

S217
C-1

*FUNCION DE LA CAPSIDE INTERNA EN LA TRANSCRIPCION "IN VITRO" DE
ROTAVIRUS.*

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias

por
Ana María Sandino García

Agosto, 1990

Patrocinante y Director de Tesis: Dr. Eugenio Spencer Ossa



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la Candidata

ANA MARIA SANDINO GARCIA

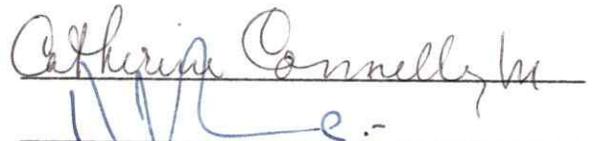
ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de defensa de Tesis rendido el día 23 de Agosto de 1990.

Director de Tesis:
Dr. Eugenio Spencer

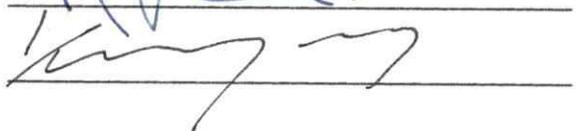


Comisión Informante de Tesis:

Dra. Catherine Connelly



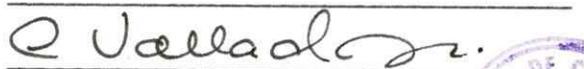
Dr. Romilio Espejo



Dr. Juan Kuznar

Dr. Manuel Rodríguez

Dr. Luis Valladares



A EUGENIO Y A NUESTRO HIJO



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Eugenio por haber sido un excelente Director de Tesis, entregándome todo su respaldo, estímulo y enseñanza, dándome una base fuerte para comenzar con buenas expectativas mi vida profesional.

Un agradecimiento muy especial para todas mis amigas y compañeros del Laboratorio y Facultad de Ciencias, quienes con su compañía, cariño, apoyo y amistad han hecho muy agradable todo este tiempo.

A la Fundación Andes, gracias por haberme respaldado prácticamente durante toda mi carrera.

Finalmente quiero manifestar mi agradecimiento a los profesores y a todas aquellas personas que de algún modo me brindaron su ayuda durante la realización del Doctorado.

INDICE DE MATERIAS

	Página
1-ABREVIATURAS	ix
2-RESUMEN	x
3-SUMMARY	xiii
4-INTRODUCCION	1
5-MATERIALES Y METODOS	22
5.1-Purificación de virus	22
5.2-Obtención de las partículas virales de cubierta simple	22
5.3-Obtención de cores virales y proteína Vp6	23
5.4-Ensayo de actividad de RNA polimerasa	24
5.5-Análisis de los RNA mensajeros virales en geles de poliacrilamida urea	24
5.6-Producción de anticuerpos policlonales	25
5.7-Producción de anticuerpos monoclonales	25
5.8-ELISA de las fracciones virales	26
5.9-Ensayo de interferencia en la reacción de recuperación de la actividad RNA polimerasa mediante anticuerpos	27
5.10-Marcación del RNA genómico viral con uridina ³ H	28
5.11-Ensayos de filtración del complejo proteína-RNA en filtros de nitrocelulosa	29
5.12-Marcación del RNA genómico viral con pCp ³² P	29
5.13-Transferencia de proteínas y unión del RNA genómico radioactivo	30
5.14-Ensayos de unión por retardo en la movilidad electroforética de un segmento de RNA genómico viral aislado	31
5.15-Inmunoprecipitación del complejo proteína-RNA	31

5.16-Marcación de los polipéptidos virales con metionina ³⁵ S	32
5.17-Marcación de los polipéptidos virales con ¹²⁵ I	32
5.18-Entrecruzamiento de las proteínas virales mediante reactivos bifuncionales	36
6-RESULTADOS	37
6.1-Recuperación de la actividad RNA polimerasa de cores humanos de distinto electroferotipo con la adición de proteína Vp6 purificada homóloga	37
6.2-Análisis de los productos de transcripción de la partícula viral reconstituída	41
6.3-Utilización de anticuerpos para estudiar la naturaleza la interacción entre el core y la proteína Vp6	44
6.4-Ensayos de filtración del complejo proteína-RNA en filtros de nitrocelulosa	47
6.5-Transferencia de proteínas y unión del RNA genómico radioactivo	48
6.6-Ensayos de unión por retardo en la movilidad electroforética de un segmento de RNA genómico viral aislado	52
6.7-Inmunoprecipitación del complejo proteína-RNA	59
6.8-Entrecruzamiento de las proteínas virales mediante reactivos bifuncionales	66
6.9-Utilización de anticuerpos monoclonales para determinar la región de la proteína Vp6 involucrada en la transcripción	75
7-DISCUSSION	79
8-CONCLUSIONES	94
9-BIBLIOGRAFIA	95

LISTA DE TABLAS

	página
-TABLA I	
-Segmentos de RNA genómico de rotavirus y sus productos polipeptídicos	4
-TABLA II	
-Recuperación de la actividad de RNA polimerasa de rotavirus humano en presencia de anticuerpos policlonales anti core y anti Vp6	46
-TABLA III	
-Recuperación de la actividad de RNA polimerasa de rotavirus humano en presencia de anticuerpos monoclonales anti Vp6	78

LISTA DE FIGURAS

	Página
-Figura 1A y 1B	
-Microscopía electrónica de las partículas de rotavirus humano	13
-Figura 1C	
-Microscopía electrónica de las partículas de rotavirus humano	15
-Figura 2	
-Electroforesis en geles de poliacrilamida de los polipéptidos de rotavirus humano	17
-Figura 3	
-Reconstitución de la partícula viral de cubierta simple a partir de cores y proteína Vp6 purificada	20
-Figura 4	
-Electroforesis de los polipéptidos virales de las partículas de rotavirus humano marcadas con ^{125}I	34
-Figura 5	
-Recuperación de la actividad RNA polimerasa a partir de cores virales y Vp6 homóloga	38
-Figura 6	
-Transcripción "in vitro" de diferentes partículas de rotavirus humano	42
-Figura 7	
-Obtención de RNA genómico de rotavirus humano radioactivo mediante la reacción catalizada por la RNA ligasa del fago T ₄ y pCp ^{32}P	50
-Figura 8	
-Ensayo de unión por retardo en la movilidad electroforética del segmento 11 de RNA genómico de rotavirus humano incubado con Vp6 purificada de la misma cepa	55
-Figura 9	
-Ensayo de unión por retardo en la movilidad electroforética del segmento 11 de RNA genómico de rotavirus humano incubado bajo distintas condiciones con Vp6 purificada	57

-Figura 10	
-Inmunoprecipitación del complejo formado entre la proteína Vp6 y el segmento 10 de RNA genómico de rotavirus humano	61
-Figura 11	
-Inmunoprecipitación del complejo formado entre la proteína Vp6 y el segmento 11 de RNA genómico de rotavirus humano	64
-Figura 12	
-Análisis de los productos de transcripción sintetizados por distintas partículas de rotavirus radioactivas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-urea	68
-Figura 13	
-Electroforesis bidimensional de los polipéptidos de las partículas virales de cubierta simple en ausencia de DSP	71
-Figura 14	
-Electroforesis bidimensional de los polipéptidos de las partículas virales de cubierta simple tratadas con 62,5 µg/ml de DSP	73

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: seroalbúmina de bovino
cpm: cuentas por minuto
DMSO: dimetilsulfóxido
DSP: ditiobis(succimidilpropionato)
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGTA: ácido etilenglicol bis(β aminoetileter) N,N'tetraacético
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida
pCp: citidina 3'5'bis(fosfato)
PEG: polietilenglicol
PM: peso molecular
mRNA: ácido ribonucleico mensajero
rpm: revoluciones por minuto
SAM: S-adenosilmetionina
SDS: dodecilsulfato de sodio
TBE: tampón Tris borato EDTA
Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
VP: proteínas virales

RESUMEN

Rotavirus es un importante agente etiológico de gastroenteritis aguda, especialmente en niños menores de dos años. Este virus pertenece a la familia *Reoviridae*, está formado por una doble cubierta protéica que rodea un core central, donde se encuentra el genomio viral. Su genoma consiste de 11 segmentos de RNA de doble hebra, cada uno de los cuales codifica para al menos un polipéptido. La cubierta externa esta compuesta de los polipéptidos denominados Vp7 y Vp4, los que constituyen los antígenos de neutralización, definen los serotipos virales y tienen un rol fundamental durante la entrada del virus a la célula. La cubierta interna está formada por un sólo polipéptido denominado Vp6, que corresponde a la proteína más abundante del virus, representa acerca del 60% del contenido polipeptídico del virión. También posee características antigénicas, define los subgrupos virales. El core viral está formado por las proteínas Vp1, que aparentemente corresponde a la polimerasa del virus; Vp2, la cual se cree que une RNA de doble hebra y Vp3, que corresponde a la guanililtransferasa y posiblemente a la ATPasa viral. El core aparentemente contiene todas las enzimas necesarias para la síntesis del RNA viral, sin embargo, durante la replicación del RNA requiere la presencia de las proteínas no estructurales y para que ocurra la síntesis de RNA mensajero es indispensable la presencia de la proteína Vp6.

En esta tesis se estudia la función que cumple la proteína Vp6 de rotavirus en la transcripción, específicamente que tipo de interacción existe entre esta proteína y el core viral, que hace posible la síntesis de RNA mensajero. El virus con una cubierta protéica, formado por el core y la proteína Vp6, es el responsable de la transcripción tanto "in vivo" como "in vitro". Sin embargo, la capacidad de transcribir se pierde cuando se remueve la cubierta interna formada por Vp6, mediante un tratamiento con altas concentraciones de CaCl_2 , con lo que se obtiene el core viral, el cual carece de esta actividad. La actividad de RNA polimerasa asociada a la partícula viral de cubierta simple se puede recuperar al incubar nuevamente el core con la proteína Vp6 libre de calcio, bajo estas condiciones se sintetizan los mismos transcritos virales y se reconstituye el virus de cubierta simple. La proteína Vp6 no presenta actividades enzimáticas asociadas a la transcripción, aparentemente su función es de tipo estructural, es decir, su interacción con el RNA genómico viral o con algún polipéptido del core le da a éste una estructura que hace posible la transcripción. Los resultados de esta tesis permitieron descartar la posibilidad que la proteína Vp6 interactuara en forma estable con el RNA viral, puesto que mediante técnicas de filtración del complejo proteína-RNA en filtros de nitrocelulosa, unión del RNA genómico marcado a las proteínas virales transferidas a papel de nitrocelulosa, retardo en la movilidad electroforética de un segmento de RNA genómico marcado e inmunoprecipitación del

complejo proteína-RNA, no se detectó unión entre estas fracciones virales.

La utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia distintos epítopes de la proteína Vp6 sugiere que la región involucrada en la unión de esta proteína al core es su región amino terminal. Finalmente, mediante el uso de reactivos de entrecruzamiento se encontró que Vp6 se une a un polipéptido del core, el cual corresponde a la proteína Vp3. Se discute la posibilidad que a través de esta interacción ocurra la activación del aparato transcripcional.

SUMMARY

Rotavirus is a member of the *Reoviridae* family and it is the mayor cause of acute gastroenteritis in infants under two years of age. The virus particle is made of a double protein shell surrounding a central core which contains the viral genome, that consist of 11 double stranded RNA segments each coding for one polypeptide. The outer capsid is made of two polypeptides, the neutralization antigens, named Vp4 and Vp7 which are directly involved in viral penetration, and define the viral serotypes. The inner viral shell is made of a single polypeptide which correspond to the mayor viral component and account up to 60% of the total polypeptide content of the virion. The antigenic properties of Vp6 define two antigenic subgroups. The viral core is formed by Vp1, that may correspond to the viral polymerase; Vp2 a polypeptide with a double stranded RNA binding protein activity and Vp3, the viral guanylyltransferase and also probably an ATPase. The viral core seems to have all the enzymatic activities required for RNA synthesis, but during RNA replication it requires of the presence of non-structural polypeptides and on mRNA synthesis of the presence of Vp6 . The role of Vp6 in human rotavirus transcription is studied, in special, the specific interaction between this polypeptide and the viral core that makes possible the mRNA synthesis. The single shell virus which contains the viral core and Vp6, is responsible

for both the "in vitro" and "in vivo" transcription. When the inner protein shell, made of Vp6, is removed by treatment with high CaCl_2 concentration the viral core thus obtained is unable to transcribe. The RNA polymerase activity associated to the single shell particle may be recovered when the viral core and Ca^{+2} free Vp6 are incubated together. Under this condition the single shelled particle is reconstituted and the ability to transcribed identical mRNA to the original particle is recovered. Polypeptide VP6 does not have enzymatic activities associated to transcription, the involvement in transcription seems to be structural rather than enzymatic, provably through the interaction with the genomic RNA or other core structural polypeptide involving a particle structure that makes transcription possible. The results shown in the present thesis do not suggest a possible interaction between Vp6 and the viral RNA. The results were obtained by several techniques including: Filtration through nitrocellulose filter of the protein-RNA complexes; protein blotting and further incubation of the filters with labeled RNA; assays of retardation of the electrophoretic mobility of the RNA segments due to polypeptide binding and by immunoprecipitation of RNA-protein complex. Using monoclonal antibodies against different Vp6 epitopes, the interaction of the amino-terminal portion of Vp6 with the viral core was shown. Experiments using cross-linking reagents indicate that Vp6 interacts with the core polypeptide Vp3. The involvement of this interaction on transcription is discussed

INTRODUCCION.

El rotavirus es un importante agente etiológico de la diarrea aguda en muchas especies animales, incluyendo la humana, infectando principalmente a individuos de corta edad (Holmes 1983, Cukor y Blacklow 1984, Kapikian y Chanock 1985, Estes y Cohen 1989). Este virus se transmite por vía fecal-oral, aunque no se puede descartar la vía aérea como posible forma de infección (Cukor y Blacklow 1984). Una vez que el virus ha ingresado al organismo, específicamente al sistema gastrointestinal, se requiere de un período corto de incubación, de uno a dos días, para la aparición de los principales síntomas (Cukor y Blacklow 1984). El cuadro clínico asociado a rotavirus se caracteriza por vómitos, diarrea y fiebre alta, los cuales persisten por tres a siete días, dando como resultado un estado de desnutrición y de deshidratación isotónica, con acidosis metabólica, que algunas veces conduce a la muerte (Rodríguez y col. 1977). El virus, infecta las células epiteliales maduras de las vellosidades del intestino delgado, en su extremo proximal, provocando en el citoplasma la distensión de las cisternas del retículo endoplásmico, el hinchamiento de las mitocondrias y la vacuolización de las células, lo que lleva a la muerte prematura de las células, las cuales son reemplazadas por células inmaduras incapaces de realizar las funciones normales de absorción (Kapikian y Chanock 1985). Durante la fase aguda de la diarrea se excretan en las deposiciones grandes cantidades de virus

(10^{11} partículas/g de material fecal), característica que ha permitido un fácil diagnóstico del agente, ya sea por microscopía electrónica o por detección del genomio viral por electroforesis (Herring y col. 1982).

