

LA PRESENCIA DE GENOMAS CON INSERCIONES Y/O DELECCIONES EN LA PRINCIPAL REGIÓN REGULADORA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B SUGIERE UNA MULTICODIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA X

Andrea Caballero (1) | Josep Gregori (2) | María Buti (3,4) | David Tabernero (1,3,5) | Josep Quer (3,2) | María Blasi (3,1,5) | Francisco Rodríguez-Algarra (6) | Rosario Casillas (2) | Carolina González (1) | Irene Belmonte (1) | Leonardo Nieto (5) | Xose Costa (7) | Rafael Esteban (3,4) | María Homs (1,3,5) | Francisco Rodríguez-Frías (1,3,5)

1-Hospital Vall d'Hebron - Departamento de Bioquímica | 2-Institut de Recerca Vall d'Hebron - Laboratorio Enfermedades Hepáticas | 3-CIBEREHD | 4-Hospital Vall d'Hebron - Departamento de Hepatología | 5-Hospital Vall d'Hebron - Departamento de Microbiología - Unidad Patología Hepática | 6-Universidad Politécnica de Cataluña - Departamento de Telemática | 7-Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela - Servicio de Microbiología

INTRODUCCIÓN

El ENHII del virus de la hepatitis B (HBV), con dos regiones IIA (nt 1644-1666) y IIB (nt 1702-1713), que regulan la replicación viral, codifica la región preCore y la región C-terminal de la proteína transactivadora multifuncional X (HBx) (Figura 1). HBx es una proteína de 154 aminoácidos con un papel clave en el control de la proliferación celular, viabilidad y transformación y cuyo ligando mejor caracterizado es la proteína DDB1 (Damage specific DNA binding protein 1).

A lo largo de toda la secuencia del genoma del VHB se producen mutaciones de manera natural y son especialmente relevantes en las regiones que regulan la replicación como el promotor del Core (PBC y URR), cajas TATA, el ENHII o en el ORF X. En este sentido inserciones y deleciones (ins-del) en el ENHII, que modifican la proteína X, están asociadas con la severidad de la infección por el VHB.

