per a la població HP és manté. Es a dir, la proporció de càpsides que colocalitzen amb ALIX per a la població L0 cau a 72 hores, mentre que per a la població HP es manté constant. Aquesta diferència pot ser deguda a l'augment d'antigen, tal i com s'observa en les imatges d'immunofluorescència, en el nombre de càpsides a les 72 hores. Mentre a 48 hores per a la població L0 hi ha poc virus i poca proteïna ALIX, per a la població HP aquestes quantitats són més grans. Quan la població L0 incrementa la quantitat d'antigen, el coeficient M1 cau, degut a que la proporció que colocalitza amb ALIX és menor. Aquesta disminució en la proporció pot ser deguda a que la quantitat de proteïna ALIX disponible sigui encara insuficient per interaccionar amb tots els virus, o bé a que la població L0 interaccioni pitjor amb la proteïna ALIX, ja que per a la població HP el coeficient es manté.

Quan ens fixem en el coeficient M2, el qual mostra el grau de colocalització relatiu d'ALIX amb el virus respecte el total d'ALIX de la imatge, és a dir el percentatge d'ALIX que colocalitza amb el virus, veiem que les mitjanes de cada població, 0.30 ± 0.05 per a L0 i 0.33 ± 0.06 per a HP, tampoc mostren diferències significatives entre elles a 48 hores post infecció. En canvi el coeficient M2 a 72 hores post infecció mostra una

mitjana de 0.30 ± 0.03 per a la població HP i de 0.42 ± 0.03 per a la població L0, la qual és significativament superior a la de la població HP ($p < 0.05$). Això ens indica que hi ha una major proporció d'ALIX que es troba colocalitzant amb el virus en la població L0, respecte la població HP. Aquest coeficient, sorprenentment més baix per a la població HP, es podria interpretar si en les cèl·lules infectades amb HP hi hagués una major quantitat d'ALIX. El coeficient M2 no mostra diferències significatives entre els temps post infecció, però sí que s'observa una tendència a augmentar en el cas de la població L0. Es a dir, la proporció d'ALIX que colocalitza amb el virus respecte el total d'ALIX, augmenta amb el temps per a la població L0. En canvi, per a la població HP, aquesta proporció es manté més estable. Aquests resultats suggereixen que hi podria haver una quantitat major d'ALIX en les cèl·lules infectades amb la població HP respecte les infectades amb L0.

Per analitzar la contribució del virus i de la proteïna ALIX en la colocalització, es van utilitzar els coeficients d'overlap k_1 i k_2 [269], que ens mostren la contribució en la colocalització del virus i d'ALIX, respectivament.

L'anàlisi a 48 hores post infecció no va mostrar diferències significatives en la contribució del virus en la colocalització, tal i com mostren les mitjanes de les poblacions, 0.42 ± 0.06 per la L0 i 0.44 ± 0.09 per l'HP, del coeficient d'overlap k_1 . Per tant, a les 48 hores hi ha la mateixa quantitat de càpsides de L0 i HP per punt de colocalització. A les 72 hores, aquesta contribució del virus en la colocalització, tampoc mostra diferències significatives entre les mitjanes de les poblacions HP i L0. Tot i mostrar una mitjana de 0.28 ± 0.02 per a la població L0 i 0.31 ± 0.05 per a la població HP, la distribució del 50% dels valors en les dues poblacions es troba al mateix

nivell. Per tant el nombre de càpsides per unitat de colocalització seguiria essent el mateix per a les dues poblacions de l'HAV. Pel que fa a les diferències del coeficient k_1 entre els dos temps post infecció, s'observa una disminució de la contribució en la colocalització per part de les dos poblacions dels virus, tot i que només és significativa per a la població L0 ($p < 0.05$).

Per valorar el grau de contribució d'ALIX en la colocalització vam utilitzar el coeficient d'overlap k_2 . A les 48 hores post infecció aquest coeficient mostra unes mitjanes de 0.15 ± 0.02 per a la població L0 i 0.16 ± 0.03 per HP. Aquestes mitjanes no mostren diferències significatives entre les dues poblacions, tot i que s'observa una tendència d'alguns dels valors d'HP a estar per sobre de la mitjana de L0, mostrant així que, almenys en aquests casos, hi hauria més ALIX per punt de colocalització respecte la població L0 (**Figura 18**). Per tant a 48 hores post infecció HP semblaria que té una major capacitat de captar ALIX. A les 72 hores post infecció, la mitjana de la població HP és significativament superior a la de la població L0 ($p < 0.05$), essent d'un valor de 0.28 ± 0.02 i 0.19 ± 0.01 , respectivament. Això ens confirma que hi hauria més ALIX per punt de colocalització en la població HP que en L0, confirmant-se així que HP té una major capacitat de captar ALIX. Si observem les diferències entre els temps post infecció, veiem com la contribució d'ALIX en la colocalització augmenta per a les dues poblacions, tot i que només és significatiu en el cas d'HP ($p < 0.05$).

Valorant els dos coeficients d'overlap al llarg del temps, s'observa com a mesura que disminueix la contribució del virus en la colocalització, augmenta la contribució d'ALIX (**Figura 18**).

Finalment, els resultats obtinguts amb al control negatiu de colocalització mostren per als coeficients de Manders M1 i M2 un valor de mitjana de 0.18 ± 0.06 i 0.11 ± 0.04 per a L0, i 0.17 ± 0.03 i 0.12 ± 0.03 per HP, respectivament. En el cas dels coeficient d'overlap k1 i k2 els valors de les mitjanes són 0.04 ± 0.01 i 0.04 ± 0.01 per a L0, i 0.07 ± 0.01 i 0.05 ± 0.01 per HP, respectivament. Aquests valors es troben per sota del 50% del valor mitjà dels obtinguts en el nostre anàlisi de colocalització entre la càpsida del virus i la proteïna ALIX, i són significativament molt menors als mateixos ($p < 0.01$). Amb aquests resultats podem afirmar que la colocalització entre la càpsida del virus de l'HAV i la proteïna cel·lular ALIX és real, és a dir, que no es tracta de la coincidència aleatòria dels punts de llum en la colocalització.

El conjunt de tots aquests resultats suggereix que la cèl·lula podria estar expressant més ALIX durant la infecció amb HP respecte L0. A més a més, el fet que en els punts de colocalització de la població HP hi hagi una major quantitat d'ALIX, podria indicar una millor capacitat d'interacció amb aquesta proteïna cel·lular per part de la població HP. Per altra banda, en les cèl·lules infectades amb la població L0 sembla que l'augment del virus a les 72 hores porta també associat un increment d'ALIX. No obstant, la quantitat total d'ALIX i la seva contribució en la colocalització sembla que són menors que per la població HP.

4.3 Expressió relativa d'ALIX durant la infecció amb les poblacions HM175-L0 i HM175-HP de l'HAV en el model cel·lular Huh7-AI

Amb els resultats obtinguts en l'estudi quantitatiu de microscòpia confocal, els quals suggerien que hi podria haver una major quantitat d'ALIX en les cèl·lules infectades amb la població HP i un augment d'ALIX associat a l'augment del virus en la població L0, es va decidir quantificar el mRNA d'ALIX en aquestes condicions. La quantificació relativa d'ALIX en el model cel·lular Huh7-AI es va realitzar mitjançant RT-qPCR del mRNA d'ALIX a 48 i 72 hores post infecció en cèl·lules infectades amb les poblacions L0 i HP amb una MOI de 5. Es va quantificar també el mRNA d'ALIX de cèl·lules Huh7-AI no infectades als mateixos temps post infecció. Per altra banda, es va quantificar el virus de l'HAV per RT-qPCR en els mateixos lisats cel·lulars, per poder analitzar la relació entre el títol viral i la quantitat d'ALIX present en les cèl·lules, per a les dos poblacions del virus. Es van realitzar un mínim de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun i per cadascuna de les condicions.

La mitjana dels valors d'expressió relativa d'ALIX de les poblacions, mostra uns valors de 0.70 ± 0.10 i 1.24 ± 0.14 per a L0 i HP, respectivament, a 48 hores post infecció. A les 72 hores post infecció aquests valors augmenten fins a 0.99 ± 0.13 per a la població L0 i 1.52 ± 0.21 en el cas de la població HP. Aquests resultats mostren una significativa major expressió relativa d'ALIX en les cèl·lules infectades amb la població HP respecte les infectades amb L0, tan a les 48 com a les 72 hores post infecció ($p < 0.05$) (**Figura 19**). S'observa també un augment de l'expressió d'ALIX en les cèl·lules infectades amb les dos poblacions del virus al llarg del temps, tot i

que només és significatiu en les cèl·lules infectades amb la població L0 ($p < 0.05$) (**Figura 19**).

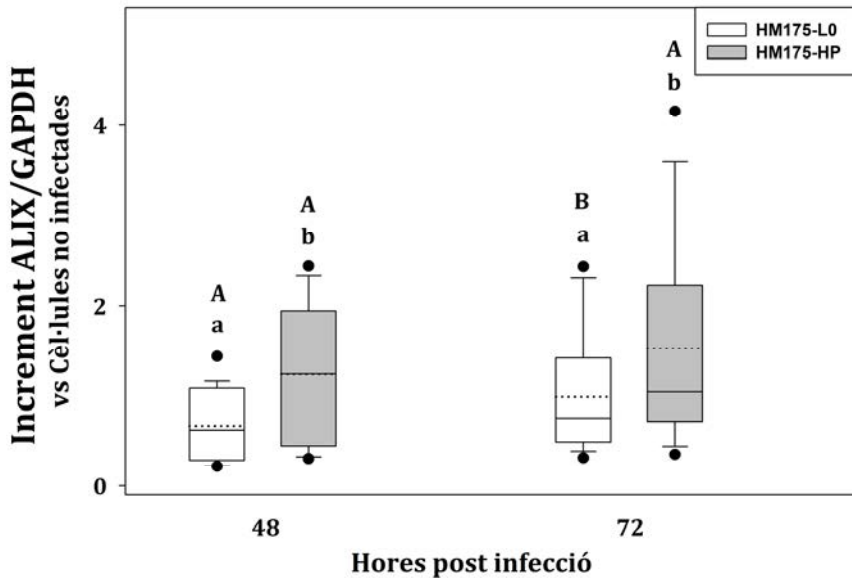


Figura 19. Expressió relativa d'ALIX en cèl·lules Huh7-AI infectades amb les poblacions L0 i HP de l'HAV. Es mostra l'increment de l'expressió relativa d'ALIX normalitzada amb el control endogen GAPDH en cèl·lules Huh7-AI infectades amb el virus respecte la de les cèl·lules no infectades. Els box plots mostren la distribució dels valors d'un mínim de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun. El límit inferior de la caixa mostra el percentil 25, dins de la caixa la línia discontinua en punts mostra la mitjana aritmètica i la línia contínua la mediana del grup, el límit superior de la caixa mostra el percentil 75. Els bigotis per sota i per sobre de la caixa mostren els percentils 10 i 90, respectivament. Els punts inferior i superior als bigotis mostren el percentil 5 i 95, respectivament. Les diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) entre poblacions de virus en un mateix temps post infecció s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres $a \neq b$ en minúscula. Les diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) d'una mateixa població de virus en els diferents temps post infecció s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres $A \neq B$ en majúscules.

Si analitzem l'increment d'ALIX en les cèl·lules infectades amb les dues poblacions del virus a les 72 hores post infecció, la població L0 mostra un increment major que el de la població HP, amb unes mitjanes de 3.26 ± 0.33 i 2.65 ± 0.18 , respectivament (**Figura 20 A**). Pel que fa al increment del títol viral, la població L0 també mostra un increment significativament

superior al de la població HP ($p < 0.05$), amb uns valors de mitjana de 4.74 ± 0.42 i 1.54 ± 0.10 , respectivament (Figura 20 B).

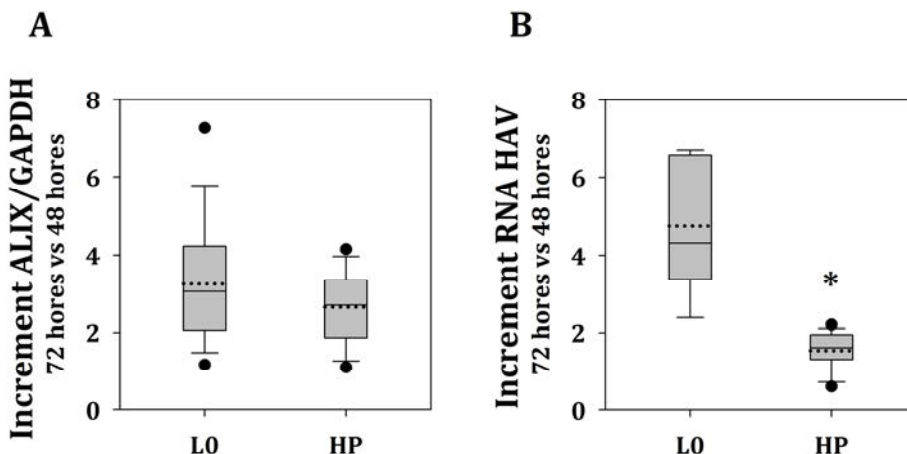


Figura 20. Increment de l'expressió d'ALIX i de les poblacions de L'HAV a 72 hores post infecció respecte 48 hores post infecció. **A.** Es mostra l'increment de l'expressió relativa d'ALIX normalitzada amb el control endògen GAPDH en cèl·lules Huh7-AI infectades amb cadascuna de les poblacions del virus a 72 hores post infecció, respecte la de les cèl·lules infectades amb cadascuna de les poblacions del virus a 48 hores post infecció. **B.** Es mostra l'increment del títol viral mesurat per RT-qPCR en cèl·lules Huh7-AI infectades amb cadascuna de les poblacions del virus a 72 hores post infecció, respecte el títol viral en les cèl·lules infectades amb cadascuna de les poblacions del virus a 48 hores post infecció. Els box plots mostren la distribució dels valors d'un mínim de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun. El límit inferior de la caixa mostra el percentil 25, dins de la caixa la línia discontinua en punts mostra la mitjana aritmètica i la línia contínua la mediana del grup, el límit superior de la caixa mostra el percentil 75. Els bigotis per sota i per sobre de la caixa mostren els percentils 10 i 90, respectivament. Els punts inferior i superior als bigotis mostren el percentil 5 i 95, respectivament. El símbol * indica que hi ha significació estadística, $p < 0.05$.

Amb el conjunt d'aquests resultats, podem afirmar que hi ha una major quantitat d'ALIX en les cèl·lules infectades amb la població HP respecte les infectades amb L0 en els dos temps post infecció. No obstant, l'increment d'ALIX a les 72 hores és major per a la població L0, tal i com mostra també el títol viral d'aquesta població.

Amb els resultats obtinguts fins al moment amb l'estudi de microscòpia confocal i la quantificació de l'expressió cel·lular d'ALIX, es va decidir aplicar un model de regressió lineal simple per estudiar si l'expressió d'ALIX mostrava una relació directa amb el títol de genomes vírics de cadascuna de les poblacions de l'HAV. Els resultats mostren una excel·lent correlació positiva entre l'expressió d'ALIX i el títol viral per a les dues poblacions de l'HAV ($R > 0.80$) (**Figura 21 A i B**). Tot i que el coeficient de correlació és lleugerament més alt per a la població L0 ($R = 0.89$) que per a la població HP ($R = 0.83$), la pendent de la recta de regressió és major en HP (pendent: 0.72). La inclinació de la recta ens indica l'increment de l'expressió d'ALIX quan el títol viral augmenta. Es a dir, l'increment d'ALIX per unitat de virus seria major en la població HP que en la L0. Si tenim en compte la infectivitat específica de cada població (número de partícules infeccioses / número de genomes), la qual és de 0.02 ± 0.01 (1/50) per a la L0 i 0.06 ± 0.01 (1/16) per a l'HP (entre parèntesis són el nombre mitjà de partícules infeccioses pel nombre de partícules físiques), obtenim una aproximació de la relació entre el nombre de càpsides i l'expressió d'ALIX (**Figura 21 C i D**). Els valors de la recta de regressió es mantenen iguals.

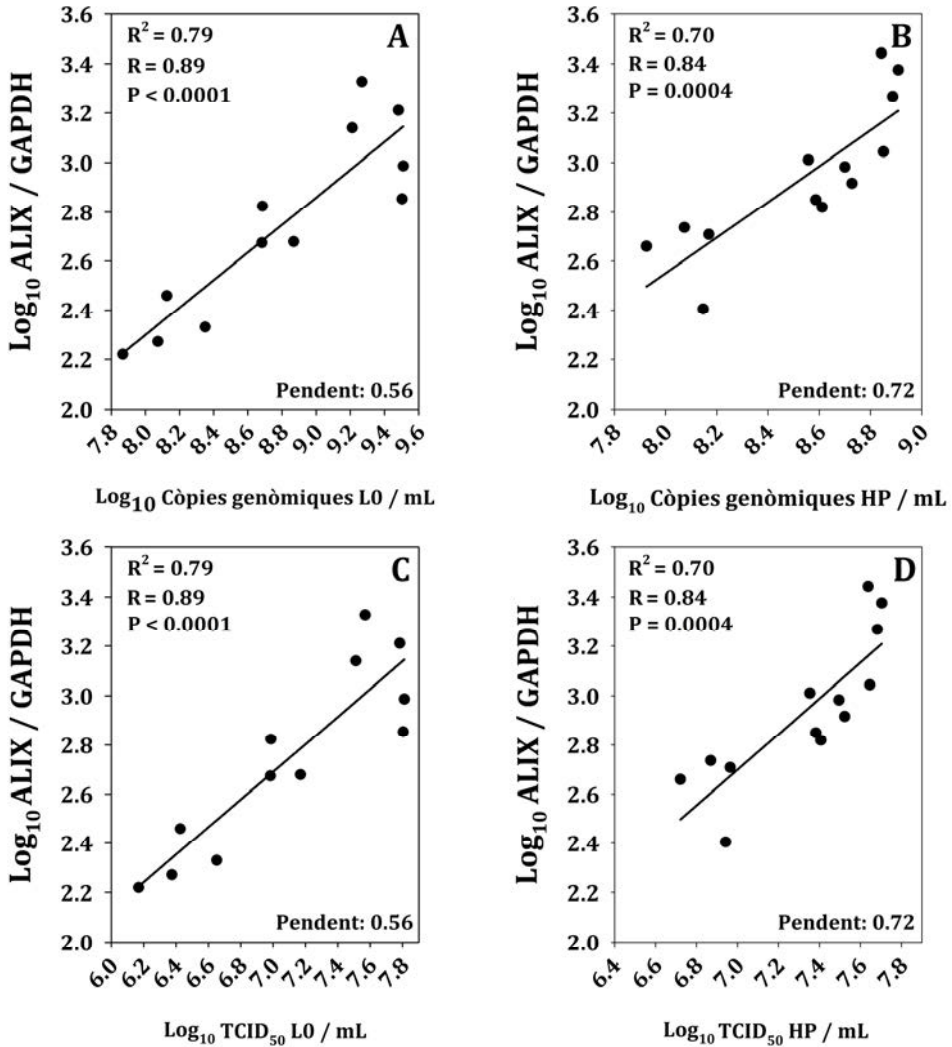


Figura 21. Relació entre l'expressió relativa d'ALIX i el títol viral de les poblacions HM175-L0 i HM175-HP en cèl·lules Huh7-AI. (A, B) Es mostra el logaritme de l'expressió relativa d'ALIX normalitzada amb el control endogen GAPDH en funció del logaritme del títol viral mesurat per RT-qPCR per mil·lilitre. (C, D) Es mostra el logaritme de l'expressió relativa d'ALIX normalitzada amb el control endogen GAPDH en funció del logaritme del títol viral mesurat per RT-qPCR corregit per la infectivitat específica de cada població, per mil·lilitre. La línia correspon a la recta de regressió lineal simple. R^2 : coeficient de determinació. R: coeficient de correlació de Pearson.

4.4 Implicacions del silenciament gènic d'ALIX en les cèl·lules Huh7-AI en l'alliberament de les partícules víriques de les poblacions HM175-L0 i HM175-HP a sobrenedant cel·lular

Un cop analitzat el comportament d'ALIX en els hepatòcits infectats amb les poblacions parental L0 i el mutant de creixement ràpid HP de l'HAV, es va decidir estudiar quines serien les conseqüències del silenciament gènic d'ALIX en la sortida d'ambdues poblacions.

El silenciament gènic es va realitzar mitjançant un sistema d'interferència de RNA. Concretament a través de la transfecció d'un conjunt de 4 siRNA (*small interfering RNA*) diana per al gen *ALIX* (també anomenat *PDCD6IP* en humans). Com a control és va utilitzar un conjunt de 4 siRNA no diana (NT-siRNA, *non-targeting siRNA*), que permet distingir els efectes específics del silenciament del nostre gen d'altres efectes no específics del nostre gen que es poden produir quan s'utilitzen aquests sistemes d'interferència de RNA. Els resultats obtinguts de 6 experiments independents amb dues rèpliques cadascun, mostren una mitjana de totes les rèpliques de $85.35\% \pm 2.69$ de silenciament d'ALIX (siALIX) respecte els controls no silenciats (NT-siRNA) ($p < 0.01$) (**Figura 22**).

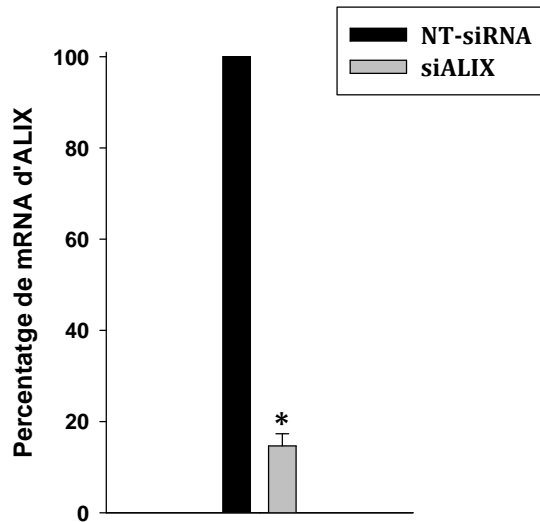


Figura 22. Abundància d'ALIX en cèl·lules Huh7-AI silenciades. Quantitat relativa d'mRNA d'ALIX present en cèl·lules Huh7-AI 48 hores després de ser transfectades amb 100nM de siALIX. El càlcul relatiu es fa respecte el control de cèl·lules transfectades amb 100nM de NT-siRNA. Es mostra la mitjana de 6 experiments independents amb dues rèpliques cadascun mesurats per triplicat per RT-qPCR \pm l'error estàndard. El símbol * indica que hi ha significació estadística, $p < 0.01$.

Les cèl·lules es van transfectar amb els siRNA corresponents i 24 hores després es van infectar a una MOI de 5 amb les poblacions L0 i HP de l'HAV. A les 24 hores post infecció es van quantificar els virus en el sobrenedant de cultiu cel·lular per poder comparar la quantitat de partícules alliberades en les cèl·lules on ALIX estava silenciada respecte les cèl·lules on no ho estava (**Figura 23 A**). Els resultats obtinguts de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun d'ells i per a cadascuna de les poblacions de l'HAV, mostren una caiguda significativa de $0.45 \pm 0.11 \text{ Log}_{10}$ del títol infeccions en els sobrenedants de cultiu de la població L0 ($p < 0.05$). En canvi, per al mutant de replicació ràpida HP aquesta caiguda és molt menor, tan sols de $0.11 \pm 0.07 \text{ Log}_{10}$ (**Figura 23 B**). Per a la població L0 i la mutant HP, aquestes caigudes correspondrien a un 64.5% i 22.4%, respectivament.

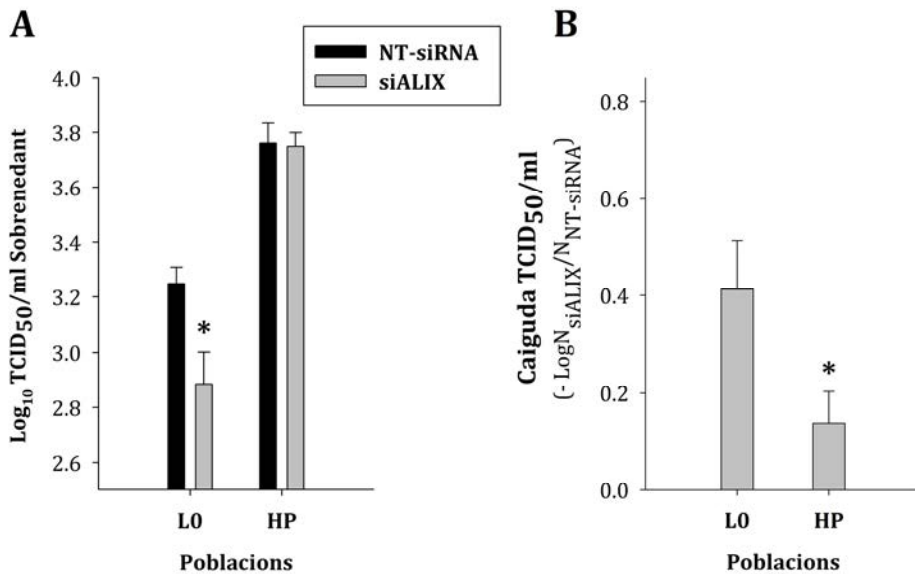


Figura 23. Efecte del silenciament gènic d'ALIX en l'alliberament de les partícules en cèl·lules Huh7-AI. A. Títols infecciosos a sobrenedant de cultiu. Els resultats mostren la mitjana del Log₁₀ del títol infeccios a 24 hores post infecció, mesurat per duplicat per TCID₅₀/ml, d'un total de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun i per a cadascuna de les poblacions de l'HAV ± l'error estàndard. **B. Caiguda del títol infeccios a sobrenedant de cultiu.** Els resultats mostren la caiguda del títol infeccios en el sobrenedant a 24 hores post infecció, de cèl·lules silenciades (siALIX) respecte el de les cèl·lules control no silenciades (NT-siRNA). El símbol * indica que hi ha significació estadística, p<0.05.

Per tal de comprovar que aquesta caiguda del títol no era deguda a un problema en la replicació del virus, es va quantificar l'RNA del virus en els lisats cel·lulars al mateix temps post infecció. Els resultats d'un total de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun i per cadascuna de les poblacions de l'HAV, mostren que la quantitat de RNA de l'HAV en els lisats cel·lulars no és menor en les cèl·lules silenciades per cap de les dues poblacions. A més a més, per a la població L0 s'observa augment significatiu d'aquest RNA intracel·lular (p<0.05), fet que demostra una vegada més que, el silenciament d'ALIX només faria disminuir la sortida del virus de la cèl·lula i no la seva replicació. En la població HP, també s'observa un lleuger augment del RNA viral en els lisats cel·lulars però sense arribar a ser

significatiu, fet que concorda amb la tampoc significativa caiguda d'aquesta població en el sobrenedant de cultiu (**Figura 24**).

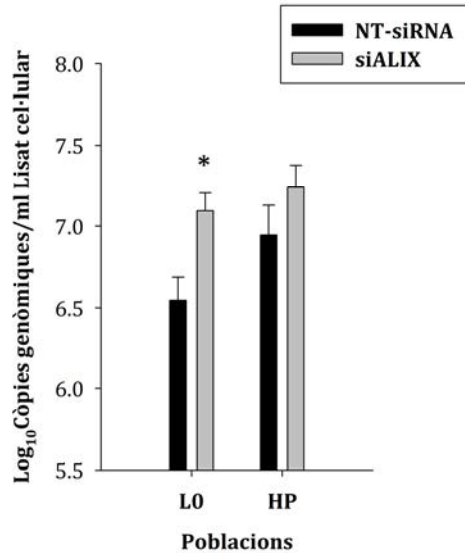


Figura 24. Efecte del silenciament gènic a nivell intracel·lular 24 hores post infecció en cèl·lules Huh7-AI. Els resultats mostren la mitjana del Log₁₀ de les còpies genòmiques, mesurades per duplicat per RT-qPCR, d'un total de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun i per cadascuna de les poblacions de l'HAV ± l'error estàndard. El símbol * indica que hi ha significació estadística, $p < 0.05$.

Finalment es va estudiar la naturalesa de les partícules virals alliberades en el sobrenedant de cultiu de les cèl·lules on ALIX es trobava silenciada, per comparar-la amb la dels seus controls no silenciats (NT-siRNA). Per dur a terme aquest objectiu es van concentrar els sobrenedants procedents de les cèl·lules silenciades per cadascuna de les dues poblacions i es va realitzar un gradient isopícnic d'iodixanol sacarosa (veure apartat 7.2 de material i mètodes) per a cadascuna d'elles. Paral·lelament, es va seguir el mateix protocol amb els sobrenedants procedents de les cèl·lules control no silenciades infectades amb les dues poblacions.

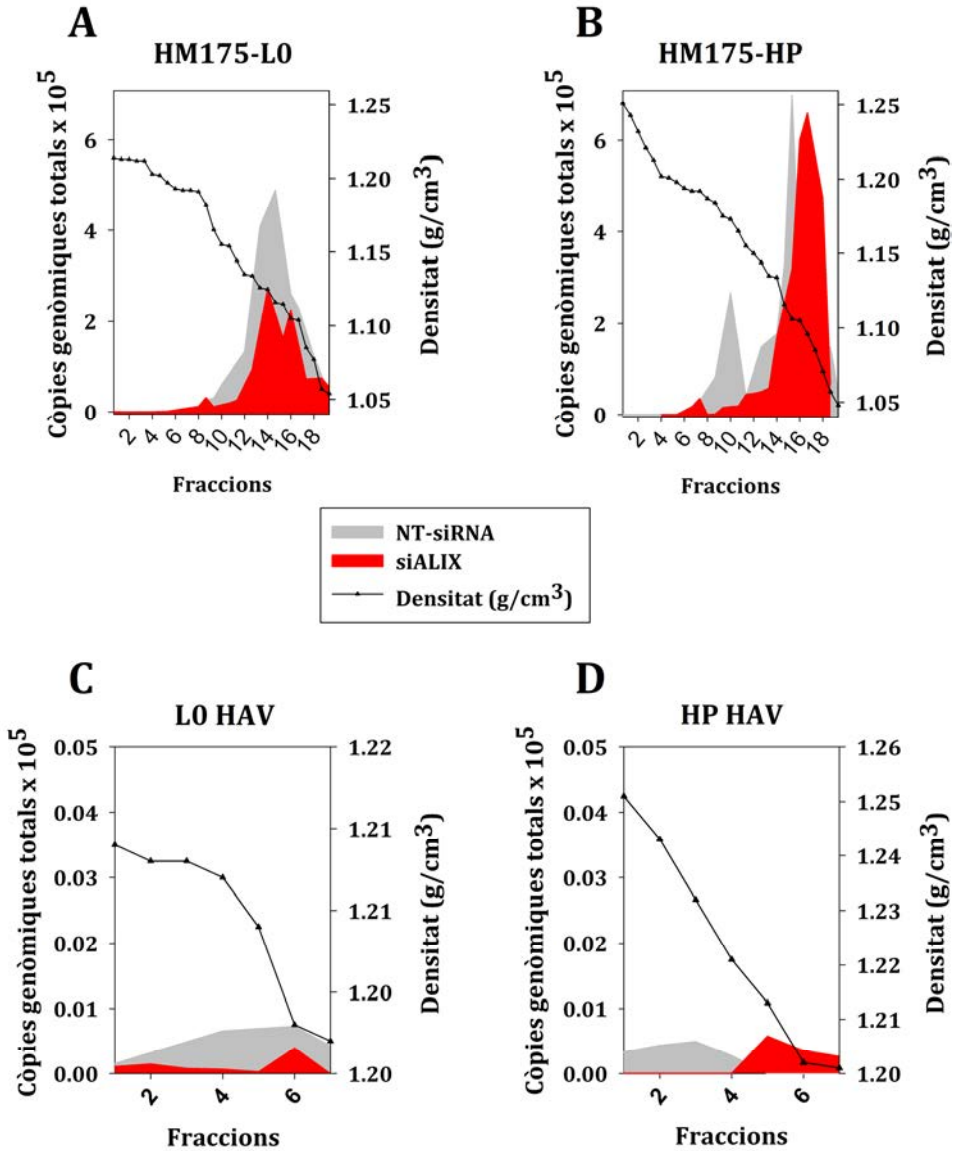


Figura 25. Efecte del silenciament en la naturalesa de les partícules alliberades en el sobrenedant de cultiu cel·lular en cèl·lules Huh7-A1. **A, B.** Gradients d'iodixanol-sacarosa obtinguts concentrant els sobrenedants procedents de tots els experiments i rèpliques independents del silenciament. Els gràfics mostren els pics de partícules pseudoembolcallades (eHAV) en el rang de menor densitat 1.06-1.12g/cm³, i les partícules nues (HAV) en el rang de major densitat 1.20-1.25g/cm³. **C, D.** Fraccions corresponents al pic de les partícules nues (1.20-1.25g/cm³).