Debido a sus características morfológicas y bioquímicas los rotavirus han sido clasificados dentro de la familia *Reoviridae* (Kapikian y Chanock 1985). El análisis estructural indica que estos virus miden 70 a 75 nm de diámetro, carecen de envoltura, tienen una cápside icosaédrica y están formados por una doble cubierta de proteínas que rodea a un núcleo central o core (Kapikian y Chanock 1985, Estes y Cohen 1989). Los viriones sometidos a una sedimentación en equilibrio en CsCl muestran una densidad boyante de $1,36 \text{ g/cm}^3$ y un coeficiente de sedimentación entre 520-530 S cuando se ultracentrifugan en gradientes de sacarosa (Kapikian y Chanock 1985, Estes y Cohen 1989). El virión visto al microscopio electrónico tiene una apariencia de rueda de carreta, de donde deriva su nombre "rota" (Figura 1A) (Flewett y col. 1974). En las deposiciones obtenidas durante un episodio de diarrea y en el citoplasma de las células infectadas, además del virus completo se encuentran otros dos tipos de partículas virales. Una de estas corresponde con un virus que contiene una sola cubierta proteica, llamado virus de cubierta simple, el cual mide aproximadamente 60-65 nm de diámetro, con una densidad boyante en CsCl de $1,38 \text{ g/cm}^3$ y un coeficiente de sedimentación de 450-478 S (Chasey 1977, Petrie y col. 1981, Estes y Cohen 1989). EL otro tipo está compuesto por partículas que carecen de ambas cubiertas proteicas y sólo contienen el núcleo central,

llamadas "core viral", el cual tiene un diámetro de 40-45 nm, una densidad boyante en CsCl de 1,44 g/cm³ y un coeficiente de sedimentación de 280 S (Bican y col. 1984, Estes y Cohen 1989) .

El genoma viral está formado por 11 segmentos distintos de RNA de doble hebra, con un peso molecular que varía desde 2,2 x 10⁶ Daltons para el segmento mayor y de 0,2 x 10⁶ Daltons para el menor (Kapikian y Chanock 1985). Cada uno de estos segmentos codifica a lo menos para un polipéptido, como se muestra en la Tabla I (Smith y col. 1980, Arias y col. 1982, Mc Crae y Mc Corquodale 1982, Estes y Cohen 1989).

El virión está compuesto aparentemente por un mínimo de 6 polipéptidos. La cubierta o cápside externa está formada por dos de ellos, denominados Vp7 y Vp4, los cuales se han identificado como los antígenos de neutralización (Kapikian y col. 1981, Hoshino y col. 1985, Offit y Blavat 1986). Existen numerosas variantes de estos antígenos que han permitido clasificar los rotavirus en diferentes serotipos. En la actualidad, se han descrito 11 serotipos definidos por la glicoproteína Vp7 y 9 por la proteína Vp4 (Estes y Cohen 1989). La cubierta interna está formada solamente por la proteína Vp6, que representa cerca del 60% del contenido polipeptídico total del virión (Novo y Esparza 1981). Esta proteína también tiene características antigénicas, que define los llamados subgrupos antigénicos, actualmente se han descrito solo dos, conocidos como subgrupo I y II (Kalika y col. 1981, Greenberg y col. 1983 a y b). El core viral está formado por el genomio viral y los polipéptidos Vp1, Vp2 y Vp3, que aparentemente conforman el sistema enzimático asociado a la transcripción y replicación del genomio viral (Bican y col. 1984,

TABLA I

Segmentos de RNA genómico de Rotavirus y sus productos polipeptídicos

Segmento	Producto Polipeptídico	PM ($\times 10^3$ D)	Características
1	Vp1	124	polipéptido del core, probable polimerasa viral.
2	Vp2	102	polipéptido del core, una RNA de doble hebra.
3	Vp3	98	polipéptido del core, es la guanililtransferasa.
4	Vp4	86	polipéptido de superficie, antígeno de neutralización hemaglutinina, sufre corte proteolítico (Vp5 y Vp8), define serotipos.
5	NS53	58	polipéptido no estructural implicado en replicación.
6	Vp6	44	polipéptido de la cápside interna, es el polipéptido más abundante del virus, antígeno de subgrupo, requerido en transcripción.
7	NS34	34	polipéptido no estructural implicado en replicación, una RNA de simple hebra.
8	NS35	36	polipéptido no estructural implicado en replicación.
9	Vp7	34	glicoproteína de superficie, antígeno de neutralización, reconoce receptor celular, define serotipos.
10	NS28	20	polipéptido no estructural importante en morfogénesis
11	NS29	21	polipéptido no estructural probablemente fosforilado

Sandino y col. 1986, Patton y Gallegos 1988).

El desarrollo de métodos de propagación de rotavirus en células en cultivo, ha permitido recientemente un importante avance en el estudio y caracterización del ciclo de replicación del virus. Se ha observado que la cubierta externa durante la iniciación del ciclo tiene una función importante, ya que es requerida durante las etapas de adsorción y penetración del virus a la célula (Fukuhara y col. 1988). La infección se inicia cuando el virus de doble cubierta se une a la célula huésped a través de la glicoproteína de superficie Vp7, la cual reconoce un receptor celular, que aún no ha sido definido (Fukuhara y col. 1988). Luego la proteína Vp4 de la cubierta externa es activada mediante un corte proteolítico, catalizado específicamente por la tripsina, lo que le confiere a la partícula viral su capacidad infectiva (Espejo y col. 1981). El tratamiento del rotavirus con tripsina produce el rompimiento de Vp4 en dos polipéptidos, denominados Vp5 y Vp8 de 60 y 28 KDaltons, respectivamente. El fragmento mayor Vp5 contiene, al parecer, regiones hidrofóbicas, semejantes a las encontradas en los virus Sindbis y Semliki, que le confieren capacidad de fusión a la célula (Mackow y col. 1988). Por esta propiedad se piensa que la proteína Vp5 tendría una actividad relacionada con la fusión, que jugaría un papel importante en la penetración directa del virus a la célula, ya que se ha observado que el virus tratado con tripsina entra a la célula directamente a través de la membrana celular y no por endocitosis (Suzuki y col. 1985 y 1986, Kaljot y col. 1988). Durante la entrada del virus a la célula, se pierde la cubierta protéica externa, liberándose al citoplasma el virus de cubierta

simple (Clark y col. 1980, Suzuki y col. 1986). Estas partículas virales son capaces de transcribir tanto "in vivo" como "in vitro" los 11 genes virales (Cohen y col. 1977, Spencer y Arias 1981, Stacy-Phipps y Patton 1987, Sandino y col. 1988). Los productos de transcripción obtenidos en ambas condiciones son idénticos y codifican para los mismos polipéptidos, lo que indica que esta partícula es la responsable de la transcripción en la célula infectada (Mason y col. 1983, Mc Crae y Mc Corquodale 1982, Sandino y col. 1988). Estos resultados sugieren que el virus sintetiza los RNA mensajeros y proteínas virales tan pronto como entra a la célula. La acumulación de proteínas virales en el citoplasma resulta en la formación de grandes inclusiones denominadas viroplasmos, donde se ha propuesto que ocurre tanto la replicación del genoma, como el ensamblaje de las partículas virales (Mc Crae y Faulkner-Valle 1981).

La expresión génica de rotavirus no puede ser dividida en el esquema clásico de una fase temprana y otra tardía, como ocurre en la mayoría de los otros virus (Johnson y Mc Crae 1989). Sin embargo, se ha observado en células infectadas que existe una regulación tanto a nivel de la transcripción como de la traducción, puesto que el mRNA viral no se sintetiza en concentraciones equimolares en la célula y a su vez las proteínas virales son sintetizadas en concentraciones relativas, significativamente diferentes respecto al mRNA viral existente (Stacy-Phipps y Patton 1987, Sandino y col. 1988, Johnson y Mc Crae 1989).

El virus replica su genoma asimétricamente, generando el RNA

de doble hebra, usando como templado la hebra positiva de RNA, que es indistinguible del mRNA viral, ya que incluso posee la estructura "cap" en su extremo 5' (Imai y col. 1983, Mc Crae y Mc Corquodale 1983, Patton 1986). Por lo tanto, cabe suponer que el mRNA viral cumple dos funciones en la célula: dirigir la síntesis de proteínas virales y servir como templado de la síntesis del RNA de hebra negativa. El mecanismo que regula la cantidad de RNA mensajero que participa en la replicación o en la traducción no se conoce. El RNA de doble hebra sintetizado no se encuentra libre en las células infectadas por rotavirus, ni tampoco es liberado de las subpartículas virales cuando se realiza la síntesis "in vitro", lo que indica que cada partícula capaz de replicar es responsable de sólo un ciclo de replicación, donde la hebra de RNA negativo sintetizada queda inmediatamente asociada a la hebra positiva complementaria (Stacy-Phipps y Patton 1987, Patton y Gallegos 1988).

Se han realizado numerosos estudios para identificar, tanto a las partículas subvirales como a las proteínas involucradas en la replicación del RNA genómico viral. El análisis de la composición polipeptídica de estas subpartículas virales indica que, las partículas capaces de replicar difieren de las capaces de transcribir, tanto en su coeficiente de sedimentación como en la composición polipeptídica. Las partículas con capacidad replicativa son extremadamente heterogéneas respecto a su composición y propiedades de sedimentación, lo que sugiere que varían estructuralmente durante el ciclo infectivo (Helmberger-Jones y Patton 1986, Patton y Gallegos 1988, Gallegos y Patton 1989). Se han identificado al menos 3 intermediarios de

esté involucrada en la replicación (Comunicación personal del Dr. John Patton).

Basandose en estas evidencias, se ha sugerido que el intermediario inicial formado durante el ensamblaje del virus de cubierta simple en las inclusiones viroplásmicas, sería el "pre core". Este contiene las proteínas estructurales Vp1 y Vp3, que presentan secuencias similares con aquellas de las RNA polimerasas de otros virus (Liu y col. 1988, Cohen y col. 1989). Luego a este intermediario se asociaría la proteína Vp2, para completar la síntesis del RNA de hebra negativa, perdiendose parcialmente las proteínas no estructurales (Gallegos y Patton 1989). Finalmente, se asociaría la proteína Vp6 al core para formar el virus de cubierta simple, eliminandose la totalidad de las proteínas no estructurales. Una vez formado el virus de cubierta simple, este puede cumplir dos funciones: a) ser un intermediario para la síntesis del virus de doble cubierta o b) ser una partícula con actividad de transcriptasa, capaz de sintetizar mRNA viral, con el fin de amplificar el ciclo replicativo del virus.

El último estado de la morfogénesis del rotavirus ocurre en el retículo endoplasmático (RER), donde la proteína Vp4 y la glicoproteína Vp7 se sitúan alrededor del virus de cubierta simple para formar la cubierta externa (Estes y col. 1983). Se ha propuesto que durante la maduración del virión, la partícula viral de cubierta simple migra de las inclusiones viroplásmicas a regiones del RER, que contienen las glicoproteínas virales de transmembrana Vp7 y NS28 (Chan y col. 1988, Petrie y col. 1982 y 1984). El virus de cubierta simple es capaz de unirse al RER

debido a que la proteína Vp6 tiene afinidad por la proteína NS28, la cual serviría como receptor de la partícula viral en el RER (Meyer y col. 1989). Después, el virus de cubierta simple yema hacia el lumen del RER, resultando en forma transiente una partícula viral que está rodeada de una membrana que probablemente tiene las proteínas NS28 y Vp7 (Kabcenell y col. 1988). Sin embargo, no está claro cómo la proteína Vp4 se asocia al virus de cubierta simple durante la morfogénesis, aparentemente la asociación de esta proteína ocurre antes de la entrada de la partícula viral al RER (Kabcenell y col. 1988, Mackow y col. 1988). Así, la partícula viral, que pasa al interior del RER por yemación, contiene la proteína Vp4 necesaria para ensamblar la cubierta protéica externa. Finalmente, por un mecanismo inexplicado aún, en el RER la membrana que rodea a las partículas se libera junto con la proteína NS28, permitiendo que la Vp7 se asocie con la Vp4, condensándose alrededor de la partícula viral para formar la cubierta externa. Los virus de doble cubierta, ya maduros se acumulan en el lumen del RER hasta que se produce la lisis celular (Chasey 1977).

Dentro del ciclo infectivo anteriormente descrito, el fenómeno que se ha estudiado en nuestro laboratorio es el de la transcripción viral y específicamente, la función que cumplen las proteínas estructurales del virus en la transcripción "in vitro". La transcripción de rotavirus es un proceso conservativo que usa como templado el RNA genómico de doble hebra. Esto implica que el virus tiene asociada una RNA polimerasa RNA dependiente capaz de

realizar esta función, ya que las células no disponen de este tipo de enzimas (Cohen y col. 1979, Spencer y Arias 1981). El virus completo manifiesta esta actividad transcripcional "in vitro", una vez que es activado. Su activación se puede lograr por dos métodos, mediante un shock de calor, el que aparentemente modifica la estructura de la cápside externa o removiendo la cubierta proteica externa mediante un tratamiento con agentes quelantes de calcio tal como EDTA (Cohen y col. 1979, Spencer y Arias 1981). Los 11 mRNA sintetizados "in vitro" por el virus contienen la estructura cap en su extremo 5' y carecen de la secuencia poli A en su extremo 3', siendo idénticos a la hebra positiva del RNA genómico viral (Imai y col. 1983, Mc Crae y Mc Corquodale 1983). Esto indica además que las enzimas involucradas en la formación de la estructura cap en el extremo 5' son proteínas estructurales del virus (Spencer y García 1984). En nuestro laboratorio se ha demostrado que la guanililtransferasa corresponde a la proteína Vp3 ubicada en el core viral (Spencer y col. 1990).