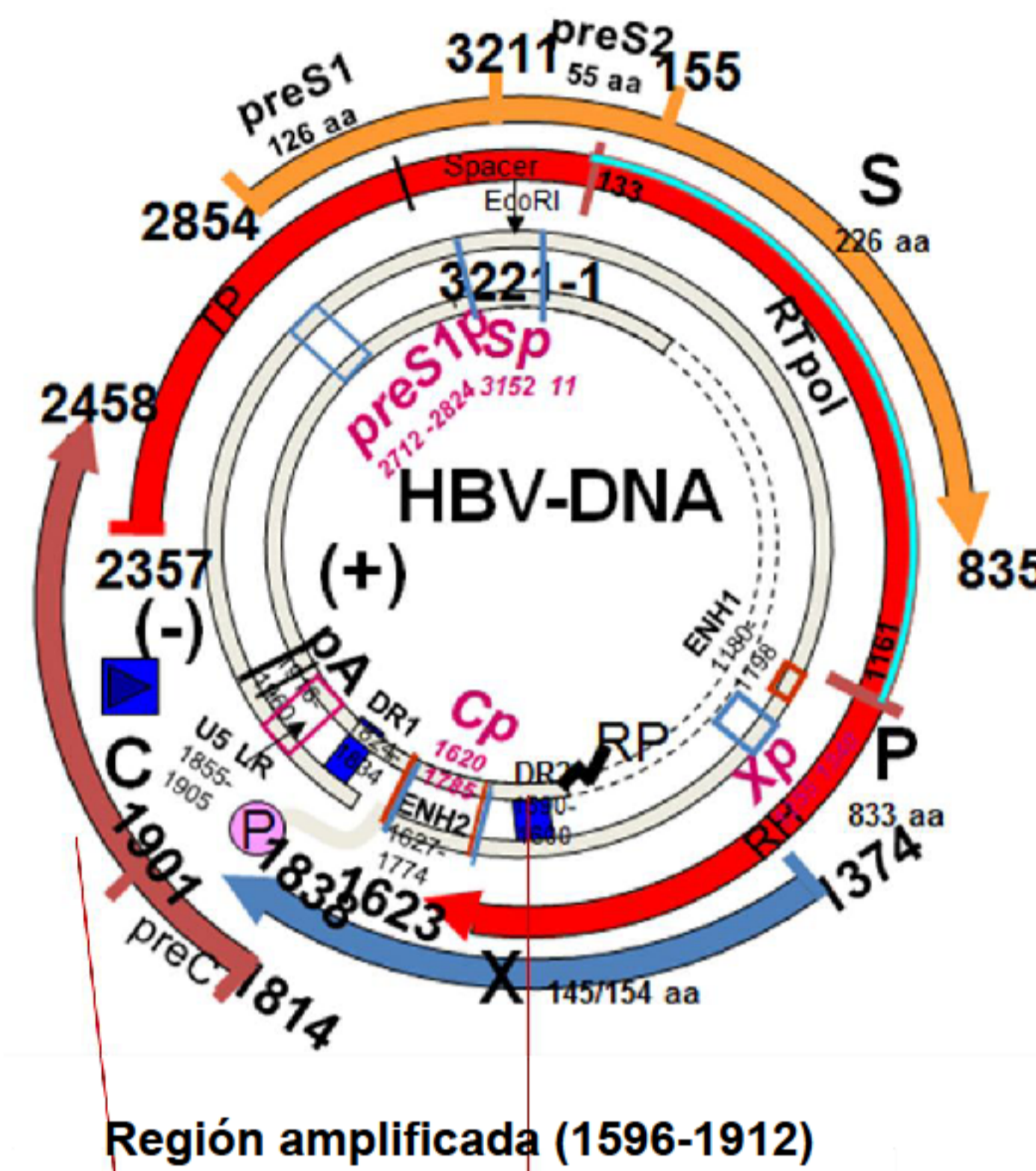


Figura 1: Representación del genoma de 3,2 kb del VHB

OBJETIVO

Evaluar la presencia de inserciones y/o deleciones en el ENHII y su posible efecto de truncamiento o elongación del HBx en la cuasispecies del VHB en 50 pacientes sin tratamiento antiviral.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se analizaron 50 muestras de 50 pacientes sin tratamiento antiviral con hepatitis crónica B mediante secuenciación masiva UDPS-Ultra-Deep Pyrosequencing (454, Roche).

La región estudiada (nt 1596-1912) abarca el extremo 3' del ORF X y el extremo 5' del gen Core, incluyendo las regiones URR, PBC, cajas TATA y el ENH II (Figura 1).

Se analizaron las mutaciones de tipo inserción, deleción e inserción+deleción (Ins-Del) y su proporción en la totalidad de las secuencias y las diferentes variantes (haplotipos). La presencia de estas mutaciones fue confirmada por clonaje.