Els gradients de densitat confirmen una vegada més el que ja havíem observat en les quantificacions de partícules virals infeccioses d'aquests sobrenedants. La població L0 mostra una caiguda significativa respecte la quantitat de partícules alliberades en sobrenedants de cèl·lules no silenciades ($p < 0.05$), mentre que per a la població HP aquesta caiguda és significativament menor que en L0 ($p < 0.05$) (**Figura 25 A i B**).

Amb els resultats d'aquests gradients, es van analitzar individualment les fraccions corresponents als dos fenotips del virus. Es va calcular la caiguda de les partícules nues (HAV) i les pseudoembolcallades (eHAV) alliberades a sobrenedant en les condicions de silenciament d'ALIX, respecte les de cèl·lules control no silenciades (NT-siRNA). Els resultats observats mostren que per a la població L0 el percentatge de caiguda de les partícules eHAV en cèl·lules silenciades respecte les no silenciades és de 55.3% (**Figura 25 A**), i per a les nues aquest percentatge és de 58.1% (**Figura 25 C**). Si fem el mateix per a la població HP, veiem una caiguda de les partícules eHAV del 13.3% (**Figura 25 B**) i de les partícules nues del 2.6% (**Figura 25 D**), ambdós molt menors que en la població L0 (**Taula 2**).

	HM175-L0	HM175-HP
eHAV	55.3 %	13.3 %
HAV	58.1 %	2.6 %

Taula 2. Percentatges de caiguda a sobrenedant de les partícules pseudoembolcallades (eHAV) i nues (HAV) en cèl·lules Huh7-AI amb ALIX silenciati. Es mostra el percentatge de caiguda a sobrenedant de cèl·lules amb ALIX silenciati respecte cèl·lules control, dels dos fenotips del virus per separat provinents dels gradients d'iodixanol sacarosa obtinguts concentrant els sobrenedants de tots els experiments i rèpliques independents del silenciament.

Amb el conjunt dels resultats observats podem afirmar que el silenciament d'ALIX afecta molt més i de manera significativa a la població

L0 que a l'HP ($p < 0.05$). A més a més, el silenciament d'ALIX semblaria afectar tan a la via de sortida de les partícules nues (HAV) com a la de les pseudoembolcallades (eHAV) en la població L0, mentre que per a la població HP semblaria que la poca caiguda que s'observa es major en el pic de les partícules eHAV que en el de les HAV. Es a dir la inhibició d'ALIX afecta a la sortida dels dos fenotips del virus per igual en la població L0, mentre que en la població HP sembla que tot i afectar-li poc, aquesta inhibició afecta més al fenotip pseudoembolcallat que al nu.

4.5 Biogènesi de les partícules pseudoembolcallades (eHAV) i nues (HAV) durant el cicle biològic del virus de l'Hepatitis A *in vitro* en el model cel·lular hepàtic Huh7-AI polaritzat

Amb els resultats obtinguts fins al moment, els quals semblarien indicar una millor eficiència de sortida del mutant HM175-HP en la línia cel·lular Huh7-AI, es va decidir desenvolupar un protocol de polarització *in vitro* d'aquesta línia cel·lular hepàtica per tal de poder aprofitar les avantatges que ens proporciona aquest mutant per a estudiar la biogènesi d'aquestes partícules pseudoembolcallades (eHAV) i nues (HAV) durant el cicle biològic de l'HAV.

La polarització de la línia cel·lular d'hepatocarcinoma Huh7-AI va resultar complicada degut al fet que la gran majoria de substàncies comercials que s'utilitzen per induir la polarització de les cèl·lules hepàtiques, donen lloc a una polarització en 3D formant boles similars a un òrgan *in vitro*. En el nostre cas l'objectiu era aconseguir un grau de polarització suficient per observar les dues membranes diferenciades, però

mantenint una polarització simple columnar. Finalment aquesta polarització del model cel·lular Huh7-AI es va aconseguir mitjançant una combinació de diferents factors. Aquests factors inclouen, la sembra d'una quantitat específica de cèl·lules, 5×10^5 cèl·lules / 1.12 cm^2 , suplementar els medis de creixement amb un 15% de sèrum fetal boví (FBS), i renovar aquest medi cada 48 hores un cop les cèl·lules han arribat a la confluència suplementant-lo amb un 1% de DMSO durant 14 dies.

El seguiment de la polarització es va fer mitjançant un estudi de microscòpia confocal amb anticossos contra marcadors específics de les membranes apical i basolateral de les cèl·lules, la ZO-1 (*zonula occludens protein-1*) de les unions estretes i l'ATPasa de sodi-potassi (*Na⁺K⁺-ATPasa*), respectivament. En els hepatòcits les unions estretes (*tight junctions*) mantenen la polaritat cel·lular i segellen els canalicles biliars formant una barrera intercel·lular entre la bilis i la sang [271]. En les línies cel·lulars humanes derivades d'hepatòcits com les Huh7-AI, les proteïnes associades a les unions estretes (*tight junctions*) com la ZO-1, formen cinturons al pol apical de la cèl·lula com passa amb les cèl·lules simples polaritzades, i fins i tot en ocasions s'observen els canalicles biliars [272,273]. La *Na⁺K⁺-ATPasa* és una bomba de sodi potassi localitzada a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials polaritzades cultivades en cultius 2D (cultius simples, en monocapa, no tridimensionals), que s'encarrega de bombejar sodi i potassi cap a la cèl·lula [274].

La distribució d'aquests marcadors en els nostres hepatòcits polaritzats és l'adequada, mostrant poca o nul·la colocalització entre ells en les monocapes de cèl·lules polaritzades Huh7-AI. En les imatges de microscòpia confocal, l'*Na⁺K⁺-ATPasa* mostra una distribució basolateral i la ZO-1 es localitza principalment en el domini apical dels hepatòcits, similar

al que passaria en un epiteli simple columnar (**Figura 26 i Figura 27**). Aquestes dades, suggereixen que els cultius d'Huh7-A1 polaritzades *in vitro* sota aquestes condicions, presenten una polarització simple en monocapa, funcional i suficient per a l'estudi de la biogènesi de les partícules de l'HAV.

La polarització simple columnar de la majoria de les cèl·lules epitelials cultivables, com les Caco-2, s'avalua mitjançant la mesura de la resistència transepitelial (TER) de les monocapes cel·lulars cultivades en membranes [275,276]. Els hepatòcits no presenten aquesta característica ja que són epitelis relativament permeables, nombrosos estudis demostren que les molècules de fins 50 kDa poden passar a la bilis (i fins a 270kDa en els casos de colèstasis degut a la lligadura del conducte biliar) [277]. Això implica que els mètodes convencionals per a la determinació de la polaritat cel·lular, com és la mesura de la TER, són poc fiables com a indicadors de la polaritat dels hepatòcits.

En aquest estudi per tal de comprovar que la infecció amb el virus no alterava la permeabilitat de la monocapa, és va utilitzar el marcador FITC-dextrà de 4 kDa, per mesurar si la infecció amb el virus provocava un increment d'aquesta permeabilitat. El dextrà conjugat amb una molècula fluorescent (com el FITC) dona lloc a un derivat de gran utilitat com a marcador en estudis de permeabilitat vascular i cel·lular [278–280].

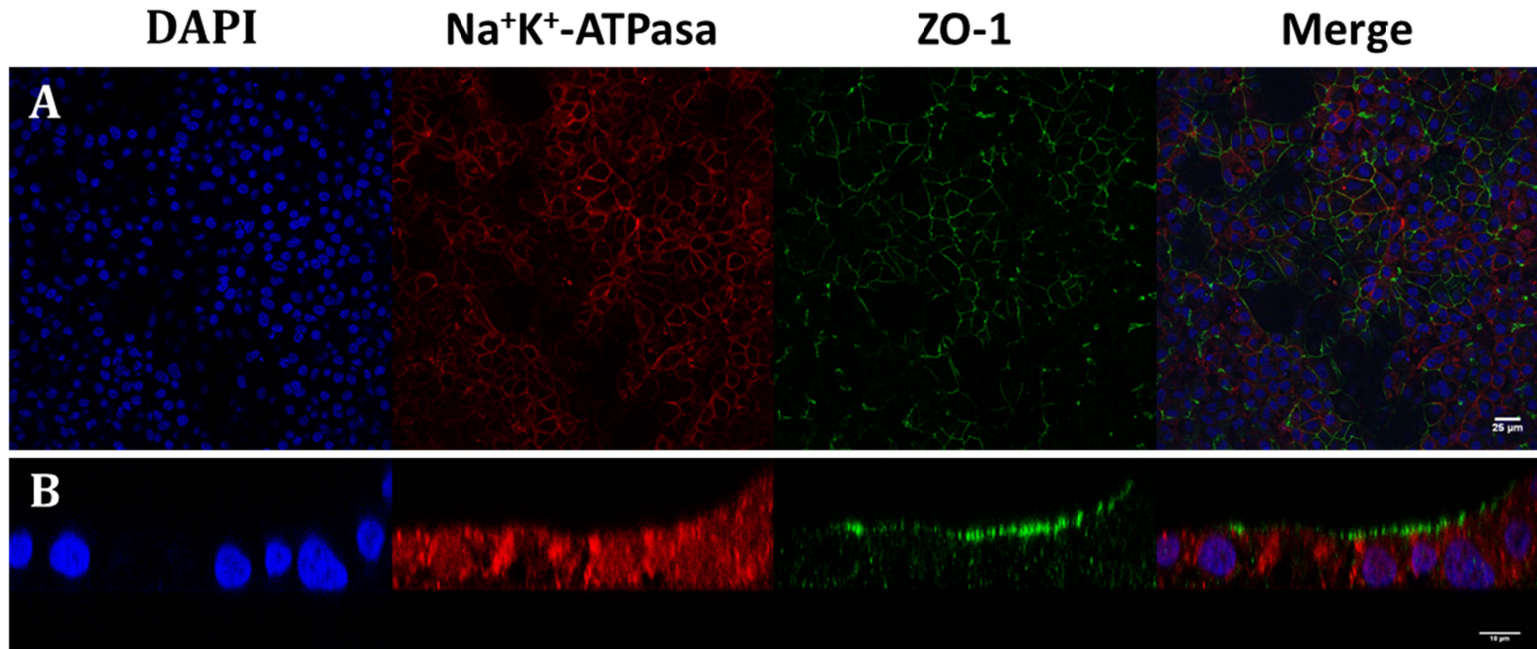


Figura 26. Polarització de cèl·lules Huh7-AI. Immunofluorescència de doble marcatge i anàlisi per microscòpia confocal. Na⁺K⁺-ATPasa (marcador basolateral), en vermell; ZO-1 (marcador apical), en verd; DAPI (nucli), en blau. **A.** Seccions horitzontals XY. Barra d'escala, 25 μm. **B.** Seccions verticals XZ. Barra d'escala, 10 μm. Seccions agafades a distància de 0.5 μm entre elles. Imatges representatives d'un mínim de tres experiments independents.

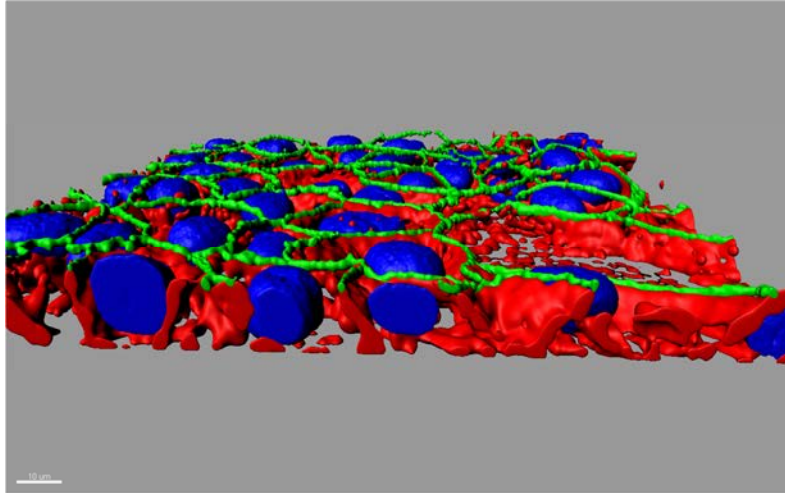


Figura 27. Imatge d'alta resolució d'una reconstrucció volumètrica tridimensional (3D) de la monocapa de cèl·lules Huh7-AI polaritzades. Na⁺K⁺-ATPasa (marcador basolateral), en vermell; ZO-1 (marcador apical), en verd; DAPI (nucli), en blau. Reconstrucció feta amb el software *Imaris v.7.2.1*. Barra d'escala, 10 µm.

Per mesurar si la infecció amb el virus alterava la permeabilitat cel·lular es van polaritzar cèl·lules Huh7-AI sobre membranes semipermeables (0.4 µm porus) d'un sistema de transwell de 12 pous (*Corning™ Transwell™ Multiple Well Plate with Permeable Polycarbonate Membrane Inserts*). Seguidament es van infectar amb el virus parental L0 amb una MOI de 5 a través dels compartiments apical i basolateral per separat. Per tenir un control de la permeabilitat en condicions normals, es van mantenir cèl·lules sense infectar sota les mateixes condicions per poder quantificar la quantitat de FITC-Dextrà que travessa la monocapa en aquestes condicions. El dia 6 post infecció es va afegir a través del compartiment apical una quantitat coneguda de FITC-Dextrà, i passades 24 hores es van recollir els sobrenedants dels dos compartiments del transwell. Es va quantificar la quantitat de FITC-Dextrà en cada compartiment mesurant la fluorescència emesa per aquesta molècula i extrapolant-ho a través d'una recta patró. El càlcul del percentatge de permeabilitat es va fer en funció de la quantitat de FITC-Dextrà que havia

passat al compartiment basolateral respecte la quantitat total present en els dos compartiments.

Els resultats després de 7 dies d'infecció de dos experiments independents per a cada condició mostren, que tan si la infecció es realitza a través del compartiment apical com a través del basolateral, no hi ha diferències significatives en la permeabilitat respecte les cèl·lules no infectades (**Figura 28**). Es a dir, la infecció amb el virus no altera la permeabilitat de la monocapa d'aquestes cèl·lules Huh7-AI amb polarització simple columnar.

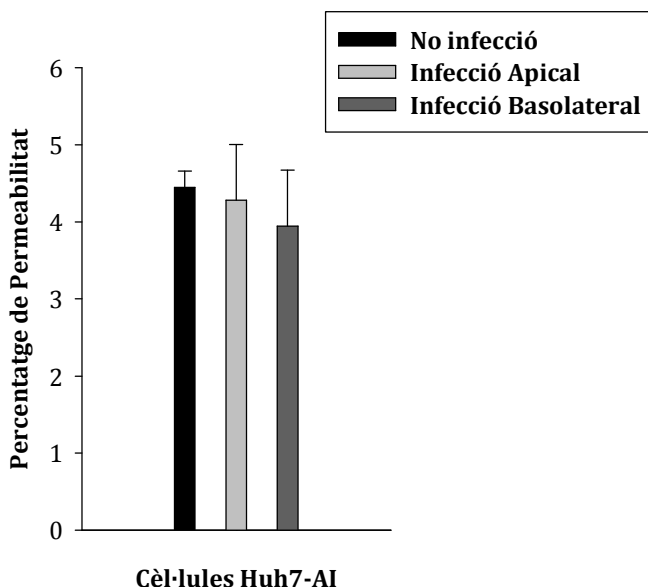


Figura 28. Permeabilitat de les cèl·lules Huh7-AI polaritzades a 7 dies post infecció. Percentatge de permeabilitat calculat mitjançant la concentració de FITC-Dextrà al compartiment basolateral respecte el total inoculat. Es mostra la mitjana de dos experiments independents per a cadascuna de les condicions \pm l'error estàndard.

Per estudiar la biogènesi de les partícules de l'HAV en els hepatòcits *in vitro*, es van cultivar monocapes de cèl·lules Huh7-AI sobre membranes

d'inserts de transwell i es van deixar polaritzar durant 14 dies, sota les condicions explicades anteriorment (veure apartat 7.8 de material i mètodes). Un cop polaritzades, es van infectar amb les dos poblacions de l'HAV, la parental L0 i el mutant de replicació ràpida HP, amb una MOI de 5 a través de la membrana basolateral tal i com succeeix de manera natural en la infecció *in vivo*. Posteriorment, es van recollir les partícules produïdes en els sobrenedants d'ambdós compartiments del transwell, basolateral i apical, a temps 0, 5 i 7 dies després de la infecció (p.i) (**Figura 29**). El títol a temps 0 correspon al títol després d'una hora i mitja d'adsorció i dos rentats, el qual es va sostreure per observar l'augment de títol als 5 i 7 dies.

Seguint el curs natural de la infecció, quan s'infecta amb el virus a través de la membrana basolateral, els resultats mostren que la sortida de l'HAV dels hepatòcits polaritzats *in vitro* es dona a través dels dos dominis de la membrana, tan el basolateral com l'apical. Per a la població L0 la sortida és significativament major a través de la membrana apical ($p < 0.05$), mentre que per la població HP aquesta sortida és igual per la membrana apical que per la basolateral (**Figura 29 A i B, Figura 30 A**). A més a més, la sortida de la població HP a través de la membrana basolateral és significativament major respecte la de la població L0 ($p < 0.05$) (**Figura 29 A**). Tal i com s'ha comentat en la introducció, els darrers anys s'ha descrit un nou model de cicle enterohepàtic de l'HAV que contempla, a més de la coneguda sortida a través de la membrana apical, la sortida a través de la membrana basolateral [57]. Aquestes partícules alliberades a través de la membrana basolateral fins l'espai de Disse, s'ha descrit que podrien entrar als hepatòcits subjacents i facilitar així la propagació del virus en el fetge [57].

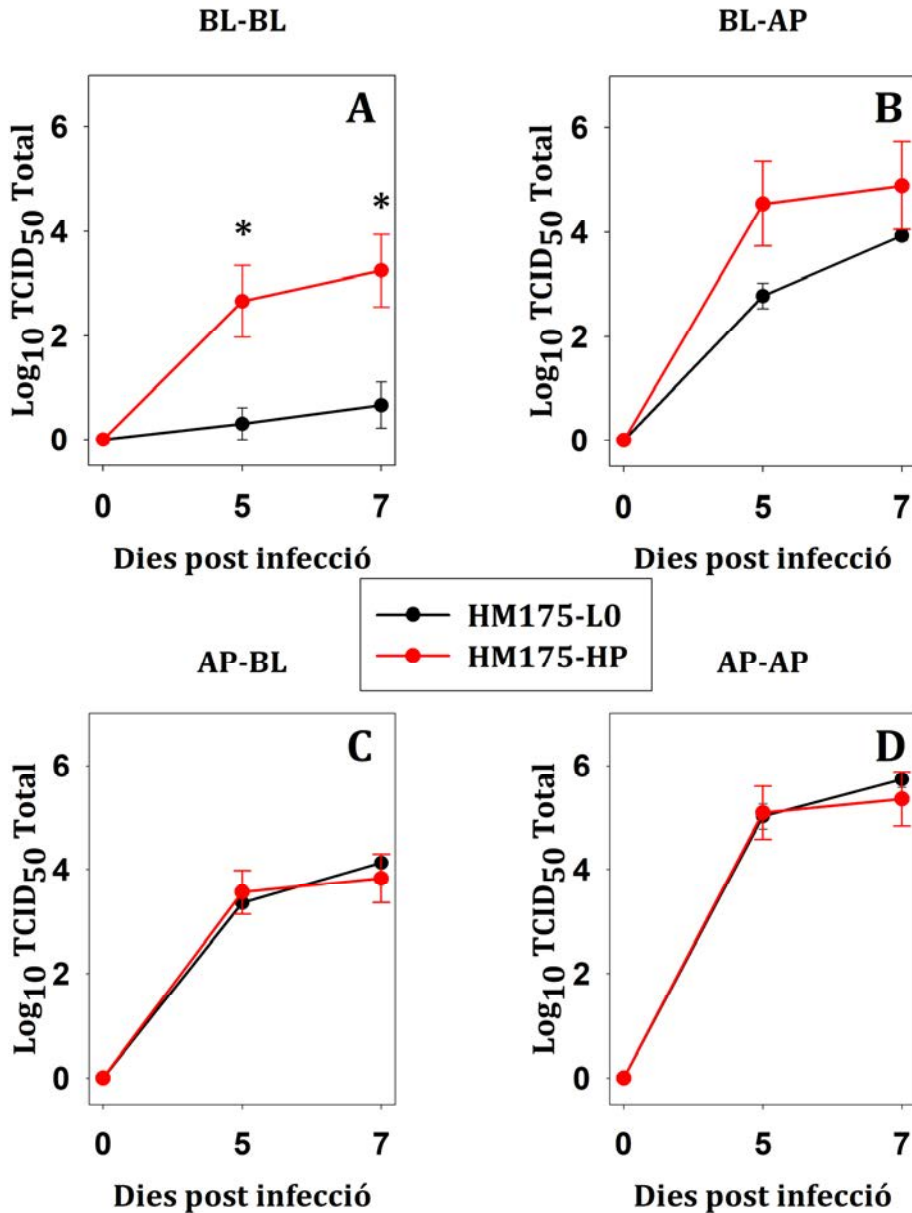


Figura 29. Biogènesi del virus de l'HAV en hepatòcits polaritzats *in vitro*. Huh7-AI polaritzades infectades a través de la membrana basolateral (BL) i apical (AP) utilitzant un sistema de transwell. **A.** BL-BL: infecció per basolateral sortida per basolateral. **B.** BL-AP: infecció per basolateral sortida per apical. **C.** AP-BL: infecció per apical sortida per basolateral. **D.** AP-AP: infecció per apical sortida per apical. L'anàlisi inclou la població parental HM175-L0 (negre) i el mutant HM175-HP (vermell). Els resultats mostren la mitjana del Log₁₀ del títol infeccions, mesurat per TCID₅₀, d'un total de 3 experiments independents amb 3 rèpliques cadascun i per cadascuna de les poblacions de l'HAV ± l'error estàndard.

Després de confirmar aquesta sortida a través dels dos dominis de l'hepatòcit per part de les nostres poblacions de l'HAV, vam decidir intentar infectar amb el virus a través de la membrana apical. La finalitat d'aquest assaig era estudiar si aquesta infecció a hepatòcits subjacents també es podria donar quan el virus surt pel canalicle biliar a través de la membrana apical, infectant els hepatòcits subjacents a través d'aquesta membrana.

Els resultats mostren una sorprenent eficiència d'entrada del virus per la membrana apical de l'hepatòcit. Veiem que un cop ha entrat per aquesta membrana la sortida per a les dues poblacions de l'HAV és major a través de la mateixa membrana apical ($p < 0.05$), tot i sortir també a través del domini basolateral (**Figura 29 C i D, Figura 30 B**).

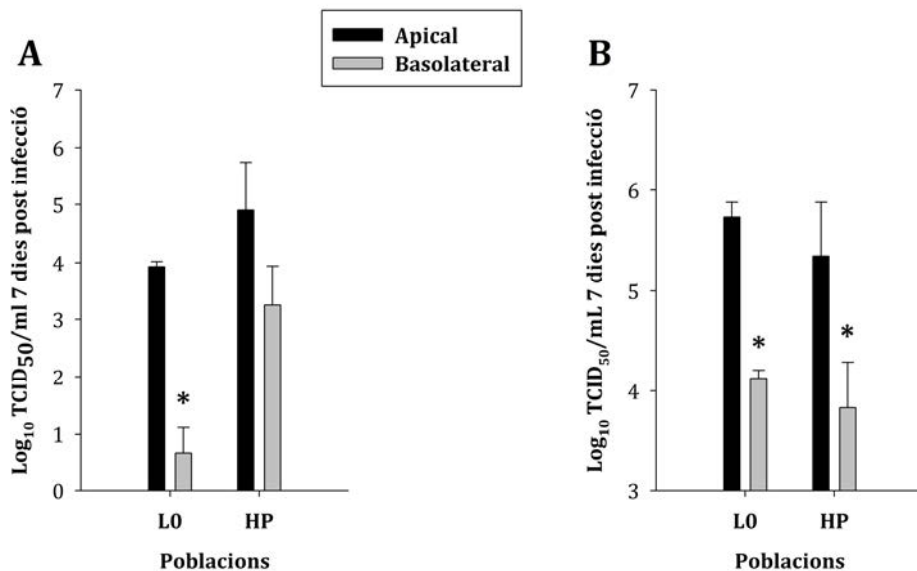


Figura 30. Sortida del virus de l'HAV en hepatòcits polaritzats *in vitro*. Els resultats mostren el Log₁₀ de la mitjana del títol infecció total a sobrenedant a 7 dies post infecció, mesurat per TCID₅₀, d'un total de 3 experiments independents amb 3 rèpliques cadascun i per cadascuna de les poblacions \pm l'error estàndard. **A.** Infecció a través de la membrana basolateral. **B.** Infecció a través de la membrana apical. El símbol * indica que hi ha significació estadística, $p < 0.05$.

Si anem a observar el percentatge de virus que surten per cadascuna de les vies, apical o basolateral, per cadascuna de les vies d'entrada, l'eficiència de sortida del les dues poblacions és significativament superior a través de la membrana apical, independentment de la via d'entrada (**Figura 31**).

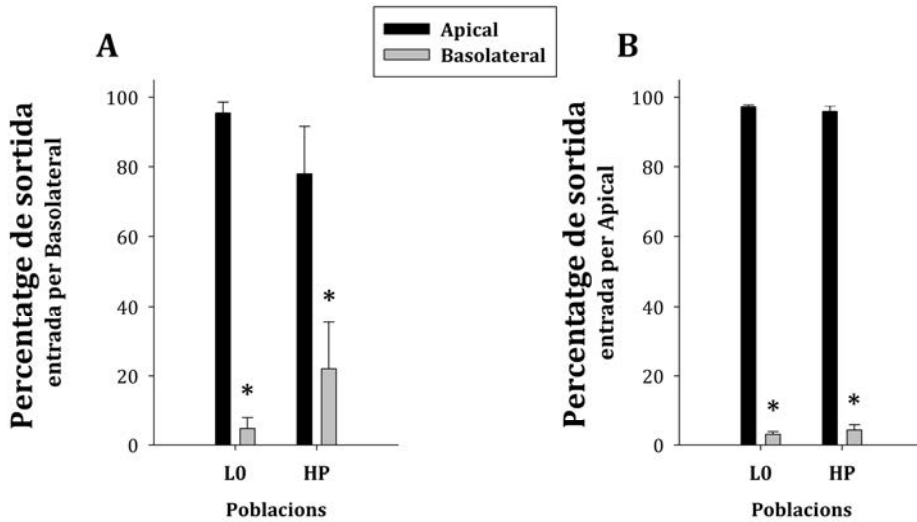


Figura 31. Eficiència de sortida del virus de l'HAV en hepatòcits polaritzats *in vitro*. Els resultats mostren el percentatge del Log₁₀ de la mitjana del títol infeccions total a sobrenedant a 7 dies post infecció, mesurat per TCID₅₀, d'un total de 3 experiments independents amb 3 rèpliques cadascun i per cadascuna de les poblacions ± l'error estàndard. **A.** Infecció a través de la membrana basolateral. **B.** Infecció a través de la membrana apical. El símbol * indica que hi ha significació estadística, p<0.05.

Amb el conjunt de resultats, podem afirmar que, tot i que en el cas de la població HP quan la entrada es dona per la membrana basolateral, la sortida per la membrana basolateral semblava igual a través dels dos dominis de l'hepatòcit, l'eficiència de sortida per a les dues poblacions del virus és major a través de la membrana apical (**Figura 31 A**). Aquests resultats indiquen que la sortida a través del domini basolateral és força ineficient i es donaria en condicions on la replicació del virus és molt elevada, tal i com observem amb la població HP. A més a més, la infecció

d'hepatòcits subjacents es podria donar tant per la membrana basolateral com per l'apical i facilitar així la propagació del virus en el fetge (**Figura 29 C i D**).

Per últim, es va decidir estudiar quina era la naturalesa d'aquestes partícules alliberades a sobrenedant en aquests sistemes de cultiu *in vitro* d'hepatòcits polaritzats. Tot i agrupar i concentrar les quantitats restants de sobrenedant després de la seva titulació per TCID₅₀ dels 3 experiments independents i les seves rèpliques, degut a les dificultats i les limitacions de la tècnica, només es va poder determinar el fenotip de les partícules provinents de la via més eficient (**Figura 29 D**). Es van realitzar els gradients d'iodixanol-sacarosa amb els sobrenedants obtinguts al compartiment apical del transwell provinents de la infecció a través de la membrana apical, per cadascuna de les poblacions de l'HAV.

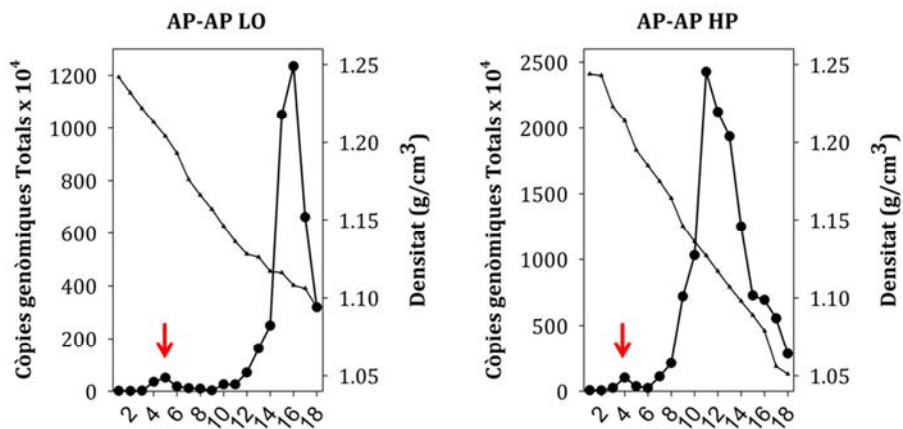


Figura 32. Naturalesa de les partícules alliberades a través de la membrana apical en hepatòcits polaritzats. Gradients d'iodixanol-sacarosa obtinguts concentrant els sobrenedants procedents de les rèpliques independents del transwell. S'observen els pics de partícules pseudoembolcallades (eHAV) en el rang de menor densitat 1.06-1.12g/cm³, i les partícules nues (HAV) en el rang de major densitat 1.20-1.25g/cm³ (↓).

Els gradients mostren que el fenotip majoritari continua essent el pseudoembolcallat (eHAV) per a les dues poblacions de l'HAV (**Figura 32, Taula 3**). No obstant, el percentatge de partícules nues és més elevat que en els gradients realitzats inicialment (**Taula 1**). Aquest percentatge, que continua essent lleugerament més elevat per a la població HP respecte la població L0, podria ser degut a la presència de sals biliars en aquests hepatòcits polaritzats *in vitro*. En assajos realitzats recentment amb hepatòcits polaritzats *in vitro*, s'ha descrit que aquestes sals podrien ser les causants de l'alteració de l'embolcall i la consegüent presència de partícules nues [54].

		HM175-L0	HM175-HP
AP-AP	eHAV	95.1 %	96.8 %
	HAV	4.9 %	3.2 %

Taula 3. Percentatges de partícules pseudoembolcallades (eHAV) i nues (HAV) alliberades a sobrenedant de cultiu cel·lular de les poblacions HM175-L0 i HM175-HP. Es mostra el percentatge dels dos fenotips del virus obtinguts dels gradients d'iodixanol sacarosa provinents de concentrar els sobrenedants de tots els experiments i rèpliques independents dels assajos amb transwell.

4.6 Alteració molecular de la via de sortida del virus de l'HAV com a base per a l'obtenció de potencials drogues antivirals multidiana

Els resultats obtinguts fins al moment sobre la via de sortida de la cèl·lula d'aquestes dues poblacions de l'HAV, ens va portar a pensar que la via de sortida del virus podria ser una bona diana per una teràpia antiviral. A més a més, la major eficiència de sortida de la cèl·lula per part de la població HM175-HP, ens donaria una prova rigorosa en l'estudi de l'eficàcia d'aquesta potencial teràpia antiviral.