Con el fin de estudiar cuales son las proteínas estructurales involucradas en la transcripción se han utilizado procedimientos que permiten separar las proteínas virales por etapas. Estos consisten en tratar con EDTA el virus completo para remover la cubierta externa, la que no es requerida durante la transcripción, con lo que se obtiene el virus de cubierta simple (figura 1B), que luego se trata con agentes caotrópicos, tales como altas concentraciones de calcio o de tiocianato (Almeida y col. 1979, Bican y col. 1982). Con este tratamiento se remueve específicamente la proteína Vp6 que compone la cubierta interna

del virus (figura 2), obteniéndose el core viral (figura 1C), que carece de actividad transcripcional (Bican y col. 1982, Sandino y col. 1986). Esto permite concluir que la pérdida de actividad RNA polimerásica asociada al tratamiento con calcio se debe a la pérdida de la proteína Vp6 (Sandino 1984 y 1986). La demostración se obtuvo cuando se eliminó el calcio del sobrenadante que contiene la proteína, con agentes quelantes como EDTA, EGTA o diálisis, incubando nuevamente el core con la proteína Vp6 libre de calcio, recuperándose la actividad transcripcional que poseía el virus de cubierta simple entre un 60% a un 75% (Sandino 1984, Sandino y col. 1986). La pérdida de la actividad transcripcional, debido a la remoción de la cápside interna, podría deberse a que Vp6 correspondiera a la RNA polimerasa viral. Sin embargo, las polimerasas generalmente se encuentran en pocas copias por virión y en este caso Vp6 corresponde a la proteína más abundante del virus. Además, existen evidencias basadas en la secuencia de la proteína Vp1, que ésta podría corresponder a la polimerasa viral (Cohen y col. 1989). No obstante lo anterior, no se puede descartar que Vp6 sea un cofactor de la RNA polimerasa viral. Esta posibilidad se basa en resultados que muestran que Vp6 por sí sola es incapaz de transcribir diversos templados, bajo diferentes condiciones (Sandino 1984). Conforme a estos resultados se ha estudiado si esta proteína tiene alguna función enzimática asociada a la transcripción, tal como una actividad de ATPasa, la cual ha sido detectada en otros virus asociada tanto al proceso de extrusión del RNA mensajero viral, como a la síntesis del mRNA durante la etapa de iniciación o elongación

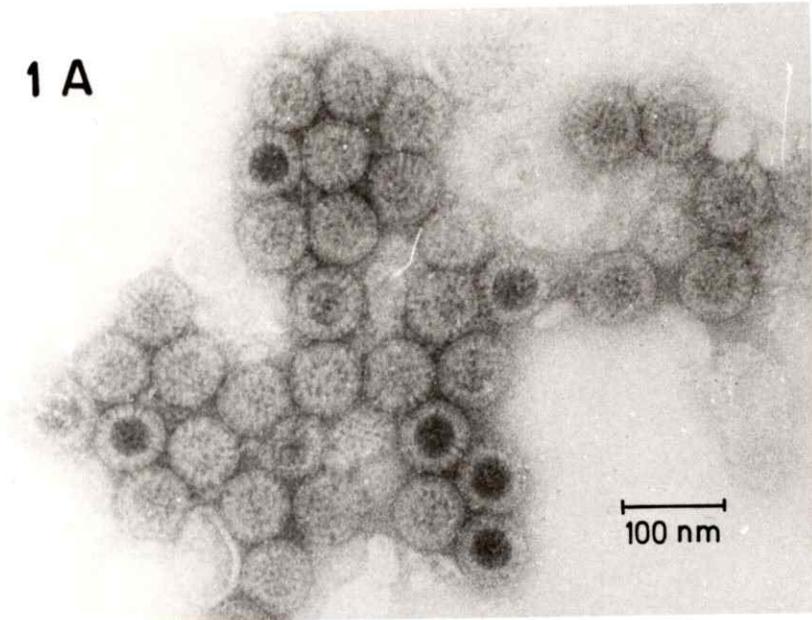
MICROSCOPIA ELECTRONICA DE LAS PARTICULAS DE ROTAVIRUS HUMANO.

1A) Virus completos purificados a partir de deposiciones, teñidos con molibdato de amonio al 3% pH 7,0.

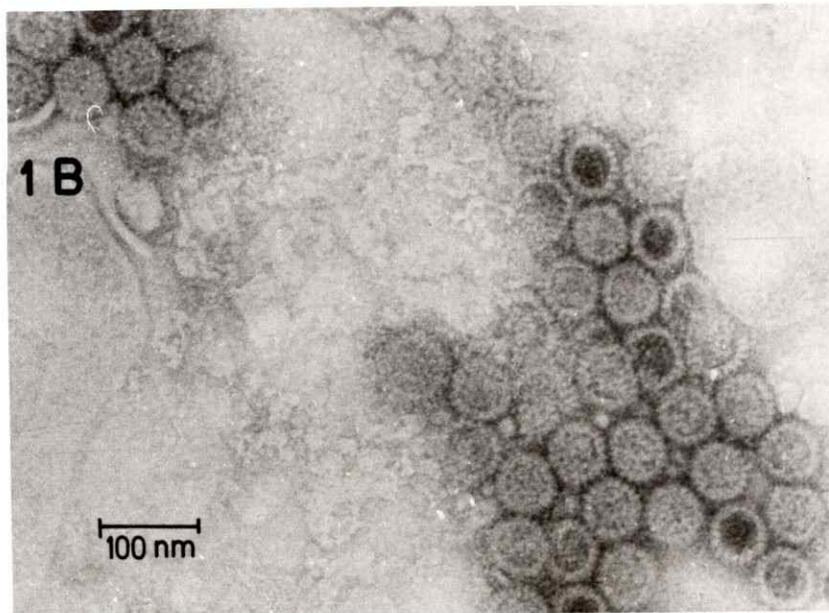
1B) Virus de cubierta simple obtenidos mediante un tratamiento de los virus completos con 10mM EDTA por 30 min. a 37°C, teñidos con molibdato de amonio al 3% pH 7,0.

FIGURA 1A y 1B

1 A



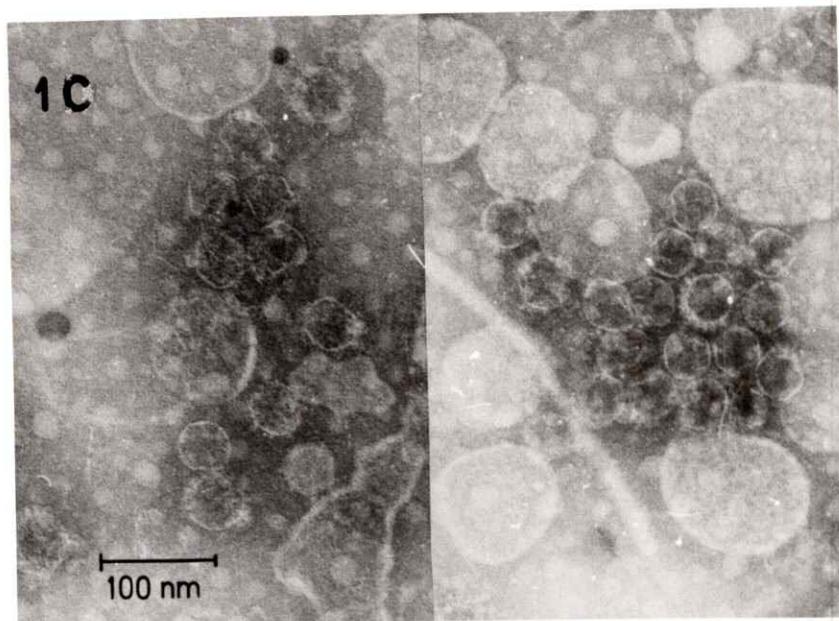
1 B



MICROSCOPIA ELECTRONICA DE LAS PARTICULAS DE ROTAVIRUS HUMANO

1C) Cores virales obtenidos mediante un tratamiento del virus de cubierta simple con 0,5M CaCl_2 por 10 min. a 37°C , teñidos con ácido fosfotúngstico al 2% pH 7,0.

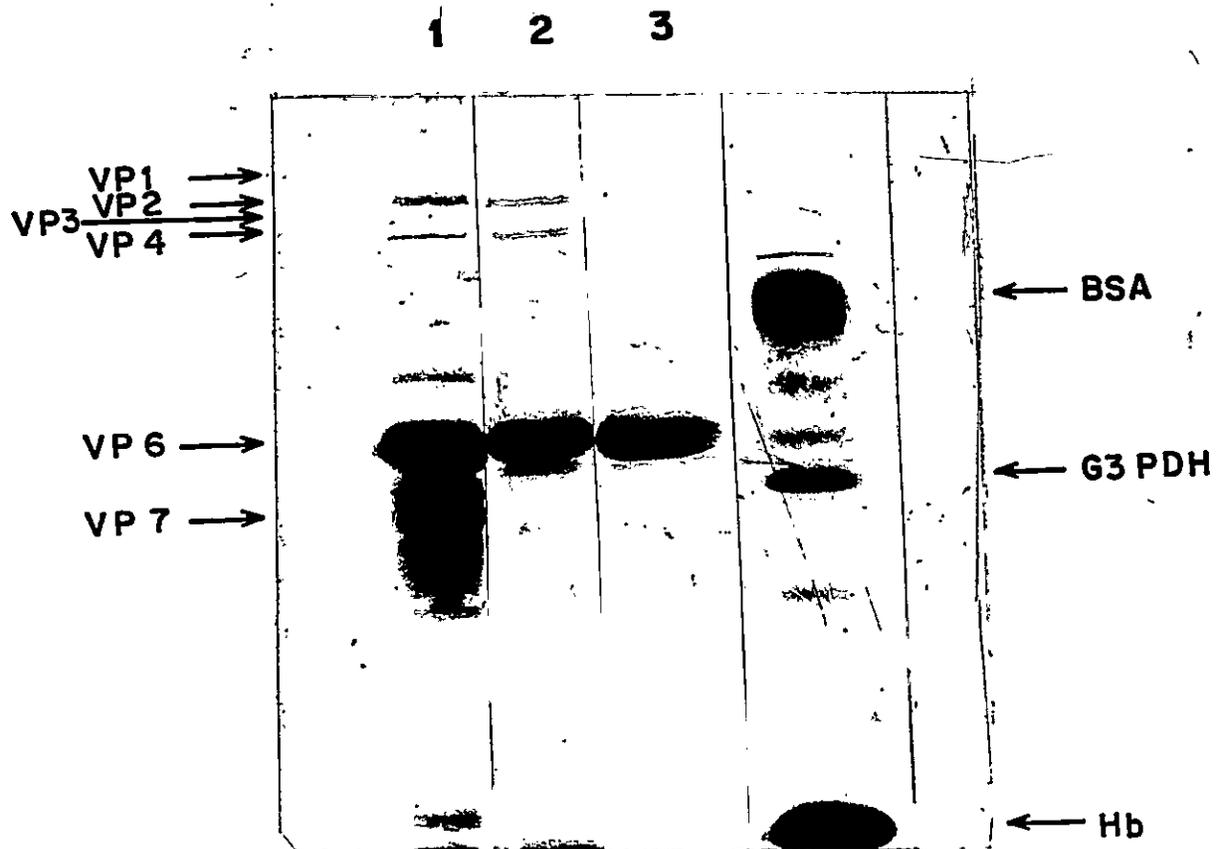
FIGURA 1C



ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LOS POLIPEPTIDOS DE ROTAVIRUS HUMANO

Los polipéptidos virales de: el virus completo (línea 1), el virus de cubierta simple (línea 2) y el sobrenadante obtenido luego del tratamiento del virus de cubierta simple con 0,5 M CaCl_2 por 10 min. a 37°C (línea 3), fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida 12% y posteriormente teñidos con nitrato de plata. Los polipéptidos virales se indican por su nomenclatura corriente. Las flechas indican las posiciones de los marcadores de peso molecular: seroalbúmina de bovino 66,000 KD (BSA), gliceraldehído trifosfato deshidrogenasa 36,000 KD (G3PDH) y hemoglobina 16,000 KD (Hb).

FIGURA 2



(Shuman y col. 1980). Pese a que se ha demostrado que la transcripción de rotavirus es dependiente de la hidrólisis de ATP, la proteína Vp6 carece de esta actividad, bajo todas las condiciones ensayadas (Pizarro y col. 1990, Sandino 1984). Resultados similares se obtuvieron en los estudios de actividad de nucleasa, en los cuales, no se observó capacidad alguna de Vp6 para degradar distintos sustratos (Sandino 1984).

