

# MANIPULACIÓ I VARIABILITAT DE VIRUS

ANTONI VILLAVERDE\*, ESTEVE DOMINGO\*\*

\*Departament de Genètica i Microbiologia. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona

\*\*Centro de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid

## Variabilitat genètica de virus i malaltia

Malgrat la seva simplicitat genètica (uns deu productes gènics codificats en un RNA de set mil a vuit mil nucleòtids), tant l'estructura, la replicació i els mecanismes de variabilitat genètica dels picornavirus són encara ben lluny d'ésser compresos. D'entre els picornavirus patògens, el més important econòmicament és un afta virus anomenat virus de la febre aftosa (VFA), que infecta bovins, porcíns i altres animals domèstics. Sabem també molt poc dels mecanismes pels quals el virus causa malaltia. Un aspecte que ha estat molt estudiat en el nostre laboratori i que potser resultarà rellevant per a la patogènia vírica (encara no és segur), és l'alta capacitat de mutació que té el VFA. És cert que aquesta alta mutabilitat no és propietat exclusiva del VFA, sinó que, tal com hem resumit fa poc (Domingo i Holland, 1988) té lloc també en altres virus i elements genètics (bé amb DNA o RNA), que repliquen via un RNA (retrovirus, hepadnavirus, retrotransposons, etc.). Això dóna a aquests tipus d'elements una flexibilitat genètica de la qual, naturalment, els virus treuen avantatges. Un d'ells és la capacitat d'esquivar els anticossos i cèl·lules del sistema immunitari, i hom està d'acord que la variabilitat antigènica és ben freqüent en la natura. Una altra conseqüència de la variabilitat és la instal·lació en teixits i òrgans de virus diferents dels que inicialment varen penetrar en l'organisme. Per exemple, variants del picornavirus coksackie poden replicar en el pàncrees i causar diabetis. O bé, derivats defectius del virus del xarampió poden anar a replicar al cervell, i donar lloc a una encefalitis fatal que es coneix com panencefalitis esclerosant subaguda. També es dóna, com a conseqüència de la variabilitat dels virus, la capacitat de començar a infectar nous animals o plantes, i n'hi ha diversos exemples recollits en el llibre esmentat abans (Domingo i Hilland, 1988).

Tot això reflecteix una situació estadísticament molt complexa: un virus consisteix en una distribució de genomes, amb seqüències de nucleòtids relacionades però no idèntiques que anomenem *quasispècies*. Aquest terme fou proposat per M. Eigen per descriure com haurien d'haver estat les primeres molècules replicants en els primers brots de vida a la Terra (resum recent a Eigen i Biebricher, 1988). És ben interessant el fet que virus actuals tinguin aquesta estructura genètica (Domingo et al., 1985). Seguint amb conceptes d'evolució, diríem que l'estructura en quasispècies dels virus RNA permet una increïble quan-

titat de diferents «col·lisions» entre virus i cèl·lules de les quals s'aprofiten totes les que permeten als virus sortir endavant biològicament. Algunes d'aquestes, malauradament, ho fan donant lloc a malalties greus.

## Gens constants

Per tot el que acabem de resumir, és important determinar *frequències de mutació* i *taxes de fixació de mutacions* en els genomes vírics. Les primeres, que són una propietat inherent al sistema enzimàtic de replicació de l'àcid nucleic víric, s'han estimat de fins a  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  errors per nucleòtid i ronda de duplicació del RNA. Les *taxes de fixació de mutacions* durant la replicació dels virus en la naturalesa, que són més senzilles de determinar que les freqüències de mutació, prenen valors molt variables, però que poden arribar a ser de  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$  substitucions per nucleòtid i any. No és, doncs, gens sorprenent que els virus RNA siguin heterogenis i variables. Això no obstant, hi ha segments del RNA genòmic que s'han conservat en l'evolució. El gen 3D (polimerasa) dels picornavirus n'és un exemple. Aquest segment, que pel VFA és de 1410 nucleòtids, codifica una proteïna vírica de la maquinària enzimàtica de replicació. Sorprenentment, alguns segments de la proteïna 3D no solament són molt semblants entre picornavirus diferents, sinó que l'homologia de seqüència s'estén fins i tot a virus de plantes (Franssen et al., 1984). Quins mecanismes poden explicar la conservació de segments de 3D entre virus tant diversos? Nosaltres varem considerar dues possibilitats: (i) El gen 3D és menys mutable (menor *frequència de mutació*) que altres gens més variables. (ii) El gen 3D és tan mutable com altres gens, però *les taxes de fixació de mutacions* en 3D són menors. Afortunadament, des de feia anys havíem acumulat un bon nombre de seqüències d'un dels gens més variables de VFA: el que codifica la proteïna VP1 de la càpside vírica. Aquestes dades, juntament amb noves seqüències del gen 3D, ens varen permetre resoldre el dilema de la constància de 3D.