Donat que amb el silenciament d'ALIX mitjançant siRNAs, els percentatges d'inhibició de la sortida del virus que es van obtenir no arribaven al 65% per a la població parental L0 i al 25% per l'HP, no el vam considerar una bona opció com a teràpia antiviral i vam decidir provar si obteníem una efectivitat major utilitzant agents químics. Es van escollir diferents drogues que poguessin alterar la via de sortida que segueix l'HAV en cèl·lules hepàtiques amb la finalitat d'obtenir un potencial antiviral basat principalment en la inhibició d'aquesta via de sortida.

Es va decidir seleccionar dues drogues que actuen a diferents nivells sobre la generació de vesícules del sistema d'endocitosi que el virus utilitza per sortir de la cèl·lula amb els seu fenotip pseudoembolcallat [17]. Per altra banda, és va seleccionar una tercera droga que actua a nivell dels lisosomes, donat que amb els resultats obtinguts no podem descartar la hipòtesi que les formes de sortida del virus dels hepatòcits infectats siguin a través de vies diferents d'exportació, amb l'eHAV alliberat via els cossos multivesiculars (MVB), i els virions nus via els lisosomes [261]. Encara que aquesta última via sigui minoritària, si la droga era efectiva, combinant-la amb la que ens funcione per la via dels MVB podríem cobrir les dues vies de sortida possibles del virus.

En primer lloc, vam escollir una droga que actuava directament sobre els cossos multivesiculars (MVB), la wortmanina, un inhibidor de la PI3K (fosfoinositol 3-quinasa). Aquesta quinasa és necessària durant la biogènesis dels MVB. Es conegut que aquesta droga inhibeix la PI3K amb la consegüent inhibició de la formació de les vesícules intraluminals del MVB, i com a resultat d'això es produeix la vacuolització d'aquests endosomes tardans i disminueix la secreció d'exosomes [281-284].

En segon lloc, vam decidir utilitzar la monensina, una droga que actua sobre el balanç osmòtic de les vesícules endolisosomals, el que es coneix com un ionòfor. El seu mecanisme d'acció es basa en alterar l'intercanvi de ions de sodi per hidrogen a través de les membranes vesiculars, el que provoca un ambient hiperosmòtic dins les vesícules i la seva posterior vacuolització (inflament). Les membranes d'aquestes vesícules alterades, ràpidament es conjuguen amb LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) induint-se la via d'autofàgia no canònica, una via alternativa a l'autofàgia clàssica. Aquesta via, afavoreix el trànsit de vesícules endolisosomals com els MVB cap a la degradació per autofàgia, evitant així el seu trànsit cap a la membrana plasmàtica i la secreció d'exosomes al espai extracel·lular [285–287].

Per últim vam escollir la bafilomicina A1, una droga que actua sobre la V-ATPasa lisosomal, la bomba de protons que s'encarrega de mantenir l'acidificació del lisosoma, el que es coneix com un agent lisosomotròpic. Aquesta droga actua inhibint aquesta bomba i com a conseqüència provoca un augment del pH del lisosoma que dona a lloc a la pèrdua de la seva capacitat enzimàtica i les seves funcions [288].

La concentració utilitzada de cada inhibidor es va determinar analitzant la viabilitat cel·lular d'un rang de 4 concentracions. El criteri establert per dur a terme els assajos d'inhibició de la sortida del virus, va ser utilitzar la major concentració d'inhibidor possible dins d'una viabilitat d'un mínim del 80% per tal d'assegurar-nos el major efecte possible en la nostra línia cel·lular Huh7-AI (**Figura 33**).

L'inhibidor es va afegir a les 24 hores post infecció per assegurar-nos que encara no s'ha produït la sortida de moltes de les partícules virals,

ja que si prenem com a referència els resultats obtinguts en la quantificació de l'expressió relativa d'ALIX (veure apartat 4.3, Figura 19), aquests ens indiquen que a 48 hores ja s'està produint un augment del mRNA d'aquesta proteïna implicada en la sortida del virus, el que es pot interpretar com que ja hi ha un nombre important de partícules virals sortint de la cèl·lula.

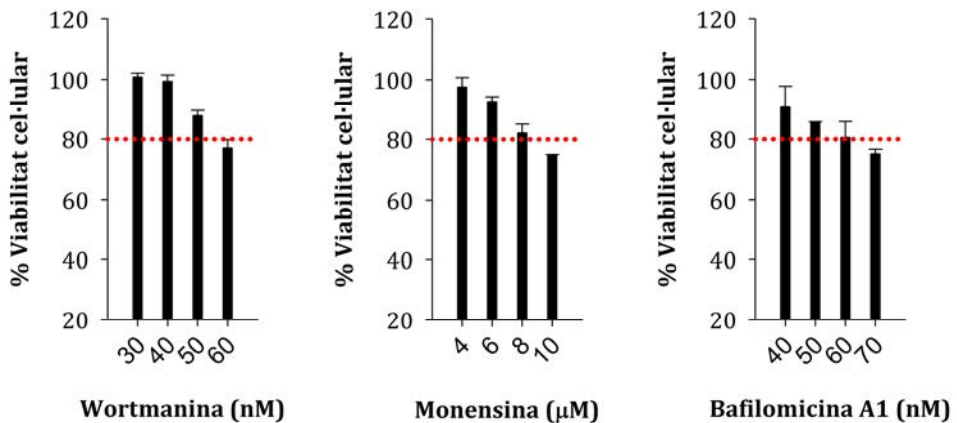


Figura 33. Citotoxicitat de les drogues en cèl·lules Huh7-AI. Cèl·lules amb medi de cultiu MEM al 2% FBS suplementat amb la concentració especificada de cadascuna de les drogues durant 24 hores. Els resultats mostren la mitjana del percentatge de cèl·lules viables, mesurat per duplicat, com s'indica a l'apartat 7.1.7, d'un total de 2 experiments independents amb dues rèpliques cadascun, per a cadascuna de les drogues i concentracions \pm l'error estàndard. La línia de punts vermella mostra el 80% de viabilitat establert com a criteri mínim per a la realització dels assajos d'inhibició de sortida.

Les concentracions escollides per cadascuna de les drogues van ser, 50 nM per la wortmanina, 8 μ M per la monensina i 60 nM per la bafilomicina A1, ja que per sobre d'aquests valors la viabilitat cel·lular ja no arribava al 80% establert (Figura 33). Tal i com es descriu més detalladament en l'apartat 7.10 de material i mètodes, es va infectar amb les dues poblacions del virus amb una MOI d'1 afegint la droga a les 24 hores post infecció, es va deixar replicar el virus amb presència de la droga un total de 24 hores més i es van quantificar les partícules infeccioses en el sobrenedant de cultiu cel·lular en cèl·lules amb presència i absència de la

droga, per tal de poder calcular el percentatge d'inhibició de la sortida del virus de la cèl·lula degut a l'acció de cadascuna de les drogues (**Figura 34**).

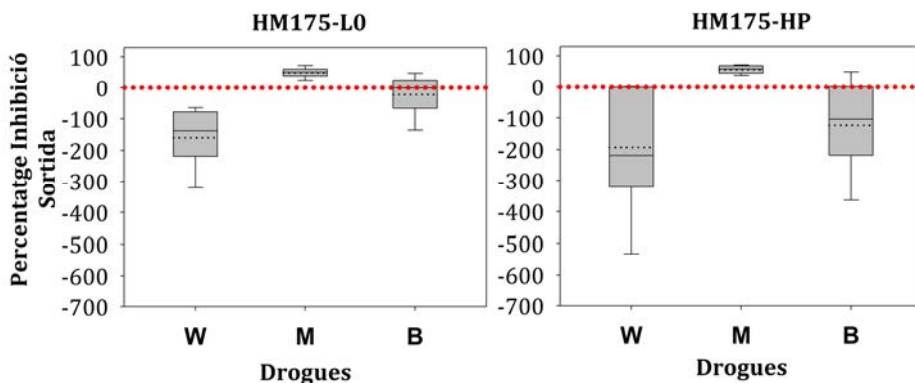


Figura 34. Percentatge d'inhibició de les drogues sobre la via de sortida de la cèl·lula de les poblacions L0 i HP del virus de l'HAV en cèl·lules hepàtiques. W, wortmanina 50nM; M, monensina 8µM; B, bafilomicina A1 60nM. Els box plots mostren la distribució dels valors dels percentatges d'inhibició corresponents a un mínim de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun per droga i població de l'HAV. El límit inferior de la caixa mostra el percentil 25, dins de la caixa la línia discontinua en punts mostra la mitjana aritmètica i la línia contínua la mediana del grup, el límit superior de la caixa mostra el percentil 75. Els bigotis per sota i per sobre de la caixa mostren els percentils 10 i 90, respectivament.

Els resultats obtinguts amb la wortmanina, l'inhibidor de la PI3K, mostren un augment sorprenent del virus a sobrenedant de cultiu tant per la població L0 com per la població HP, tot i que per aquesta última l'augment és major. La hipòtesi inicial plantejada sobre la PI3K per alterar la biogènesi dels cossos multivesiculars (MVB) i evitar així l'alliberament dels exosomes no és una bona estratègia per inhibir la sortida del virus de la cèl·lula, sinó tot el contrari, veiem com hi ha un augment sorprenentment elevat de virus a sobrenedant de cultiu (**Figura 34**).

En el cas de la monensina, el ionòfor que indueix l'autofàgia no canònica mitjançant l'alteració osmòtica dels cossos multivesiculars (MVB),

si que mostra un percentatge d'inhibició de la via de sortida del virus de la cèl·lula. El percentatge d'inhibició de les poblacions de l'HAV mostra un valor de mitjana de 49.57 ± 4.11 per a la població L0, i de 56.22 ± 3.24 per a la població HP (**Figura 34** i **Figura 35**). Tot i que la inhibició és parcial, veiem com la degradació dels cossos multivesiculars (MVB), induïda per la monensina en activar l'autofàgia no canònica, afecta més a la població HP que a la L0, però sense arribar a ser significatiu.

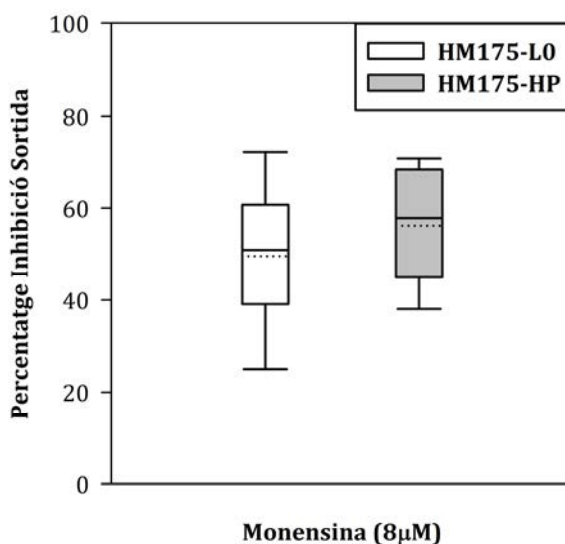


Figura 35. Percentatge d'inhibició de la monensina en la sortida de les poblacions L0 i HP de l'HAV en cèl·lules hepàtiques. Els box plots mostren la distribució dels valors dels percentatges d'inhibició corresponents a un mínim de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun per droga i població de l'HAV. El límit inferior de la caixa mostra el percentil 25, dins de la caixa la línia discontinua en punts mostra la mitjana aritmètica i la línia contínua la mediana del grup, el límit superior de la caixa mostra el percentil 75. Els bigotis per sota i per sobre de la caixa mostren els percentils 10 i 90, respectivament.

Pel que fa a la bafilomicina A1, l'inhibidor de la bomba de protons dels lisosomes, tampoc mostra inhibició sobre la via de sortida per a cap de les dues poblacions de l'HAV. Sorprenentment, tornem a observar un augment de virus en el sobrenedant de cultiu, tot i que no és tant elevat com en el cas de la wortmanina, i els valors tenen una distribució molt més

variable, arribant en alguns casos a inhibir la sortida (**Figura 34**). Tot i que alterant la funció dels lisosomes ja no esperàvem inhibir la via majoritària de sortida del virus de la cèl·lula, si esperàvem observar una caiguda minoritària representativa d'aquesta possible via de sortida de les partícules nues.

En resum, de les tres drogues escollides amb la idea de seguir diferents estratègies per alterar aquesta via de sortida de l'HAV de la cèl·lula, tan sols la monensina ens dona uns percentatges d'inhibició acceptables tan per a la població L0 com per la població HP.

4.6.1 Efecte de les potencials drogues antivirals sobre les fases inicials del cicle del virus de l'HAV

Donat que les drogues que actuen sobre les vesícules del sistema d'endocitosi poden alterar des de les vesícules més tempranes d'entrada a la cèl·lula fins a les més tardanes, incloent l'alliberament dels exosomes, vam voler aprofitar aquesta característica per testar aquestes drogues, basades principalment en la inhibició de la via de sortida, en les fases més inicials del cicle de l'HAV, amb la idea de trobar una droga que ens inhibís diferents etapes del cicle del virus per poder-la proposar com un potencial antiviral multidiana per a l'HAV.

Les concentracions a les que es van utilitzar les drogues van ser les mateixes que en els assajos de sortida, 50 nM per la wortmanina, 8 µM per la monensina i 60 nM per la bafilomicina A1, amb la diferència que en aquest cas és van pre-incubar les cèl·lules abans de la infecció durant 2 hores amb les drogues corresponents. Tal i com es descriu més detalladament en l'apartat **7.10** de material i mètodes, és va infectar amb

les dues poblacions del virus a una MOI d'1 i es va suplementar el medi post infecció amb la droga corresponent durant 21 hores més, un cop retirat el medi amb la droga, es va afegir medi fresc deixant replicar el virus durant 24 hores abans de quantificar les partícules infeccioses després de tres cicles de congelació - descongelació de les cèl·lules. Igual que en els assajos de sortida, es va realitzar el mateix protocol en paral·lel amb cèl·lules sense la presència de la droga per tal de poder calcular posteriorment el percentatge d'inhibició de les fases inicials del cicle de l'HAV degut a l'acció de cadascuna de les drogues (**Figura 36**).

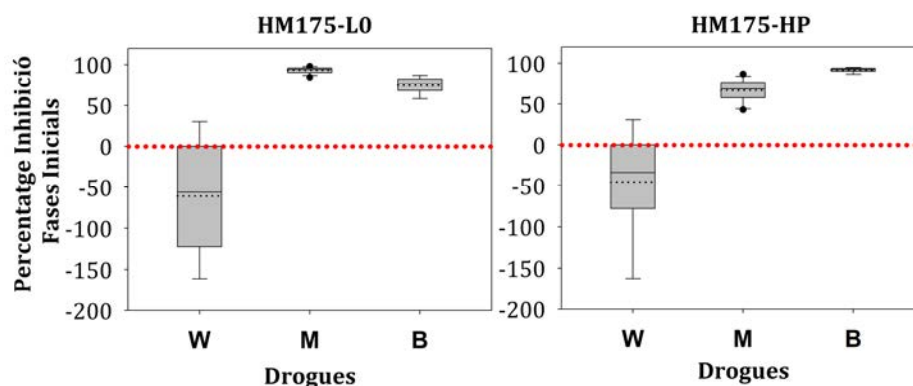


Figura 36. Percentatge d'inhibició de les drogues sobre les fases inicials del cicle de l'HAV de les poblacions L0 i HP en cèl·lules hepàtiques. W, wortmanina 50nM; M, monensina 8µM; B, bafilomicina A1 60nM. Els box plots mostren la distribució dels valors dels percentatges d'inhibició corresponents a un mínim de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun per droga i població de l'HAV. El límit inferior de la caixa mostra el percentil 25, dins de la caixa la línia discontinua en punts mostra la mitjana aritmètica i la línia contínua la mediana del grup, el límit superior de la caixa mostra el percentil 75. Els bigotis per sota i per sobre de la caixa mostren els percentils 10 i 90, respectivament. Els punts inferior i superior als bigotis mostren el percentil 5 i 95, respectivament.

Observant els resultats obtinguts amb la wortmanina, l'inhibidor de la PI3K veiem, una vegada més, un augment de virus infecciosos, tant per la població L0 com per la població HP (**Figura 36**).

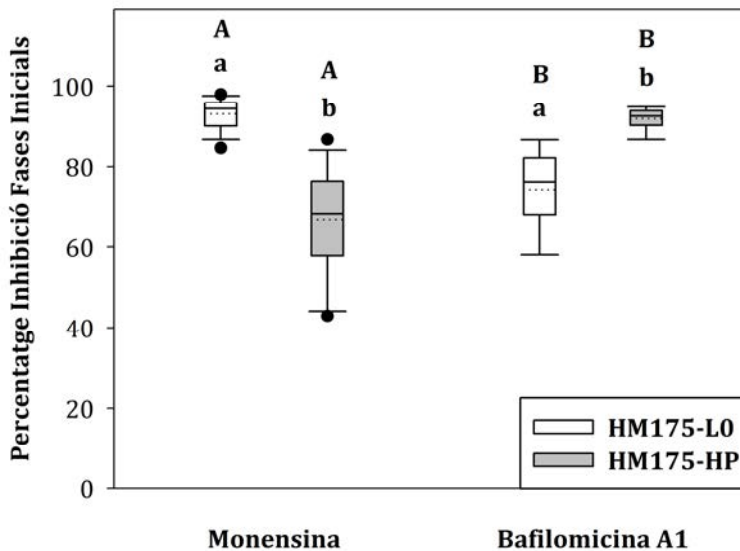


Figura 37. Percentatge d'inhibició de la monensina i la bafilomicina A1 en l'entrada de les poblacions L0 i HP de l'HAV en cèl·lules hepàtiques. Els box plots mostren la distribució dels valors dels percentatges d'inhibició corresponents a un mínim de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun per droga i població de l'HAV. El límit inferior de la caixa mostra el percentil 25, dins de la caixa la línia discontinua en punts mostra la mitjana aritmètica i la línia contínua la mediana del grup, el límit superior de la caixa mostra el percentil 75. Els bigotis per sota i per sobre de la caixa mostren els percentils 10 i 90, respectivament. Els punts inferior i superior als bigotis mostren el percentil 5 i 95, respectivament. Les diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) entre poblacions de virus per un mateix inhibidor s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres $a \neq b$ en minúscula. Les diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) d'una mateixa població de virus entre inhibidors diferents s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres $A \neq B$ en majúscules.

Pel que fa a la monensina, aquesta droga mostra un percentatge d'inhibició de les fases d'entrada significativament superior en la població L0 respecte la HP, amb valors de 93.10 ± 0.64 i 66.69 ± 2.26 , respectivament ($p < 0.01$). En canvi, la bafilomicina A1 mostra un percentatge d'inhibició de les fases d'entrada del cicle de l'HAV significativament major per a la població HP respecte la L0, amb valors de 91.89 ± 0.65 i 74.30 ± 2.30 , respectivament ($p < 0.01$) (**Figura 37**). Dit d'una altra manera, la monensina mostra un percentatge d'inhibició en les fases d'entrada significativament superior al de la bafilomicina per a la població L0, i per tant seria un millor inhibidor en aquesta etapa del cicle del virus per a aquesta població de

l'HAV ($p < 0.05$) (**Figura 37**). Per a la població HP, en canvi, és la bacilomicina A1 la que mostra un percentatge d'inhibició en les fases d'entrada significativament superior respecte la monensina, i per tant seria un millor inhibidor en aquesta etapa del cicle del virus per a aquesta població de l'HAV ($p < 0.05$) (**Figura 37**).

Amb el conjunt de resultats obtinguts amb els assajos de la sortida i els de les fases d'entrada, semblaria que la monensina és el millor candidat com a potencial antiviral multidiana del virus de l'HAV en hepatòcits humans.

4.6.2 Efecte de les potencials drogues antivirals sobre l'IRES del virus de l'HAV

Per últim, donat que moltes de les estratègies antivirals que s'han intentat fins al moment contra el virus de l'HAV anaven dirigides a inhibir l'activitat del seu IRES, i ja que aquest és un factor essencial en el cicle de replicació del virus [178,184,289,290], vam decidir estudiar si aquestes drogues podien tenir algun efecte sobre l'activitat del IRES de les poblacions L0 i HP de l'HAV.

Al laboratori es disposava de plasmidis bicistrònics que contenen l'IRES de les poblacions L0 i HP, anomenats G1RL0 i G1R ϕ 16, respectivament [217]. Aquests plasmidis, porten una còpia del gen que codifica per la luciferasa de *Photinus pyralis* (FLuc) i una altra del gen de la luciferasa de *Renilla reniformis* (RLuc). El gen FLuc és traduït a partir de l'IRES de l'HAV, mentre que la traducció del gen RLuc és *cap* dependent. D'aquesta manera, la relació FLuc/RLuc representa l'activitat de l'IRES

normalitzada amb respecte a la quantitat de RNA transcrit a partir del plasmidi present a la cèl·lula.

Per avaluar l'efecte sobre l'activitat de l'IRES de l'HAV es van transfectar de manera transitòria cèl·lules Huh7-AI amb els dos plasmidis, tal i com es detalla en l'apartat **7.11.4** de material i mètodes. La concentració de les drogues wortmanina, monensina i bafilomicina utilitzada va ser la mateixa que ens els assajos anteriors de la sortida i les fases inicials del cicle del virus de l'HAV. Les drogues es van afegir 6 hores després de la transfecció i es van deixar fins al moment de la mesura de l'activitat bioluminescent, 24 hores després de la transfecció. L'activitat bioluminescent de la FLuc i la RLuc es va mesurar en els lisats de cèl·lules Huh7-AI amb presència i absència de les drogues, per tal de poder calcular posteriorment el percentatge d'inhibició de l'activitat de l'IRES degut a l'acció de cadascuna de les drogues. Es van realitzar 5 experiments independents per a cada plasmidi amb dues replics cadascun i en cadascuna de les condicions.

Malauradament, cap de les drogues utilitzades en els assajos d'inhibició de la sortida i les fases inicials del cicle del virus, mostren un percentatge d'inhibició clar de l'activitat de l'IRES, per cap de les dues poblacions de l'HAV (**Figura 38 A**).

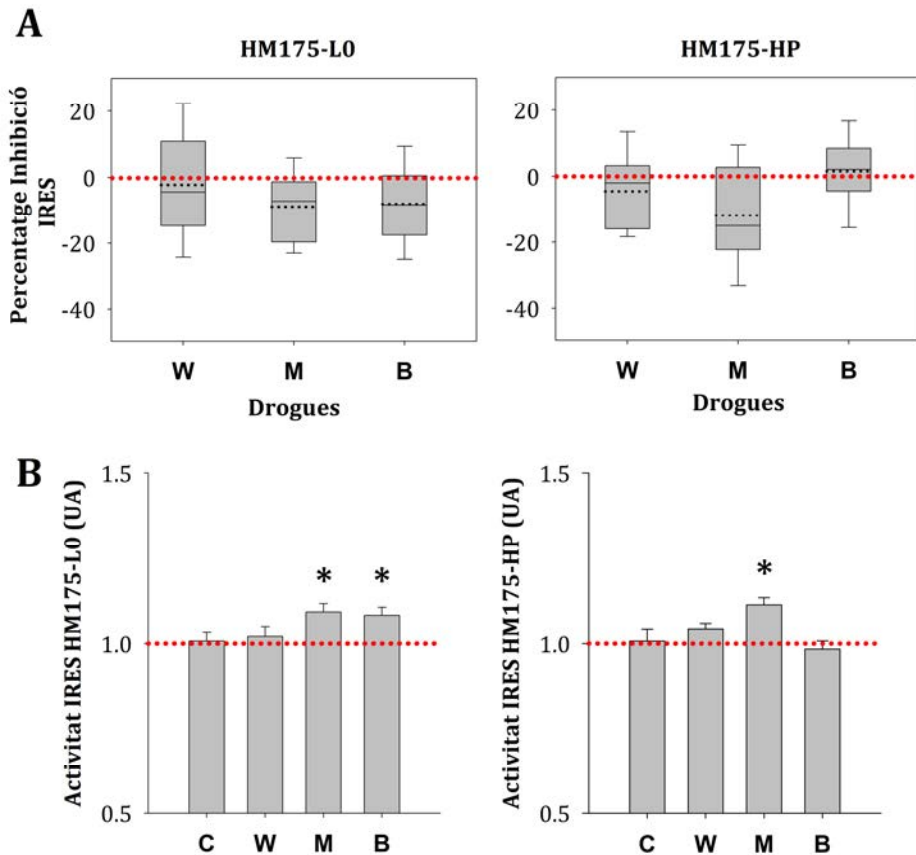


Figura 38. Efecte de les drogues sobre l'IRES de les poblacions L0 i HP de l'HAV en cèl·lules hepàtiques. A. Percentatge d'inhibició de les drogues sobre l'activitat de l'IRES. W, wortmanina 50nM; M, monensina 8 μ M; B, bafilomicina A1 60nM. Els box plots mostren la distribució dels valors dels percentatges d'inhibició corresponents a 5 experiments independents amb dues rèpliques cadascun. El límit inferior de la caixa mostra el percentil 25, dins de la caixa la línia discontinua en punts mostra la mitjana aritmètica i la línia contínua la mediana del grup, el límit superior de la caixa mostra el percentil 75. Els bigotis per sota i per sobre de la caixa mostren els percentils 10 i 90, respectivament. Els punts inferior i superior als bigotis mostren el percentil 5 i 95, respectivament. **B. Activitat relativa de l'IRES sota l'efecte de les drogues.** C, Control sense droga; W, wortmanina 50nM; M, monensina 8 μ M; B, bafilomicina A1 60nM. Es mostra el valor de la mitjana \pm l'error estàndard. El càlcul de l'activitat relativa de l'IRES sota l'efecte de les drogues es va obtenir dividint cada valor FLuc/RLuc per la mitjana dels valors de FLuc/RLuc del plasmidi sense droga, i es va expressar com a unitats arbitràries (UA) [25]. Es van realitzar 5 experiments independents per a cada plasmidi amb dues rèpliques en cadascun i amb cadascuna de les condicions. El símbol * indica que hi ha significació estadística, $p < 0.05$.

No obstant, la bafilomicina A1 és la droga que mostra un major percentatge d'inhibició de l'IRES i una menor activitat relativa de l'IRES en la població HP (**Figura 38**). En canvi, en la població L0 la bafilomicina A1 mostra un augment significatiu de l'activitat relativa de l'IRES respecte el control sense droga ($p < 0.05$) (**Figura 38 B**). El conjunt d'aquests resultats ens explica perquè la bafilomicina A1 funciona com un millor inhibidor de les fases inicials del cicle del virus per a la població HP respecte la L0 (**Figura 36**), ja que la traducció dirigida per l'IRES es dona dins d'aquestes fases inicials del cicle del virus de l'HAV (**Figura 5**).

De la mateixa manera, la monensina mostra un increment significatiu de l'activitat relativa de l'IRES en les dues poblacions de l'HAV ($p < 0.05$) (**Figura 38 B**). Aquest increment en l'activitat relativa de l'IRES, es tradueix en un percentatge d'inhibició de l'IRES, per part d'aquesta droga, negatiu. Aquesta increment és major en la població HP que en la L0, i el consegüent percentatge d'inhibició és més negatiu per HP que per L0. Aquests resultats ens expliquen perquè la monensina mostra un percentatge d'inhibició de les fases inicials del cicle del virus menor per a la població HP respecte la L0 (**Figura 36**).

Amb el conjunt dels resultats de les tres drogues sobre les diferents dianes, degut a la seva efectivitat en la inhibició tan de la sortida com de les fases inicials del cicle del virus, tot i la inesperada activació de l'IRES, podem afirmar que el millor candidat com a potencial antiviral multidiana per al virus de l'HAV és la monensina.

4.6.3 Estudi de la capacitat d'inducció d'autofàgia no canònica de la monensina mitjançant microscòpia confocal de la proteïna cel·lular LC3b en el model cel·lular Huh7-AI

Finalment es va comprovar la capacitat d'inducció d'autofàgia no canònica per part de la monensina, la droga seleccionada com a potencial antiviral multidiana del virus de l'HAV. La monensina, tal com s'ha comentat anteriorment provoca un desequilibri en el balanç osmòtic de les vesícules endolisosomals (MVB), alterant l'intercanvi de ions de sodi per hidrogen a través de les membranes vesiculars. Aquest desequilibri provoca un ambient hiperosmòtic dins les vesícules que dona lloc a la seva vacuolització (inflament). Les membranes d'aquestes vesícules alterades, ràpidament son conjugades amb LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) induint la via d'autofàgia no canònica, la qual afavoreix el trànsit de vesícules endolisosomals com els MVB cap a la degradació per autofàgia [285–287].

Per observar la capacitat de la monensina d'induir aquest tipus d'autofàgia no canònica que dona lloc a la degradació del virus, es va utilitzar una immunofluorescència de doble marcatge analitzada per microscòpia confocal del marcadore d'autofàgia LC3b i del virus de l'HAV, en les cèl·lules Huh7-AI tractades amb la droga. Es van infectar monocapes de cèl·lules Huh7-AI un cop havien assolit la confluència, amb les dues poblacions del virus amb una MOI de 5. A les 24 hores post infecció es va afegir la mateixa concentració de monensina utilitzada en els assajos anteriors d'inhibició de la sortida i es va deixar replicar el virus durant 48 hores més. Posteriorment es va realitzar el protocol d'immunofluorescència indirecta de doble marcatge, detallat a l'apartat 7.12 de material i mètodes.

Com a controls de l'experiment i per tal de valorar el grau d'inducció d'autofàgia no canònica degut a l'efecte de la droga, es va realitzar el mateix protocol d'immunofluorescència en cèl·lules Huh7-AI sense infectar amb absència (**Figura 39 A**) i presència (**Figura 39 B**) de la droga, i en cèl·lules infectades amb cadascuna de les poblacions del virus sense la droga.

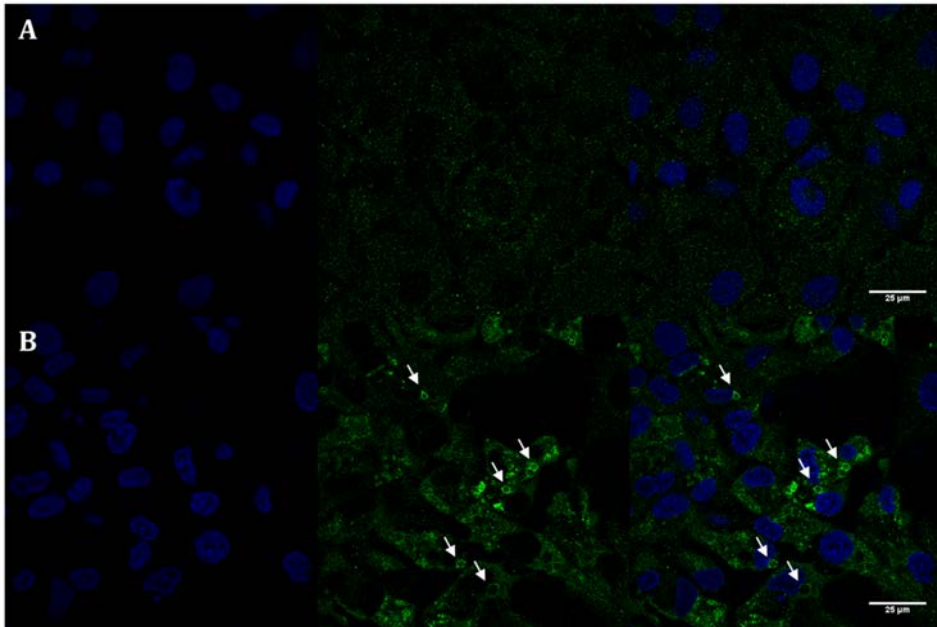


Figura 39. Inducció de l'autofàgia no canònica amb monensina en cèl·lules Huh7-AI. LC3b, en verd; HAV, en vermell; Nucli, en blau. Vesícules endolisomals (↓). **A.** Cèl·lules sense monensina. **B.** Cèl·lules amb 8μM de monensina. Seccions horitzontals XY. Barra d'escala, 25 μm. Talls preses a una distància de 0.12 μm entre ells. Imatges representatives d'un mínim de dos experiments independents.

Les imatges de microscòpia confocal mostren un clar augment del marcatge de LC3b en presència de la droga en les cèl·lules Huh7-AI no infectades. A més a més, el marcatge presenta un canvi de distribució mostrant àrees on LC3b es troba molt més localitzat marcant les membranes del que podrien ser vesícules endolisomals (↓) [285–287].