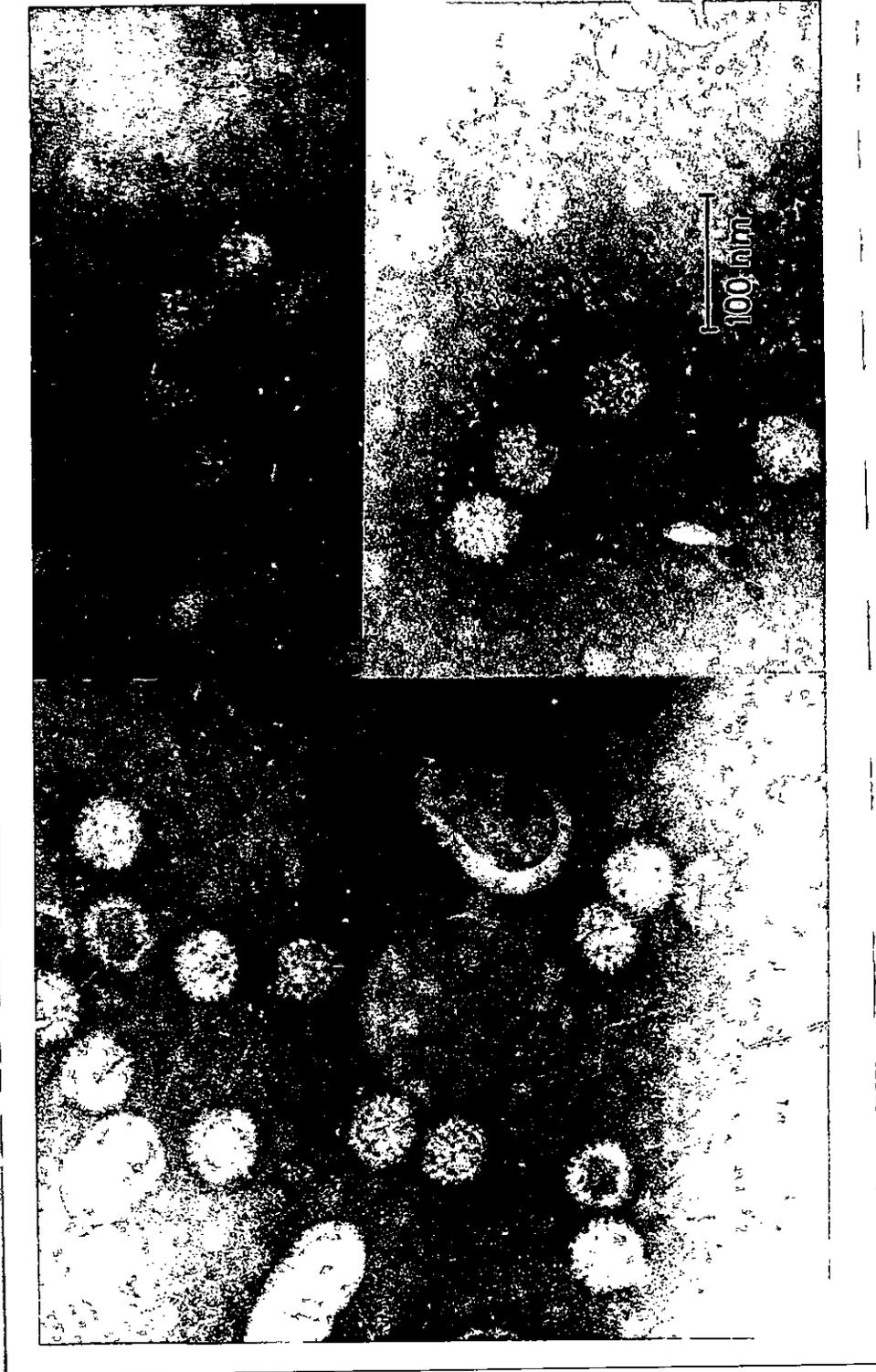
Al observar al microscopio electrónico la partícula viral formada luego de incubar el core viral con la proteína Vp6, ésta tiene la misma apariencia del virus de cubierta simple, en la que Vp6 se dispone nuevamente alrededor del core (figura 3). Por lo tanto, no solo se recupera la actividad transcripcional sino que se reconstituye la partícula viral de cubierta simple debido a la reasociación de Vp6 al core viral (Sandino 1984, Sandino y col. 1986). Estos resultados parecen indicar que Vp6 tiene una función de tipo estructural más que enzimático, en la transcripción.

Lo antes descrito demuestra que la presencia de la proteína Vp6 es indispensable para que ocurra la transcripción, sin embargo su función e interacción con los componentes del core viral aún no se conoce. El objetivo de esta tesis es conocer la función que cumple la proteína Vp6 en la transcripción, específicamente entender como Vp6 al interactuar con el core viral introduce cambios en éste que significan adquirir la capacidad de sintetizar RNA mensajero a partir del genomio viral. Se estudia fundamentalmente si esta proteína interactúa con el RNA genómico viral o con los polipéptidos del core.

RECONSTITUCION DE LA PARTICULA VIRAL DE CUBIERTA SIMPLE A PARTIR DE CORES Y PROTEINA VP6 PURIFICADA

Microscopía electrónica de cores de rotavirus humano incubados con proteína Vp6 purificada durante 30 min. a 37°C. Luego de la incubación las muestras fueron puestas en una grilla cubierta con Formvar y teñidas con molibdato de amonio al 3% pH 7,0.

FIGURA 3



MATERIALES Y METODOS

PURIFICACION DE VIRUS: los rotavirus humanos se purificaron a partir de 150g a 200g de deposiciones, obtenidas de niños menores de 2 años con diarrea aguda, mediante un método descrito previamente (Spencer y col. 1984). Este consiste básicamente en la extracción de las deposiciones con freón y la obtención del virus luego de varias ultracentrifugaciones, que incluyen colchones y gradientes de sacarosa. El virus se resuspende en tampón Tris HCl 50 mM pH 8,0 y se guarda a -20°C. Esta suspensión viral es estable por al menos 6 meses. Cada aislado viral se caracterizó por el análisis de la migración de su RNA genómico en geles de poliacrilamida al 7%, con lo que se define su electroferotipo (Spencer y col.1983). También se identificaron mediante ELISA, como se describe más adelante.

OBTENCION DE LAS PARTICULAS VIRALES DE CUBIERTA SIMPLE: estas partículas se obtienen mediante un tratamiento del virus de doble cubierta con EDTA 10 mM por 30 min. a 37°C. Luego, esta mezcla se centrifuga a 17,000 rpm en tubos Eppendorf por 30 min. El virus de cubierta simple queda en el precipitado, que se resuspende en tampón Tris HCl 50 mM pH 8,0 (Sandino y col.1986). Esta suspensión viral es estable a 0°C por solo 24 horas. Como se ha descrito previamente con este método se remueve específicamente la cubierta externa del virus (Spencer y García 1984). La pureza de las partículas virales se comprobó tanto por

microscopía electrónica como por el análisis del contenido polipeptídico en geles de poliacrilamida al 12% y por ensayo de la actividad de RNA polimerasa del virus de cubierta simple.

OBTENCION DE LOS CORES VIRALES Y LA PROTEINA VP6: estas fracciones virales se obtienen mediante el tratamiento del virus de cubierta simple con CaCl_2 0,5 M durante 15 min. a 37°C , con lo que se remueve específicamente la cubierta interna formada por la proteína Vp6, como se ha descrito previamente (Sandino 1984, Sandino y col. 1986). Luego esta mezcla se centrifuga a 17,000 rpm en tubos Eppendorf por 30 min. con lo que se obtiene el core viral en el precipitado y en el sobrenadante la proteína Vp6. Los cores se resuspenden en tampón Tris HCl 50 mM pH 8,0, suspensión viral que es estable a 0°C por solo 24 horas. La pureza de los cores virales se comprobó por microscopía electrónica, por el análisis del contenido polipeptídico en geles de poliacrilamida al 12% y tanto por ensayo de RNA polimerasa como por ensayo de recuperación de la actividad transcripcional. El ensayo de recuperación de la actividad transcripcional consiste en incubar el core viral con la proteína Vp6 libre de calcio durante 30 min. a 37°C y luego ensayar la actividad RNA polimerasa de la partícula viral formada por ambas fracciones virales (Sandino 1984, Sandino y col. 1986). Con el fin de obtener la proteína Vp6 libre de calcio, el sobrenadante se somete a diálisis contra una solución tampón Tris HCl 50 mM pH 7,0 en presencia y ausencia de EDTA, a 4°C durante al menos 4 horas. La pureza de la proteína Vp6 se determinó por el análisis de la composición polipeptídica

del sobrenadante que contiene esta proteína, en geles de poliacrilamida al 12% y principalmente por la capacidad de Vp6 de unirse al core y recuperar la actividad transcripcional. La proteína Vp6 libre de calcio es estable a 0°C durante 48 horas.

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD RNA POLIMERASA: ésta se determina por la incorporación de UMP ^3H o UMP ^{32}P a material ácido insoluble, como se ha descrito previamente (Spencer y Arias 1981). El ensayo consiste en incubar directamente la partícula o fracción viral que corresponda según se indique. Con una mezcla de reacción que contiene: tampón Tris HCl 160 mM pH 8,5, MgCl_2 10 mM, NaCl 80 mM, ATP, CTP, GTP 2mM cada uno, UTP ^3H 240 μM (a.e. 60 cpm/pmol) o UTP ^{32}P 240 μM (a.e. 400 cpm/pmol) y S-adenosilmetionina 0.1 mM, durante 30 min. a 45°C. Al término de la incubación se mide la radioactividad asociada a material ácido insoluble en un contador de centelleo líquido.

ANALISIS DE LOS RNA MENSAJEROS VIRALES EN GELES DE POLIACRILAMIDA UREA: Se diseñó un sistema de geles que permite identificar el RNA de simple hebra del de doble hebra, puesto que el RNA de doble hebra tiene la particularidad de migrar más rápido que los RNA mensajeros en estos geles. Los transcritos virales se obtuvieron a partir de un ensayo de actividad RNA polimerasa como se describe en el punto anterior, con la diferencia que al término de la incubación se detiene la reacción por centrifugación de la mezcla a 17,000 rpm en tubos eppendorf por 30 min., con el fin de precipitar el virus. El sobrenadante se resuspende en formamida desionizada al 99%, que contiene 250 μM

EDTA pH 8,0 y 1/20 volumen de una solución de xilencianol al 0,1%. Luego se somete a electroforesis en geles de poliacrilamida al 5%-8M urea, durante 21 horas a 150 Volts en tampón TBE. El gel se tiñe con plata, siguiendo el protocolo descrito anteriormente por Herring y col. 1982 o se somete a radioautografía.

PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES: estos se obtuvieron en conejos, por inyecciones subcutáneas en el lomo de aproximadamente 100 µg. de virus de cubierta simple con adyuvante de Freund completo, según lo descrito anteriormente (de Ioannes 1985). Luego de 3 semanas se inyectan con otra dosis igual y a la semana siguiente se sangran por la oreja. La presencia de los anticuerpos obtenidos en el suero se mide inicialmente por inmunoprecipitación del virus de cubierta simple en capilares. El título de anticuerpos se realiza por diluciones del suero en reacciones de ELISA, utilizando como antígenos virus de cubierta simple, core y proteína Vp6, siguiendo el protocolo que se describe más adelante.

PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES: estos se obtuvieron en ratones de la cepa Balb/C, por inyecciones intraperitoneales, de 50-100 µg de proteína Vp6 con adyuvante de Freund completo, por 3 veces cada 2 semanas. Después de 2 semanas más, se inyectan durante 2 días seguidos, con la mitad de la dosis de proteína viral y sin adyuvante de Freund. A continuación se realiza la fusión entre las células del bazo del ratón y las células de la

línea mieloide SP2/0, en presencia de PEG. La determinación de anticuerpos en los sobrenadantes de los hibridomas se hace por ELISA como se describe más adelante. Finalmente se produce líquido ascítico con los hibridomas que presentan anticuerpos anti proteína Vp6, con el fin de obtener grandes cantidades del anticuerpo monoclonal, siguiendo el protocolo antes descrito (de Ioannes 1985).

Los anticuerpos monoclonales anti Vp6 subgrupo específicos, fueron donados por el Dr. Albert Kapikian del laboratorio de enfermedades infecciosas del National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, E.E.U.U..

Los anticuerpos monoclonales anti Vp6 denominados 50, 443 y 1026, fueron donados por el Dr. Pierre Pothier del laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología Médica del Centre Hospitalier Regional et Universitaire de Dijon, Francia.

ELISA DE LAS FRACCIONES VIRALES: se desarrolló un método de ELISA directo que consiste en pegar a la placa el antígeno viral, el cual al reaccionar con su anticuerpo se detecta por un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa o fosfatasa alcalina.

Como antígenos se utilizaron diluciones desde 15 µg hasta 20 ng de la partícula viral de cubierta simple, el core viral y la proteína Vp6 en una solución tampón que contiene Na_2CO_3 1,5 mM, NaHCO_3 3,5 mM, NaN_3 0,3 mM pH 9,6. Se agregan 100 µl de antígeno a cada pocillo y luego se incuba a temperatura ambiente toda la noche. A continuación se lavan los pocillos tres veces con un tampón PBS-Tween pH 7,0 y se dejan durante 1 hora a temperatura ambiente con este tampón, con el fin de bloquear los sitios

inespecíficos. Al término de la incubación los pocillos se lavan tres veces más, igual que la primera vez y se agregan 100 µl por pocillo del primer anticuerpo incubando nuevamente por 3 horas a 37°C. Este anticuerpo corresponde a los sueros obtenidos de conejos, a los anticuerpos monoclonales, o al líquido ascítico obtenido de ratones, los cuales fueron diluïdos sucesivamente en tampón PBS-Tween pH 7,0, con el fin de determinar la dilución de trabajo adecuada. Luego de esta incubación se lava 3 veces como antes y se agregan 100 µl por pocillo de una dilución 1:1000 en tampón PBS-Tween pH 7,0 del segundo anticuerpo, incubando 1 hora a 37°C. Este corresponde a un anticuerpo anti conejo o anti ratón según sea el caso, conjugado con peroxidasa o fosfatasa alcalina. Finalmente se lava tres veces más, se revela la reacción enzimática agregando el sustrato que corresponda y se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda adecuada para el producto a determinar.

ENSAYO DE INTERFERENCIA EN LA REACCION DE RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD RNA POLIMERASA MEDIANTE ANTICUERPOS: se incuba la fracción viral, ya sea core o proteína Vp6, con un determinado anticuerpo, durante 30 min. a 37°C. Luego el complejo antígeno-anticuerpo se incuba por otros 30 min. a 37°C con la otra fracción viral, proteína Vp6 o core según corresponda. Finalmente se reaisla la partícula viral que se obtiene, por centrifugación a 17,000 rpm en tubos eppendorf durante 30 min. y se ensaya la actividad RNA polimerasa.

Las concentraciones de anticuerpos se han elegido

previamente por medio de ELISA, de modo de asegurarse de tener la máxima reacción entre el anticuerpo y la fracción viral. Esto se realizó de la siguiente manera: se utiliza como antígeno la concentración con la cual se va a llevar a cabo el ensayo, que corresponde a 0,3 µg de core o 0,4 µg de proteína Vp6 y como anticuerpo se utilizan diluciones sucesivas de éste, de modo de elegir una concentración de anticuerpo con la cual se ha logrado el plateau en la curva de reacción.

MARCACION DEL RNA GENOMICO VIRAL CON URIDINA ³H: con el fin de marcar radioactivamente el RNA genómico viral se utilizó una cepa de rotavirus de mono denominada SA-11, que crece eficientemente en células en cultivo. El RNA marcado de SA-11 se obtuvo por infección de la línea celular derivada de riñón fetal de mono rhesus, denominada MA-104. Monocapas de células MA-104 en botellas de cultivo de 220 cm², fueron infectadas a m.o.i. de 3 a 8, con virus previamente tratados con 1 µg/ml de tripsina. Después de una hora de infección se lava el inóculo con tampón PBS pH 7,2 y se reemplaza por medio MEM en ausencia de suero fetal que contiene 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 100 µg/ml de kanamicina, 5 µg/ml de actinomicina D y 1,5 µC/ml de 5-6 ³H uridina, incubando a 37°C hasta desprendimiento celular total (Sandino y col. 1988). A continuación se congela el cultivo y después de sucesivos congelamientos y descongelamientos el virus se extrae con freón. La fase acuosa se centrifuga a 1,500 x g para eliminar los restos celulares. Luego el sobrenadante de esta centrifugación, se ultracentrifuga a 105,000 x g, con el fin de precipitar el virus.