## Comparació de l'heterogeneïtat de gens 3D i de gens VP1 entre VFA epidemiològicament relacionats.

Actualment es coneix la seqüència del gen que codifica VP1 de prop d'un centenar de VFA, dels quals trenta són de diferents aïllats del tipus serològic C. Des de l'any 1970 fins al 1982, es varen aïllar 18 VFA de tipus C<sub>1</sub> a Espanya, molts d'ells a Catalunya, i aquests virus han estat genèticament (Sobrinó et al., 1986; Martínez et al., 1988) i antigènica (Mateu et al., 1987; Mateu et al., enviat a publicar) estudiats. VP1 és la proteïna del VFA que conté determinats antigens importants per la neutralització de la infectivitat vírica. En efecte, entre VFAs de tipus C aïllats a Catalunya varem poder demostrar variacions antigèniques amb anticossos monoclonals (Mateu et al., 1987) i també el poder de protecció encreuada limitat que tenien vacunes preparades amb un virus determinat, front a altres virus estretament relacionats (Martínez et al., 1988).

Per vuit d'aquests virus de tipus C<sub>1</sub> varem determinar la seqüència completa de nucleòtids del gen 3D. Això va representar seqüenciar un total de 11280 bases pel mètode de terminació de cadena pels *didesoxi-trifosfats*, tal com s'ha descrit abans (Sobrinó et al., 1986). La primera observació treia dels resultats d'aquests experiments va ser que entre els gens 3D hi havia mutacions que manifestaven una heterogeneïtat genètica, tal com ja havíem vist en els gens VP1 (Martínez et al., 1988). Però la sorpresa fou que, en computar el nombre de mutacions per cada parell de VFAs analitzats, resultava que com més aprop

eren les dates d'aïllament dels dos virus comparats, més semblants eren els valors d'heterogeneïtat obtinguts per VP1 i per 3D. De fet, tenim virus aïllats el mateix dia en tres granges molt properes de la província de Girona. Per a aquests virus el gen 3D és tan variable com el VP1. En canvi, a mesura que les dates d'aïllament dels virus comparats s'allunyen, el gen VP1 és significativament més heterogeni que el gen 3D. Amb una anàlisi estadística dels valors obtinguts, es pot concloure que mentre l'heterogeneïtat entre gens 3D és indistingible de la de gens VP1 en virus co-circulants (diríem en la *quasispècie* de VFA), la *taxa de fixació de mutacions* és el doble per al gen VP1 que per al gen 3D. Aquests resultats ens permeten suggerir que molt probablement de les dues possibilitats esmentades abans, la (ii) és la correcta. És a dir, proposem que, globalment, els nucleòtids de 3D són igualment mutables que els de VP1, però hi ha una pressió selectiva positiva per fixar mutacions en VP1 (Villaverde et al., enviat a publicar). Ben recentment, hem dut a terme una anàlisi més fina, considerant diferents segments dels gens VP1 i 3D, i sembla que en tots els casos el que varia és la taxa de fixacions de mutacions, però no la mutabilitat dels segments comparats (A. Villaverde, no publicat).

Així doncs, proposem que la conservació a llarg termini dels gens 3D entre virus ben diferents es deu a un mecanisme que podríem definir com un constant retorn a unes mateixes seqüències que permeten viabilitat. És una conservació per convergència de seqüències mestres en la *quasispècie* vírica.

## Bibliografia

1. DOMINGO E, HOLLAND, JJ (1988) High error rates, polpulation equilibrium and evolution of RNA replication systems. En RNA Genetics (Domingo, E., Holland, J.J. i Ahlquist, P., eds), vol. 3. pp. 3-36. CRC Press, inc., Florida.
2. DOMINGO E, MARTINEZ-SALAS E, SOBRINO F, DE LA TORRE JC, PORTELA A, ORTÍN J, LÓPEZ-GALINDEZ C, PÉREZ-BREÑA P, VILLANUEVA N, NÁJERA R, VANDEPOL S, STEINHAUER D, DEPOLO N, HOLLAND J (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance - A review. *Gene* 40:1-8.
3. EIGEN M, BIEBRICHER CK (1988). Sequence spaces and the quasispecies concept. En RNA Genetics (Domingo, E., Holland, J.J. i Ahlquist, P.,eds.), vol. 3. pp. 211-245. CRC Press, inc., Florida.
4. MARTINEZ MA, CARRILLO C, PLANA J, MASCARELLA R, BERGADÀ J, PALMA EL, DOMINGO E, SOBRINO F. (1988). Genetic and immunogenic variations among closely related isolates of foot-and-mouth disease virus. *Gene* 62:75-84.
5. MATEU MG, ROCHA E, VICENTE O, VAYREDA F, NAVALPOTRO C, ANDREU D, PEDROSO E, GIRALT E, ENJUANES L, DOMINGO E (1987). Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Research*, 8:261-274.
6. MATEU MG, DA SILVA JL, ROCHA E, DE BRUM DL, ALONSO A, ENJUANES L, DOMINGO E, BARAHONA H (1988). Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. Enviat per publicar.
7. SOBRINO F, PALMA EL, BECK E, DÁVILA M, DE LA TORRE JC, NEGRO P, VILLANUEVA N, ORTÍN J, DOMINGO E (1986). Fixation of mutations in the viral genome during an outbreak of foot-and-mouth disease: heterogeneity and rate variations. *Gene* 50:149-159.
8. VILLAVERDE A, MARTÍNEZ-SALAS E, DOMINGO E, (1988) 3D gene of foot-and-mouth disease virus: conservation by convergence of average sequences. Enviat a publicar.