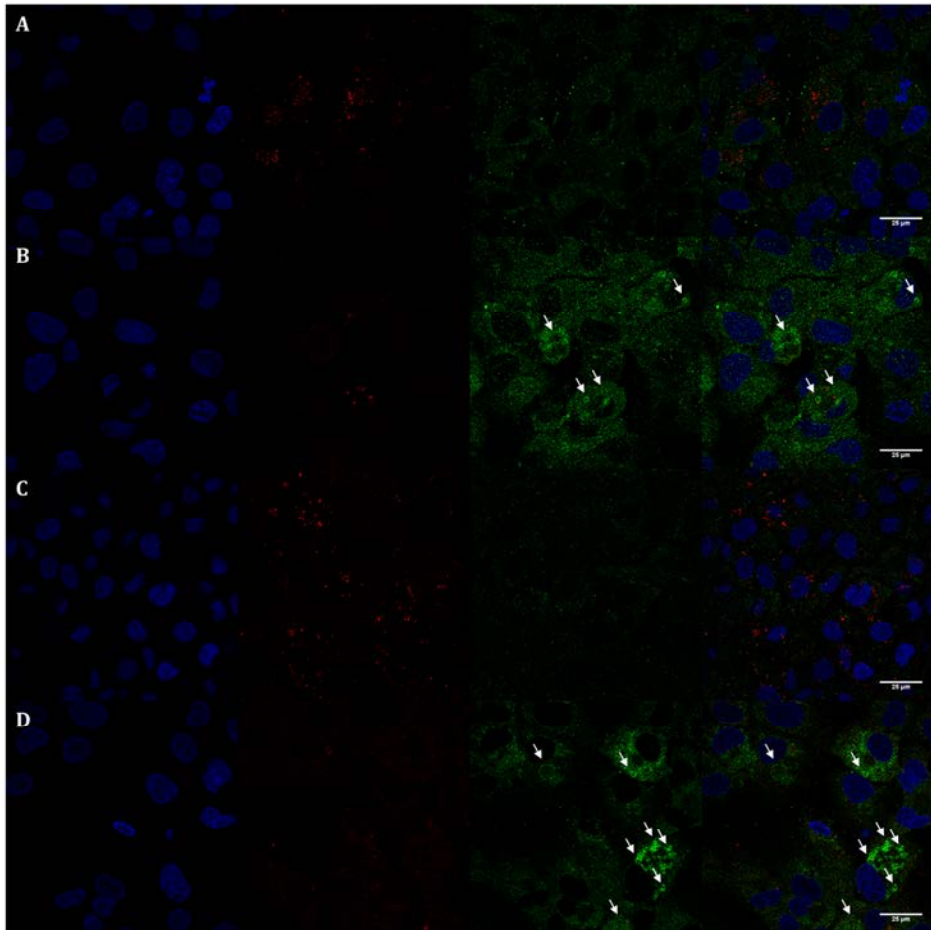


Figura 40. Inducció de l'autofàgia no canònica amb monensina i efecte sobre el virus de l'HAV en cèl·lules Huh7-AI. LC3b, en verd; HAV, en vermell; Nucli, en blau. Vesícules endolisosomals (↓). **A** Cèl·lules infectades amb la població L0 a 72 hores post infecció sense monensina. **B.** Cèl·lules infectades amb la població L0 a 72 hores post infecció amb $8\mu\text{M}$ de monensina. **C.** Cèl·lules infectades amb la població HP a 72 hores post infecció sense monensina. **D.** Cèl·lules infectades amb la població HP a 72 hores post infecció amb $8\mu\text{M}$ de monensina. Seccions horitzontals XY. Barra d'escala, $25\ \mu\text{m}$. Talls presos a una distància de $0.12\ \mu\text{m}$ entre ells. Imatges representatives d'un mínim de dos experiments independents.

Les imatges de les cèl·lules Huh7-AI infectades amb l'HAV mostren com la presència del virus disminueix notablement en presència de la droga, tan per la població L0 (**Figura 40 A i B**) com per l'HP (**Figura 40 C i D**). El marcatge de LC3b en les cèl·lules infectades també mostra aquest canvi de distribució amb presència de monensina, concentrant-se al voltant de les

vesícules endolisosomals (↓). No s'observa colocalització directa de la proteïna LC3b amb la càpsida viral degut a que el virus no interacciona directament amb aquesta proteïna. Amb el conjunt d'aquests resultats podem afirmar que la monensina indueix l'autofàgia no canònica que dona lloc a la degradació d'aquestes dues poblacions de l'HAV i la consegüent disminució del seu títol viral en els sobrenedants de cultiu (**Figura 35**).

5. DISCUSSIÓ



En els darrers anys, la via de sortida del virus de l'HAV ha generat nombroses controvèrsies sobre el seu cicle. Arrel del descobriment per part del grup d'Stanley Lemon l'any 2013 de l'existència de partícules de l'HAV embolcallades per membranes derivades de la cèl·lula [17], s'ha produït un canvi de paradigma molt important en l'estudi de l'HAV. La biogènesi d'aquestes partícules pseudoembolcallades depèn, entre d'altres, de la proteïna ALIX associada al complex ESCRT. El nostre estudi aporta novetats importants sobre el paper que desenvolupa la proteïna cel·lular ALIX durant la sortida de la cèl·lula d'aquestes partícules pseudoembolcallades de l'HAV.

Estudis *in vitro* amb les línies de cultiu cel·lular Huh-7.5, HepG2, MRC-5 i BSC-1, han demostrat que el fenotip pseudoembolcallat de l'HAV és el majoritari en els sobrenedants de cultiu cel·lular obtinguts infectant tan amb la soca citopatogènica, HM175/18f, com amb la no citopatogènica HM175/p16 de l'HAV [17]. Les nostres dades corroboren que aquest fenotip pseudoembolcallat, anomenat amb les sigles eHAV, també és el majoritari en el sobrenedants d'assajos *in vitro* realitzats amb cèl·lules FRhK-4 i Huh7-AI infectades amb dues poblacions de l'HAV derivades de la soca citopatogènica HM-175/43c, la HM175-L0 i la HM175-HP [72,96,217].

La població de *fitness* alt HM175-HP, mostra a més, un major percentatge d'aquestes partícules pseudoembolcallades (eHAV) respecte la població parental HM175-L0, en el model cel·lular Huh7-AI. Una mutació en la posició 134 de VP2, molt propera als residus 144-149 (4.5 Å de distància) del primer dels dominis d'unió (*late domains*) a ALIX [17], dona lloc a un canvi d'aminoàcid no conservatiu d'una serina (S) per una glicina (G). Aquest canvi li confereix més flexibilitat i podria facilitar la interacció de la proteïna ALIX amb la càpsida de la població HP, facilitant així la seva sortida

de la cèl·lula a través dels cossos multivesiculars. D'altra banda, aquesta població també mostra un major percentatge d'eHAV en el model cel·lular Huh7-AI respecte el model FRhK-4, el que fa pensar que no seria només la potencial mutació en la càpsida del virus el que fa que aquest percentatge de partícules pseudoembolcallades (eHAV) sigui més elevat, sinó que el model cel·lular hi juga un paper important. Les cèl·lules hepàtiques es caracteritzen per tenir una gran capacitat secretora, això sumat al fet que el model cel·lular Huh7-AI està format per cèl·lules tumorals, les quals sintetitzen una major quantitat d'exosomes, podria explicar perquè aquest major percentatge de partícules pseudoembolcallades per part de la població HP només l'observem en el model cel·lular Huh7-AI [291–293].

L'estudi d'immunofluorescència confocal utilitzat per analitzar el paper d'ALIX durant les fases finals del cicle del virus de l'HAV en cèl·lules Huh7-AI infectades amb les poblacions L0 i HP, mostra com la proteïna ALIX i la càpsida del virus colocalitzen en les dues poblacions de l'HAV. Aquests resultats posen en evidència una vegada més la participació de la proteïna ALIX en la via de sortida de la cèl·lula de l'HAV [17].

Per altra banda, d'aquest estudi destaca també, la ràpida i elevada replicació de la població HP respecte la L0 en cèl·lules Huh7-AI, indicant que aquest augment en la velocitat de replicació de la població HP no és exclusiu de la línia cel·lular FRhK-4, a la qual es troba adaptada [217].

La dinàmica que segueix la proteïna ALIX *in vitro* en cèl·lules Huh7-AI infectades amb aquestes dues poblacions de l'HAV guarda relació amb el nivell i la velocitat de replicació característics de cadascuna d'elles. La població HP mostra una proporció de càpsides colocalitzant amb la proteïna ALIX que es manté constant en els dos temps post infecció, en canvi per a la

població L0 aquesta proporció cau a les 72 hores post infecció, coincidint amb l'augment del títol viral d'aquesta població. Aquesta caiguda fa que la proporció de càpsides de la població HP colocalitzant amb ALIX a 72 hores post infecció sigui major que per a la població L0. En condicions on les dues poblacions mostren un nivell elevat de replicació viral, les càpsides de la població HP semblen tenir més afinitat per la proteïna ALIX que les de la L0.

La proporció de proteïna ALIX que colocalitza amb la càpsida de la població HP és manté constant en els dos temps post infecció, en canvi per a la població L0 aquesta tendeix a augmentar a les 72 hores post infecció, coincidint amb l'augment en l'expressió d'ALIX en cèl·lules infectades amb aquesta població. Aquest augment fa que la proporció d'ALIX que colocalitza amb la càpsida de la població HP sigui menor que per L0, posant de manifest la major quantitat total d'ALIX en cèl·lules infectades amb la població HP respecte L0 en els dos temps post infecció.

Els nivells d'expressió d'ALIX mostren una relació directa amb el nivell de replicació de cadascuna de les poblacions de l'HAV. ALIX és la proteïna associada al sistema ESCRT que interacciona i s'encarrega de classificar el *cargo* per introduir-lo dins les vesícules intraluminals (exosomes) dels cossos multivesiculars (MVB) [249,250,294,295], que en el cas de l'HAV són les càpsides virals [17,245]. Amb els resultats observats, sembla que la cèl·lula respon expressant una major quantitat d'ALIX per poder carregar dins les vesícules intraluminals totes les càpsides produïdes pel virus, les quals posteriorment seran alliberades al espai extracel·lular a través de la fusió dels cossos multivesiculars (MVB) amb la membrana plasmàtica. La població HP, degut a que té un nivell de replicació major, produeix una major quantitat de càpsides per cèl·lula respecte la població parental L0 [217]. Aquesta major replicació coincideix amb uns nivells

d'expressió d'ALIX en cèl·lules Huh7-AI infectades amb la població HP més elevats que quan es troben infectades amb L0. Fins al moment, exceptuant alguns estudis que relacionen una major expressió d'ALIX amb la mort cel·lular en neurones *in vivo* [296,297], la regulació de la síntesi de la proteïna ALIX és encara un terreny força desconegut. No obstant, s'ha demostrat que hi ha una autoregulació de la conformació i l'activitat d'ALIX per part del seu domini ric en prolines (*PRR*) [298,299]. ALIX està formada per tres dominis; el domini *Bro1* mitjançant el qual interacciona amb la proteïna CHMP4 del complex ESCRT-III, el domini *V* mitjançant el qual interacciona amb els *late domains* YPX_{1/3}L, i el domini *PRR* implicat en la regulació d'ALIX i lloc d'unió amb ESCRT-I i amb múltiples *late domains*. L'autoinhibició d'ALIX es dona per la interacció entre el domini *PRR* amb el *Bro1*, la qual dona lloc a un tancament en la conformació que impedeix la interacció amb CHMP4 i amb els *late domains* YPX_{1/3}L [245,300–302]. En condicions normals ALIX es troba present al citosol en forma de monòmer amb la seva conformació tancada. Quan ALIX dimeritza a través del seus dominis *V* i *PRR* adquireix la seva conformació activa [303,304] (**Figura 41**). El procés mitjançant el qual es produeix aquesta dimerització encara no es coneix [245]. ALIX intervé en molts processos d'escissió de les membranes entre els quals destaquen la citocinesi, l'alliberament dels retrovirus i el trànsit endolisosomal de receptors [294,305]. La regulació de l'activació d'ALIX en els processos de citocinesi i alliberament de retrovirus es dona mitjançant un mecanisme de fosforilació dels residus S718-S721 del domini *PRR* que dona lloc a la configuració oberta d'ALIX i n'evita la autoinhibició [299]. Per al trànsit endolisosomal de receptors que es dona mitjançant la formació de vesícules intraluminals en els MVB, la regulació de l'activació d'ALIX es dona mitjançant la interacció de la proteïna ALG-2 (*apoptosis-linked gene 2 product*) amb el domini *PRR* en un procés dependent de calci [298].

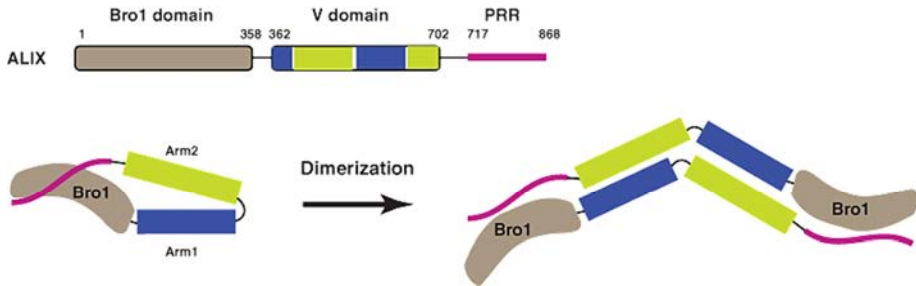


Figura 41. Organització dels dominis i conformacions de la proteïna ALIX. Domini Bro1 amb marró, domini V amb (blau; braç 1 i verd; braç 2) i domini PRR amb rosa. A l'esquerra representació esquemàtica de la conformació tancada en forma de monòmer. A la dreta representació esquemàtica de la conformació activa en forma de dímer. Imatge adaptada de [245].

Per altra banda en estudis recents s'ha descrit que en absència de *cargo* la formació de les vesícules intraluminals disminueix, es a dir, els exosomes no es formen si no hi ha alguna cosa per transportar [249]. Una de les moltes funcions de la proteïna ALIX, és actuar com a factor de classificació de proteïnes vacuolars de classe E, aquests factors s'ha descrit que són necessaris per la formació de vesícules intraluminals dins els MVB [306–309]. Els motius d'unió a ALIX, YPX_{1/3}L i la ubiquïtina són fins al moment els únics senyals coneguts que activarien la formació d'aquestes vesícules intraluminals [249,295]. La càpsida del virus de l'HAV presenta aquests motius d'unió YPX₃L en la proteïna VP2, els quals promourien la formació d'exosomes a través del sistema ESCRT-III mitjançant la seva unió amb el domini V d'ALIX. A mesura que augmenta el nombre de càpsides generades pel virus hi haurà una major demanda d'ALIX per part de la cèl·lula, i aquesta podria respondre augmentant-ne la seva síntesi. La població HP genera un major nombre de càpsides que poden fer que aquest augment sigui superior.

La contribució del virus en la colocalització és la mateixa per part de les dues poblacions de l'HAV i mostra una tendència a disminuir a mesura que augmenta el nivell d'expressió d'ALIX, especialment en les cèl·lules infectades amb la població L0, on l'augment d'ALIX és major que en les infectades amb HP. La contribució d'ALIX en canvi, tendeix a augmentar a mesura que augmenta l'expressió d'ALIX per a les dues poblacions del virus. No obstant, en la població HP aquest augment posa de manifest una major contribució d'ALIX en la colocalització respecte L0, indicant una millor capacitat d'interacció amb ALIX per part d'aquesta població. La correlació entre l'expressió d'ALIX i el títol viral de la població HP també mostra una major expressió per unitat de virus d'aquesta població respecte la L0. Aquestes diferències confirmen que els canvis en la conformació de la càpsida de la població HP, especialment la mutació propera a la tirosina del domini YPHGLL d'unió amb ALIX (4,5 Å), li confereixen una major flexibilitat i faciliten la interacció amb aquesta proteïna intracel·lular. Estudis amb els virus de l'ebola (EbVP40) i el virus de la immunodeficiència humana (HIV-1) mostren com la seqüència YPX_nL dels *late domains* és l'element que reconeix el domini V d'ALIX, però l'afinitat de la interacció es troba modulada pel context on es presenta aquesta seqüència [310,311].

Molts virus embolcallats, incloent els retrovirus [312–318], alguns rhabdovirus [319], filovirus [320–323], arenavirus [324] i alguns ortomixovirus [325], presenten *late domains* mitjançant els quals segresten la maquinària cel·lular ESCRT per facilitar el seu alliberament de la cèl·lula. El mecanisme que utilitza el virus de l'HAV és similar a l'utilitzat pels virus embolcallats però la seva sortida es dona a través dels MVB dins les vesícules intraluminals. Quantes més vesícules és formin, major serà la quantitat d'exosomes que els MVB alliberaran al espai extracel·lular quan es fusionin amb la membrana plasmàtica. Aquest és el mecanisme mitjançant

el qual semblaria que la població HP aconseguix aquesta major eficiència de sortida de la cèl·lula en forma de virus pseudoembolcallat (eHAV).

En condicions de silenciament gènic d'ALIX la quantitat de virus alliberats a l'espai extracel·lular disminueix notablement per a la població parental L0, en canvi per a la població de HP aquesta disminució és molt menor. Els nivells de silenciament que s'aconsegueixen mitjançant siRNA no permeten inhibir completament la traducció [326–328]. En el cas de la població HP, la qual mostra una major afinitat amb la proteïna ALIX, això pot fer que tot hi haver-hi poca quantitat de proteïna ALIX, el virus pugui aprofitar-la millor i no mostri una disminució tant accentuada de partícules al espai extracel·lular.

Per a la població parental L0, sota condicions de silenciament d'ALIX, es veu afectat l'alliberament dels dos fenotips del virus, tal i com s'ha descrit amb la soca HM175/p16 de l'HAV [17]. Aquests resultats suggereixen que ALIX podria estar implicada en la via de sortida dels dos fenotips del virus de l'HAV per a la població L0, reforçant la hipòtesi que el virus sortiria per una única via com a fenotip pseudoembolcallat, el qual perdria per l'acció de les sals biliars [17,54]. No obstant, per a la població HP, la poca caiguda que s'observa és major en el pic de les partícules pseudoembolcallades que en el de les nues. Per tant, en el cas d'aquesta població no es pot assegurar que aquesta sigui la única via que utilitza el virus per sortir de la cèl·lula. En aquest cas, cobra força la hipòtesi sobre la possible sortida del virus a través de dues vies diferents en funció del seu fenotip, l'eHAV alliberat a la sang a través de la membrana basolateral via ALIX i els MVB, i els virions nus a la bilis a través de la membrana apical via els lisosomes [57,261].

La biogènesis d'aquests dos fenotips de l'HAV durant el seu cicle enterohepàtic es troba envoltada d'importants incògnites. Tot i que el mecanisme que utilitza el virus per arribar fins a fetge té encara molts interrogants, el model més acceptat fins al moment es basa en l'existència d'un cicle enterohepàtic [231], en el qual la progènie vírica es secretada per l'hepatòcit a través de la membrana apical cap als canalicles biliars des d'on arriba a les vies biliars i novament a l'intestí. Des d'aquí els virus poden ser excretats a la femta o bé reabsorbits i transportats de nou cap al fetge, el que constitueix un cicle enterohepàtic, que continua fins que els anticossos neutralitzants o altres mecanismes l'interrompen [53]. Recentment, aquest model de cicle enterohepàtic ha sofert algunes modificacions degut al descobriment del fenotip pseudoembolcallat del virus de l'HAV [57], considerant també la sortida de partícules pseudoembolcallades a través de la membrana basolateral fins a l'espai de Disse, on es troben els sinusoides hepàtics [17,54,57]. Aquesta nova via de sortida facilitaria la propagació del virus entre els hepatòcits ja que un cop al espai de Disse, el virus podria infectar els hepatòcits subjacents [18,57].

Fins els darrers anys, el paper de la polaritat dels hepatòcits en la patogènesi i la transmissió de virus hepatotròpics, com l'HAV o l'HCV, no s'havia estudiat ampliament, en gran part degut a la falta de models de cultiu d'hepatòcits amb una polarització funcionalment rellevant. Com a conseqüència, històricament l'estudi de l'entrada i la sortida de virus en línies cel·lulars derivades d'hepatòcits s'ha dut a terme sota moltes limitacions. No obstant, gràcies als avenços recents en el desenvolupament de models de cultiu cel·lular d'hepatòcits polaritzats, especialment en el camp de l'HCV [274,329,330], actualment s'ha convertit en un camp d'estudi important. El desenvolupament d'un model de cèl·lules Huh7-Al polaritzades en un sistema de transwell al llarg d'aquest estudi, ens ha

permès estudiar l'entrada i sortida de l'HAV d'hepatòcits amb un bon nivell de polarització.

Seguint el curs natural de la infecció, un cop el virus ha entrat a l'hepatòcit a través de la membrana basolateral, en el nostre estudi la sortida a través de la membrana apical és la majoritària per a les dues poblacions de l'HAV. Estudis anteriors, han descrit una sortida de l'HAV a través del domini basolateral major al 95%, suggerint que el virus podria sortir prèviament per la membrana basolateral, tornaria a entrar als hepatòcits i posteriorment per un procés de transcitosi arribaria fins la membrana apical on seria alliberat [98,262]. D'altra banda, estudis posteriors, descriuen que la sortida a través dels dominis basolateral i apical és més balancejada, suggerint els dos dominis, basolateral i apical, com a possibles vies de sortida de l'HAV dels hepatòcits polaritzats [54,69]. No obstant, en el nostre estudi, la sortida a través del domini basolateral és minoritària i només s'observa quan la replicació viral és molt elevada, tal i com és el cas de la població HP. La ràpida i elevada replicació d'aquesta població, deguda a la major activitat del seu IRES, el seu ús de codons, i la seva eficiència en la sortida de la cèl·lula descrita al llarg d'aquest estudi, li confereixen un avantatge alhora de sortir a través d'aquest domini dels hepatòcits.

La propagació del virus entre els hepatòcits a través de la membrana apical mostra una entrada i sortida molt eficient a través d'aquest domini de l'hepatòcit, obrint una nova hipòtesi sobre el model de cicle enterohepàtic. El virus es podria propagar entre els hepatòcits entrant a través de la membrana apical quan es troba en el canalicle biliar per ser excretat a la femta. En el domini apical dels hepatòcits, tot i estar especialitzat en diverses funcions exocrines, s'hi han descrit processos d'endocitosi

involucrats en el reciclatge i en el transport intracel·lular mitjançant vesícules, als quals es troba involucrada l'annexina VI, una proteïna estructural utilitzada com a marcador d'endosomes hepàtics del compartiment apical [331]. La polarització dels hepatòcits que es va aconseguir *in vitro* mitjançant l'addició de DMSO durant 14 dies, ha estat descrita també per altres autors per a l'estudi de la persistència del virus de l'hepatitis C [332]. Cal tenir en compte que aquesta polarització és en forma de monocapa, com la d'un epitelí simple columnar, en canvi al fetge els hepatòcits *in vivo* mostren una polarització complexa amb una distribució tridimensional que dona lloc als canalicles biliars, la qual podria fer variar aquests darrers resultats [274,330,333]. D'altra banda, són necessaris nous estudis per determinar, quin és i on es troba, el receptor responsable de la infecció de l'HAV en els hepatòcits, la qual a dia d'avui continua essent una incògnita [65,68], i seria de gran ajuda per a l'estudi del seu cicle biològic.

Amb el conjunt de l'estudi podem afirmar que la població HP produeix un major percentatge de partícules pseudoembolcallades respecte la LO. Aquesta característica es deguda a que la càpsida d'aquesta població té més afinitat per la proteïna ALIX, el qual li confereix una major eficiència de sortida de la cèl·lula en respecte al model parental L0. La població HP, semblaria que s'ha adaptat a aquesta sortida en forma de partícules pseudoembolcallades, per mantenir el seu alt *fitness*. Aquest fet sumat a la major eficiència del seu IRES i l'ús de codons, contribueixen a la rapidesa en la replicació característica d'aquesta població. D'altra banda, cal destacar també, que el rol d'ALIX en la formació d'exosomes sembla ser cèl·lula dependent, jugant papers diferents en funció de la línia cel·lular estudiada [249,305,334-336]. Són necessaris més estudis amb diferents línies cel·lulars i soques de l'HAV per poder confirmar si el virus utilitza només aquesta via de sortida, en forma de virus pseudoembolcallat, o si la sortida

és molt dependent del tipus de cèl·lula a la qual infecta i de la soca del virus utilitzada.

Nombrosos estudis suggereixen la utilització de siRNA per silenciar factors requerits per l'activitat de l'IRES com a teràpia antiviral contra l'HAV [163,164,176,337]. En aquest estudi, amb els resultats obtinguts amb el silenciament d'ALIX, no es pot considerar la utilització d'aquests siRNAs com a potencial teràpia antiviral basada en la via de sortida del virus.

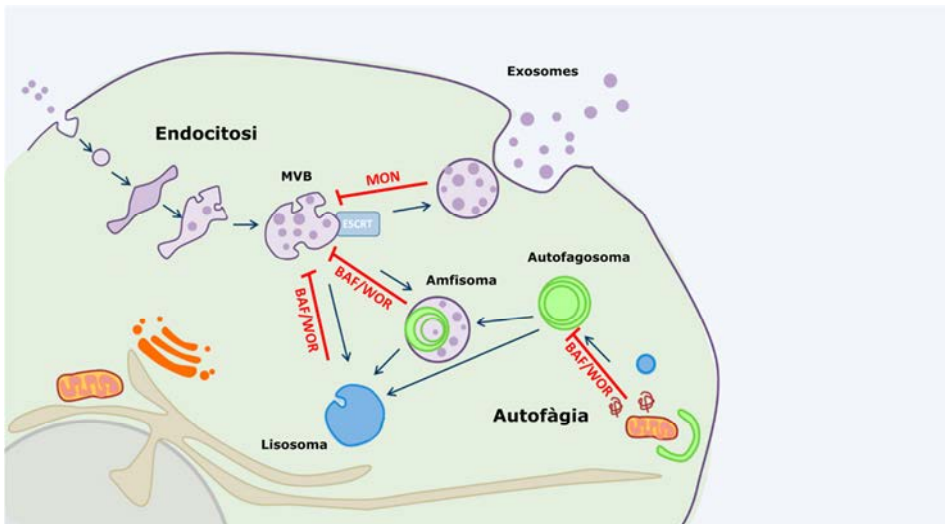


Figura 42. Efecte dels potencials antivirals sobre la sortida del virus de l'HAV de la cèl·lula. Convergència de les vies d'endocitosi i autofàgia en els cossos multivesiculars (MVB). WOR; wortmanina, MON; monensina i BAF; bafilomicina A1. Imatge adaptada de [256].

La major inhibició de la monensina en la sortida de la població HP, deguda a la degradació dels MVB induïda per l'activació de l'autofàgia no canònica [285,287], és una evidència més de la major eficiència de sortida a través dels MVB per part d'aquesta població. La millor interacció de la càpsida de la població HP amb la proteïna ALIX, pot donar lloc a MVB amb

una major quantitat de vesícules intraluminals amb partícules víriques al seu interior.

L'augment inesperat de partícules a sobrenedant per les dos poblacions del virus observat amb la bafilomicina A1, pot ser degut a l'efecte d'aquesta droga sobre el procés d'autofàgia [256,257,338]. Els processos d'autofàgia i reciclatge comparteixen la maquinària de trànsit vesicular ESCRT i s'encarreguen de mantenir l'homeòstasi cel·lular [257]. Quan la via de degradació per autofàgia es troba inhibida per efecte de la bafilomicina A1, la maquinària ESCRT es troba disponible per als processos de reciclatge i la cèl·lula augmenta la secreció d'exosomes utilitzada pel virus de l'HAV per sortir de la cèl·lula [256,257,339].

La hipòtesi plantejada d'inhibir la PI3K per alterar la biogènesi dels cossos multivesiculars (MVB) i evitar així l'alliberament dels exosomes no va resultar ser una bona estratègia per inhibir la sortida del virus de l'HAV de la cèl·lula. La inhibició de la PI3K, a més d'actuar sobre els MVB, inhibeix l'autofàgia i provoca també la inhibició de la via de senyalització *PI3K-Akt-mTOR* involucrada en la traducció *cap* dependent i la supervivència cel·lular. La inhibició de la PI3K dona lloc a condicions de *shut-off* cel·lular, les quals s'ha descrit que virus com el de l'encefalomiocarditis (EMCV), l'hepatitis C (HCV) i l'hepatitis B (HBV), entre d'altres, poden aprofitar per incrementar els seus nivells de replicació [340–343]. Probablement el major augment de partícules virals mostrat per la població HP respecte la L0, ve donat per la seva ràpida i elevada replicació en condicions de *shut-off* cel·lular descrita en estudis anteriors [217], sumat a la major eficiència de sortida a l'interior d'exosomes que es veu potenciada per la inhibició de l'autofàgia provocada per la wortmanina [256,257,344].

La monensina i la bafilomicina A1 juguen un paper important en l'intercanvi iònic a nivell de la membrana vesicular, que té com a conseqüència alteracions en el pH intravesicular [288,345,346]. Aquesta inhibició de la baixada de pH interrompria la maduració de les vesícules d'endocitosi, afectant així la desencapsidació del RNA víric, suggerint com a potencials antivirals drogues que bloquegin aquesta baixada de pH en les vesícules d'endocitosi. Per altra banda, l'enzim PI3K intervé en un gran nombre de processos cel·lulars, a més de l'autofàgia, els MVB i la via de senyalització *PI3K-Akt-mTOR*, també té una funció important en la fusió de vesícules de transport intracel·lular [347]. Resulta difícil, discernir a quin d'aquests processos és deguda la variabilitat observada amb la wortmanina en les fases inicials del cicle del virus.

Es desconeix el mecanisme mitjançant el qual aquestes drogues provoquen una activació de l'activitat de l'IRES de l'HAV, però tot i així es podria considerar segur l'ús de la monensina com a potencial antiviral multidiana per al virus de l'HAV, donat que inhibeix l'entrada tot i a pesar d'activar l'IRES i inhibeix també la sortida. Les propietats antivirals de la monensina s'han avaluat en nombrosos estudis, mostrant una bona activitat antiviral contra alguns virus com el citomegalovirus humà (HCMV) i el poliomavirus murí (MPyV) [348,349]. Estudis anteriors també havien proposat la monensina com potencial antiviral degut al seu efecte inhibidor sobre la desencapsidació de l'HAV [350]. Actualment, l'ús terapèutic d'agents ionòfors es dona en el camp dels antipalúdics, on un dels tractaments orals més comunament utilitzats és la cloroquina, una droga amb activitat similar a la monensina [351-353].

6.CONCLUSIONS



- El fenotip pseudoembolcallat de l'HAV és el majoritari en sobrenedants de cultiu cel·lular dels models cel·lulars FRhK-4 i Huh7-AI infectats amb les poblacions L0 i HP.
- La població HP mostra uns nivells de replicació més elevats i és més ràpida que la parental L0 en cèl·lules Huh7-AI.
- La mutació S134G de la proteïna VP2 de la càpsida de la població HP li confereix una major afinitat amb la proteïna ALIX.
- L'expressió d'ALIX mostra una relació directa amb el nivell de replicació de cadascuna de les poblacions de l'HAV.
- El silenciament d'ALIX en cèl·lules Huh7-AI provoca un efecte menor en la sortida de la població HP que en la de L0.
- La sortida de l'HAV a través del domini basolateral dels hepatòcits polaritzats *in vitro* és minoritària i només es dona amb nivells de replicació viral molt elevats.
- La població HP és més eficient que la parental L0 sortint de la cèl·lula a través dels cossos multivesiculars (MVB) en forma de partícula pseudoembolcallada.
- La major eficiència de sortida de la població HP juntament amb la seva millor traducció contribueixen a l'alt *fitness* d'aquesta població.
- El ionòfor monensina és un bon candidat com a possible antiviral mutidiana per a l'HAV.