A partir de éste se obtiene el RNA genómico, por extracción con fenol cloroformo. El RNA se precipita con etanol y se resuspende en Tris HCl 50 mM pH 7,0. Finalmente el grado de marcación se detecta por electroforesis del RNA genómico en geles de poliacrilamida al 7% y posterior radioautografía. Además se mide la radioactividad asociada a material ácido insoluble de la suspensión de RNA obtenida.

ENSAYOS DE FILTRACION DEL COMPLEJO PROTEINA-RNA EN FILTROS DE NITROCELULOSA: cantidades crecientes de RNA genómico viral radioactivo se filtraron a través de filtros de nitrocelulosa (Millipore m_r), con el fin de definir el background. Luego se incubó una cantidad fija de RNA genómico tritiado con cantidades crecientes de proteína Vp6, durante 30 min. a 37°C, en tampón Tris-HCl 160 mM pH 8,5, 10 Mm NaCl y se filtró el complejo. Los filtros fueron lavados una vez, con tampón Tris HCl 50 mM pH 7,0, 10 mM NaCl, secados y contados en un contador de centelleo líquido. Durante la incubación del RNA con la proteína se agregaron algunos agentes utilizados en otros sistemas como estabilizadores del complejo, tales como EGTA, BSA, DTT y gliceraldehído. Se reguló el flujo de filtración y el número de lavados, con el fin de no dañar el complejo formado (Riggs y col. 1970, Smolarskky y Tal 1970, Johnson y col. 1979).

MARCACION DEL RNA GENOMICO VIRAL CON pCp ^{32}P : con el fin de marcar el extremo 3'OH del RNA genómico viral de rotavirus humano se utilizó un sistema con pCp P^{32} y RNA ligasa de fago T₄ (Bruce

y Uhlemberg 1978). La mezcla de reacción que contiene: tampón Hepes NaOH 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 20 mM, DTT 3.3 mM, ATP 6 µM, BSA 0.001%, 50 unidades de RNA ligasa, pCp ³²P 4.2 x 10⁷ cpm y 1,5 µM de RNA genómico viral, se incubó a 15°C por 5 horas. Luego se extrajo el RNA con fenol cloroformo y se precipitó en etanol, resuspendiéndose en tampón Tris HCl 50 mM pH 7,0. A cada una hora de reacción se extrajo una alícuota de la mezcla, a la cual se le midió la radioactividad asociada a material ácido insoluble y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7%, con el fin de observar los productos marcados mediante radioautografía.

TRANSFERENCIA DE PROTEINAS Y UNION DEL RNA GENOMICO RADIOACTIVO:

La transferencia de los polipéptidos virales se realizó conforme a un método previamente descrito (Towbin y col. 1979), el cual consiste brevemente en: las proteínas virales se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, luego se transfieren a papel de nitrocelulosa. Al terminar la transferencia, el papel de nitrocelulosa se trata durante 30 min. a temperatura ambiente, con una solución de unión que contiene: tampón Tris HCl 10 mM pH 7,0, NaCl 50 mM, EDTA 1mM, a la cual se le agrega 5% de leche descremada con el fin de bloquear los sitios de unión no específica. A continuación se incubó el papel de nitrocelulosa, durante 3 horas a temperatura ambiente, con 10 ml de solución de unión que contiene 5x10⁵ cpm/ml de RNA radioactivo, dentro de una bolsa nylon sellada, agitando ocasionalmente. Finalmente se lava el papel por 1 hora en solución de unión cambiando 4 veces la solución, se seca al aire

y se somete a radioautografía (Silva y col. 1987).

ENSAYOS DE UNION POR RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORETICA DE UN SEGMENTO DE RNA GENOMICO VIRAL AISLADO : los segmentos de RNA genómico viral radioactivo se separaron mediante una electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida al 7%. Luego se aisló cada uno de los segmentos, cortando del gel la zona que lo contenía, usando como referencia una radioautografía de él. Estos trozos de gel fueron posteriormente sometidos a electroelución en un aparato de electroelución BRL (Bethesda Research Lab.E.E.U.U.), de acuerdo al manual de instrucciones. Los segmentos obtenidos fueron posteriormente precipitados con etanol, resuspendidos en tampón Tris HCl 50 mM pH 7,0 y guardados a -70°C .

Los ensayos de retardo en la movilidad electroforética se hicieron como se indica a continuación: $1,3 \times 10^4$ cpm de segmento 11 de RNA con 0,2 a 0,8 μg de proteína Vp6 purificada se incuban durante 30 min. a 37°C , bajo las condiciones que se indican en el texto y luego se someten a electroforesis en geles al 4% de acrilamida en tampón TBE 0,5x. Se corre a 35 Ampere constante durante 6 horas, haciendo circular el tampón de corrida que corresponde a TBE 0,5x. Finalmente se seca el gel y se expone a radioautografía.

INMUNOPRECIPITACION DEL COMPLEJO PROTEINA-RNA: se incubaba el segmento 10 u 11 de RNA genómico radioactivo con la proteína Vp6 durante 30 min. a 37°C , en las condiciones que se indican en el

texto. Este complejo se incubaba con un anticuerpo anti Vp6 durante 60 min. a 4°C. Luego, se agrega la proteína A Sepharosa saturada con BSA y se incubaba durante 60 min. a 4°C. Se colectan las esferas por centrifugación a 5,000 rpm en tubos Eppendorf por 3 min., se lavan 6 veces con tampón Tris HCl 10 mM pH 7,5 y finalmente se agrega el tampón de muestra que contiene glicerol al 10%, azul de bromofenol en 1/25 volumen en tampón TBE, se hierve por 3 min. y se somete a electroforesis en geles al 4% de acrilamida como se describió en el punto anterior.

MARCACION DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES CON METIONINA ³⁵S: para marcar los polipéptidos virales se utilizó la misma cepa de rotavirus de mono SA-11 utilizada para marcar el RNA genómico viral y se siguió el mismo procedimiento descrito para esto, con la diferencia que la uridina tritiada fue reemplazada por metionina radioactiva. En este caso a una hora postinfección, el inóculo viral fue reemplazado por medio MEM libre de metionina, que contiene 20 µC/ml de metionina ³⁵S, continuando la incubación a 37°C hasta que se produzca el desprendimiento celular total. A continuación se congela el cultivo y después de sucesivos congelamientos y descongelamientos el virus se purifica por extracción en freón y varias centrifugaciones, que incluyen colchones de sacarosa y gradientes de cloruro de cesio (Sandino y col. 1988).

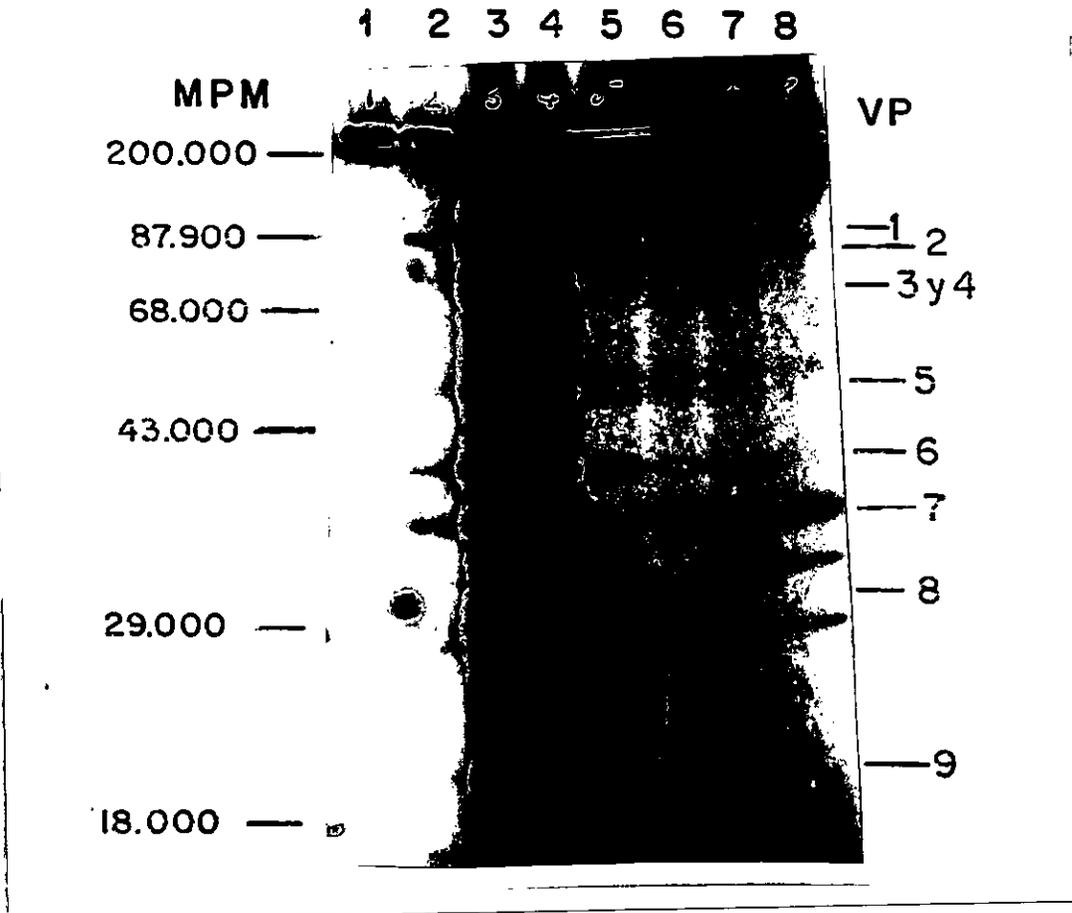
MARCACION DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES CON ¹²⁵I: con el fin de obtener polipéptidos de rotavirus humano radioactivos se utilizó el sistema de radioiodinación de New England Nuclear mr. Este

consiste en marcar suavemente con NaI^{125} , mediante lactoperoxidasa y glucosa oxidasa asociada a esferas inértres, bajo las condiciones descritas por el manual del fabricante. El sistema emplea la acción de la glucosa oxidasa co-inmovilizada a la lactoperoxidasa para generar peróxido de hidrógeno a partir de β -D-glucosa. Finalmente para purificar las partículas virales yodadas, del NaI^{125} libre y de las partículas dañadas, se realiza una filtración en una columna de Sephadex G-25 (15 cm x 0,5 cm) equilibrada con tampón Tris HCl 50 mM pH 8,0, recolectando la radioactividad presente en el volumen de exclusión. Con el fin de determinar el contenido de polipéptidos virales en cada fracción, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% y posterior radioautografía. En la figura 4 se muestra la radioautografía del gel, que contiene las proteínas presentes en las partículas virales obtenidas de las 8 fracciones colectadas, luego de filtrar el virus marcado por una columna Sephadex G-25. Como se deduce de la figura el virus aparece principalmente en las fracciones 3 y 4.

ELECTROFORESIS DE LOS POLIPEPTIDOS DE LAS PARTICULAS DE ROTAVIRUS HUMANO MARCADAS CON ^{125}I

Radioautografía de las 8 fracciones colectadas en el volumen de exclusión, luego de filtrar a través de una columna Sephadex G-25 las partículas virales de cubierta simple marcadas con ^{125}I , las cuales se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%. A la izquierda se indica la posición de los marcadores de peso molecular y a la derecha la posición de los polipéptidos virales.

FIGURA 4



ENTRECRUZAMIENTO DE LAS PROTEINAS VIRALES MEDIANTE REACTIVOS BIFUNCIONALES: El ensayo consiste en incubar 10 µg de las partículas virales de cubierta simple, de rotavirus SA-11 marcadas con metionina ³⁵S o de rotavirus humano marcado con ¹²⁵I, resuspendidas en tampón PBS pH 7,2 MgCl₂ 1 mM, con distintas diluciones que van de 5 a 500 µg/ml de DSP, durante 30 min. a temperatura ambiente por dos veces. El ditiobis (succimidilpropionato) o DSP, se prepara disolviendo 10 mg en 1 ml de DMSO en el momento de realizar el experimento. La reacción se detiene agregando tampón Tris 1 M pH 8,0 y se incuba por otros 30 min. a temperatura ambiente, para luego someterlo a PAGE SDS al 12%, en ausencia de agentes reductores. Una vez finalizada la electroforesis en primera dimensión, se corta cada línea del gel y se incuba con 2% de 2-mercaptoetanol en tampón Tris HCl 0,5 M pH 6,8, durante 10 min. a 37°C. Finalmente, se realiza la PAGE-SDS al 12% que corresponde a la segunda dimensión y una vez que el gel ha sido secado se somete a radioautografía (Brenner y col. 1985, Hantula y Bamford 1988).

RESULTADOS.

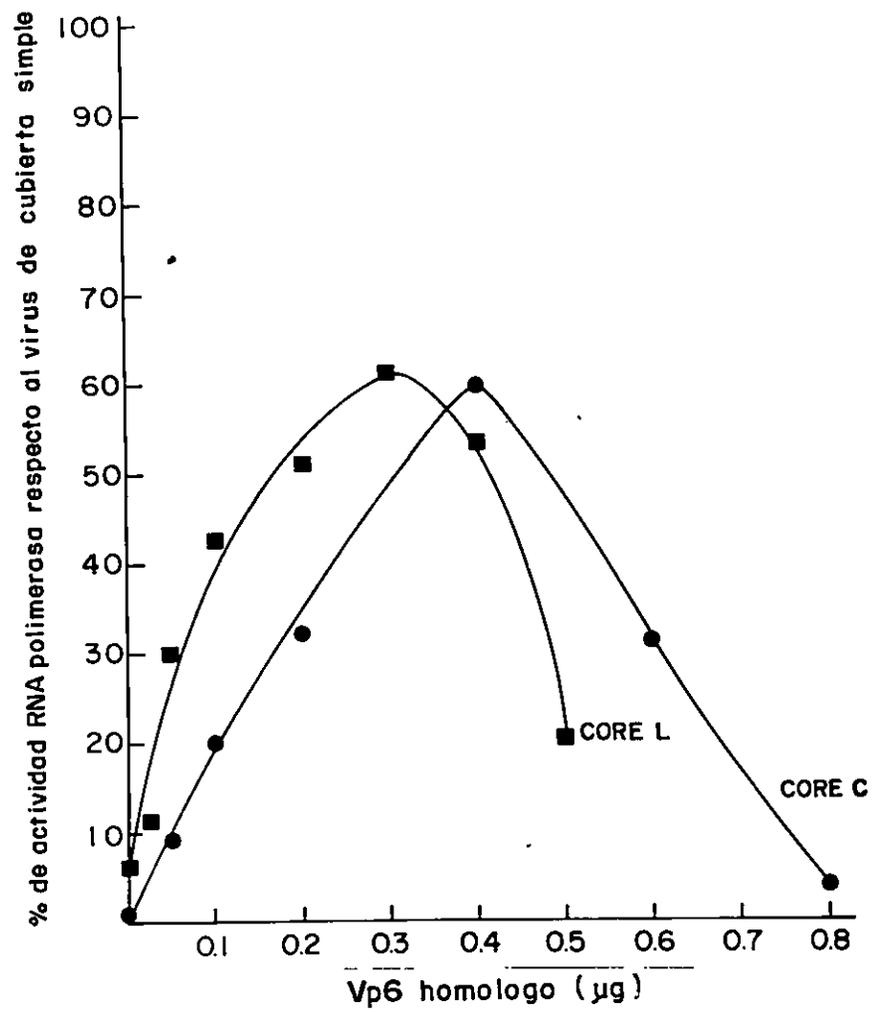
RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD RNA POLIMERASA DE CORES HUMANOS DE DISTINTO ELECTROFEROTIPO CON LA ADICION DE PROTEINA VP6 PURIFICADA HOMOLOGA.