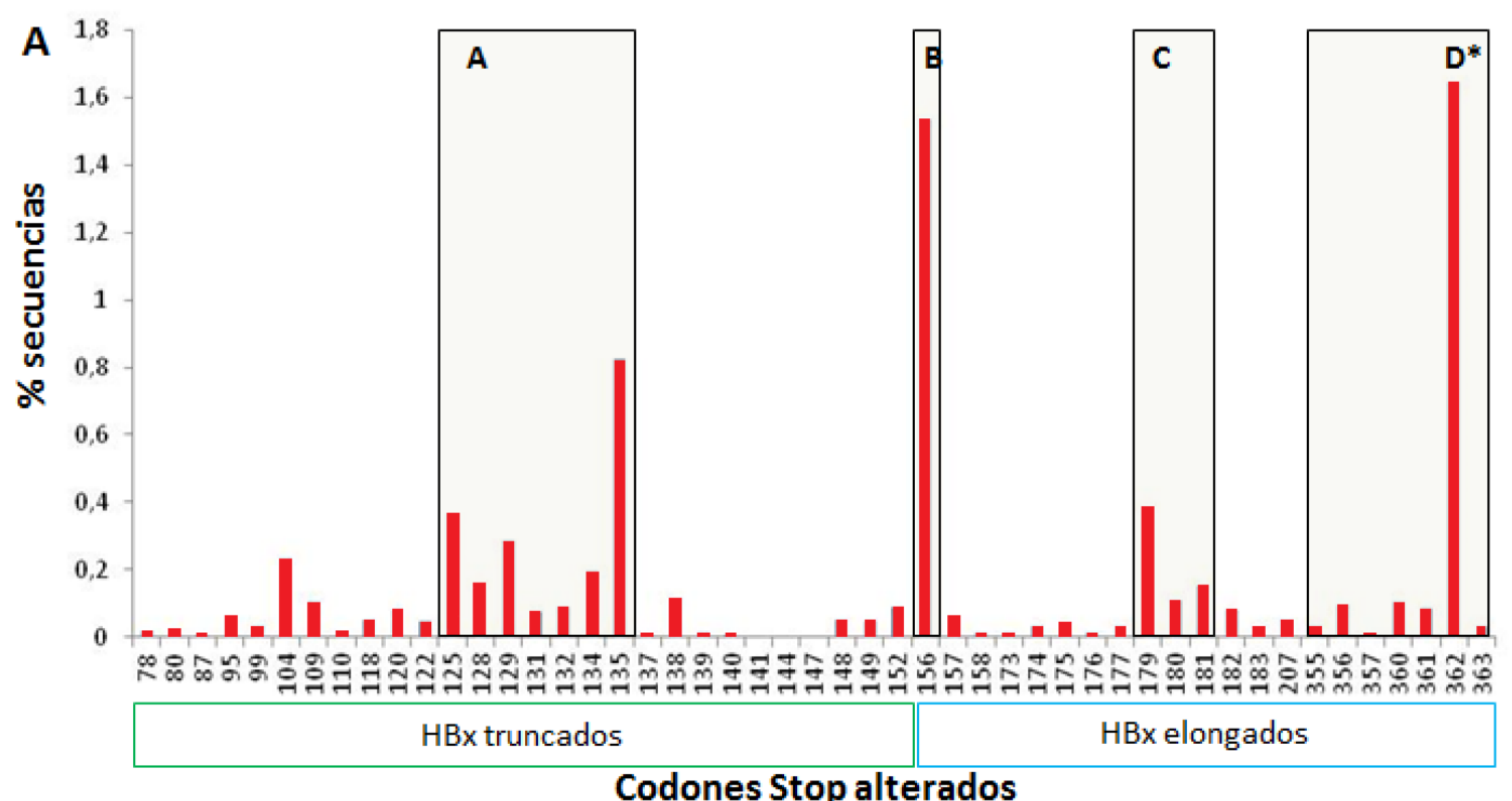
Resultados:

Se analizaron 960921 secuencias, mediana 16734 secuencias/paciente (rango 1905-57993) y 1039 haplotipos, mediana 17 haplotipos/paciente (rango 4-55).

Se observaron 128 Ins-Del, representando el 7,1% de las secuencias y el 27,5% de los haplotipos. En 47/50 muestras (94%) se observaron Ins-Del, con una mediana de 3,4% secuencias con Ins-Del/paciente (0-74,5%).

Todas estas inserciones y deleciones causan alteraciones del codón stop normal del HBx (posición 155), quedando alterados 49 codones debidos a stop prematuros (HBx truncados) o tardíos (HBx elongados) (Figura 2A), representando el 7.6% de las secuencias y el 29,2% de los haplotipos.

Las Ins-Del principales fueron (a) deleción de 8 nt entre 1754-1777 causantes de HBx truncados y que también modifican las cajas TATA, (b) duplicación en 1644-1670 con o sin deleción compensatoria en 1754-1777, que modifica el motivo de interacción HBx-DDB1 y duplica la diana para el factor de transcripción C/EBP y (c) inserción o (d) deleción de T en 1825, ambas codificantes de HBx elongados (Figura 2B).



* Codon stop estimado a partir de la secuencia patrón de cada genotipo

Figura 2A: Proteínas X truncadas debidas a codones de stop prematuros y proteínas X elongadas. Se distinguen 4 clusters según las cuatro variantes con inserciones y deleciones descritas en la figura 2B.
Figura 2B: Porcentaje de las mutaciones más comunes en las secuencias y haplotipos.

B	Variantes ins/del	Localización nt	% Secuencias	% Haplotipos
A	Deleción 8 nt	1754-1777 (TA2/TA3)	0.87	4.43
B	Duplicación +/- deleción	1644-1770 (DDB1) 1754-1777	1.5	3.08
C	Inserción T	1825	0.38	1.06
D*	Deleción T	1825	2.91	4.32

Conclusiones:

La presencia de genomas codificantes de HBx truncados o elongados sugiere un mecanismo de multicodificación del VHB con diferentes versiones de HBx con posibles funciones alternativas.

La extrema complejidad de la cuasispecie del VHB en la región X/BCP/PC revela la presencia sistemática de inserciones y/o deleciones que podrían afectar a la actividad transcripcional del ENHII y cuya relevancia clínica debe ser evaluada en mayor profundidad.

Referencias:

- Preikschat et al. (2002)
- Günther et al. (1996)