7. MATERIAL I MÈTODES



7.1 Cèl·lules i virus

7.1.1 Poblacions víriques

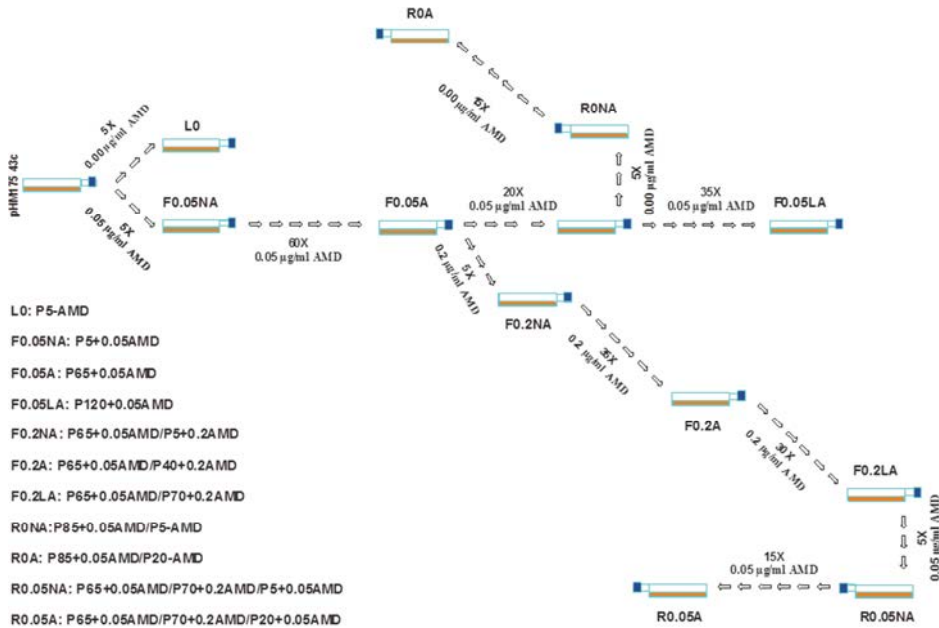


Figura 43. Esquema del flux de treball realitzat en el grup de Virus Entèrics per a l'obtenció de poblacions de l'HAV adaptades a diferents nivells de silenciament cel·lular. Imatge adaptada de [72].

En aquest estudi es van utilitzar dues de les poblacions víriques derivades de la soca citopatogènica HM175/43c del HAV (número d'accés GenBank: M59809) [205], obtingudes al grup de Virus Entèrics [96,217]. Aquestes poblacions havien estat prèviament obtingudes a partir de passatges seriatos, a intervals de 7 dies, en cèl·lules FRhK-4. Es va fer multiplicar el virus en absència d'actinomicina D (AMD, Sigma) o en presència de 0.05 µg/ml o 0.2 µg/ml d'AMD. D'una banda tenim la població parental o HM175-L0, que prové de la soca HM-175/43c després de replicar 5 passatges en absència d'AMD. D'altra banda es va utilitzar la població de

creixement ràpid HM175-HP, la qual és el resultat d'un procés de *molecular breeding* entre dues poblacions adaptades a diferents condicions de silenciament cel·lular, F0.05LA (120 passatges en 0.05 µg/ml d'AMD) i F0.2LA (65 passatges en 0.05 µg/ml d'AMD + 70 passatges en 0.2 µg/ml d'AMD) [217].

7.1.2 Línies cel·lulars

La població parental HM175-L0 i la de creixement ràpid HM175-HP es feien replicar a les cèl·lules FRhK-4 (ATCC CRL 1688), línia cel·lular epiteloide i contínua derivada de cèl·lules embrionàries de ronyó de mono rhesus (*Macaca mulatta*).

La línia cel·lular FRhK-4 es cultivava a 37°C en medi essencial mínim (MEM) suplementat amb un 15% de sèrum fetal boví inactivat (fetal bovine serum, FBSi), aminoàcids no essencials (NEAA), antibiòtics i solucions tamponadores. Aquestes cèl·lules es subcultivaven cada 7-8 dies amb una relació de multiplicació 1:3, obtenint una monocapa confluent després de la incubació durant 2-3 dies a 37°C.

SOLUCIONS NECESSÀRIES:

MEM 15 % FBSi:

MEM 1X amb sals Eagle autoclavat 20 minuts i suplementat en condicions d'esterilitat amb:

NaHCO ₃	2 % (v/v)
HEPES	15 mM

L-Glutamina	2 mM
NEAA	1X
FBSi	15 % (v/v)
Penicilina – Estreptomicina ...	100 UI/ml – 100 µg/ml

Tampó PBS:

NaCl	8 g/l
KCl	0.2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1.15 g/l
KH ₂ PO ₄	0.2 g/l

En H₂O bidestil·lada

Ajustar el pH a 7.1-7.2 si cal

Esterilitzar per autoclau 20 min

Conservar a 4 °C

Tripsina-EDTA:

Tripsina	2.5 g/l
EDTA	0.2 g/l
Penicilina – Estreptomicina ...	100 UI/ml – 100 µg/ml

En tampó PBS

Esterilitzar per filtració

Conservar a -20°C

Pel desenvolupament de la tesi, exceptuant la producció de *stocks* virals i comptats experiments, es van utilitzar cèl·lules Huh7-A1 [207] cedides per G.Kaplan, del Center for Biologics Evaluation and Research

(Maryland, Estats Units). Aquestes cèl·lules deriven de la línia parental Huh7 (*Human hepatocarcioma*). La sublínia Huh7-AI mostra una major permissivitat a la infecció per l'HAV que el model parental Huh7. Aquesta línia cel·lular es cultivava a 37°C en medi essencial mínim (MEM) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (*fetal bovine serum*, FBS), aminoàcids no essencials (NEAA), antibiòtics i solucions tamponadores. Aquestes cèl·lules es subcultivaven cada 7-8 dies amb una relació de multiplicació 1:6, obtenint una monocapa confluent després de la incubació durant 2-3 dies a 37°C.

Solucions necessàries:

MEM 10 % FBS:

MEM 1X amb sals Eagle autoclavat 20 minuts i suplementat en condicions d'esterilitat amb:

NaHCO ₃	2 % (v/v)
HEPES	15 mM
L-Glutamina	2 mM
NEAA	1X
FBS	10 % (v/v)
Penicilina – Estreptomina ...	100 UI/ml – 100 µg/ml

Tampó PBS:

NaCl	8 g/l
KCl	0.2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1.15 g/l
KH ₂ PO ₄	0.2 g/l

En H₂O bidestil·lada

Ajustar el pH a 7.1-7.2 si cal

Esterilitzar per autoclau 20 min

Conservar a 4 °C

Tripsina-EDTA:

Tripsina	0.5 g/l
EDTA	0.2 g/l
Penicilina – Estreptomicina ...	100 UI/ml – 100 µg/ml

En tampó PBS

Esterilitzar per filtració

Conservar a -20°C

7.1.3 Obtenció de suspensions víriques de la soca parental HM175-L0 i la soca HM175-HP

Les suspensions víriques (*stocks virals*) emprades en els diferents assajos s'obtenien infectant amb la soca parental HM175-L0 o amb la soca HM175-HP cèl·lules FRhK-4, les quals formaven monocapes en flascons de cultiu T-175 cm² seguint el següent protocol:

- Decantar el medi de creixement dels flascons de cultiu i infectar la monocapa cel·lular amb una multiplicitat d'infecció (MOI) d'un virus infecció per cada cèl·lula
- Incubar els flascons infectats a 37°C durant 60 minuts per a permetre l'adsorció del virus a les cèl·lules

- Incorporar el medi post-infecció, de composició idèntica al medi de creixement però amb un 2% de FBSi. En el cas de la soca, aquest medi era suplementat també amb 0.05 µg/ml d'AMD
- Incubar a 37°C fins tenir un efecte citopàtic (CPE) generalitzat (7 - 10 dies després de la infecció)
- Lisar les cèl·lules mitjançant tres cicles de congelació-descongelació a -80°C. En els casos on el que volem obtenir és el sobrenedant aquest pas es pot ometre
- Centrifugar el cultiu lisat a 3,000 x g durant 20 minuts per tal d'obtenir una suspensió vírica lliure de restes cel·lulars. Per als sobrenedants centrifugar a 1,500 x g durant 10 minuts
- Guardar la suspensió vírica a -80°C

7.1.4 Replicació del virus parental HM175-L0 i del mutant HM175-HP en cèl·lules Huh7-AI

Les suspensions víriques de la població HM175-L0 i HM175-HP obtingudes a la línia cel·lular FRhK-4, es van utilitzar per infectar cèl·lules Huh7-AI al llarg de tota la tesi. El protocol que es va seguir és similar a l'utilitzat en FRhk-4 per a la producció de suspensions virals, però presenta petites variacions.

- Decantar el medi de creixement del cultiu i infectar la monocapa cel·lular amb la multiplicitat d'infecció (MOI) necessària i determinada per cada experiment
- Incubar a 37°C durant 60 minuts per a permetre l'adsorció del virus a les cèl·lules
- Incorporar el medi post-infecció, de composició idèntica al medi de creixement però amb un 2% de FBS

- Incubar a 37°C el temps post infecció que requereixi l'assaig
- Lisar les cèl·lules mitjançant tres cicles de congelació-descongelació a -80°C. En els casos on el que volem obtenir és el sobrenedant aquest pas es pot ometre
- Centrifugar el cultiu lisat a 3,000 x g durant 20 minuts per tal d'obtenir una suspensió vírica lliure de restes cel·lulars. Per als sobrenedants centrifugar a 1,500 x g durant 10 minuts
- Si no s'ha d'utilitzar el mateix dia, guardar la suspensió vírica a -80°C

7.1.5 Obtenció de suspensions concentrades de partícules virals

Un cop obtingudes les suspensions víriques es segueix el següent protocol:

- Centrifugar a 10,000 x g durant 30 minuts a 4°C dos cops per eliminar impureses
- Ultra-centrifugar a 100,000 x g 1 hora a 4°C
- Resuspendre el *pellet* en 1ml de PBS
- Guardar la suspensió vírica a 4°C si és per a ús immediat o a -80°C per a usos posterior

7.1.6 Quantificació del títol infecció de les suspensions d'HAV: càlcul de la TCID₅₀/ml

La quantificació del títol víric infecció de les suspensions d'HAV es realitzava segons el càlcul de la TCID₅₀, que es defineix com la dosi vírica

que provoca efecte citopàtic (CPE) en el 50% de les monocapes cel·lulars infectades. Per a dur a terme aquesta titulació, s'infecten monocapes de cèl·lules FRhK-4 en plaques de 96 pous. Breument, el protocol que se seguia era:

- Descartar el medi de creixement de les plaques de 96 pous amb monocapes confluents de FRhK-4
- Inocular a la placa dilucions seriades 1:10 en medi essencial mínim (MEM) 0% FBS de la suspensió vírica a titular. Concretament, s'inoculava una columna (8 pous) per cada dilució, afegint 20 µl a cada pou. Com a control negatiu s'afegia el mateix volum de MEM 0% FBS als 8 pous d'una columna de la placa
- Incubar la placa a 37°C durant 60 minuts en una atmosfera enriquida amb un 5% en CO₂
- Afegir el medi post-infecció, d'igual composició al medi de creixement però amb un 2% de FBSi
- Incubar a 37°C en una atmosfera enriquida amb un 5% en CO₂ durant 13 dies
- Realitzar les lectures de presència/absència d'efecte citopàtic (CPE) per cada pou inoculat de la placa als 10-11 dies i efectuar una lectura addicional i definitiva als 13 dies
- Calcular la TCID₅₀ segons la fórmula descrita en el mètode de Behrens i Kärber [14] i que es detalla a continuació:

$$\text{LogTCID}_{50} = \text{lr} + 1/2\text{d} - 1 \Sigma (\text{pi}+1)$$

on:

lr és el logaritme en base 10 de la dilució més alta que dona el 100% d'efecte citopàtic (CPE)

d és el logaritme de la sèrie dilucional

pi és la proporció de resposta positiva en les dilucions amb CPE en menys de les 8 rèpliques

D'aquesta manera, i tenint en compte que el volum de l'inòcul era de 20 µl, s'obtenia la quantificació del títol víric de les suspensions expressat com la dosi infecciosa que provoca efecte citopàtic en el 50% de les monocapes cel·lulars per mil·lilitre (TCID₅₀/ml).

7.1.7 Recompte de la viabilitat cel·lular

Preparació de la suspensió cel·lular

- Tripsinitzar les cèl·lules
- Afegir MEM 10-15% FBS per inactivar la tripsina
- Agafar 90µl de la suspensió cel·lular i afegir-li 10µl de blau tripà. Idealment el número de cèl·lules a comptar en cadascun dels quadrants de la cambra de Neubauer hauria de ser entre 10 i 100 cèl·lules. En cas que el número sigui superior a 100 s'hauria de fer una dilució de la suspensió cel·lular i tenir-ho en compte a l'hora de realitzar els càlculs de la concentració cel·lular
- Barrejar bé i introduir 10µl de la suspensió cel·lular amb blau tripà a la cambra de Neubauer coberta amb un cobreobjectes

Comptatge de cèl·lules

Comptar les cèl·lules en cadascun dels quatre quadrants de la cambra. En el cas que quedin cèl·lules just a la vora dels quadrants, comptar les que quedin en dos d'ells (Ex: vora inferior i esquerra), sempre seguint el mateix criteri en cadascun dels quatre quadrants. El blau tripà

penetra únicament en les cèl·lules no viables de tal forma que sota el microscopi les cèl·lules no viables es veuen blaves i les viables refringents.

Càlcul de la concentració

Fórmula per al recompte a la cambra de Neubauer

$$\text{Concentració en la suspensió (cèl/mL)} = [(\text{cèl·lules contades}/4) \times 10,000] \times \text{FD}_a$$

a En el cas que haguem tingut que aplicar una dilució, haurem de transformar la concentració obtinguda durant el recompte cel·lular en la concentració de la mostra multiplicant pel factor de dilució.

7.2 Gradients isopícnic de densitat d'iodixanol-sacarosa

Els gradients isopícnic d'iodixanol sacarosa es van utilitzar per estudiar la naturalesa de les partícules víriques produïdes per les poblacions HM175-L0 i HM175-HP al llarg de tota la tesi en diferents sobrenedants de cultiu cel·lular. Els sobrenedants a analitzar es concentren prèviament en un volum final de 1 mL seguint el protocol descrit a l'apartat

7.1.5. Es segueix el següent protocol:

- Netejar el formador de gradients amb aigua amb lleixiu i aclarir amb aigua destil·lada
- Preparar les dues solucions: (Volum necessari per a un gradient)
 - o Solució 50% Iodixanol: 1ml 0.50M Sacarosa en buffer TN + 4ml Iodixanol (*OptiPrep Density Gradient Medium, Axis-Shield*)

- Solució Tampó: 5 ml 0.50M Sacarosa en buffer TN

(Buffer TN: 50mM Tris, 100mM NaCl; pH 7.4)

- Posem 4.5 ml de cadascuna de les solucions a la columna corresponent del formador de gradients (vigilant que la clau estigui tancada). Afegir una barra magnètica a la columna amb major concentració i mantenir el formador de gradients a sobre de l'agitador magnètic activat perquè estigui en agitació
- Obrir la clau que comunica les dos columnes i preformar el gradient amb la bomba peristàltica en un tub per a ultracentrífuga *Beckman Ultra-Clear*
- Afegim, gota a gota per evitar desfer el gradient, 1 ml de virus a sobre (el tub amb el ml de virus, abans el posem 2 minuts al bany d'ultrasons perquè els virus no estiguin agregats entre ells o al plàstic del tub)
- Ultra-centrifuguem el gradient amb un rotor basculant a 200,000 x g durant 2 hores i 45 minuts a 4°C (important activar l'opció "slow deceleration" de la ultracentrífuga per evitar que ens alteri el gradient al frenar)
- Recollim les fraccions utilitzant la bomba peristàltica (aproximadament 20 fraccions de 0,5 ml)
- Netejar acuradament el formador de gradients amb aigua destil·lada i lleixiu, seguidament aclarir amb aigua destil·lada
- Llegir l'índex de refracció de cadascuna de les fraccions utilitzant el refractòmetre, per calcular la seva densitat d'acord amb les equivalències facilitades pel fabricant de la solució d'iodixanol *OptiPrep™ (Axis-Shield)*
- Extreure l'RNA de cadascuna de les fraccions seguint el protocol del kit comercial Nucleospin RNA Virus Extraction (Macherey-Nagel),

per al seu posterior anàlisi mitjançant RT-qPCR (detallada en el següent apartat 7.3)

7.3 RT-PCR a temps real del virus de l'HAV

El protocol de la RT-PCR a temps real (RT-qPCR) de la regió 5'NCR utilitzat en aquesta tesi doctoral és el descrit per Costafreda i col·laboradors el 2006 [118]. Per a quantificar l'RNA del virus de l'HAV es va utilitzar el kit *RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR (Invitrogen™, Life Technologies™)* i els primers i la sonda descrits en la **Taula 4**. Es segueixen els següents passos:

- Preparació de la barreja de reacció per a la RT-qPCR:

Reactiu	Volum	Concentració final
5X Buffer Reaction mix	5 µl	1X
100 µM primer HAV 68 (Sigma Aldrich)	0.125 µl	0.5 µM
100 µM primer HAV 240 (Sigma Aldrich)	0.225 µl	0.9 µM
50 µM sonda 150(-) HAV TaqMan® marcada amb FAM™	0.125µl	0.25 µM
Ultrasense Enzim mix	1.25 µl	
H₂O desionitzada lliure de DNases i RNases (Gibco®, Life Technologies™)	13.275µl	
Extracte d'àcids nucleics (RNA)	5 µl	
Volum total	25 µl	

- Posar la placa a l'aparell de RT-qPCR i seguir el següent programa:

FASES DE LA RT-qPCR	TEMPERATURA	TEMPS	CICLES
Transcripció reversa	55°C	60'	1X
Desnaturalització inicial/ activació polimerasa	95°C	5'	1X
Desnaturalització	95°C	15''	
Hibridació	60°C	1'	45X
Extensió	65°C	1'	

La fluorescència es mesurava al final de cada cicle

L'aparell de RT-qPCR utilitzat per aquesta tesi era el Mx3000P (*Stratagene*) i els resultats de les quantificacions s'analitzaven amb el programa *MxPro* proporcionat per la mateixa casa comercial de l'aparell.

Oligonucleòtid	Seqüència
HAV 68	5' TCACCGCCGTTTGCCTAG 3'
HAV 240	5' GGAGAGCCCTGGAAGAAAG 3'
HAV 150 (-)	5' [6FAM]TTAATTCCTGCAGGTTTCAGG[MGBNFQ] 3'

Taula 4. Primers i sonda utilitzats per la realització de la RT-qPCR de la regió 5'NCR.

7.4 Microscòpia electrònica de transmissió (TEM)

Les fraccions obtingudes en els gradients d'iodixanol sacarosa corresponents a les partícules pseudoembolcallades (eHAV) i nues (HAV), tan de les cèl·lules FRhK-4 com de les Huh7-AI, van ser agrupades en *pools*. Seguidament es van dialitzar utilitzant membranes de cel·lulosa (*Dialysis tubing cellulose membrane, avg. flat width 10 mm (0.4 in.), Sigma-Aldrich®*), per tal d'eliminar la solució d'iodixanol sacarosa ja que interferia a la observació dels virus al microscopi electrònic. La diàlisi es va dur a terme

durant tres dies amb una solució salina de TN (50mM Tris, 100mM NaCl), renovant-la cada 12 hores. Un cop dialitzats, els *pools* de cada fenotip de l'HAV es van ultracentrifugar a 100,000 x *g* durant 3 hores a 4°C, per tal de concentrar els virus en un volum final de 25 µl de PBS.

Les mostres van ser observades als Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB), amb el microscopi electrònic de transmissió JEM 1010 (Jeol) a 80 kV. Les imatges es van agafar amb la càmera digital *Megaview charge-coupled device (CCD)* a 1000 x 1000 píxels i es van analitzar amb el software *AnalySIS* versió 3.2 (*Olympus Soft Imaging Solutions*).

7.4.1 Tinció negativa

Material necessari

- Reixetes *only carbon* de 400 mesh (proporcionades pels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona, CCiTUB)
- Paper de filtre
- Càpsules de petri petites
- Pinces nº 4
- Parafilm
- Reactius:
 - PTA al 2% (Àcid fosfotúngstic), pH 7.3
 - Aigua mil·li-Q

Procediment de la gota

- Irradiar les reixetes durant 5' amb llum ultraviolada, amb la finalitat que hi hagi una millor extensió de la mostra sobre la reixeta
- Posar una gota de 5 μ l de la mostra en la cara neta del parafilm. Contactar la reixeta amb la mostra per la part on es troba la membrana durant 1 minut
- Rentar la reixeta amb aigua *mi·li-Q* 3 cops durant 1 minut
- Posar la reixeta en contacte amb la gota de 50 μ l de l'agent de tinció PTA durant 1 minut
- Extreure l'excés de líquid amb ajut d'un paper de filtre tallat prèviament
- Posar la reixeta sobre un paper de filtre dins d'una càpsula de petri i deixar que s'eixugui, mínim 2 hores abans d'ésser observada al microscopi electrònic

Netejar les pinces, abans i després de la seva utilització, amb la finalitat d'evitar errors deguts a la barreja de diferents mostres.

7.5 Microscòpia de colocalització confocal

L'estudi de microscòpia confocal de colocalització quantitativa de les poblacions HM175-L0 i HM175-HP del virus de l'HAV amb la proteïna ALIX es va realitzar mitjançant l'anàlisi d'imatges d'immunofluorescència indirecta. La presa d'imatges es va dur a terme amb el microscopi confocal *LEICA TCS SP2 (Leica Microsystems)* dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB) utilitzant un objectiu HCXPL APOCS 63.0x1.40 OIL a una resolució de 1024 x 1024 i zoom 4. La distància entre talls va ser de 0.12 μ m (25-30 talls per imatge). Els làsers utilitzats van ésser

els de 488nm, 568nm i 405nm. Durant tot l'anàlisi es va mantenir un *Threshold* de 5 per a totes les imatges.

7.5.1 Ús del software d'anàlisi

Les imatges del microscopi confocal s'obtenen dividides per canals, cadascun d'ells correspon a un làser. Amb el software *Hyugens Essential v. 3.7.1 p4* es preparen les imatges per al seu anàlisi realitzant prèviament una deconvolució d'aquestes. Aquesta deconvolució consisteix en la restauració de les imatges obtingudes per microscòpia amb l'estimació i eliminació del soroll produït per l'energia despresa del flux de fotons dels làsers. També s'encarrega de tornar a la ubicació original la llum dispersa, definint els objectes de les imatges. Un cop obtingudes les imatges deconvolucionades es procedeix al càlcul de la colocalització amb el mateix software.

La colocalització es descriu com la coincidència en l'espai, amb les mateixes coordenades, de dues senyals de fluorescència generades per dos fluorocroms que marquen dos antígens. La colocalització quantitativa ens permet examinar els antígens d'interès en imatges d'immunofluorescència obtingudes per microscòpia confocal gràcies al càlcul de determinats coeficients [270].

Degut a l'interès en el comportament del virus de l'HAV i de la proteïna ALIX de manera independent, i degut també a la diferència d'abundància en el marcatge de cada antigen, es va decidir utilitzar els coeficients M1, M2 i k1, k2. Aquests coeficients proporcionen un valor independent per a cada canal, fet el qual aporta més informació.

El programa informàtic d'anàlisi emprat, *Hyugens Essential*, ens proporciona aquests coeficients. El coeficients de Manders M1 i M2 ens indiquen el grau o percentatge de colocalització dels píxels d'interès per a cada canal. Aquest càlcul no es veu influenciat per les intensitats dels dos canals però sí pel soroll de la imatge i el *Threshold* establert [270], per això és important la deconvolució de les imatges i mantenir sempre el mateix nivell de *Threshold*.

El coeficient de Manders M1 correspon al canal 1, el làser 568 (HAV, vermell), i és el resultat del sumatori de la intensitat dels píxels vermells que colocalitzen (es troben en les mateixes coordenades) amb el canal 2, el làser 488 (ALIX, verd), dividit entre el sumatori de les intensitats dels píxels del canal 1.

$$\mathbf{M1} = \frac{\sum_i S1_{i,coloc}}{\sum_i S1_i}$$

S1: Intensitat de la senyal dels píxels del canal 1

El coeficient de Manders M2 correspon al canal 2, el làser 488 (ALIX, verd), i és el resultat del sumatori de la intensitat dels píxels verds que colocalitzen (es troben en les mateixes coordenades) amb el canal 1, el làser 568 (HAV, vermell), dividit entre el sumatori de les intensitats dels píxels del canal 2.

$$\mathbf{M2} = \frac{\sum_i S2_{i,coloc}}{\sum_i S2_i}$$

S2: Intensitat de la senyal dels píxels del canal 2

Els coeficients de solapament k1 i k2, indiquen la contribució de cada canal en el grau de colocalització, ja que aquest es veu influenciat per la intensitat dels dos canals.

El coeficient k_1 correspon al canal 1, el làser 568 (HAV, vermell), i és el resultat del sumatori de la intensitat dels píxels del canal 1 multiplicat per la intensitat dels píxels del canal 2, el làser 488 (ALIX, verd), que es trobin en les mateixes coordenades i dividit per la intensitat total al quadrat del canal 1.

$$k_1 = \frac{\sum_i S_{1i} \cdot S_{2i}}{\sum_i (S_{1i})^2}$$

El coeficient k_2 correspon al canal 2, el làser 488 (ALIX, verd), i és el resultat del sumatori de la intensitat dels píxels del canal 2 multiplicat per la intensitat dels píxels del canal 1, el làser 568 (HAV, vermell), que es trobin en les mateixes coordenades i dividit per la intensitat total al quadrat del canal 2.

$$k_2 = \frac{\sum_i S_{1i} \cdot S_{2i}}{\sum_i (S_{2i})^2}$$

7.5.2 Immunofluorescència indirecta de doble marcatge per al virus de l'HAV i la proteïna cel·lular ALIX

Per a dur a terme l'estudi de microscòpia confocal del virus de l'HAV amb la proteïna ALIX es va posar a punt un protocol d'immunofluorescència indirecta sobre el cultius de cèl·lules Huh7-AI infectades amb el virus. Es van fer créixer cèl·lules sembrades a una densitat de 7×10^4 cèl·lules/pou en un cobreobjectes *Lab-Tek® Chambered #1.0 Borosilicate Coverglass System (8 chamber) Nunc™, Thermo Scientific™*. Un cop confluents (48 hores després aproximadament) es van infectar a una MOI de 5. Les infeccions del virus es van parar a les 48 i les 72 hores post infecció i se'ls va realitzar el següent protocol:

Reactius

- PBS 100mM
- Solució de fixació: paraformaldehid 4% en PBS i sacarosa 60mM
- Solució de rentat: PBS amb Glicina 20mM
- Solució de permeabilització: PBS amb Glicina 20mM i 0.5% TritóX100
- Solució de bloqueig: PBS amb Glicina 20mM i 1% BSA
- Solució d'incubació: PBS amb Glicina 20mM, 1% BSA i 0.025% TritóX100

Procediment

- Retirar el medi de cultiu
- Rentar amb PBS
- 15' solució de fixació
- 2 x 5' PBS
- 2 x 5' solució de rentat
- 10' solució de permeabilització
- 2 x 5' solució de rentat
- 30' solució de bloqueig
- 60' solució d'incubació amb els anticossos primaris a 37°C amb humitat controlada
 - o 1/800 *Anti-HAV Mouse monoclonal isotype IgG2a 7E7(M40) (Mediagnost)*
 - o 1/50 *Anti-ALIX Rabbit polyclonal isotype H-270 (Santa Cruz Biotechnology)*
- 2 x 5' solució de rentat

- 60' solució d'incubació amb els anticossos secundaris a 37°C amb humitat controlada
 - o 1/2000 *Goat Anti-Mouse polyclonal IgG Cy3* (Abcam)
 - o 1/1000 *Goat Anti-Rabbit polyclonal IgG H&L Alexa Fluor 488* (Abcam)

*A partir d'aquest pas cal protegir les immunofluorescències de la llum

- 2 x 5' solució de rentat
- 15' solució d'incubació amb DAPI (*Cell biology Boehringer MannheimTM*) a 1 µg/ml
- 2 x 5' PBS
- Addicionar PBS i guardar a 4°C
- Observar les immunofluorescències al microscopi confocal

Controls: anticossos primaris sols, anticossos secundaris sols, un primari amb el segon secundari, una mostra sense anticossos (auto fluorescència).

7.5.3 Immunofluorescència indirecta de doble marcatge per al virus de l'HAV i la proteïna cel·lular LC3b

Per comprovar que la colocalització observada en l'estudi de microscòpia confocal no es tractava d'una coincidència dels punts en l'espai deguda a l'atzar, es va realitzar un control negatiu de colocalització. Per dur a terme aquest control es va utilitzar el marcador LC3b, característic de la membrana de l'autofagosoma. El protocol d'immunofluorescència indirecta utilitzat va ser el mateix que en l'apartat anterior **7.5.2**, però canviant l'anticòs primari anti-ALIX per *Anti-LC3b Rabbit polyclonal (Sigma-Aldrich)*, a una dilució 1/300. Es van fer créixer cèl·lules sembrades a una densitat de 7×10^4 cèl·lules/pou en un cobreobjectes *Lab-Tek® Chambered #1.0 Borosilicate Coverglass System (8 chamber) NuncTM, Thermo ScientificTM*.

Un cop confluents (48 hores després aproximadament) es van infectar a una MOI de 5 amb les dos poblacions de l'HAV per separat. Les infeccions del virus es van aturar a les 72 hores post infecció.

7.6 Quantificació relativa de l'expressió d'ALIX en cèl·lules Huh7-AI

Per quantificar l'expressió relativa d'ALIX en les cèl·lules Huh7-AI infectades amb les poblacions L0 i HP de l'HAV, es va posar a punt una RT-qPCR per al mRNA del gen *ALIX* obtingut dels lisats cel·lulars.

Les cèl·lules Huh7-AI es van sembrar a un *Split ratio* de 1:6 en flascons de 25cm² de superfície. Un cop confluents (48 hores després aproximadament) es van infectar amb les dos poblacions de l'HAV amb una MOI de 5. Les infeccions es van aturar a les 48 i 72 hores post infecció per a cadascuna de les poblacions. Paral·lelament es van mantenir flascons sota les mateixes condicions, però sense infectar-los amb el virus, com a control per cada temps post infecció. Es van realitzar un mínim de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun per a cada població i temps post infecció. Seguidament es va extreure l'RNA total de les cèl·lules seguint les instruccions del kit comercial *GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)*.

7.6.1 RT-qPCR ALIX i GAPDH

Per a la RT-qPCR es va utilitzar el kit *KiCqStart® One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix™ (Sigma-Aldrich)* amb els primers i les sondes *KiCqStart® Probe Assays (Sigma-Aldrich)* pre-dissenyats per l'anàlisi de l'expressió gènica (**Taula 5**). Com a gen de referència endogen es va utilitzar *GAPDH*.

Ambdós gens es van quantificar per triplicat en cada mostra. Es segueixen els següents passos:

- Preparació de les dues barreges de reacció per a la RT-qPCR:
 - Barreja per a la quantificació del gen *ALIX* (*PDCD6IP*):

Reactiu	Volum	Concentració final
KiCqStart One-Step Probe RT-qPCR (2X)	10 µl	1X
10 µM primer FH2_PDCD6IP (Sigma Aldrich)	0.9 µl	0.45 µM
10 µM primer RH2_PDCD6IP (Sigma Aldrich)	0.9 µl	0.45 µM
10 µM sonda PH2_PDCD6IP (Sigma Aldrich)	0.3µl	0.15 µM
H₂O desionitzada lliure de DNases i RNases (Gibco®, Life Technologies™)	2.9µl	
Extracte d'àcids nucleics (RNA)	5 µl	
Volum total	20 µl	

- Barreja per a la quantificació del gen de referència *GAPDH*:

Reactiu	Volum	Concentració final
KiCqStart One-Step Probe RT-qPCR (2X)	10 µl	1X
10 µM primer FH1_GAPDH (Sigma Aldrich)	0.9 µl	0.45 µM
10 µM primer RH1_GAPDH (Sigma Aldrich)	0.9 µl	0.45 µM
10 µM sonda PH1_GAPDH (Sigma Aldrich)	0.3µl	0.15 µM
H₂O desionitzada lliure de DNases i RNases (Gibco®, Life Technologies™)	2.9µl	
Extracte d'àcids nucleics (RNA)	5 µl	
Volum total	20 µl	

- Posar la placa a l'aparell de RT-qPCR i seguir el següent programa:

FASES DE LA RT-qPCR	TEMPERATURA	TEMPS	CICLES
Síntesi cDNA	50°C	20'	1X
Desnaturalització	95°C	1'	1X
Cicle PCR	95°C	5"	40X
	60°C	35"	

La fluorescència es mesurava al final de cada cicle

L'aparell de RT-qPCR utilitzat per aquesta tesi era el Mx3000P (*Stratagene*) i els resultats de les quantificacions s'analitzaven amb el programa MxPro proporcionat per la mateixa casa comercial de l'aparell.