La recuperación de la actividad de RNA polimerasa asociada al virus se estudió utilizando una cantidad definida de core viral con cantidades crecientes de proteína Vp6 homóloga purificada, libre de calcio. En este experimento, como se muestra en la figura 5, se utilizaron dos aislados virales que presentan distinto electroferotipo, los cuales pertenecen a los subgrupos I y II, definidos por las propiedades antigénicas de la proteína Vp6. El aislado "L" corresponde a un electroferotipo de corrida larga que pertenece al subgrupo antigénico II y el aislado C corresponde a un electroferotipo de corrida corta que pertenece al subgrupo antigénico I. El experimento consiste en incubar fracciones de 0.3 µg de cores virales con cantidades crecientes de proteína Vp6 homóloga, que van desde 0,1 a 0,8 µg, durante 30 min. a 37°C, bajo las condiciones previamente descritas para la recuperación de la actividad transcripcional (Sandino 1984, Sandino y col. 1986). Luego se ensaya la actividad de RNA polimerasa de la partícula viral obtenida. En la figura 5 se muestra el porcentaje de recuperación de la actividad de RNA polimerasa, expresada como un porcentaje de la actividad obtenida por el virus de cubierta simple, del cual provienen cada uno de los cores y proteína Vp6, al que se le asignó el 100%.

RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD DE RNA POLIMERASA A PARTIR DE CORES VIRALES Y VP6 HOMOLOGA

Una cantidad fija (0.3 μg) de cores de rotavirus humano fue incubada con cantidades crecientes (entre 0,1 y 0,8 μg) de proteína Vp6 purificada homóloga, durante 30 min. a 37°C, con el fin de que ocurra la reasociación de ambas fracciones virales, luego se ensaya la actividad RNA polimerasa como se describe en "materiales y métodos". La actividad RNA polimerasa se expresa como porcentaje respecto a la actividad que presenta el virus de cubierta simple, del cual se obtuvieron los cores y Vp6. Los experimentos se realizaron con dos aislados diferentes, uno de electroferotipo largo ("L"), que pertenece al subgrupo II y el otro de electroferotipo corto ("C"), que pertenece al subgrupo I.

FIGURA 5



En la figura 5 se observa que al incubar el core viral con la proteína Vp6 libre de calcio se recupera la actividad transcripcional tan pronto como se empieza a adicionar Vp6 al core, es decir, la presencia de esta proteína está directamente relacionada con la capacidad de transcripción del virus. En este experimento se observa que a medida que se agrega la proteína Vp6 sobre su core homólogo, aumenta la actividad transcripcional hasta llegar a una recuperación óptima. Los resultados indican que existe una relación óptima entre el core y la proteína Vp6, que es igual para ambos aislados y coincide exactamente con la relación molar que existe entre estas fracciones en la partícula viral de cubierta simple. Es interesante destacar que no se observaron mayores diferencias en el comportamiento de los dos aislados virales, a pesar que presentan electroferotipos distintos y pertenecen a subgrupos antigénicos diferentes, lo cual permite generalizar los resultados. La adición de cantidades mayores que el óptimo de la proteína, disminuye la recuperación de la actividad transcripcional. Esto aparentemente se debe a que al tener mayor cantidad de proteína Vp6 en el medio, se está favoreciendo la interacción Vp6-Vp6, sobre la interacción Vp6-core. La observación al microscopio electrónico del sobrenadante que contiene la proteína Vp6, muestra que esta proteína es capaz de unirse entre sí formando redes, lo que apoyaría la idea de que a altas concentraciones de Vp6 se favorecería la interacción Vp6-Vp6 por sobre la interacción Vp6-core (datos no mostrados).

El porcentaje de recuperación óptima alcanzado es muy semejante para ambos aislados virales y corresponde

aproximadamente al 60% de la actividad que presenta el virus de cubierta simple. Por otra parte, es importante destacar que el porcentaje de actividad transcripcional recuperada coincide con el porcentaje de partículas reconstituídas que se observan al microscopio electrónico (figura 3).

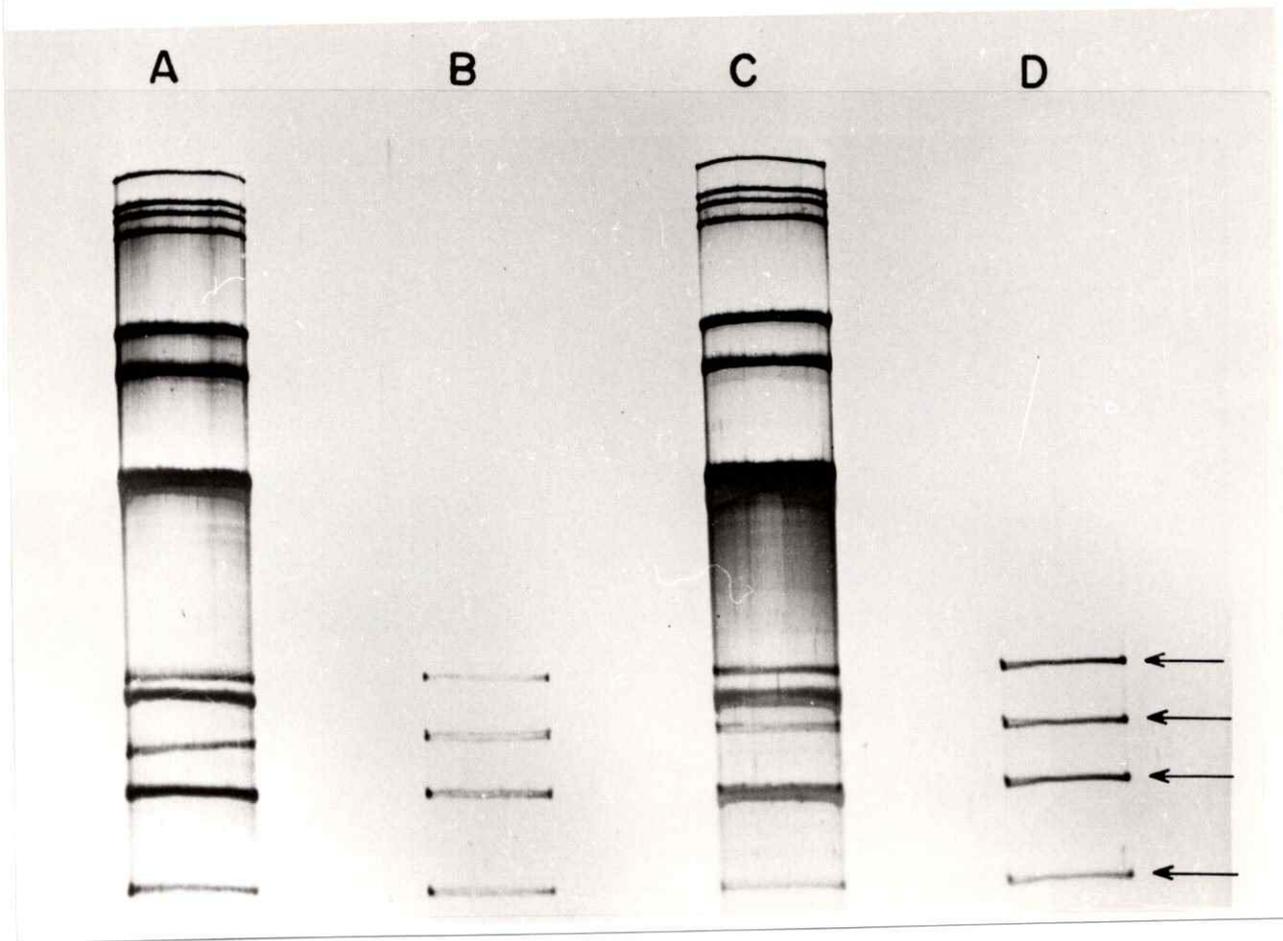
ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE TRANSCRIPCION DE LA PARTICULA VIRAL RECONSTITUIDA.

Los productos de transcripción sintetizados por la partícula viral reconstituída se analizaron mediante geles de poliacrilamida al 5%-8 M urea. Estos geles permiten separar RNA de simple hebra del de doble hebra, ya que el RNA de doble hebra migra más rápido que el de simple hebra en estas condiciones. La figura 6 muestra los resultados de este experimento, donde se analizan los productos de transcripción sintetizados por las distintas partículas virales. Se utilizaron como marcadores los cuatro segmentos de RNA genómico viral de mayor tamaño, los cuales se observan en la línea D. En la línea A se encuentran los productos sintetizados por el virus de cubierta simple, que corresponden a los once mensajeros virales, los cuales tienen un patrón de corrida muy semejante al patrón de RNA genómico viral. En la línea B se muestran los productos sintetizados por el core viral. Como la figura lo indica no se detectan productos donde migran los RNA mensajeros virales, con lo que se demuestra que el core viral no es capaz de transcribir. Finalmente, en la línea C se muestran los productos sintetizados por la partícula viral obtenida luego de incubar el core con la proteína Vp6, en las

TRANSCRIPCIÓN "IN VITRO" DE DIFERENTES PARTICULAS DE ROTAVIRUS HUMANO

Los transcritos obtenidos de las distintas partículas virales fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 5%-8M Urea. Línea A: productos sintetizados por el virus de cubierta simple; línea B: productos obtenidos de los cores virales; línea C: productos sintetizados por la partícula viral reconstituída. Cada muestra contiene 2 µg del RNA genómico del mismo aislado viral como marcador interno (línea D). Las flechas indican la posición de los cuatro segmentos de mayor peso molecular del RNA genómico viral. El gel se desarrolló por tinción con nitrato de plata.

FIGURA 6



condiciones óptimas encontradas en el experimento anterior, donde se puede apreciar que los productos obtenidos son idénticos a los transcritos sintetizados por el virus de cubierta simple.

UTILIZACION DE ANTICUERPOS PARA ESTUDIAR LA NATURALEZA DE LA INTERACCION ENTRE EL CORE Y LA PROTEINA VP6.

Una manera de estudiar la interacción de la proteína Vp6 con el core es a través de la utilización de anticuerpos, ya sea interfiriendo con estos anticuerpos en la reasociación del core y la proteína Vp6 o reemplazando a Vp6 por otra proteína que tenga la capacidad de unirse específicamente al core, tal como un anticuerpo anti core. Con este fin se prepararon anticuerpos policlonales anti core y anti Vp6 en conejos como se describe en "materiales y métodos". Estos anticuerpos se preincubaron con la fracción viral que se indica en la Tabla II. Luego el complejo antígeno-anticuerpo formado se incubó con la otra fracción viral. Finalmente se reaisla por centrifugación la partícula viral obtenida en estas condiciones y se somete a un ensayo de actividad RNA polimerasa. De este modo la interacción del anticuerpo con la fracción viral se estudia a través del ensayo de transcripción, determinando la incorporación de UMP ^3H a material ácido insoluble. En la Tabla II se muestran los resultados de estos experimentos, expresados como porcentaje de la actividad de transcripción asociada al virus de cubierta simple. Los resultados indican que tanto el core como la proteína Vp6 por sí solos no poseen capacidad de transcripción. Sin embargo, al incubar juntos el core con la proteína Vp6 se obtiene un nivel de síntesis de un 65% respecto al virus de

cubierta simple (línea 4). Ahora, cuando se incubaba el core con el suero que contiene anticuerpos anti core se observa que no hay transcripción, lo que permite concluir que la proteína Vp6 no puede ser reemplazada por estos anticuerpos en su función en la transcripción, pese a que éstos reaccionan con el core como se observa al ensayo de ELISA (línea 5).

Por otro lado, se utilizaron los anticuerpos anti core y anti Vp6 para estudiar si la unión de éstos a alguna de las dos fracciones virales era capaz de interferir en la recuperación de la actividad transcripcional. Los resultados muestran que cuando al virus reconstituido se le agrega el antisuero se observan los mismos niveles de recuperación de la actividad transcripcional, lo que sugiere que los determinantes antigénicos de la proteína Vp6 que no interaccionan con el core no estarían involucrados en la transcripción (línea 7). La incubación del core con el antisuero y posterior adición de Vp6, no produjo inhibición de la unión de la proteína y se obtuvo un 63% de la actividad transcripcional (línea 6). Más aún, por microscopía electrónica se observaron virus reconstituídos, lo que indica que Vp6 y los anticuerpos anti core no compiten por el mismo sitio de unión en el core. Sin embargo, la preincubación de Vp6 con el antisuero inhibe la reacción al menos en un 50%, lo que indica que en el antisuero existen anticuerpos anti los sitios de la proteína Vp6 que deben interaccionar directamente con el core viral (línea 8). Como control se realizaron los mismos experimentos con sueros preinmunes, con los que no se observó ningún efecto. Esto demuestra que los resultados se deben a la presencia en el suero

Recuperación de la actividad RNA polimerasa de rotavirus humano en la presencia de anticuerpos policlonales anti core y anti Vp6

Fracción viral	Preincubación con anticuerpos (a)	Adición posterior	% de la recuperación de la actividad RNA polimerasa.
virus cubierta simple 0,8 µg	-	-	100 (b)
core 0,3 µg	-	-	12
Vp6 0,4 µg	-	-	0,1
core + Vp6	-	-	65
core	suero anti core y anti Vp6	-	15
core	"	Vp6	63
core + Vp6	"	-	58
Vp6	"	core	29

(a) Los anticuerpos fueron incubados bajo condiciones que aseguran un 100% de unión a la fracción viral respectiva.

(b) El 100% corresponde a 2,500 pmoles de UMP (³H) incorporado a material ácido insoluble por 30 min. a 45°C.

hiperinmune de anticuerpos dirigidos contra alguno de los determinates antigénicos en cuestión, es decir, se deben a la presencia de anticuerpos específicos. El hecho de no tener anticuerpos anti core que interfieran en la reacción de recuperación de la actividad transcripcional y por el contrario tener anti la proteína Vp6, se podría deber a que Vp6 interacciona con el ácido nucleico más que una proteína del core, ya que anticuerpos anti ácido nucleico son muy difíciles de obtener.

ENSAYOS DE FILTRACION DEL COMPLEJO PROTEINA-RNA EN FILTROS DE NITROCELULOSA.

Los resultados obtenidos de los experimentos realizados con anticuerpos parecen indicar que la proteína Vp6 probablemente interacciona con el RNA genómico viral. Por este motivo se ensayó la capacidad de unión de Vp6 purificada al ácido nucleico, mediante ensayos clásicos de unión de un ácido nucleico a una proteína, como es la filtración en filtros de nitrocelulosa. Este ensayo se basa en retener en el filtro de nitrocelulosa el ácido nucleico marcado siempre que esté unido a la proteína, mientras que el ácido nucleico libre no es retenido. Con este fin se obtuvo RNA genómico viral radioactivo a partir de cultivos de células MA-104 infectadas con rotavirus SA-11 en presencia de uridina ^3H . El RNA genómico viral se obtuvo de la progenie viral purificada, por extracción con fenol-cloroformo y posterior precipitación con etanol. Con el fin de descartar que el RNA genómico viral se uniera por sí solo al filtro, se filtraron distintas cantidades de radioactividad de éste a través de los

filtros de nitrocelulosa. En las condiciones utilizadas no se detectó ningún tipo de unión del ácido nucleico libre, por lo que no hubo problemas de retención inespecífica, como se observa en algunos casos cuando se usa DNA. A continuación se incubó, una cantidad fija de RNA genómico tritiado con distintas concentraciones de proteína Vp6, con el propósito de que ocurra la unión entre ambas fracciones virales y posteriormente las mezclas de reacción se filtraron en las condiciones descritas en "materiales y métodos". Los ensayos de unión, no mostraron retención al filtro del ácido nucleico en presencia de la proteína Vp6, por lo tanto no se detectó unión de la proteína al ácido nucleico por este método.

Estos experimentos se realizaron en presencia de distintas concentraciones de agentes, tales como BSA, DTT y gliceraldehído, los cuales estabilizan el complejo proteína-ácido nucleico en otros sistemas. También se utilizó EGTA y NaCl, puesto que se ha observado que éstos facilitan la unión de la proteína Vp6 al core viral, en nuestro sistema.

Además se controló exhaustivamente el flujo de filtración y los lavados, con el fin de evitar una separación de las fracciones virales unidas, en caso que exista una unión débil entre ellas.

TRANSFERENCIA DE PROTEINAS Y UNION DEL RNA GENOMICO MARCADO.

Debido a que los resultados obtenidos mediante filtración en filtros de nitrocelulosa fueron negativos, se pensó en hacer otro experimento típico de unión, como es la unión del ácido nucleico

marcado a las proteínas transferidas a papel de nitrocelulosa.

Para realizar estos experimentos se utilizó RNA genómico de rotavirus humano marcado. Sin embargo, la marcación del RNA de rotavirus humano no resulta fácil de hacer, puesto que la totalidad de las cepas silvestres no son cultivables, lo que dificulta el marcaje del RNA genómico viral durante la infección. Por este motivo, se buscó otro mecanismo para obtener el RNA genómico viral radioactivo, que se basa en marcar el extremo 3'OH libre del RNA de doble hebra, utilizando pCp ^{32}P y RNA ligasa del fago T₄. Esta reacción de marcación resultó ser altamente eficiente, como se muestra en la figura 7. En los canales 1 a 5 se muestra el producto obtenido después de tomar alícuotas a intervalos de una hora de reacción. Como se observa desde la primera hora de reacción se marcan los 11 segmentos de RNA genómico eficientemente, sin detectarse diferencias de marcación entre ellos. A partir de la quinta hora de reacción se llega a un máximo de incorporación según se determinó por radioactividad asociada a material ácido insoluble.

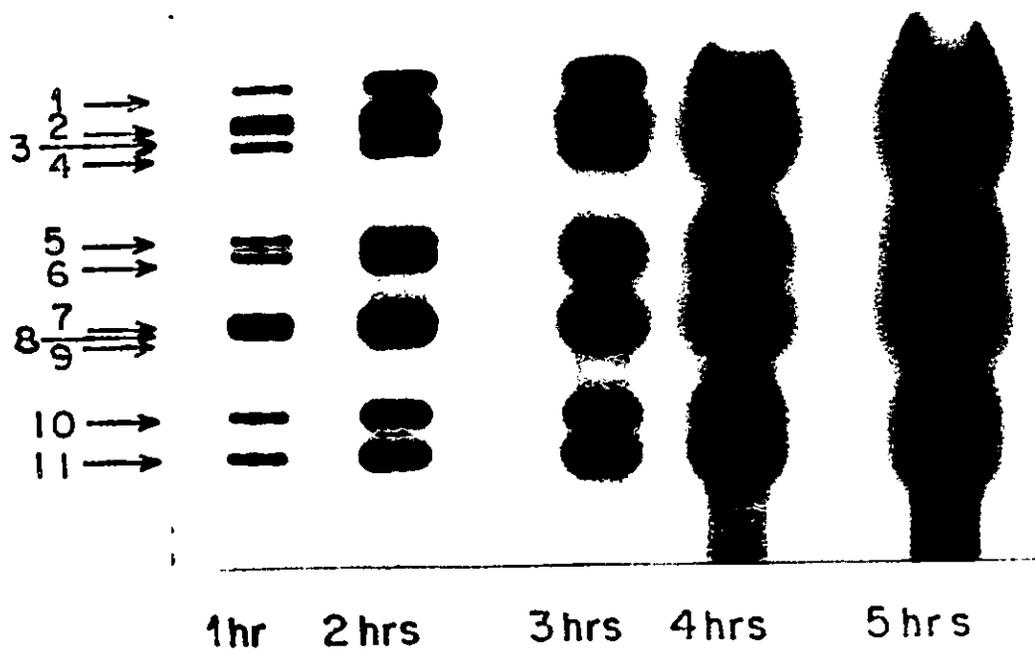
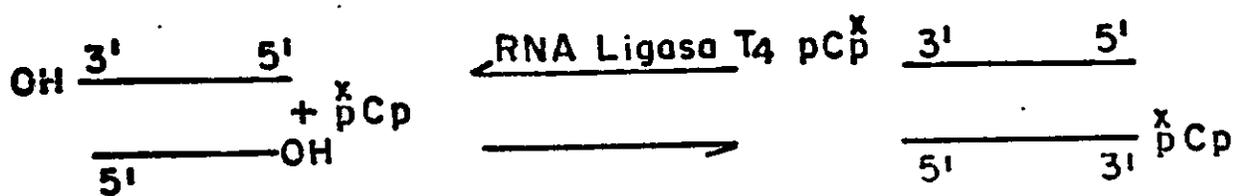
Por su parte, la proteína Vp6 fue sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, luego fue transferida a papel de nitrocelulosa conforme al protocolo descrito por Towbin y col. 1979. Este papel fue entonces incubado por 3 horas a temperatura ambiente con el RNA marcado (1×10^5 cpm/ml) disuelto en 5 ml de tampón de unión. Finalmente, el papel se lava, se seca y se somete a radioautografía.

La transferencia de cantidades crecientes de la proteína Vp6 al papel de nitrocelulosa se siguió, tiñendo el papel de nitrocelulosa con amido black, determinándose que en estas

OBTENCION DE RNA GENOMICO DE ROTAVIRUS HUMANO RADIOACTIVO
MEDIANTE LA REACCION CATALIZADA POR LA RNA LIGASA DE FAGO T₄ Y
pCp ³²P

El RNA genómico de rotavirus humano se marcó mediante la reacción esquematizada en la parte superior de la figura, con lo que se obtiene el extremo 3'OH de cada segmento de RNA radioactivo. La radioautografía muestra los productos obtenidos cada una hora de reacción, desde 1 hora hasta las 5 horas (líneas 1-5 respectivamente). Cada una hora de reacción se tomó una alícuota de 2µl de la mezcla de reacción, se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% y posterior radioautografía. Las flechas indican la posición de los 11 segmentos de RNA genómico.

FIGURA 7



condiciones más del 90 % de la proteína existente en el gel es transferida al papel (Dato no mostrado). Sin embargo, los resultados de estos experimentos fueron negativos, ya que no se pudo determinar la formación de banda alguna de radioactividad que corresponda a un posible complejo proteína-RNA, pese a que se buscaron las más variadas condiciones de formación del complejo.

ENSAYOS DE UNION POR RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORETICA DE UN SEGMENTO DE RNA GENOMICO AISLADO.

Basandose en que resulta más fácil estudiar la unión de una proteína a un ácido nucléico de menor tamaño y que además es más fácil reconocer el cambio en la movilidad electroforética de un sólo segmento de RNA marcado, los segmentos de RNA genómico viral marcados con pCp ^{32}P y RNA ligasa fueron separados uno de otro para realizar los experimentos que se describen a continuación, con el fin de tener mayor eficiencia tanto en la unión como en la detección de ésta. Por este motivo previo al experimento, el RNA genómico marcado se sometió a PAGE-SDS, luego se cortó cada banda del gel correspondiente a un segmento de RNA y posteriormente se electroeluyó el segmento.

Para realizar el ensayo se eligió el segmento 11 de RNA genómico, debido a que es el de menor peso molecular y por lo tanto, es más fácil detectar cambios en la movilidad producto de la unión de algunas moléculas de Vp6. El ensayo consistió en incubar cantidades crecientes de la proteína Vp6 (0,2 a 0,8 μg) con el segmento 11 de RNA marcado ($1,5 \times 10^4$ cpm) durante 30 min a 37°C y posteriormente someterlo a electroforesis en geles al 4% de acrilamida en las condiciones descritas en "materiales y

métodos".

En este tipo de experimentos se utiliza ácido nucleico de gran cantidad de radioactividad, debido a que el porcentaje de unión de éste a la proteína generalmente es bajo y de este modo, se puede detectar con mayor facilidad la aparición de una banda de menor intensidad en el gel, como consecuencia de la unión de ambas fracciones.

Estos ensayos se hicieron en presencia de agentes que en otros sistemas facilitan la unión del ácido nucleico a la proteína, tales como polietilenglicol, ditiotreitól y EGTA. En todos los experimentos de este tipo se utilizó tRNA de levadura, con el fin de bloquear la unión inespecífica.

En la figura 8 se muestran los resultados de estos experimentos, donde se observa que la migración del segmento 11 de RNA genómico en presencia de 0,2, 0,4 y 0,8 µg de proteína Vp6, líneas 3,4 y 5 respectivamente, es la misma que en ausencia de la proteína (líneas 1 y 2). Por otro lado, se puede observar en las líneas 6 a 14 que la adición de agentes que podrían facilitar la unión como PEG, DTT y EGTA respectivamente, tampoco varía la migración. Como se puede observar en la figura 8, no se obtuvo un retardo en la movilidad que fuera dependiente de la presencia de Vp6, las bandas de menor migración se obtuvieron también en los controles, lo que permite descartar que en estas condiciones se pueda determinar la formación de un complejo de este tipo.

Como control positivo de este experimento se realizó el mismo ensayo en otro sistema, donde se pudo determinar la unión

del ácido nucleico a una proteína por este método. Este sistema corresponde al factor de 65-72 kDaltons de adenovirus, denominado EivF, el cual se une a la región promotora EIV del DNA de adenovirus (Cortés y col. 1988)

Con el fin de optimizar las condiciones del ensayo y poder detectar con mayor facilidad una banda de menor movilidad que migrara muy cerca del segmento 11 de RNA genómico viral, se utilizaron geles de mayor longitud.

En estos geles también se estudió la temperatura óptima de unión y la presencia de $MgCl_2$. Se utilizaron distintas concentraciones de NaCl, ya que el NaCl a bajas concentraciones facilita la unión y a altas concentraciones la inhibe. Además se estudió el efecto de la competencia con RNA genómico viral no marcado, para mostrar si la unión es específica. Al igual que en el experimento anterior se usó tRNA como bloqueador de la unión inespecífica y se estudió también el efecto de distintas combinaciones de agentes, tales como PEG, DTT y EGTA.

Los resultados de estos experimentos se pueden ver en la figura 9. La radioautografía muestra que la temperatura no es un factor determinante en la formación del complejo (líneas 1 a 4). Se puede observar que las distintas concentraciones de NaCl no tienen efecto alguno (líneas 5 a 8). Las bandas de migración más lentas que el segmento parecen corresponder a agregados de éste, ya que su retardo no es afectado por la presencia de RNA no radioactivo como competidor (líneas 9 a 11). En este experimento además se estudio el efecto de distintas combinaciones de PEG, EGTA y DTT, pudiendose determinar que tampoco tienen efecto en la posible formación de un complejo (líneas 12 a 15). Por último, se

ENSAYO DE UNION POR RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORETICA DEL SEGMENTO 11 DE RNA GENOMICO VIRAL DE ROTAVIRUS HUMANO INCUBADO CON VP6 PURIFICADA DE LA MISMA CEPA

El segmento 11 de RNA genómico de rotavirus marcado con pCp ^{32}P ($1,5 \times 10^4$ cpm) se incubó con cantidades crecientes de proteína Vp6, en tampón Tris HCl 160 mM pH 8,5, que contenía 10 mM NaCl y 80 μg de tRNA de levadura como bloqueador inespecífico, durante 30 min. a 37°C . Luego se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida al 4%, como se indica en "materiales y métodos". Se secó el gel y finalmente se sometió a radioautografía. Se utilizaron como agentes que facilitan la unión de ambas fracciones virales PEG al 2%, 10mM DTT y 0,5 M EGTA. Todas las líneas contienen el segmento 11 de RNA. La línea 1 contiene solo RNA, la línea 2 contiene tRNA también, las líneas 3-5 además de lo anterior tienen 0,2, 0,4 y 0,8 μg de proteína Vp6 respectivamente, las líneas 6-8 son igual que 3-5 pero en presencia de PEG, las líneas 9-11 son igual que 3-5 pero en presencia de DTT y las líneas 12-14 son igual que 3-5 pero en presencia de EGTA.