Oligonucleòtid	Seqüència
FH2_PDCD6IP	5' CTCAGATGAGAGAAGCCACC 3'
RH2_PDCD6IP	5' ACATCTTCAATTGCTGCTGG 3'
PH2_PDCD6IP	5' [6FAM]TGGCAAATGGGGTGCTAGCTTCCCT[OQA] 3'
FH1_GAPDH	5' GAAGGAAATGAATGGGCAGC 3'
RH1_GAPDH	5' TCTAGGAAAAGCATCACCCG 3'
PH1_GAPDH	5' [6FAM]ACTAACCCCTGCGCTCCTGCCTCGAT[OQA] 3'

Taula 5. Primers i sondes utilitzats per a la quantificació relativa d'ALIX en cèl·lules Huh7-AI. *KiCqStart® Probe Assays (Sigma-Aldrich)* pre-dissenyats per l'anàlisi de l'expressió gènica.

L'anàlisi de l'expressió relativa un cop obtinguts els valors de Ct de les RT-qPCR es va fer mitjançant el mètode de comparació de Ct de *Josh Haines i Melissa Kelley, Dharmacon, Lafayette, CO, USA* [354].

En primer lloc, els valors de Ct dels triplicats de cada mostra es van normalitzar individualment utilitzant el nivell d'expressió del gen endogen *GAPDH* de la mateixa mostra. Donat que les Ct són una mesura proporcional

al logaritme negatiu de la concentració de la seqüència diana, per aconseguir un valor d'expressió va ser necessari transformar les dades. Un cop fet això, les dades es van normalitzar respecte els resultats obtinguts de les mostres control establertes en cada cas, per aconseguir el valor de l'increment de cada mostra (*fold change*).

Els càlculs realitzats van ser:

1. Normalitzar amb el gen de referència endogen

$$\Delta Ct = Ct(\text{gen diana}) - Ct(\text{gen referència endogen})$$

2. Transformació exponencial de l'expressió

$$\Delta Ct \text{ Expressió} = 2^{-\Delta Ct}$$

3. Mitjana de les rèpliques i desviació estàndard

4. Normalitzar respecte el tractament control

$$\text{Increment } (\Delta \Delta Ct) = 2^{-\Delta Ct} (\text{mostra problema}) / 2^{-\Delta Ct} (\text{mostra control})$$

7.7 Silenciament gènic d'ALIX

El silenciament del gen ALIX en cèl·lules Huh7-AI es va dur a terme mitjançant la transfecció de siRNA amb el sistema *SMART pool ON-TARGETplus PDCD6IP siRNA* (Dharmacon, GE Healthcare). Per al control amb les cèl·lules Huh7-AI no silenciades es va utilitzar com a control un *SMART pool ON-TARGETplus Non-targeting siRNA* (Dharmacon, GE Healthcare). Es van sembrar les cèl·lules a una densitat de 6.7×10^4 cèl·lules/pou en plaques de 48 pous utilitzant sempre medis de cultiu sense antibiòtics i 24 hores després es va realitzar el protocol de transfecció detallat a continuació. La concentració final dels dos *pools* de siRNA utilitats va ésser de 100nM.

Procediment de transfecció

Aquest protocol es fa paral·lelament amb els dos *pools* de siRNA inclosos en l'experiment, tan els dirigits al gen d'interès com els utilitzats com a control negatiu.

- Diluir els siRNA a 10 μM en H_2O desionitzada lliure de RNAses (*Gibco*®, *Life Technologies*™)
- En tubs separats diluir els siRNA i el reactiu de transfecció DharmaFECT 4 amb medi de cultiu lliure de sèrum
 - o Tub 1: preparar 50 μl / pou de siRNA, afegint 5 μl de la solució 10 μM de siRNA i 45 μl de medi de cultiu lliure de sèrum
 - o Tub 2: preparar 50 μl / pou del reactiu de transfecció DharmaFECT 4, afegint 0.25 μl del reactiu i 49.75 μl de medi de cultiu lliure de sèrum
- Barrejar acuradament les dues solucions amb la pipeta i incubar 5' a temperatura ambient (RT)
- Afegir el contingut del tub 1 al tub 2 per un volum final de 100 μl (1:1)
- Barrejar acuradament amb la pipeta i incubar 20' a RT
- Afegir 400 μl / pou de medi de cultiu al 2% FBS sense antibiòtic, per obtenir un volum final de solució de transfecció de 500 μl / pou a una concentració final de 100nM de siRNA
- Treure el medi de cultiu dels pous de la placa de 24 i afegir 500 μl / pou de la solució de transfecció
- Incubar les cèl·lules a 37°C en una atmosfera enriquida amb un 5% en CO_2 durant 48 hores

- Quantificar el mRNA d'ALIX seguint el protocol detallat en l'apartat 7.6

Per a l'anàlisi de l'expressió gènica es va seguir el mateix mètode de comparació de Ct detallat a l'apartat 7.6.

Gen	Seqüència
ALIX (PDCD61P)	5' CAGAUCUGCUUGACAUUUA 3'
	5' UCGAGACGCUCCUGAGAU 3'
	5' GCGUAUGGCCAGUAUAAUA 3'
	5' GUACCUCAGUCUAUAUUGA 3'
Non-targeting	5' UGGUUUACAUGUCGACUAA 3'
	5' UGGUUUACAUGUUGUGUGA 3'
	5' UGGUUUACAUGUUUUCUGA 3'
	5' UGGUUUACAUGUUUCCUA 3'

Figura 44. Seqüències SMARTpool siRNA (Dharmacon, GE Healthcare).

7.8 Polarització de cèl·lules Huh7-AI *in vitro*

La polarització de la línia cel·lular d'hepatocarcinoma humà Huh7-AI es va dur a terme sembrant una quantitat de 5×10^5 cèl·lules en 1.12cm² de superfície, i suplementant el medi de creixement amb un 15% de sèrum fetal boví (FBS). Aquest medi es renovava cada 48 hores un cop les cèl·lules havien arribat a la confluència suplementant-lo amb un 1% de DMSO. Aquest protocol es duia a terme un total de 14 dies mantenint les cèl·lules a 37°C en una atmosfera enriquida amb un 5% en CO₂.

7.8.1 Immunofluorescència indirecta de doble marcatge per cèl·lules Huh7-AI polaritzades

Per tal d'avaluar la polarització es va posar a punt una immunofluorescència indirecta de doble marcatge de les unions estretes (tight junctions) de la membrana apical, concretament per la proteïna ZO-1 (*zonula occludens protein-1*), i de l'ATPasa de sodi-potassi (Na^+K^+ -ATPasa) de la membrana basolateral dels hepatòcits. Es van polaritzar cèl·lules seguint el protocol descrit en l'apartat anterior 7.8 sobre un cobreobjectes *Lab-Tek® Chambered #1.0 Borosilicate Coverglass System (2 chamber) (Nunc™, Thermo Scientific™)*. Un cop polaritzades se'ls va realitzar el següent protocol:

Reactius

- PBS 100mM
- Solució de fixació: paraformaldehid 4% en PBS i sacarosa 60mM
- Solució de rentat: PBS amb Glicina 20mM
- Solució de permeabilització: PBS amb Glicina 20mM i 0.05% TritóX100
- Solució de bloqueig: PBS amb Glicina 20mM i 1% BSA
- Solució d'incubació: PBS amb Glicina 20mM, 1% BSA i 0.025% TritóX100

Procediment

- Retirar el medi de cultiu
- Rentar amb PBS

Material i mètodes

- 15' solució de fixació
- 2 x 5' PBS
- 2 x 5' solució de rentat
- 10' solució de permeabilització
- 2 x 5' solució de rentat
- 30' solució de bloqueig
- 60' solució d'incubació amb els anticossos primaris a 37°C amb humitat controlada
 - o 1/250 Anti-ZO-1 rabbit polyclonal (Santa Cruz Biotechnology)
 - o 1/100 Anti- Na+K+-ATPasa Mouse monoclonal (Abcam)
- 2 x 5' solució de rentat
- 60' solució d'incubació amb els anticossos secundaris a 37°C amb humitat controlada
 - o 1/500 Goat Anti-Rabbit polyclonal IgG H&L Alexa Fluor 488 (Abcam)
 - o 1/200 Goat Anti-Mouse polyclonal IgG Cy3 (Abcam)

*A partir d'aquest pas cal protegir les immunofluorescències de la llum

- 2 x 5' solució de rentat
- 15' solució d'incubació amb DAPI (*Cell biology Boehringer MannheimTM*) a 1 µg/ml
- 2 x 5' PBS
- Addicionar PBS i guardar a 4°C
- Observar les immunofluorescències al microscopi confocal

Controls: anticossos primaris sols, anticossos secundaris sols, un primari amb el segon secundari, una mostra sense anticossos (auto fluorescència).

Les imatges d'immunofluorescència indirecta van ser agafades amb el microscopi confocal *LEICA TCS SP2 (Leica Microsystems)* dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB). La presa d'imatges es va dur a terme amb un objectiu HCXPL APOCS 40.0x1.25 OIL a una resolució de 512 x 512 i HCPL APOCS 20.0x0.70 IMM/COR a 1024 x 1024, amb una distància entre talls de 0.5 µm. Els làsers utilitzats van ésser els de 488nm, 568nm i 405nm. La reconstrucció volumètrica tridimensional (3D) es va fer amb el software *Imaris v.7.2.1*.

7.8.2 Infecció de monocapes polaritzades de cèl·lules Huh7-AI en sistemes de *transwell*

Es van sembrar cèl·lules Huh7-AI a densitat 5×10^5 cèl·lules/pou en inserts de membrana semipermeables (0.4 µm porus) d'un sistema de *transwell* de 12 pous (*Corning™ Transwell™ Multiple Well Plate with Permeable Polycarbonate Membrane Inserts*). Es van polaritzar les cèl·lules seguint el protocol detallat en l'apartat anterior **7.8**. Un cop polaritzades, es van infectar amb les dos poblacions de l'HAV, la parental L0 i la mutant de replicació ràpida HP, a una MOI de 5 a través dels compartiments apical i basolateral del sistema de *transwell*. Passat el temps d'adsorció del virus (1 hora 30 minuts) es va retirar l'inòcul, es va netejar la monocapa i es va deixar incubar amb medi al 2% de FBS a 37°C en una atmosfera enriquida amb un 5% en CO₂. Es van recollir les partícules produïdes en els sobrenedants d'ambdós compartiments a temps 0, 5 i 7 dies després de la infecció. El títol a temps 0 correspon al títol després d'una hora i mitja d'adsorció i dos rentats, el qual es va sostreure per observar l'augment de títol als 5 i 7 dies. Es van realitzar un mínim de 3 experiments independents amb 3 rèpliques cadascun i per cadascuna de les poblacions del virus.

7.8.3 Mesura de la permeabilitat amb FITC-Dextrà

Per mesurar si la infecció amb el virus alterava la permeabilitat de la monocapa de cèl·lules Huh7-A1 polaritzades, es va utilitzar el marcador FITC-Dextrà de 4 kDa. Es va dur a terme el protocol descrit en l'apartat anterior **7.8.2**, amb algunes modificacions que es detallen a continuació:

- Es fan duplicats per cadascuna de les condicions
- Es deixen dos pous sense infectar per poder-los utilitzar com a control de la permeabilitat en condicions normals
- Un cop retirem el sobrenedant d'ambdós compartiments (apical i basolateral) a temps 5 dies, el medi que s'afegeix és medi sense roig fenol i sense sèrum
- A dia 6 post infecció afegim 10 μ l / pou del *stock* de FITC-Dextrà a 5mM a través del compartiment apical del *transwell*. (a partir d'aquest pas, ell inclòs, es fa la resta de l'experiment sense llum a la cabina)
- Es tapa la placa amb paper d'alumini i es deixa incubant a 37°C en una atmosfera enriquida amb un 5% en CO₂ 24 hores
- Recollir en *eppendorf* totes les mostres del *transwell* i protegir-les de la llum

Quantificació del FITC-Dextrà

Tant per a les mostres com per a la recta patró cal tenir la precaució de treballar sense llum. Sempre es mantindran els *eppendorf* en gel i protegits de la llum amb paper d'alumini.

Recta patró

2,5 μM = 10 μL solució FITC-Dextrà 125 μM + 490 μl Medi *

400 nM = 240 μL solució FITC-Dextrà 2,5 μM + 1260 μl Medi*

200 nM = 700 μL solució FITC-Dextrà 400 nM + 700 μl Medi*

100 nM = 700 μL solució FITC-Dextrà 200 nM + 700 μl Medi*

50 nM = 700 μL solució FITC-Dextrà 100 nM + 700 μl Medi*

25 nM = 700 μL solució FITC-Dextrà 50 nM + 700 μl Medi*

12,5 nM = 700 μL solució FITC-Dextrà 25 nM + 700 μl Medi*

6,125 nM = 700 μL solució FITC-Dextrà 12,5 nM + 700 μl Medi*

Blanc = 700 μl Medi*

**Medi sense roig fenol. El que es va utilitzar per dur a terme l'experiment.*

- Carregar la placa ELISA afegint 175 μL / pou de l'estàndard o la mostra. Cal evitar la formació de bombolles i d'esquitxades que poden sortir de la pipeta.

La fluorescència va ser determinada amb un espectrofluorímetre (*Victor3; Perkin Elmer, Waltham, MN, EUA*). Els valors obtinguts es van interpolar amb la recta patró.

Es van realitzar un mínim de dos experiments independents per a cadascuna de les condicions.

7.9 Mesura de la citotoxicitat de les drogues en cèl·lules Huh7-AI

Per mesurar la citotoxicitat de les drogues en la línia cel·lular Huh7-AI, es va fer un recompte de la viabilitat cel·lular tal i com s'indica en

l'apartat **7.1.7** del rang de les 4 concentracions esmentades en l'apartat **4.6** per cadascuna de les drogues.

Es van incubar durant 24 hores les cèl·lules Huh7-AI confluents amb medi MEM al 2% FBS suplementat amb cadascuna de les drogues i concentracions, i com a controls cèl·lules Huh7-AI confluents amb medi MEM al 2% FBS sense drogues. Es van realitzar dos experiments independents amb dues rèpliques cadascun per a cada condició. Un cop realitzat el recompte de la viabilitat cel·lular per duplicat en cadascuna de les condicions dels experiments i les rèpliques, es va calcular el percentatge de viabilitat cel·lular respecte dels controls de cèl·lules sota les mateixes condicions però sense la droga.

7.10 Assaig d'alteració molecular de la via de sortida del virus de l'HAV com a base per a l'obtenció de potencials drogues antivirals multidiana

Els experiments amb les drogues durant la fase de sortida de cicle del virus de l'HAV es van realitzar amb cèl·lules Huh7-AI cultivades sota les condicions descrites a l'apartat **7.1.2** en flascons de 25 cm² de superfície, un cop assolida la confluència cel·lular es va seguir el següent protocol.

- Retirar el medi de cultiu
- Rentar dos cops amb PBS
- Infectar amb la població del virus corresponent a una MOI d'1
- Incubar a 37 °C durant 1 hora
- Afegir medi post infecció MEM 2% FBS
- Incubar 24 hores a 37 °C
- Retirar el medi

- Rentar dos cops amb PBS
- Afegir MEM 2% FBS suplementat, o no (per als controls), amb la concentració de la droga corresponent
- Incubar a 37 °C durant 24 hores
- Recollir el sobrenedant cel·lular
- Quantificar els virus infecciosos dels sobrenedants cel·lulars (veure apartat 7.1.6)

Drogues testades:

- Wortmanina (Sigma-Aldrich) a 50 nM
- Monensina (Sigma-Aldrich) a 8 µM
- Bafilomicina A1 (Sigma-Aldrich) a 40 nM

7.10.1 Assaig d'inhibició de les fases inicials del cicle de l'HAV en cèl·lules Huh7-AI

Els experiments amb les drogues durant les fases inicials de cicle del virus de l'HAV es van realitzar amb cèl·lules Huh7-AI cultivades amb les mateixes condicions descrites en l'apartat anterior 7.10 modificant el moment d'addició de les drogues sota el següent protocol.

- Retirar el medi de cultiu
- Rentar dos cops amb PBS
- Afegir MEM 2% FBS suplementat, o no (per als controls), amb la concentració de la droga corresponent
- Incubar a 37 °C durant 2 hores
- Infectar amb la població del virus corresponent a una MOI d'1
- Incubar a 37 °C durant 1 hora

- Afegir medi post infecció MEM 2% FBS suplementat amb la droga, o sense suplementar en el cas dels control
- Incubar a 37 °C durant 21 hores
- Retirar el medi
- Rentar dos cops amb PBS
- Afegir medi fresc MEM 2% FBS
- Incubar a 37 °C durant 24 hores
- Lisar les cèl·lules amb tres cicles de congelació – descongelació
- Quantificar els virus infecciosos dels lisats cel·lulars (veure apartat 7.1.6)

Drogues testades:

- Wortmanina (Sigma-Aldrich) a 50 nM
- Monensina (Sigma-Aldrich) a 8 µM
- Bafilomicina A1 (Sigma-Aldrich) a 40 nM

7.11 Anàlisi de l'activitat de l'IRES mitjançant l'ús de vectors bicistrònics

Per observar l'efecte de les potencials drogues antivirals sobre la capacitat per promoure l'inici de la traducció dependent de l'IRES que presenten les dues poblacions del virus de l'hepatitis A utilitzades en aquest estudi, es va fer ús d'un vector bicistrònic, el qual va ser amablement cedit al nostre laboratori per la Dra. Anne Marie Roque-Afonso (*Laboratoire de Virologie, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, França*) (**Figura 45**). Aquest vector bicistrònic presenta un sistema dual de luciferases, és a dir, conté un gen que codifica per la luciferasa de *Photinus pyralis* (*Fluc, de Firefly luciferase*), el qual actua com a gen reporter i un altre gen que codifica per la luciferasa

Renilla reniformis (*Rluc*, de *Renilla luciferase*), que serveix com a control intern de l'eficiència de transfecció. L'IRES de les poblacions de l'HAV es troba als dos plasmidis, localitzat després del gen de la *Rluc* i abans del gen de la *Fluc*. Mentre que la transcripció és dirigida pel promotor de citomegalovirus, la traducció de *Fluc* depèn de l'IRES de l'HAV i la de la *Rluc* de *cap* (**Figura 45**). El vector també conté un gen de resistència a ampicil·lina [25].

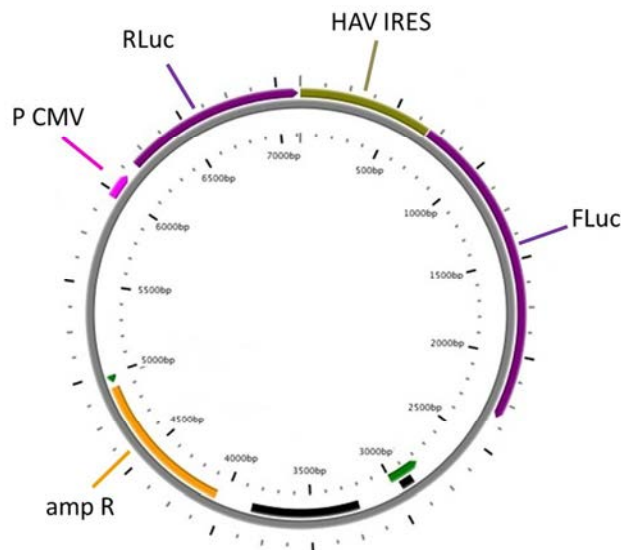


Figura 45. Esquema del vector bicistrònic G1RC. FLuc és el gen que codifica per la luciferasa de *Photinus pyralis*, i actua com a gen reporter; RLuc és el gen que codifica per la luciferasa de *Renilla reniformis*, i actua com a control de l'eficiència de la transfecció; HAV IRES és l'IRES de l'HAV de la soca adaptada a cultiu cel·lular HM-175/18f; P CMV és el promotor de citomegalovirus; ampR és un gen de resistència a ampicil·lina. Imatge adaptada de [217].

La seqüència corresponent a l'IRES del HAV en el plasmidi G1RC va ser modificada en el nostre laboratori, mitjançant mutagènesis dirigida per crear una sèrie de plasmidis que continguessin un IRES igual al de les poblacions HM175-L0 i HM175-HP, anomenats G1RL0 i G1R ϕ 16, respectivament [217]. El vector G1R ϕ 16 es diferencia del G1RL0 per la

presència de tres mutacions, T590C, T726C i T359C, que li confereixen un canvi estructural a l'IRES proporcionant-li una major activitat dirigint la traducció respecte a G1RL0, en cèl·lules FRhK-4 [217]. Per tal d'utilitzar els dos plasmidis bicistrònics per a la transfecció transitòria de cèl·lules Huh7-AI es va transformar *E. coli* amb ells amb la finalitat d'obtenir-ne grans quantitats a concentracions elevades. L'ús d'aquests vectors bicistrònics ens va permetre obtenir una estimació de l'activitat de l'IRES en cèl·lules Huh7-AI i avaluar l'efecte de les potencials drogues antivirals sobre el mateix. El coeficient FLuc/RLuc permet normalitzar l'activitat de l'IRES amb respecte a l'eficiència de transfecció. Es va mesurar l'activitat bioluminescent de la FLuc i la RLuc en els lisats de cèl·lules Huh7-AI amb presència i absència de les drogues, per tal de poder calcular posteriorment el percentatge d'inhibició de l'IRES degut a l'acció de cadascuna de les drogues. Per calcular l'activitat relativa de l'IRES sota l'efecte de les drogues, cada valor FLuc/RLuc es va dividir per la mitjana dels valors de FLuc/RLuc del plàsmid sense droga i es va expressar com a unitats arbitràries (UA) [25]. Aquest anàlisi es va realitzar per a cada plasmidi 5 cops de manera independent amb dues rèpliques en cada cas.

7.11.1 Transformació d'*E. coli* DH5 α competents

Realitzar els següents passos en condicions d'esterilitat:

- Descongelar les cèl·lules competents en gel (*Library Efficiency® DH5 α TM Competent Cells, InvitrogenTM*). Posar en gel un tub de polipropilè
- Barrejar suaument les cèl·lules i afegir 50 μ l de les mateixes en el tub de polipropilè fred

- Afegir 1 µl de cadascun dels plasmidis a les cèl·lules barrejant amb moviments suaus de la pipeta mentre es dispensa
- Incubar en gel durant 30 minuts
- Introduir el tub en un bany d'aigua a 42 °C durant 45 segons
- Posar el tub en gel durant 2 minuts
- Afegir 450 µl de medi S.O.C a temperatura ambient
- Agitar durant 1 hora a 225rpm i 37 °C
- Sembrar 100 µl de cèl·lules transformades en plaques de Petri amb medi LB agar i 100 µg / ml d'Ampicil·lina
- Incubar les plaques sembrades durant tota la nit a 37 °C

Solucions necessàries

Medi LB-Agar amb ampicil·lina (100 µg / ml):

Triptona	10 g/l
Extracte de llevadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar	15 g/l
En aigua Milli-Q	

7.11.2 Preparació de plasmidis a concentracions elevades

- Transferir una colònia procedent del pas anterior a 100 ml de medi LB amb ampicil·lina en un matràs de 1,000 ml. Mantenir en agitació a 37 °C durant tota la nit
- Centrifugar el cultiu bacterià a 4,000 g durant 15 minuts a temperatura ambient.

- Descartar el sobrenedant
- Realitzar l'extracció plasmídica segons les instruccions del fabricant amb el *kit PowerPrep™ HP Plasmid Midiprep System (Origene)*
- Guardar la midiprep a -20 °C

7.11.3 Seqüenciació de Sanger

Per comprovar la seqüència dels plasmidis produïts es va utilitzar el kit *BigDye® Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*. El protocol que es va seguir es descriu a continuació.

Preparar la barreja de reacció

Reactiu	Volum
<i>BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix</i> (Applied Biosystems)	1 µl
5 µM <i>Primer</i> específic	0.64 µl
Tampó de dilució 5x (Applied Biosystems)	2 µl
Extracte d'àcids nucleics (DNA)	1-50 ng
H ₂ O desionitzada lliure de DNases i RNases (Gibco®, Life Technologies™)	
Volum total	10 µl

Realitzar el següent programa amb el termociclador

FASES	TEMPERATURA	TEMPS	CICLES
Desnaturalització	96°C	2'	1X
Amplificació	96°C	10''	25X
	50°C	5''	
	60°C	4'	

- Guardar el producte a 4 °C
- Afegir 10 µl d'aigua desionitzada lliure de DNAses i RNAses (Gibco®, Life Technologies™) al producte resultant

La purificació dels productes d'extensió i la electroforesi en un seqüenciador automàtic es realitzaven als Centres Científics i Tecnològics de la UB (CCiTUB). La seqüenciació es va dur a terme amb un seqüenciador automàtic de DNA, *ABI Prism 377*. Els cromatogrames generats pel seqüenciador, emmagatzemats en arxius "ab.1", es van analitzar amb el programa *Chromas* (http://technelysium.com.au/?page_id=13).

Oligonucleòtid	Seqüència
MUT IRES +	5' TTCTGTCTTCTTTCTTCCAGG 3'
MUT G1RL0 -	5' CCTTATGCAGTTGCTGTCC 3'

Taula 6. Oligonucleòtids utilitzats per la seqüenciació dels plasmidis G1RL0 i G1Rφ16.

7.11.4 Transfecció transitòria de cèl·lules Huh7-AI amb plasmidis bicistrònics

Las cèl·lules Huh7-AI es van transfectar utilitzant el *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Applied Science)*, seguint el següent protocol.

- 24 hores abans de la transfecció, subcultivar cèl·lules Huh7-AI i sembrar-les en plaques de 96 pous amb un Split ratio de 1:3 utilitzant medi de cultiu MEM al 10% FBS sense antibiòtics
- Quantificar la concentració dels plasmidis a transfectar amb l'aparell *NanoDrop® ND-1000*
- Posar a temperatura ambient el vector a transfectar, el medi sense sèrum *Opti-MEM® I* (Thermo Fisher Scientific) i el reactiu de transfecció *X-treme GENE™ HP DNA Transfection Reagent (Roche)*
- Diluir el DNA plasmídic en medi *Opti-MEM® I* fins una concentració final de DNA de 0.01 µg / µl
- Afegir 3 µl de *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Applied Science)* (reactiu de transfecció) per cada 100 µl de la barreja anterior. Barrejar suaument i incubar durant 30 minuts a temperatura ambient
- Retirar el medi de cultiu de la placa de 96 pous
- Afegir gota a gota el complex DNA plasmídic - *Opti-MEM® I* - reactiu de transfecció a cada pou de la placa que es vulgui transfectar (25 µl / pou), remenant la placa suaument.
- Incubar durant 30 minuts a temperatura ambient
- Afegir 60 µl d'*Opti-MEM® I* a cada pou transfectat

- Incubar la multiplaca amb les cèl·lules transfectades en un incubador de CO₂ a 37 °C durant 24 hores

Incloure controls negatius: cèl·lules no transfectades, cèl·lules només amb DNA (sense reactiu de transfecció) i cèl·lules amb el reactiu de transfecció (sense DNA).

7.11.5 Addició de les potencials drogues antivirals

Per estudiar l'efecte de les potencials drogues antivirals sobre l'activitat de l'IRES, es van addicionar les drogues, a les concentracions determinades no citotòxiques (veure apartat **7.10**), passades sis hores de la transfecció cel·lular fins la lectura de l'activitat bioluminescent.

Drogues testades sobre l'activitat de l'IRES en cèl·lules Huh7-AI

- Wortmanina (*Sigma-Aldrich*) a 50 nM
- Monensina (*Sigma-Aldrich*) a 8 µM
- Bafilomicina A1 (*Sigma-Aldrich*) a 40 nM

7.11.6 Mesura de l'activitat bioluminescent

L'activitat bioluminescent de les luciferases Fluc i Rluc dels cultius de cèl·lules transfectades amb els plasmidis bicistrònics es va mesurar 24 hores després de la transfecció, utilitzant el kit *Dual-Glo® Luciferase Assay System* (Promega) i un luminòmetre *Lumat LB 9507* (Berthold Technologies), seguint el protocol que es detalla a continuació.

- Posar els recatius del kit a temperatura ambient
- Afegir 85 µl del reactiu *Dual-Glo® Luciferase* (el substrat específic de la luciferasa FLuc) a cada pou amb cèl·lules transfectades de la placa de 96 pous, barrejar i transferir 160 µl a un tub transparent de dimensions entre 11.5 i 12.1 mm de diàmetre i de 75 a 76 mm de longitud
- Esperar 10 minuts i mesurar l'emissió de llum amb el luminòmetre seleccionant un temps de mesura de 10 segons
- Preparar el reactiu *Dual-Glo® Stop & Glo* (que conté el substrat específic de la luciferasa RLuc i disminueix la luminescència de FLuc almenys 10,000 vegades), afegir 80 µl del mateix a cada pou i barrejar
- Esperar 10 minuts i mesurar l'emissió de llum amb el luminòmetre seleccionant un temps de mesura de 10 segons
- Calcular la relació FLuc / RLuc per a cada valor

Per obtenir la màxima precisió dels resultats, les mesures de luminescència de la *Firefly* i la *Renilla* es van restar de les luminescències de les mostres, és a dir, es va sostreure el *background*. Cap dels dos gens *reporters* s'expressa de manera endògena a les cèl·lules de mamífer. Conseqüentment, la quantitat de luminescència que va generar el *background* era característica del luminòmetre i del substrat de la luminescència. La mesura del *background* de la *Firefly luciferase* es va realitzar en cèl·lules sense transfectar i només amb l'addició del *Dual-Glo® Luciferase Reagent*. En canvi, el càlcul del *background* de la *Renilla luciferase* es va mesurar en cèl·lules sense transfectar però, amb l'addició dels dos reactius: el *Dual-Glo® Luciferase Reagent* seguit del *Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent*.

7.12 Immunofluorescència indirecta de doble marcatge per l'estudi de l'efecte de la monensina en cèl·lules Huh7-AI

Per estudiar la capacitat d'inducció d'autofàgia no canònica per part de la monensina en cèl·lules Huh7-AI i el seu efecte sobre el virus de l'HAV es va utilitzar el protocol d'immunofluorescència indirecta del virus de l'HAV amb la proteïna LC3b, descrit en l'apartat 7.5.3 de material i mètodes. Es van fer créixer cèl·lules sembrades a una densitat de 7×10^4 cèl·lules/pou en un cobreobjectes *Lab-Tek® Chambered #1.0 Borosilicate Coverglass System (8 chamber) (Nunc™, Thermo Scientific™)*. Un cop confluents (48 hores després aproximadament) es van infectar amb una MOI de 5. A les 24 hores post infecció es va afegir la monensina a una concentració de $8 \mu\text{M}$ i es va deixar replicar el virus 48 hores més. Les infeccions es van aturar a un total de 72 hores post infecció i se'ls va realitzar el protocol d'immunofluorescència. Es van realitzar 2 experiments independents.

Les imatges es van analitzar per microscòpia confocal amb el microscopi confocal *LEICA TCS SP2 (Leica Microsystems)* dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB) utilitzant un objectiu HCXPL APOCS 63.0x1.40 OIL a una resolució de 512×512 . La distància entre talls va ser de $0.12 \mu\text{m}$. Els làsers utilitzats van ésser els de 488nm, 568nm i 405nm.

7.13 Anàlisi estadístic

L'anàlisi dels resultats es va realitzar amb el programa *SigmaPlot*. Es va determinar si hi havia diferències estadísticament significatives entre el

virus parental HM175-L0 i el mutant HM175-HP per als diferents paràmetres avaluats, utilitzant el test t-Student i comprovant paràmetres com l'homoscedasticitat i la normalitat dels residus. *SigmaPlot* es va utilitzar també per l'edició de les gràfiques. Els resultats es van expressar com la mitjana \pm l'error estàndard.

8. BIBLIOGRAFIA



-
- [1] Cockayne EA. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *QJM*. 1912;6:1-28.
- [2] Zuckerman AJ. The history of viral hepatitis from antiquity to the present. In: Deinhardt, F. & Deinhardt JMD, editor. *Viral hepatitis: laboratory and clinical science*. Marcel Dekker, New York; 1983. p. 3-32.
- [3] Blumer G. Infectious jaundice in the United States. *JAMA*. 1923;81(5):353.
- [4] MacCallum FO. Homologous serum jaundice. Vol. 1, *British Medical Bulletin*. 1943. p. 114-5.
- [5] Hilleman MR. Hepatitis and hepatitis A vaccine: a glimpse of history. *J Hepatol*. 1993;18 Suppl 2:S5-10.
- [6] Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA*. 1967;200(5):365-73.
- [7] Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *J Exp Med*. 1967;125(4):673-88.
- [8] Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*. 1973;182(4116):1026-8.
- [9] Provost PJ, Wolanski BS, Miller WJ, Ittensohn OL, McAleer WJ, Hilleman MR. Physical, chemical and morphologic dimensions of human hepatitis A virus strain CR326 (38578). *Proc Soc Exp Biol Med*. 1975;148(2):532-9.
- [10] Miller WJ, Provost PJ, McAleer WJ, Ittensohn OL, Villarejos VM, Hilleman MR. Specific immune adherence assay for human hepatitis A antibody application to diagnostic and epidemiologic

- investigations. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1975;149(1):254–61.
- [11] Purcell RH, Wong DC, Moritsugu Y, Dienstag JL, Routenberg JA, Boggs JD. A microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody. *J Immunol.* 1976;116(2):349–56.
- [12] Gust ID, Lehmann NI, Crowe S, McCrorie M, Locarnini SA, Lucas CR. The origin of the HM175 strain of hepatitis A virus. *J Infect Dis.* 1985;151(2):365–7.
- [13] Cromeans T, Sobsey MD, Fields HA. Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J Med Virol.* 1987;22(1):45–56.
- [14] Cohen JI, Rosenblum B, Feinstone SM, Ticehurst J, Purcell RH. Attenuation and cell culture adaptation of hepatitis A virus (HAV): a genetic analysis with HAV cDNA. *J Virol.* 1989;63(12):5364–70.
- [15] ICTV. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. King AMQ, Adams MJ, Lefkowitz EJ, Carstens EB, editors. Elsevier; 2011. 855-880 p.
- [16] Drexler JF, Corman VM, Lukashev AN, Van Den Brand JMA, Gmyl AP, Brünink S, et al. Evolutionary origins of hepatitis A virus in small mammals. *PNAS.* 2015;112(49):15190–5.
- [17] Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, Ping L, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature.* 2013;496(7445):367–71.
- [18] Feng Z, Hirai-Yuki A, McKnight KL, Lemon SM. Naked Viruses That Aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. *Annu Rev Virol.* 2014;1(1):539–60.
- [19] Abad FX, Pintó RM, Bosch A. Survival of Enteric Viruses on Environmental Fomites. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(10):3704–10.
- [20] Walker CM, Feng Z, Lemon SM. Reassessing immune control of

- hepatitis A virus. *Curr Opin Virol.* 2015;11:7–13.
- [21] Brown EA, Zajac AJ, Lemon SM. 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.* 1994;68(2):1066–74.
- [22] Ehrenfeld E, Teterina NL. Initiation of Translation of Picornavirus RNAs: Structure and Function of the Internal Ribosome Entry Site. In: *Molecular Biology of Picornavirus.* American Society of Microbiology; 2002. p. 159–69.
- [23] Martínez-Salas E, Francisco-Velilla R, Fernandez-Chamorro J, Lozano G, Diaz-Toledano R. Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions. *Virus Res.* 2015;206:62–73.
- [24] Whetter LE, Day SP, Elroy-Stein O, Brown EA, Lemon SM. Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *J Virol.* 1994;68(8):5253–63.
- [25] Mackiewicz V, Cammas A, Desbois D, Marchadier E, Pierredon S, Beaulieux F, et al. Nucleotide variability and translation efficiency of the 5' untranslated region of hepatitis A virus: update from clinical isolates associated with mild and severe hepatitis. *J Virol.* 2010;84(19):10139–47.
- [26] Pint?? RM, D'Andrea L, P??rez-Rodríguez FJ, Costafreda MI, Ribes E, Guix S, et al. Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines. *Future Microbiol.* 2012;7(3):331–46.
- [27] Martin A, Lemon SM. Hepatitis A virus: From discovery to vaccines. *Hepatology.* 2006;43(S1):S164–72.
- [28] Wang X, Ren J, Gao Q, Hu Z, Sun Y, Li X, et al. Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. *Nature.* 2015;517(7532):85–8.

- [29] Zhu L, Zhang X. Hepatitis A virus exhibits a structure unique among picornaviruses. *Protein Cell*. 2015;6(2):79–80.
- [30] Probst C, Jecht M, Gauss-Müller V. Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles. Role of structural proteins VP4 and 2A. *J Biol Chem*. 1999;274(8):4527–31.
- [31] Costafreda MI, Ribes E, Franch A, Bosch A, Pinto RM. A Single Mutation in the Glycophorin A Binding Site of Hepatitis A Virus Enhances Virus Clearance from the Blood and Results in a Lower Fitness Variant. *J Virol*. 2012;86(15):7887–95.
- [32] Sánchez G, Aragonès L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A, Pintó RM. Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycophorin A of the erythrocyte membrane. *J Virol*. 2004;78(18):9807–13.
- [33] Scholz E, Heinricy U, Flehmig B. Acid Stability of Hepatitis A Virus. *J Gen Virol*. 1989;70(9):2481–5.
- [34] Sánchez G, Bosch A, Pintó RM. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis a virus. *J Virol*. 2003;77(1):452–9.
- [35] Nainan O V, Brinton MA, Margolis HS. Identification of amino acids located in the antibody binding sites of human hepatitis A virus. *Virology*. 1992;191(2):984–7.
- [36] Ping LH, Lemon SM. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J Virol*. 1992;66(4):2208–16.
- [37] Bosch A, González-Dankaart JF, Haro I, Gajardo R, Pérez JA, Pintó RM. A new continuous epitope of hepatitis A virus. *J Med Virol*. 1998;54(2):95–102.
- [38] Sánchez G, Bosch A, Gómez-Mariano G, Domingo E, Pintó RM. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology*. 2003;315(1):34–42.
- [39] Aragonès L, Bosch A, Pintó RM. Hepatitis A virus mutant spectra

- under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *J Virol.* 2008;82(4):1688–700.
- [40] Pintó RM, Pérez-Rodríguez F-J, D' Andrea L, de Castellarnau M, Guix S, Bosch A. Hepatitis A Virus Codon Usage: Implications for Translation Kinetics and Capsid Folding. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8:a031781.
- [41] Yu J, Li L, Zhang C, Lu S, Ao Y, Gao H, et al. A novel hepatovirus identified in wild woodchuck *Marmota himalayana*. *Sci Rep.* 2016;6(1):22361.
- [42] Anthony SJ, St Leger JA, Liang E, Hicks AL, Sanchez-Leon MD, Jain K, et al. Discovery of a Novel Hepatovirus (Phopivirus of Seals) Related to Human Hepatitis A Virus. *MBio.* 2015;6(4):e01180-15.
- [43] Lu L, Ching KZ, Paula VS de, Nakano T, Siegl G, Weitz M, et al. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J Gen Virol.* 2004;85(10):2943–52.
- [44] Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercof R, Casane D, Colina R, et al. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol.* 2002;76(18):9516–25.
- [45] Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Lite J, Sala R, Barrabeig I, Bosch A, et al. Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005-2009: circulation of newly emerging strains. *J Clin Virol.* 2011;52(2):98–102.
- [46] Cristina J, Costa-Mattioli M. Genetic variability and molecular evolution of Hepatitis A virus. *Virus Res.* 2007;127(2):151–7.
- [47] Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), Fiore AE, Wasley A, Bell BP. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on

- Immunization Practices (ACIP). MMWR. 2006;55(RR-7):1-23.
- [48] Tjon G, Xiridou M, Coutinho R, Bruisten S. Different transmission patterns of hepatitis A virus for two main risk groups as evidenced by molecular cluster analysis. *J Med Virol*. 2007;79(5):488-94.
- [49] Ngui S-L, Granerod J, Jewes LA, Crowcroft NS, Teo C-G. Outbreaks of hepatitis A in England and Wales associated with two co-circulating hepatitis A virus strains. *J Med Virol*. 2008;80(7):1181-8.
- [50] Asher L V, Binn LN, Mensing TL, Marchwicki RH, Vassell RA, Young GD. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J Med Virol*. 1995;47(3):260-8.
- [51] Blank CA, Anderson DA, Beard M, Lemon SM. Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *J Virol*. 2000;74(14):6476-84.
- [52] Pringault E, Prévost M-C, Caliot E, Pelletier I, Ouzilou L, Colbère-Garapin F. Poliovirus transcytosis through M-like cells. *J Gen Virol*. 2002;83(9):2177-82.
- [53] Dotzauer A, Brenner M, Gebhardt U, Vallbracht A. IgA-coated particles of Hepatitis A virus are translocalized antivectorially from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *J Gen Virol*. 2005;86(10):2747-51.
- [54] Hirai-Yuki A, Hensley L, Whitmire JK, Lemon SM. Biliary Secretion of Quasi-Enveloped Human Hepatitis A Virus. *MBio*. 2016;7(6):e01998-16.
- [55] Shibayama T, Kojima H, Ashida M, Hirose S, Sato A, Kamimura T, et al. Localization of hepatitis A virus in marmoset liver tissue during the acute phase of experimental infection. *Gastroenterol Jpn*. 1985;20(6):564-72.

-
- [56] Mathiesen LR, Drucker J, Lorenz D, Wagner JA, Gerety RJ, Purcell RH. Localization of hepatitis A antigen in marmoset organs during acute infection with hepatitis A virus. *J Infect Dis.* 1978;138(3):369–77.
- [57] Feng Z, Lemon SM. Peek-a-boo: membrane hijacking and the pathogenesis of viral hepatitis. *Trends Microbiol.* 2014;22(2):59–64.
- [58] Dotzauer A, Heitmann A, Laue T, Kraemer L, Schwabe K, Paulmann D, et al. The role of immunoglobulin A in prolonged and relapsing hepatitis A virus infections. *J Gen Virol.* 2012;93(Pt_4):754–60.
- [59] Dotzauer A, Gebhardt U, Bieback K, Göttke U, Kracke A, Mages J, et al. Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *J Virol.* 2000;74(23):10950–7.
- [60] Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone SM. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* 1996;15(16):4282–96.
- [61] Silberstein E, Dveksler G, Kaplan GG. Neutralization of Hepatitis A Virus (HAV) by an Immuno-adhesin Containing the Cysteine-Rich Region of HAV Cellular Receptor-1. *J Virol.* 2001;75(2):717–25.
- [62] Feigelstock D, Thompson P, Mattoo P, Zhang Y, Kaplan GG. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol.* 1998;72(8):6621–8.
- [63] Sui L, Zhang W, Chen Y, Zheng Y, Wan T, Zhang W, et al. Human membrane protein Tim-3 facilitates hepatitis A virus entry into target cells. *Int J Mol Med.* 2006;17(6):1093–9.
- [64] Tami C, Silberstein E, Manangeeswaran M, Freeman GJ, Umetsu SE, DeKruyff RH, et al. Immunoglobulin A (IgA) is a natural ligand of hepatitis A virus cellular receptor 1 (HAVCR1), and the association of IgA with HAVCR1 enhances virus-receptor interactions. *J Virol.*

- 2007;81(7):3437–46.
- [65] Das A, Hirai-Yuki A, González-López O, Rhein B, Moller-Tank S, Brouillette R, et al. TIM1 (HAVCR1) Is Not Essential for Cellular Entry of Either Quasi-enveloped or Naked Hepatitis A Virions. *MBio*. 2017;8(5):e00969-17.
- [66] Moller-Tank S, Kondratowicz AS, Davey RA, Rennert PD, Maury W. Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry. *J Virol*. 2013;87(15):8327–41.
- [67] Moller-Tank S, Maury W. Phosphatidylserine receptors: enhancers of enveloped virus entry and infection. *Virology*. 2014;468–470:565–80.
- [68] Costafreda MI, Kaplan G. HAVCR1 (CD365) and Its Mouse Ortholog Are Functional Hepatitis A Virus (HAV) Cellular Receptors That Mediate HAV Infection. *J Virol*. 2018;92(9):e02065-17.
- [69] Lemon SM, Ott JJ, Van Damme P, Shouval D. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *J Hepatol*. 2018;68(1):167–84.
- [70] Bishop NE. Conformational changes in the hepatitis A virus capsid in response to acidic conditions. *J Med Microbiol*. 1999;48(5):443–50.
- [71] Bishop NE, Anderson DA. Uncoating kinetics of hepatitis A virus virions and provirions. *J Virol*. 2000;74(7):3423–6.
- [72] Costafreda MI, Pérez-Rodríguez FJ, D’Andrea L, Guix S, Ribes E, Bosch A, et al. Hepatitis A virus adaptation to cellular shutoff is driven by dynamic adjustments of codon usage and results in the selection of populations with altered capsids. *J Virol*. 2014;88(9):5029–41.
- [73] Tesar M, Jia XY, Summers DF, Ehrenfeld E. Analysis of a potential myristoylation site in hepatitis A virus capsid protein VP4. *Virology*. 1993;194(2):616–26.
- [74] Shukla A, Padhi AK, Gomes J, Banerjee M. The VP4 peptide of

- hepatitis A virus ruptures membranes through formation of discrete pores. *J Virol.* 2014;88(21).
- [75] Racaniello VR. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Field's Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins; 2007. p. 796–838.
- [76] Zhang B, Morace G, Gauss-Müller V, Kusov Y. Poly(A) binding protein, C-terminally truncated by the hepatitis A virus proteinase 3C, inhibits viral translation. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(17):5975–84.
- [77] Pintó RM, Aragonès L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res.* 2007;127(2):158–63.
- [78] Gosert R, Cassinotti P, Siegl G, Weitz M. Identification of hepatitis A virus non-structural protein 2B and its release by the major virus protease 3C. *J Gen Virol.* 1996;77(2):247–55.
- [79] Martin A, Escriou N, Chao SF, Girard M, Lemon SM, Wychowski C. Identification and site-directed mutagenesis of the primary (2A/2B) cleavage site of the hepatitis A virus polyprotein: functional impact on the infectivity of HAV RNA transcripts. *Virology.* 1995;213(1):213–22.
- [80] Malcolm BA, Chin SM, Jewell DA, Stratton-Thomas JR, Thudium KB, Ralston R, et al. Expression and characterization of recombinant hepatitis A virus 3C proteinase. *Biochemistry.* 1992;31(13):3358–63.
- [81] Anderson DA, Ross BC. Morphogenesis of hepatitis A virus: isolation and characterization of subviral particles. *J Virol.* 1990;64(11):5284–9.
- [82] Morace G, Kusov Y, Dzagurov G, Beneduce F, Gauss-Muller V. The unique role of domain 2A of the hepatitis A virus precursor polypeptide P1-2A in viral morphogenesis. *BMB Rep.* 2008;41(9):678–83.

- [83] Cohen L, Bénichou D, Martin A. Analysis of deletion mutants indicates that the 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. *J Virol.* 2002;76(15):7495–505.
- [84] Bishop NE, Anderson DA. Hepatitis A virus subviral particles: purification, accumulation, and relative infectivity of virions, provirions and procapsids. *Arch Virol.* 1997;142(11):2147–60.
- [85] Graff J, Richards OC, Swiderek KM, Davis MT, Rusnak F, Harmon SA, et al. Hepatitis A virus capsid protein VP1 has a heterogeneous C terminus. *J Virol.* 1999;73(7):6015–23.
- [86] Bishop NE, Anderson DA. RNA-dependent cleavage of VP0 capsid protein in provirions of hepatitis A virus. *Virology.* 1993;197(2):616–23.
- [87] Gosert R, Egger D, Bienz K. A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology.* 2000;266(1):157–69.
- [88] Teterina NL, Bienz K, Egger D, Gorbalenya AE, Ehrenfeld E. Induction of intracellular membrane rearrangements by HAV proteins 2C and 2BC. *Virology.* 1997;237(1):66–77.
- [89] Yang Y, Liang Y, Qu L, Chen Z, Yi M, Li K, et al. Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(17):7253–8.
- [90] Yang Y, Yi M, Evans DJ, Simmonds P, Lemon SM. Identification of a conserved RNA replication element (cre) within the 3Dpol-coding sequence of hepatoviruses. *J Virol.* 2008;82(20):10118–28.
- [91] Marc D, Masson G, Girard M, van der Werf S. Lack of myristoylation of poliovirus capsid polypeptide VP0 prevents the formation of virions or results in the assembly of noninfectious virus particles. *J Virol.* 1990;64(9):4099–107.
- [92] Abrams CC, King AMQ, Belsham GJ. Assembly of foot-and-mouth

- disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *J Gen Virol.* 1995;76(12):3089–98.
- [93] Nugent CI, Kirkegaard K. RNA binding properties of poliovirus subviral particles. *J Virol.* 1995;69(1):13–22.
- [94] Verlinden Y, Cuconati A, Wimmer E, Rombaut B. Cell-free synthesis of poliovirus: 14S subunits are the key intermediates in the encapsidation of poliovirus RNA. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 11):2751–4.
- [95] Jiang P, Liu Y, Ma H-C, Paul A V, Wimmer E. Picornavirus Morphogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78(3):418–37.
- [96] Aragonès L, Guix S, Ribes E, Bosch A, Pintó RM. Fine-Tuning Translation Kinetics Selection as the Driving Force of Codon Usage Bias in the Hepatitis A Virus Capsid. *PLoS Pathog.* 2010;6(3):e1000797.
- [97] Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* 1989;96(3):736–49.
- [98] Snooks MJ, Bhat P, Mackenzie J, Counihan NA, Vaughan N, Anderson DA. Vectorial entry and release of hepatitis A virus in polarized human hepatocytes. *J Virol.* 2008;82(17):8733–42.
- [99] Lanford RE, Feng Z, Chavez D, Guerra B, Brasky KM, Zhou Y, et al. Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(27):11223–8.
- [100] Qu L, Feng Z, Yamane D, Liang Y, Lanford RE, Li K, et al. Disruption of TLR3 signaling due to cleavage of TRIF by the hepatitis A virus protease-polymerase processing intermediate, 3CD. *PLoS Pathog.* 2011;7(9):e1002169.
- [101] Wang D, Fang L, Wei D, Zhang H, Luo R, Chen H, et al. Hepatitis A virus 3C protease cleaves NEMO to impair induction of beta

- interferon. *J Virol.* 2014;88(17):10252–8.
- [102] Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2003;198(3):513–20.
- [103] Hornung V, Schlender J, Guenther-Biller M, Rothenfusser S, Endres S, Conzelmann K-K, et al. Replication-dependent potent IFN- α induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J Immunol.* 2004;173(10):5935–43.
- [104] Feng Z, Li Y, McKnight KL, Hensley L, Lanford RE, Walker CM, et al. Human pDCs preferentially sense enveloped hepatitis A virions. *J Clin Invest.* 2015;125(1).
- [105] Lemon SM, Binn LN. Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. *J Infect Dis.* 1983;148(6):1033–9.
- [106] Hong S, Lee HW, Chang D-Y, You S, Kim J, Park JY, et al. Antibody-secreting cells with a phenotype of Ki-67 low, CD138 high, CD31 high, and CD38 high secrete nonspecific IgM during primary hepatitis A virus infection. *J Immunol.* 2013;191(1):127–34.
- [107] Flehmig B, Zahn J, Vallbracht A. Levels of neutralizing and binding antibodies to hepatitis-A virus after onset of icterus: a comparison. *J Infect Dis.* 1984;150(3):461.
- [108] Stapleton JT, Lange DK, LeDuc JW, Binn LN, Jansen RW, Lemon SM. The role of secretory immunity in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis.* 1991;163(1):7–11.
- [109] Stapleton JT. Host immune response to hepatitis A virus. *J Infect Dis.* 1995;171 Suppl:S9-14.
- [110] Zhou Y, Callendret B, Xu D, Brasky KM, Feng Z, Hensley LL, et al. Dominance of the CD4(+) T helper cell response during acute resolving hepatitis A virus infection. *J Exp Med.* 2012;209(8):1481–92.

-
- [111] Choi YS, Lee J, Lee HW, Chang D-Y, Sung PS, Jung MK, et al. Liver injury in acute hepatitis A is associated with decreased frequency of regulatory T cells caused by Fas-mediated apoptosis. *Gut*. 2015;64(8):1303–13.
- [112] Manangeeswaran M, Jacques J, Tami C, Konduru K, Amharref N, Perrella O, et al. Binding of hepatitis A virus to its cellular receptor 1 inhibits T-regulatory cell functions in humans. *Gastroenterology*. 2012;142(7):1516–25.e3.
- [113] Kim HY, Eyheramonho MB, Pichavant M, Gonzalez Cambaceres C, Matangkasombut P, Cervio G, et al. A polymorphism in TIM1 is associated with susceptibility to severe hepatitis A virus infection in humans. *J Clin Invest*. 2011;121(3):1111–8.
- [114] D’Andrea L, Pérez-Rodríguez FJ, de Castellarnau M, Manzanares S, Lite J, Guix S, et al. Hepatitis A virus genotype distribution during a decade of universal vaccination of preadolescents. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):6842–54.
- [115] Berge JJ, Drennan DP, Jacobs RJ, Jakins A, Meyerhoff AS, Stubblefield W, et al. The cost of hepatitis A infections in American adolescents and adults in 1997. *Hepatology*. 2000;31(2):469–73.
- [116] WHO. WHO position paper on hepatitis A vaccines – June 2012. *Wkly Epidemiol Rec*. 2012;87(28/29):261–76.
- [117] Koff RS. Hepatitis A. *Lancet*. 1998;351(9116):1643–9.
- [118] Costafreda MI, Bosch A, Pintó RM. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(6):3846–55.
- [119] Bower WA, Nainan O V., Han X, Margolis HS. Duration of Viremia in Hepatitis A Virus Infection. *J Infect Dis*. 2000;182(1):12–7.
- [120] de Paula VS. Laboratory Diagnosis of Hepatitis A. *Future Virol*.

- 2012;7(5):461-72.
- [121] Fagan EA, Williams R. Fulminant viral hepatitis. *Br Med Bull.* 1990;46(2):462-80.
- [122] Lee WM. Acute liver failure. *N Engl J Med.* 1993;329(25):1862-72.
- [123] Rezende G, Roque-Afonso AM, Samuel D, Gigou M, Nicand E, Ferre V, et al. Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection. *Hepatology.* 2003;38(3):613-8.
- [124] Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Saisho H, Saotome N, Suzuki K, et al. Association between severity of type A hepatitis and nucleotide variations in the 5' non-translated region of hepatitis A virus RNA: strains from fulminant hepatitis have fewer nucleotide substitutions. *Gut.* 2002;51(1):82-8.
- [125] Vento S. Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2000;7 Suppl 1:7-8.
- [126] Mele A, Tosti ME, Stroffolini T. Hepatitis Associated with Hepatitis A Superinfection in Patients with Chronic Hepatitis C. *N Engl J Med.* 1998;338(24):1771-3.
- [127] Sattar SA, Jason T, Bidawid S, Farber J. Foodborne spread of hepatitis A: Recent studies on virus survival, transfer and inactivation. *Can J Infect Dis.* 2000;11(3):159-63.
- [128] Abad FX, Pintó RM, Diez JM, Bosch A. Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(7):2377-83.
- [129] Abad FX, Pintó RM, Bosch A. Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;156(1):107-11.
- [130] Lemon SM. Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clin Chem.* 1997;43(8 Pt 2):1494-9.
- [131] Löscher T, Keystone JS, Steffen R. Vaccination of travelers against

- hepatitis A and B. *J Travel Med.* 1999;6(2):107–14.
- [132] European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 - Hepatitis A. [Internet]. Stockholm: ECDC. 2016 [cited 2017 Dec 12]. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/hepatitis-annual-epidemiological-report-2016-2014-data#no-link>
- [133] Gozlan Y, Bar-Or I, Rakovsky A, Savion M, Amitai Z, Sheffer R, et al. Ongoing hepatitis A among men who have sex with men (MSM) linked to outbreaks in Europe in Tel Aviv area, Israel, December 2016 - June 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(29).
- [134] Rodríguez-Tajes S, Perpiñán E, Caballol B, Lens S, Mariño Z, Costa J, et al. Hepatitis A outbreak in Barcelona among men who have sex with men (MSM), January-June 2017: A hospital perspective. *Liver Int.* 2018 Nov;38(4):588–93.
- [135] European Centre for Disease Prevention and Control. Hepatitis A outbreak in the EU/EEA mostly affecting men who have sex with men - Third update, 28 June 2017. Stockholm: ECDC. 2017.
- [136] Freidl GS, Sonder GJ, Bovée LP, Friesema IH, van Rijckevorsel GG, Ruijs WL, et al. Hepatitis A outbreak among men who have sex with men (MSM) predominantly linked with the EuroPride, the Netherlands, July 2016 to February 2017. *Eurosurveillance.* 2017;22(8).
- [137] Jacobsen KH, Wiersma ST. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine.* 2010;28(41):6653–7.
- [138] Liu JP, Nikolova D, Fei Y. Immunoglobulins for preventing hepatitis A. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(2):CD004181.
- [139] Shouval D. The immunological basis for immunization series: module 18: hepatitis A. In: *Immunization, Vaccines and Biologicals.* World Health Organization; 2010. p. 1–39.

- [140] Tejada-Strop A, Costafreda MI, Dimitrova Z, Kaplan GG, Teo C-G. Evaluation of Potencies of Immune Globulin Products Against Hepatitis A. *JAMA Intern Med.* 2017;177(3):430.
- [141] Victor JC, Monto AS, Surdina TY, Suleimenova SZ, Vaughan G, Nainan O V., et al. Hepatitis A Vaccine versus Immune Globulin for Postexposure Prophylaxis. *N Engl J Med.* 2007;357(17):1685–94.
- [142] Emerson SU, Huang YK, Nguyen H, Brockington A, Govindarajan S, St Claire M, et al. Identification of VP1/2A and 2C as virulence genes of hepatitis A virus and demonstration of genetic instability of 2C. *J Virol.* 2002;76(17):8551–9.
- [143] Funkhouser AW, Purcell RH, D’Hondt E, Emerson SU. Attenuated hepatitis A virus: genetic determinants of adaptation to growth in MRC-5 cells. *J Virol.* 1994;68(1):148–57.
- [144] Xu Z-Y, Wang X-Y. Live attenuated hepatitis A vaccines developed in China. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(3):659–66.
- [145] Cederna JB, Klinzman D, Stapleton JT. Hepatitis A virus-specific humoral and cellular immune responses following immunization with a formalin-inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine.* 1999;18(9–10):892–8.
- [146] Lemon SM, Shapiro CN. The value of immunization against hepatitis A. *Infect Agents Dis.* 1994;3(1):38–49.
- [147] Bell BP, Shapiro CN, Alter MJ, Moyer LA, Judson FN, Mottram K, et al. The diverse patterns of hepatitis A epidemiology in the United States-implications for vaccination strategies. *J Infect Dis.* 1998;178(6):1579–84.
- [148] Das A. An economic analysis of different strategies of immunization against hepatitis A virus in developed countries. *Hepatology.* 1999;29(2):548–52.
- [149] Lopalco PL, Salleras L, Barbuti S, Germinario C, Bruguera M, Buti M,

- et al. Hepatitis A and B in children and adolescents--what can we learn from Puglia (Italy) and Catalonia (Spain)? *Vaccine*. 2000;19(4-5):470-4.
- [150] Dagan R, Leventhal A, Anis E, Slater P, Ashur Y, Shouval D. Incidence of hepatitis A in Israel following universal immunization of toddlers. *JAMA*. 2005;294(2):202-10.
- [151] Wasley A, Samandari T, Bell BP. Incidence of Hepatitis A in the United States in the Era of Vaccination. *JAMA*. 2005;294(2):194.
- [152] Fisenka EG, Germanovich FA, Glinskaya IN, Lyabis OI, Rasuli AM. Effectiveness of universal hepatitis A immunization of children in Minsk City, Belarus: four-year follow-up. *J Viral Hepat*. 2008;15 Suppl 2:57-61.
- [153] Dhankhar P, Nwankwo C, Pillsbury M, Lauschke A, Goveia MG, Acosta CJ, et al. Public Health Impact and Cost-Effectiveness of Hepatitis A Vaccination in the United States: A Disease Transmission Dynamic Modeling Approach. *Value Health*. 2015;18(4):358-67.
- [154] Zhou F, Shefer A, Wenger J, Messonnier M, Wang LY, Lopez A, et al. Economic Evaluation of the Routine Childhood Immunization Program in the United States, 2009. *Pediatrics*. 2014;133(4):577-85.
- [155] Wu D, Guo C. Epidemiology and Prevention of Hepatitis A in Travelers. *J Travel Med*. 2013;20(6):394-9.
- [156] Franco E, Giambi C, Ialacci R, Coppola RC, Zanetti AR. Risk groups for hepatitis A virus infection. *Vaccine*. 2003;21(19-20):2224-33.
- [157] Akriviadis EA, Redeker AG. Fulminant hepatitis A in intravenous drug users with chronic liver disease. *Ann Intern Med*. 1989;110(10):838-9.
- [158] Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Caylà J, Tortajada C, Lite J, Bosch A, et al. Hepatitis A Virus Vaccine Escape Variants and Potential New Serotype Emergence. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(4):734-7.

- [159] Hammitt LL, Bulkow L, Hennessy TW, Zanis C, Snowball M, Williams JL, et al. Persistence of Antibody to Hepatitis A Virus 10 Years after Vaccination among Children and Adults. *J Infect Dis.* 2008;198(12):1776–82.
- [160] Kanda T, Nakamoto S, Wu S, Nakamura M, Jiang X, Haga Y, et al. Direct-acting Antivirals and Host-targeting Agents against the Hepatitis A Virus. *J Clin Transl Hepatol.* 2015;3(3):205–10.
- [161] Malcolm BA, Lowe C, Shechosky S, McKay RT, Yang CC, Shah VJ, et al. Peptide aldehyde inhibitors of hepatitis A virus 3C proteinase. *Biochemistry.* 1995;34(25):8172–9.
- [162] Morris TS, Frommann S, Shechosky S, Lowe C, Lall MS, Gauss-Müller V, et al. In vitro and ex vivo inhibition of hepatitis A virus 3C proteinase by a peptidyl monofluoromethyl ketone. *Bioorg Med Chem.* 1997;5(5):797–807.
- [163] Kanda T, Kusov Y, Yokosuka O, Gauss-Müller V. Interference of hepatitis A virus replication by small interfering RNAs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;318(2):341–5.
- [164] Kanda T, Zhang B, Kusov Y, Yokosuka O, Gauss-Müller V. Suppression of hepatitis A virus genome translation and replication by siRNAs targeting the internal ribosomal entry site. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;330(4):1217–23.
- [165] Huang Y, Malcolm BA, Vederas JC. Synthesis and testing of azaglutamine derivatives as inhibitors of hepatitis A virus (HAV) 3C proteinase. *Bioorg Med Chem.* 1999;7(4):607–19.
- [166] Bergmann EM, Cherney MM, Mckendrick J, Frommann S, Luo C, Malcolm BA, et al. Crystal structure of an inhibitor complex of the 3C proteinase from hepatitis A virus (HAV) and implications for the polyprotein processing in HAV. *Virology.* 1999;265(1):153–63.
- [167] Lall MS, Karvellas C, Vederas JC. Beta-lactones as a new class of

- cysteine proteinase inhibitors: inhibition of hepatitis A virus 3C proteinase by N-Cbz-serine beta-lactone. *Org Lett.* 1999;1(5):803–6.
- [168] Ramtohul YK, James MNG, Vederas JC. Synthesis and evaluation of keto-glutamine analogues as inhibitors of hepatitis A virus 3C proteinase. *J Org Chem.* 2002;67(10):3169–78.
- [169] Yin J, Bergmann EM, Cherney MM, Lall MS, Jain RP, Vederas JC, et al. Dual modes of modification of hepatitis A virus 3C protease by a serine-derived beta-lactone: selective crystallization and formation of a functional catalytic triad in the active site. *J Mol Biol.* 2005;354(4):854–71.
- [170] Huitema C, Zhang J, Yin J, James MNG, Vederas JC, Eltis LD. Heteroaromatic ester inhibitors of hepatitis A virus 3C proteinase: Evaluation of mode of action. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(10):5761–77.
- [171] Blaum BS, Wünsche W, Benie AJ, Kusov Y, Peters H, Gauss-Müller V, et al. Functional binding of hexanucleotides to 3C protease of hepatitis A virus. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(7):3042–55.
- [172] Gauss-Müller V, Kusov YY. Replication of a hepatitis A virus replicon detected by genetic recombination in vivo. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 9):2183–92.
- [173] Husson RN, Shirasaka T, Butler KM, Pizzo PA, Mitsuya H. High-level resistance to zidovudine but not to zalcitabine or didanosine in human immunodeficiency virus from children receiving antiretroviral therapy. *J Pediatr.* 1993;123(1):9–16.
- [174] Crance JM, Lévêque F, Chousterman S, Jouan A, Trépo C, Deloince R. Antiviral activity of recombinant interferon-alpha on hepatitis A virus replication in human liver cells. *Antiviral Res.* 1995;28(1):69–80.
- [175] Berthillon P, Crance JM, Leveque F, Jouan A, Petit MA, Deloince R, et

- al. Inhibition of the expression of hepatitis A and B viruses (HAV and HBV) proteins by interferon in a human hepatocarcinoma cell line (PLC/PRF/5). *J Hepatol.* 1996;25(1):15–9.
- [176] Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Saito K, Shirasawa H, et al. Suppression of La antigen exerts potential antiviral effects against hepatitis A virus. *PLoS One.* 2014;9(7):e101993.
- [177] Esser-Nobis K, Harak C, Schult P, Kusov Y, Lohmann V. Novel perspectives for hepatitis A virus therapy revealed by comparative analysis of hepatitis C virus and hepatitis A virus RNA replication. *Hepatology.* 2015;62(2):397–408.
- [178] Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Saito K, Nakamura M, Wu S, et al. The JAK2 inhibitor AZD1480 inhibits hepatitis A virus replication in Huh7 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;458(4):908–12.
- [179] Maier K, Gabriel P, Koscielniak E, Stierhof YD, Wiedmann KH, Flehmig B, et al. Human gamma interferon production by cytotoxic T lymphocytes sensitized during hepatitis A virus infection. *J Virol.* 1988;62(10):3756–63.
- [180] Kanda T, Wu S, Kiyohara T, Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, et al. Interleukin-29 suppresses hepatitis A and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation. *Viral Immunol.* 2012;25(5):379–86.
- [181] Widell A, Hansson BG, Oberg B, Nordenfelt E. Influence of twenty potentially antiviral substances on in vitro multiplication of hepatitis A virus. *Antiviral Res.* 1986;6(2):103–12.
- [182] Crance JM, Biziagos E, Passagot J, van Cuyck-Gandré H, Deloince R. Inhibition of hepatitis A virus replication in vitro by antiviral compounds. *J Med Virol.* 1990;31(2):155–60.
- [183] Chaudhary RK, Andonov AP. Effect of ribavirin on hepatitis A virus replication in vitro. *Can J Infect Dis.* 1992;3(2):67–70.
- [184] Kanda T, Yokosuka O, Imazeki F, Fujiwara K, Nagao K, Saisho H.

- Amantadine inhibits hepatitis A virus internal ribosomal entry site-mediated translation in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331(2):621–9.
- [185] Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Okitsu K, Fujiwara K, Yokosuka O. Internal ribosomal entry-site activities of clinical isolate-derived hepatitis A virus and inhibitory effects of amantadine. *Hepatol Res.* 2010;40(4):415–23.
- [186] Debing Y, Kaplan GG, Neyts J, Jochmans D. Rapid and convenient assays to assess potential inhibitory activity on in vitro hepatitis A replication. *Antiviral Res.* 2013;98(2):325–31.
- [187] Zeisel MB, Lupberger J, Fofana I, Baumert TF. Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C – Perspectives and challenges. *J Hepatol.* 2013;58(2):375–84.
- [188] Mueller S, Coleman JR, Wimmer E. Putting synthesis into biology: a viral view of genetic engineering through de novo gene and genome synthesis. *Chem Biol.* 2009;16(3):337–47.
- [189] Weilandt R, Paulmann D, Schlottau K, Vallbracht A, Dotzauer A. Mutational modifications of hepatitis A virus proteins 2B and 2C described for cell culture-adapted and attenuated virus are present in wild-type virus populations. *Arch Virol.* 2014;159(10):2699–704.
- [190] Hilleman MR. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. *Vaccine.* 2000;18(15):1436–47.
- [191] Lemon SM, Whetter L, Chang KH, Brown EA. Why do human hepatitis viruses replicate so poorly in cell cultures? *FEMS Microbiol Lett.* 1992;100(1–3):455–9.
- [192] Emerson SU, McRill C, Rosenblum B, Feinstone S, Purcell RH. Mutations responsible for adaptation of hepatitis A virus to efficient growth in cell culture. *J Virol.* 1991;65(9):4882–6.
- [193] Binn LN, Lemon SM, Marchwicki RH, Redfield RR, Gates NL, Bancroft

- WH. Primary isolation and serial passage of hepatitis A virus strains in primate cell cultures. *J Clin Microbiol.* 1984;20(1):28-33.
- [194] Dotzauer A, Feinstone SM, Kaplan G. Susceptibility of nonprimate cell lines to hepatitis A virus infection. *J Virol.* 1994;68(9):6064-8.
- [195] Daemer RJ, Feinstone SM, Gust ID, Purcell RH. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect Immun.* 1981;32(1):388-93.
- [196] Flehmig B. Hepatitis A-virus in cell culture: I. Propagation of different hepatitis A-virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (Frhk-4). *Med Microbiol Immunol.* 1980;168(4):239-48.
- [197] Provost PJ, Hilleman MR. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1979;160(2):213-21.
- [198] Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a Human Diploid Cell Designated MRC-5. *Nature.* 1970;227(5254):168-70.
- [199] LaBrecque FD, LaBrecque DR, Klinzman D, Perlman S, Cederna JB, Winokur PL, et al. Recombinant hepatitis A virus antigen: improved production and utility in diagnostic immunoassays. *J Clin Microbiol.* 1998;36(7):2014-8.
- [200] Emerson SU, Huang YK, McRill C, Lewis M, Purcell RH. Mutations in both the 2B and 2C genes of hepatitis A virus are involved in adaptation to growth in cell culture. *J Virol.* 1992;66(2):650-4.
- [201] Day SP, Murphy P, Brown EA, Lemon SM. Mutations within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA which enhance replication in BS-C-1 cells. *J Virol.* 1992;66(11):6533-40.
- [202] Schultz DE, Honda M, Whetter LE, McKnight KL, Lemon SM. Mutations within the 5' nontranslated RNA of cell culture-adapted hepatitis A virus which enhance cap-independent translation in cultured African green monkey kidney cells. *J Virol.*

- 1996;70(2):1041–9.
- [203] Emerson SU, Huang YK, Purcell RH. 2B and 2C mutations are essential but mutations throughout the genome of HAV contribute to adaptation to cell culture. *Virology*. 1993;194(2):475–80.
- [204] Cohen JI, Ticehurst JR, Feinstone SM, Rosenblum B, Purcell RH. Hepatitis A virus cDNA and its RNA transcripts are infectious in cell culture. *J Virol*. 1987;61(10):3035–9.
- [205] Lemon SM, Murphy PC, Shields PA, Ping LH, Feinstone SM, Cromeans T, et al. Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J Virol*. 1991;65(4):2056–65.
- [206] Brack K, Frings W, Dotzauer A, Vallbracht A. A cytopathogenic, apoptosis-inducing variant of hepatitis A virus. *J Virol*. 1998;72(4):3370–6.
- [207] Konduru K, Kaplan GG. Stable Growth of Wild-Type Hepatitis A Virus in Cell Culture. *J Virol*. 2006;80(3):1352–60.
- [208] Funkhouser AW, Schultz DE, Lemon SM, Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis A Virus Translation Is Rate-Limiting for Virus Replication in MRC-5 Cells. *Virology*. 1999;254(2):268–78.
- [209] Browne SM, Al-Rubeai M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol*. 2007;25(9):425–32.
- [210] Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997;51:151–78.
- [211] Clarke DK, Duarte EA, Moya A, Elena SF, Domingo E, Holland J. Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. *J Virol*. 1993;67(1):222–8.
- [212] Duarte EA, Novella IS, Ledesma S, Clarke DK, Moya A, Elena SF, et al. Subclonal components of consensus fitness in an RNA virus clone. *J Virol*. 1994;68(7):4295–301.

- [213] Borman AM, Kean KM. Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for hepatitis A virus internal initiation of translation. *Virology*. 1997;237(1):129–36.
- [214] Widell A, Hansson BG, Nordenfelt E, Oberg B. Enhancement of hepatitis A propagation in tissue culture with 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole. *J Med Virol*. 1988;24(4):369–76.
- [215] Anderson DA, Ross BC, Locarnini SA. Restricted replication of hepatitis A virus in cell culture: encapsidation of viral RNA depletes the pool of RNA available for replication. *J Virol*. 1988;62(11):4201–6.
- [216] Sobell HM. Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(16):5328–31.
- [217] Pérez-Rodríguez FJ, D'Andrea L, de Castellarnau M, Costafreda MI, Guix S, Ribes E, et al. Improving virus production through quasispecies genomic selection and molecular breeding. *Sci Rep*. 2016;6:35962.
- [218] Peetermans J. Production, quality control and characterization of an inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine*. 1992;10 Suppl 1:S99-101.
- [219] Armstrong ME, Giesa PA, Davide JP, Redner F, Waterbury JA, Rhoad AE, et al. Development of the formalin-inactivated hepatitis A vaccine, VAQTA from the live attenuated virus strain CR326F. *J Hepatol*. 1993;18 Suppl 2:S20-6.
- [220] Vidor E, Fritzell B, Plotkin S. Clinical development of a new inactivated hepatitis A vaccine. *Infection*. 24(6):447–58.
- [221] Glück R, Mischler R, Brantschen S, Just M, Althaus B, Cryz SJ. Immunopotentiating reconstituted influenza virus virosome vaccine delivery system for immunization against hepatitis A. *J Clin Invest*. 1992;90(6):2491–5.
- [222] Mao JS, Dong DX, Zhang HY, Chen NL, Zhang XY, Huang HY, et al.

- Primary study of attenuated live hepatitis A vaccine (H2 strain) in humans. *J Infect Dis.* 1989;159(4):621-4.
- [223] Stoffel M, Lievens M, Dieussaert I, Martin I, André F. Immunogenicity of Twinrix™ in older adults: a critical analysis. *Expert Rev Vaccines.* 2003;2(1):9-14.
- [224] Beran J, Chlibek R, Weber F. A combined dual-chamber typhoid/hepatitis A vaccine as a booster dose in hepatitis A primed adults. *Vaccine.* 2003;21(32):4650-4.
- [225] Demicheli V, Tiberti D. The effectiveness and safety of hepatitis A vaccine: a systematic review. *Vaccine.* 2003 Jun 2;21(19-20):2242-5.
- [226] Jacobs JP. The status of human diploid cell strain MRC-5 as an approved substrate for the production of viral vaccines. *J Biol Stand.* 1976;4(2):97-9.
- [227] Potash L, Chanock RM, Purcell RH, Kapikian AZ. Method for producing a virus from an african green monkey kidney cell line. US; Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Patent No. 6,025,182, 2000.
- [228] Wang X-Y, Xu Z-Y, Ma J-C, von Seidlein L, Zhang Y, Hao Z-Y, et al. Long-term immunogenicity after single and booster dose of a live attenuated hepatitis A vaccine: results from 8-year follow-up. *Vaccine.* 2007;25(3):446-9.
- [229] de Paula VS, Villar LM, Morais LM, Lewis-Ximenez LL, Niel C, Gaspar AMC. Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection. *J Clin Virol.* 2004;29(4):254-9.
- [230] Kiyohara T, Ouchi Y, Hasegawa Y, Sato T, Yoneyama T, Ishii K, et al. An in-house-anti-hepatitis A virus (HAV)-specific immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay: evaluation and application to an HAV outbreak. *J Med Virol.* 2009;81(9):1513-6.
- [231] Cuthbert JA. Hepatitis A: Old and New. *Clin Microbiol Rev.*

- 2001;14(1):38–58.
- [232] Harrison SC. Principles of Virus Structure. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Field's Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins; 2007. p. 59–98.
- [233] Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. *Traffic*. 2011;12(12):1659–68.
- [234] Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12):e1001450.
- [235] McKnight KL, Xie L, González-López O, Rivera-Serrano EE, Chen X, Lemon SM. Protein composition of the hepatitis A virus quasi-envelope. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(25):6587–92.
- [236] Schröder B, Wrocklage C, Pan C, Jäger R, Kösters B, Schäfer H, et al. Integral and Associated Lysosomal Membrane Proteins. *Traffic*. 2007;8(12):1676–86.
- [237] Hanson PI, Cashikar A. Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28(1):337–62.
- [238] Hurley JH, Hanson PI. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(8):556–66.
- [239] Peel S, Macheboeuf P, Martinelli N, Weissenhorn W. Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(4):199–210.
- [240] Henne WM, Stenmark H, Emr SD. Molecular Mechanisms of the Membrane Sculpting ESCRT Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(9):a016766.
- [241] McCullough J, Colf LA, Sundquist WI. Membrane Fission Reactions of

- the Mammalian ESCRT Pathway. *Annu Rev Biochem.* 2013;82(1):663–92.
- [242] Hurley JH. The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2010;45(6):463–87.
- [243] Hurley JH. ESCRTs are everywhere. *EMBO J.* 2015;34(19):2398–407.
- [244] Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Curr Biol.* 2012 Feb 21;22(4):R116–20.
- [245] Ren X, Hurley JH. Proline-rich regions and motifs in trafficking: From ESCRT interaction to viral exploitation. *Traffic.* 2011;12(10):1282–90.
- [246] Sette P, Mu R, Dussupt V, Jiang J, Snyder G, Smith P, et al. The Phe105 loop of Alix bro1 domain plays a key role in HIV-1 release. *Structure.* 2011;19(10):1485–95.
- [247] Morita E, Sandrin V, McCullough J, Katsuyama A, Baci Hamilton I, Sundquist WI. ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe.* 2011;9(3):235–42.
- [248] Chen BJ, Lamb RA. Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT? *Virology.* 2008;372(2):221–32.
- [249] Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol.* 2012;14(7):677–85.
- [250] Fujii K, Hurley JH, Freed EO. Beyond Tsg101: The role of Alix in “ESCRTing” HIV-1. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(12):912–6.
- [251] Yi J, Tang XM. The convergent point of the endocytic and autophagic pathways in leydig cells. *Cell Res.* 1999;9(4):243–53.
- [252] Berg TO, Fengsrud M, Strømhaug PE, Berg T, Seglen PO. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem.* 1998;273(34):21883–92.

- [253] Fader CM, Sánchez D, Furlán M, Colombo MI. Induction of Autophagy Promotes Fusion of Multivesicular Bodies with Autophagic Vacuoles in K562 Cells. *Traffic*. 2007;9(2):230–50.
- [254] Gordon PB, Høyvik H, Seglen PO. Prelysosomal and lysosomal connections between autophagy and endocytosis. *Biochem J*. 1992;283(Pt 2):361–9.
- [255] Van Niel G, D’Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(4):213–28.
- [256] Baixauli F, López-Otín C, Mittelbrunn M. Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. *Front Immunol*. 2014;5:403.
- [257] Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(2):193–208.
- [258] Treyer A, Müsch A. Hepatocyte polarity. *Compr Physiol*. 2013;3(1).
- [259] Boyer JL. Bile Formation and Secretion. In: *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 1035–78.
- [260] Perwaiz S, Tuchweber B, Mignault D, Gilat T, Yousef IM. Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Lipid Res*. 2001;42(1):114–9.
- [261] Seggewiß N, Paulmann D, Dotzauer A. Lysosomes serve as a platform for hepatitis A virus particle maturation and nonlytic release. *Arch Virol*. 2016;161(1):43–52.
- [262] Counihan NA, Anderson DA. Specific IgA Enhances the Transcytosis and Excretion of Hepatitis A Virus. *Sci Rep*. 2016;6(1):21855.
- [263] Taylor MP, Burgon TB, Kirkegaard K, Jackson WT. Role of microtubules in extracellular release of poliovirus. *J Virol*. 2009;83(13):6599–609.

-
- [264] Bird SW, Maynard ND, Covert MW, Kirkegaard K. Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(36):13081–6.
- [265] Jackson WT, Giddings TH, Taylor MP, Mulinyawe S, Rabinovitch M, Kopito RR, et al. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 2005;3(5):0861–71.
- [266] Taylor MP, Kirkegaard K. Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *J Virol.* 2007;81(22):12543–53.
- [267] Robinson SM, Tsueng G, Sin J, Mangale V, Rahawi S, McIntyre LL, et al. Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS Pathog.* 2014 Apr;10(4):e1004045.
- [268] Chen Y-H, Du W, Hagemeyer MC, Takvorian PM, Pau C, Cali A, et al. Phosphatidylserine vesicles enable efficient en bloc transmission of enteroviruses. *Cell.* 2015;160(4):619–30.
- [269] Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc.* 1993;169(3):375–82.
- [270] Zinchuk V, Zinchuk O, Okada T. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem.* 2007;40(4):101–11.
- [271] Easter DW, Wade JB, Boyer JL. Structural integrity of hepatocyte tight junctions. *J Cell Biol.* 1983;96(3):745–9.
- [272] Benedicto I, Molina-Jiménez F, Barreiro O, Maldonado-Rodríguez A, Prieto J, Moreno-Otero R, et al. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology.* 2008;48(4):1044–53.
- [273] Benedicto I, Molina-Jimenez F, Bartosch B, Cosset F-L, Lavillette D,

- Prieto J, et al. The Tight Junction-Associated Protein Occludin Is Required for a Postbinding Step in Hepatitis C Virus Entry and Infection. *J Virol.* 2009;83(16):8012–20.
- [274] Molina-Jimenez F, Benedicto I, Dao Thi VL, Gondar V, Lavillette D, Marin JJ, et al. Matrigel-embedded 3D culture of Huh-7 cells as a hepatocyte-like polarized system to study hepatitis C virus cycle. *Virology.* 2012;425(1):31–9.
- [275] Shah D, Shen W-C. The Establishment of Polarity and Enhanced Transcytosis of Transferrin Receptors in Enterocyte-like Caco-2 Cells. *J Drug Target.* 1994;2(2):93–9.
- [276] Grasset E, Pinto M, Dussaulx E, Zweibaum A, Desjeux JF. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *Am J Physiol Physiol.* 1984;247(3):C260–7.
- [277] Rahner C, Stieger B, Landmann L. Structure-function correlation of tight junctional impairment after intrahepatic and extrahepatic cholestasis in rat liver. *Gastroenterology.* 1996;110(5):1564–78.
- [278] Chen H, Wu S, Lu R, Zhang Y, Zheng Y, Sun J. Pulmonary Permeability Assessed by Fluorescent-Labeled Dextran Instilled Intranasally into Mice with LPS-Induced Acute Lung Injury. *PLoS One.* 2014;9(7):e101925.
- [279] Krug SM, Amasheh M, Dittmann I, Christoffel I, Fromm M, Amasheh S. Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells. *Biomaterials.* 2013;34(1):275–82.
- [280] Nevado R, Forcén R, Layunta E, Murillo MD, Grasa L. Neomycin and bacitracin reduce the intestinal permeability in mice and increase the expression of some tight-junction proteins. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015;107(11):672–6.
- [281] Odorizzi G, Babst M, Emr SD. Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function

- essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell*. 1998;95(6):847–58.
- [282] Tsutsumi K, Fujioka Y, Tsuda M, Kawaguchi H, Ohba Y. Visualization of Ras-PI3K interaction in the endosome using BiFC. *Cell Signal*. 2009;21(11):1672–9.
- [283] Fernandez-Borja M, Wubbolts R, Calafat J, Janssen H, Divecha N, Dusseljee S, et al. Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Curr Biol*. 1999;9(1):55–8.
- [284] Jaber N, Zong WX. Class III PI3K Vps34: Essential roles in autophagy, endocytosis, and heart and liver function. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1280(1):48–51.
- [285] Florey O, Gammoh N, Kim SE, Jiang X, Overholtzer M. V-ATPase and osmotic imbalances activate endolysosomal LC3 lipidation. *Autophagy*. 2015;11(1):88–99.
- [286] Gao Y, Liu Y, Hong L, Yang Z, Cai X, Chen X, et al. Golgi-associated LC3 lipidation requires V-ATPase in noncanonical autophagy. *Cell Death Dis*. 2016;7(8):e2330–e2330.
- [287] Jacquin E, Leclerc-Mercier S, Judon C, Blanchard E, Fraitag S, Florey O. Pharmacological modulators of autophagy activate a parallel noncanonical pathway driving unconventional LC3 lipidation. *Autophagy*. 2017;13(5):854–67.
- [288] Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem*. 1991;266(26):17707–12.
- [289] Yang L, Kiyohara T, Kanda T, Imazeki F, Fujiwara K, Gauss-Müller V, et al. Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combination of amantadine and interferon-alpha. *Virology*. 2010;7(1):212.

- [290] Kanda T, Sasaki R, Nakamoto S, Haga Y, Nakamura M, Shirasawa H, et al. The sirtuin inhibitor sirtinol inhibits hepatitis A virus (HAV) replication by inhibiting HAV internal ribosomal entry site activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;466(3):567–71.
- [291] Zhou Z, Xu M-J, Gao B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cell Mol Immunol.* 2016;13(3):301–15.
- [292] O'Brien K, Rani S, Corcoran C, Wallace R, Hughes L, Friel AM, et al. Exosomes from triple-negative breast cancer cells can transfer phenotypic traits representing their cells of origin to secondary cells. *Eur J Cancer.* 2013;49(8):1845–59.
- [293] Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res.* 2008;7(12):5157–66.
- [294] Odorizzi G. The multiple personalities of Alix. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 15):3025–32.
- [295] Hurley JH, Odorizzi G. Get on the exosome bus with ALIX. *Nat Cell Biol.* 2012;14(7):654–5.
- [296] Blum D, Hemming FJ, Galas M-C, Torch S, Cuvelier L, Schiffmann SN, et al. Increased Alix (apoptosis-linked gene-2 interacting protein X) immunoreactivity in the degenerating striatum of rats chronically treated by 3-nitropropionic acid. *Neurosci Lett.* 2004;368(3):309–13.
- [297] Hemming FJ, Fraboulet S, Blot B, Sadoul R. Early increase of apoptosis-linked gene-2 interacting protein X in areas of kainate-induced neurodegeneration. *Neuroscience.* 2004;123(4):887–95.
- [298] Sun S, Zhou X, Corvera J, Gallick GE, Lin S-H, Kuang J. ALG-2 activates the MVB sorting function of ALIX through relieving its intramolecular interaction. *Cell Discov.* 2015;1(1):15018.
- [299] Sun S, Sun L, Zhou X, Wu C, Wang R, Lin S-H, et al. Phosphorylation-

- Dependent Activation of the ESCRT Function of ALIX in Cytokinetic Abscission and Retroviral Budding. *Dev Cell*. 2016;36(3):331–43.
- [300] Zhou X, Si J, Corvera J, Gallick GE, Kuang J. Decoding the intrinsic mechanism that prohibits ALIX interaction with ESCRT and viral proteins. *Biochem J*. 2010;432(3):525–34.
- [301] Zhou X, Pan S, Sun L, Corvera J, Lin S-H, Kuang J. The HIV-1 p6/EIAV p9 docking site in Alix is autoinhibited as revealed by a conformation-sensitive anti-Alix monoclonal antibody. *Biochem J*. 2008;414(2):215–20.
- [302] Pan S, Wang R, Zhou X, He G, Koomen J, Kobayashi R, et al. Involvement of the conserved adaptor protein Alix in actin cytoskeleton assembly. *J Biol Chem*. 2006;281(45):34640–50.
- [303] Pires R, Hartlieb B, Signor L, Schoehn G, Lata S, Roessle M, et al. A Crescent-Shaped ALIX Dimer Targets ESCRT-III CHMP4 Filaments. *Structure*. 2009;17(6):843–56.
- [304] Fisher RD, Chung HY, Zhai Q, Robinson H, Sundquist WI, Hill CP. Structural and Biochemical Studies of ALIX/AIP1 and Its Role in Retrovirus Budding. *Cell*. 2007;128(5):841–52.
- [305] Bissig C, Gruenberg J. ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol*. 2014;24(1):19–25.
- [306] Vincent O, Rainbow L, Tilburn J, Arst HN, Peñalva MA. YPXL/I is a protein interaction motif recognized by aspergillus PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol Cell Biol*. 2003;23(5):1647–55.
- [307] Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Göttlinger HG. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*. 2003;114(6):689–99.
- [308] Martin-Serrano J, Yarovoy A, Perez-Caballero D, Bieniasz PD, Yaravoy A. Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A. 2003;100(21):12414–9.
- [309] Katoh K, Shibata H, Suzuki H, Nara A, Ishidoh K, Kominami E, et al. The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting. *J Biol Chem*. 2003;278(40):39104–13.
- [310] Zhai Q, Fisher RD, Chung HY, Myszka DG, Sundquist WI, Hill CP. Structural and functional studies of ALIX interactions with YPXnL late domains of HIV-1 and EIAV. *Nat Struct Mol Biol*. 2008;15(1):43–9.
- [311] Martin-Serrano J, Perez-Caballero D, Bieniasz PD. Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *J Virol*. 2004;78(11):5554–63.
- [312] Göttlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(8):3195–9.
- [313] Le Blanc I, Prévost M-C, Dokh elar M-C, Rosenberg AR. The PPPY motif of human T-cell leukemia virus type 1 Gag protein is required early in the budding process. *J Virol*. 2002;76(19):10024–9.
- [314] Puffer BA, Parent LJ, Wills JW, Montelaro RC. Equine infectious anemia virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein. *J Virol*. 1997;71(9):6541–6.
- [315] Wang H, Norris KM, Mansky LM. Analysis of bovine leukemia virus gag membrane targeting and late domain function. *J Virol*. 2002;76(16):8485–93.
- [316] Wills JW, Cameron CE, Wilson CB, Xiang Y, Bennett RP, Leis J. An assembly domain of the Rous sarcoma virus Gag protein required late in budding. *J Virol*. 1994;68(10):6605–18.
- [317] Yasuda J, Hunter E. A proline-rich motif (PPPY) in the Gag polyprotein of Mason-Pfizer monkey virus plays a maturation-

- independent role in virion release. *J Virol.* 1998;72(5):4095–103.
- [318] Yuan B, Campbell S, Bacharach E, Rein A, Goff SP. Infectivity of Moloney murine leukemia virus defective in late assembly events is restored by late assembly domains of other retroviruses. *J Virol.* 2000;74(16):7250–60.
- [319] Harty RN, Paragas J, Sudol M, Palese P. A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding. *J Virol.* 1999;73(4):2921–9.
- [320] Harty RN, Brown ME, Wang G, Huibregtse J, Hayes FP. A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: Implications for filovirus budding. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(25):13871–6.
- [321] Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med.* 2001;7(12):1313–9.
- [322] Strack B, Calistri A, Accola MA, Palu G, Gottlinger HG. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(24):13063–8.
- [323] Strack B, Calistri A, Göttinger HG. Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. *J Virol.* 2002;76(11):5472–9.
- [324] Strecker T, Eichler R, Meulen J ter, Weissenhorn W, Dieter Klenk H, Garten W, et al. Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles. *J Virol.* 2003;77(19):10700–5.
- [325] Hui EK-W, Barman S, Tang DH-P, France B, Nayak DP. YRKL Sequence of Influenza Virus M1 Functions as the L Domain Motif and Interacts with VPS28 and Cdc42. *J Virol.* 2006;80(5):2291–308.

- [326] Travella S, Keller B. Down-regulation of gene expression by RNA-induced gene silencing. *Methods Mol Biol.* 2009;478:185–99.
- [327] Kim D, Rossi J. RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques.* 2008;44(5):613–6.
- [328] Scherer LJ, Rossi JJ. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat Biotechnol.* 2003;21(12):1457–65.
- [329] Belouzard S, Danneels A, Fénéant L, Séron K, Rouillé Y, Dubuisson J. Entry and release of hepatitis C virus in polarized human hepatocytes. *J Virol.* 2017 Jun 28;91(18):e00478-17.
- [330] Sainz B, Tencate V, Uprichard SL. Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection. *Virol J.* 2009;6:1–8.
- [331] Ortega D, Pol A, Biermer M, Jäckle S, Enrich C. Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes. *J Cell Sci.* 1998;111(Pt 2):261–9.
- [332] Bauhofer O, Ruggieri A, Schmid B, Schirmacher P, Bartenschlager R. Persistence of HCV in quiescent hepatic cells under conditions of an interferon-induced antiviral response. *Gastroenterology.* 2012;143(2):429–38.
- [333] Decaens C, Durand M, Grosse B, Cassio D. Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity? *Biol Cell.* 2008;100(7):387–98.
- [334] Pons V, Luyet P-P, Morel E, Abrami L, van der Goot FG, Parton RG, et al. Hrs and SNX3 Functions in Sorting and Membrane Invagination within Multivesicular Bodies. *PLoS Biol.* 2008;6(9):e214.
- [335] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science.* 2008;319(5867):1244–7.
- [336] Abrami L, Brandi L, Moayeri M, Brown MJ, Krantz BA, Leppla SH, et

- al. Hijacking Multivesicular Bodies Enables Long-Term and Exosome-Mediated Long-Distance Action of Anthrax Toxin. *Cell Rep.* 2013;5(4):986–96.
- [337] Kusov Y, Kanda T, Palmenberg A, Sgro J-Y, Gauss-Muller V. Silencing of Hepatitis A Virus Infection by Small Interfering RNAs. *J Virol.* 2006;80(11):5599–610.
- [338] Mauvezin C, Neufeld TP. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy.* 2015;11(8):1437–8.
- [339] Desdín-Micó G, Mittelbrunn M. Role of exosomes in the protection of cellular homeostasis. *Cell Adhes Migr.* 2017;11(2):127–34.
- [340] Svitkin Y V, Hahn H, Gingras AC, Palmenberg AC, Sonenberg N. Rapamycin and wortmannin enhance replication of a defective encephalomyocarditis virus. *J Virol.* 1998;72(7):5811–9.
- [341] Ji WT, Wang YC, Lin FL, Liao MH, Shih WL, Liu HJ. Inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR but not Akt enhance replication of bovine ephemeral fever virus. *Vet J.* 2011;187(1):119–23.
- [342] Mannová P, Beretta L. Activation of the N-Ras-PI3K-Akt-mTOR pathway by hepatitis C virus: control of cell survival and viral replication. *J Virol.* 2005;79(14):8742–9.
- [343] Guo H, Zhou T, Jiang D, Cuconati A, Xiao G-H, Block TM, et al. Regulation of Hepatitis B Virus Replication by the Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Signal Transduction Pathway. *J Virol.* 2007;81(18):10072–80.
- [344] Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelárová H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J*

- Biochem. 1997;243(1-2):240-6.
- [345] Bayer N, Schober D, Prchla E, Murphy RF, Blaas D, Fuchs R. Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J Virol.* 1998;72(12):9645-55.
- [346] Ochiai H, Sakai S, Hirabayashi T, Shimizu Y, Terasawa K. Inhibitory effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type proton pump, on the growth of influenza A and B viruses in MDCK cells. *Antiviral Res.* 1995;27(4):425-30.
- [347] Sheperd PR, Reaves BJ, Davidson HW, Shepherd PR, Reaves BJ, Davidson HW. Phosphoinositide 3-kinases and membrane traffic. *Trends Cell Biol.* 1996;6(3):92-7.
- [348] Iacoangeli A, Melucci-Vigo G, Risuleo G. The ionophore monensin inhibits mouse polyomavirus DNA replication and destabilizes viral early mRNAs. *Biochimie.* 2000;82(1):35-9.
- [349] Kapoor A, He R, Venkatadri R, Forman M, Arav-Boger R. Wnt Modulating Agents Inhibit Human Cytomegalovirus Replication. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2761-7.
- [350] Superti F, Seganti L, Orsi N, Divizia M, Gabrieli R, Panà A. Effect of cellular function inhibitors on the infection of Frp/3 cells by hepatitis A virus. *Med Microbiol Immunol.* 1989;178(1):29-36.
- [351] Gilliams EA, Jumare J, Claassen CW, Thesing PC, Nyirenda OM, Dzinjalama FK, et al. Chloroquine-Azithromycin Combination Antimalarial Treatment Decreases Risk of Respiratory- and Gastrointestinal-Tract Infections in Malawian Children. *J Infect Dis.* 2014;210(4):585-92.
- [352] White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet.* 2014;383(9918):723-35.
- [353] Laufer MK, Thesing PC, Dzinjalama FK, Nyirenda OM, Masonga R,

Laurens MB, et al. A Longitudinal Trial Comparing Chloroquine as Monotherapy or in Combination with Artesunate, Azithromycin or Atovaquone-Proguanil to Treat Malaria. PLoS One. 2012;7(8):e42284.

- [354] Haines J, Kelley M. Demonstration of a $\Delta\Delta C_q$ Calculation Method to Compute Relative Gene Expression from qPCR Data. GE Healthcare, Tech Note. 2010. p. 1–4.