FIGURA 8

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

SEGMENTO 11
DE RNA GENO-
MICO VIRAL →

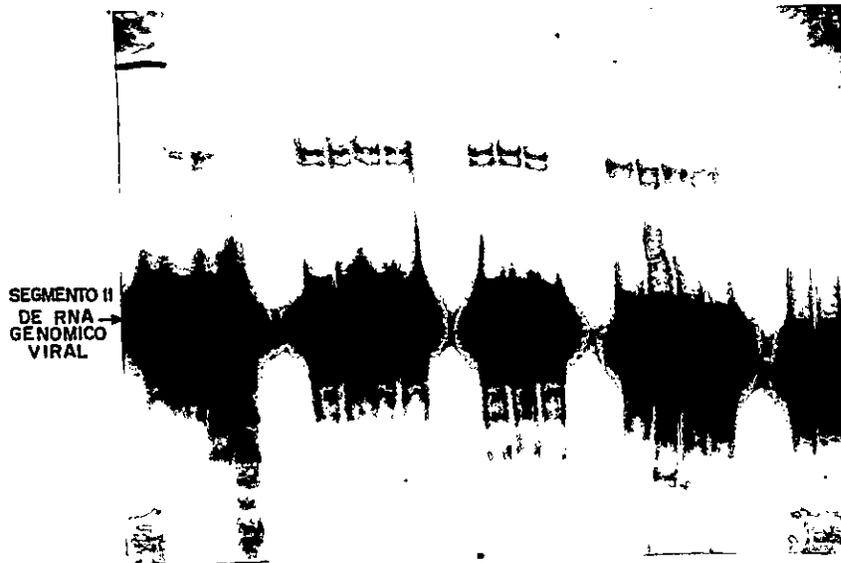


1,5 x10 ⁴ cpm RNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
80 µg tRNA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP6 µg	-	-	,2	,4	,8	,2	,4	,8	,2	,4	,8	,2	,4	,8
2% PEG	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10mM DTT	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
0,5 M EGTA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

ENSAYO DE UNION POR RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORETICA DEL SEGMENTO 11 DE RNA GENOMICO DE ROTAVIRUS HUMANO INCUBADO BAJO DISTINTAS CONDICIONES CON VP6 PURIFICADA

Estos ensayos se realizaron básicamente en las mismas condiciones que se describen en la figura 8, con las diferencias que se indican a continuación. Se buscó la temperatura óptima de reacción, incubando en vez de a 37°C a 45°C (línea 4). Se estudió el efecto de sales monovalentes y divalentes en la unión, utilizando 0,05, 0,1, 0,2 y 0,3 M de NaCl (líneas 5-8 respectivamente); 5 y 10 mM de MgCl₂ (líneas 16 y 17). Se realizaron ensayos de competencia preincubando durante 10 min. a 37°C con 1,3; 2,6 y 5,2 µg de RNA genómico viral no marcado (líneas 9,10 y 11 respectivamente. Se hicieron distintas combinaciones de los agentes utilizados en la reacción: PEG, DTT y EGTA juntos (línea 12), PEG con DTT (línea 13), DTT con EGTA (línea 14) y PEG con EGTA (línea 15). Los controles corresponden al segmento 11 de RNA: solo (línea 1), con tRNA (línea 2) y además con proteína Vp6 (línea 3). En estos experimentos se utilizó 0,2 µg de proteína Vp6.

FIGURA 9



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
15x10 ⁴ cpm RNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
80 µg tRNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl mM					0	100	200	400									
RNA frio µg							0,1	0,2	0,4	1,2	2,6	5,2					
Mg ²⁺ mM													+	+	+		
2% PEG													+	+	+		
10 mM DTT													+	+	+		
0,5 M EGTA													+	+	+		
0,4 µg VP6			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
t° 37° C		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
t° 45° C		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

estudió el efecto de magnesio como cofactor (líneas 16 y 17) determinandose en este caso que tampoco hay formación de complejo, a las diferentes concentraciones de $MgCl_2$ utilizadas. El segmento 11 de RNA genómico se comportó en todos los casos de la misma forma que en ausencia de la proteína Vp6. Estos resultados indican que no hay unión de la proteína Vp6 al ácido nucleico bajo estas condiciones de estudio.

INMUNOPRECIPITACION DEL COMPLEJO PROTEINA-RNA.

Debido a que los ensayos anteriores, que tenían por objetivo determinar la posible presencia de un complejo de unión entre Vp6 y el RNA genómico, sugieren que no habría formación de tal complejo, se buscó otra aproximación al problema. Esta consiste en la detección de la formación de un complejo entre Vp6 y el RNA genómico mediante la inmunoprecipitación del complejo con anticuerpos anti Vp6 previo a la electroforesis. Esto tiene la ventaja de permitir detectar una pequeña cantidad de proteína unida, además de independizarse de la estabilidad del complejo, el cual puede separarse durante la electroforesis. Este tipo de experimento resulta muy interesante, ya que aparentemente la unión de la proteína Vp6 al genomio viral podría corresponder a una unión muy débil.

Se utilizó un ensayo donde se incubó la proteína Vp6 con el RNA radiactivo con el fin de permitir la unión de ambos y luego se inmunoprecipitó la proteína Vp6, utilizando anticuerpos monoclonales anti Vp6. Finalmente, este complejo se somete a electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% TBE 0,5x, con el fin de observar la aparición de una banda correspondiente al

segmento de RNA radiactivo, en caso de que existiera unión entre ambas fracciones virales.

La inmunoprecipitación se realizó utilizando anticuerpos monoclonales subgrupo específicos, los cuales están definidos por la proteína Vp6 como se dijo anteriormente. La concentración de anticuerpo utilizada corresponde a una dilución con la cual se logra un plateau en la reacción de ELISA. Con esta dilución de anticuerpo se observa la totalidad de la proteína en geles de poliacrilamida al 12% luego de inmunoprecipitar.

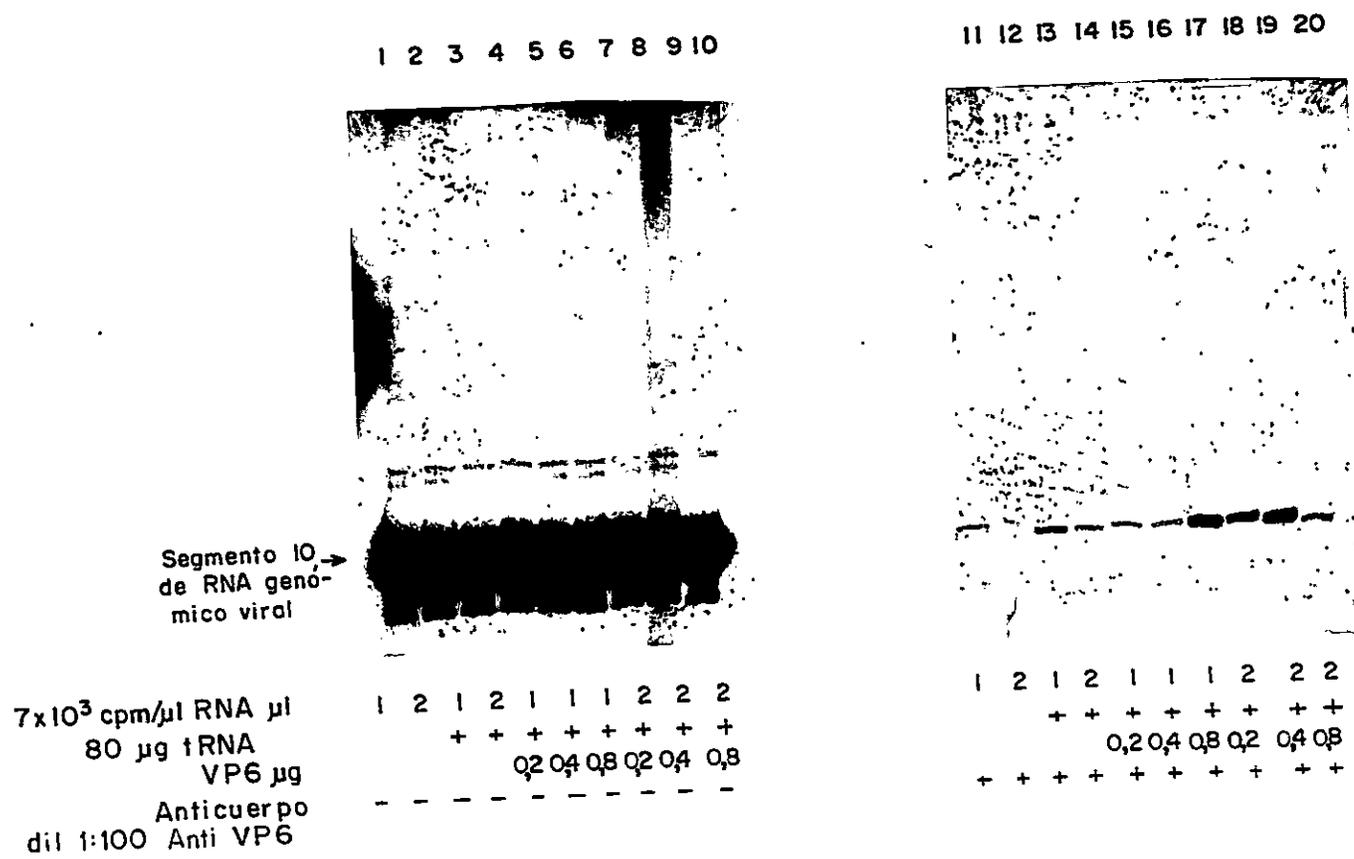
En estos ensayos se utilizó como RNA marcado los segmentos de RNA genómico 10 y 11. Los ensayos también se realizaron con el segmento 10 de RNA, con el propósito de determinar si existe algún efecto en la unión, que sea debido al segmento de RNA genómico usado.

Los resultados de estos experimentos correspondientes a los segmentos 10 y 11 se muestran en la figura 10 y 11 respectivamente. En la figura 10, las líneas 1 a 10 corresponden a la mezcla de reacción cargada directamente al gel sin inmunoprecipitar. En las líneas 11, 12, 13 y 14 se observan los resultados de los controles de la inmunoprecipitación del RNA y RNA más tRNA respectivamente, donde aparecen bandas débiles que corresponden a precipitación inespecífica. En las líneas 15 a 20 se muestra la inmunoprecipitación del complejo proteína-RNA, donde se puede apreciar que no hay unión de ambas fracciones virales, ya que en presencia o en ausencia de la proteína Vp6 se observan las mismas bandas débiles. Aunque en algunos casos parecería existir algún grado de inmunoprecipitación que depende

INMUNOPRECIPITACION DEL COMPLEJO FORMADO ENTRE LA PROTEINA VP6 Y EL SEGMENTO 10 DE RNA GENOMICO DE ROTAVIRUS HUMANO

El ensayo consiste en incubar 1×10^3 y 2×10^3 cpm de segmento de 10 de RNA genómico viral con 0,2, 0,4 y 0,8 μg de proteína Vp6 en tampón Tris HCl 160 mM pH 8,5 que contiene 10 mM NaCl y 80 μg de tRNA de levadura, durante 30 min. a 37°C . Luego inmunoprecipitar el complejo proteína-RNA formado utilizando una dilución 1:100 de anticuerpo monoclonal anti Vp6 y a continuación realizar electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% como se indica en "materiales y métodos". Se seca el gel y se somete a radioautografía (líneas 15-20). Las líneas 5-10 corresponden al mismo ensayo pero sin inmunoprecipitación. Las líneas 1,2 y 11,12 corresponden al control de RNA solo, sin y con inmunoprecipitación respectivamente. Las líneas 3,4 y 13,14 corresponden al control de RNA genómico y tRNA, sin y con inmunoprecipitación respectivamente.

FIGURA 10



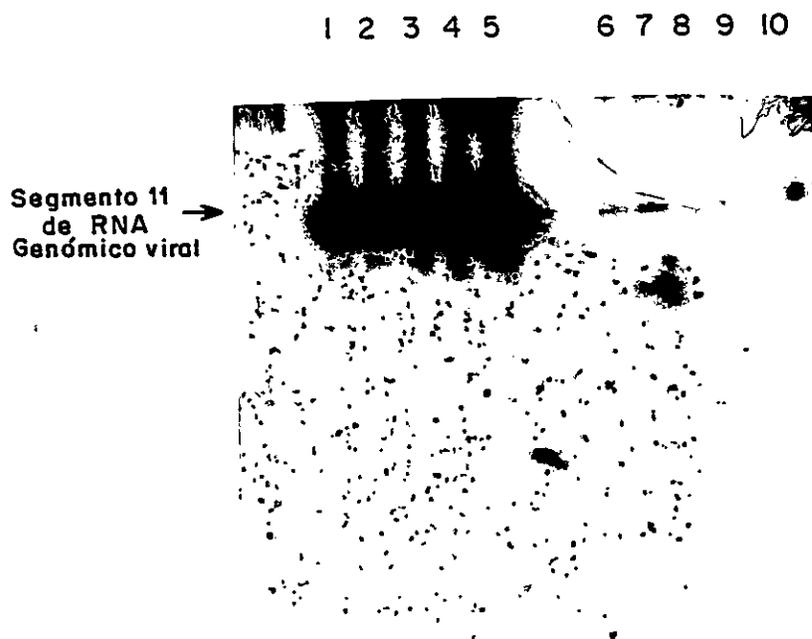
de la cantidad de Vp6 agregado, sin embargo no hay una buena correspondencia con la cantidad de RNA agregado ni tampoco con la cantidad de Vp6 utilizado. En la figura 11, donde se muestra el mismo experimento realizado con el segmento 11 de RNA marcado, se puede observar claramente que no hay unión del RNA genómico viral a la proteína Vp6, ya que aún utilizando cantidades crecientes de Vp6 se observa la misma intensidad de la banda. La aparición de esta banda parece corresponder a una precipitación no específica.

Basandose en que la proteína Vp6 podría estar funcionando como un canal de salida del RNA mensajero durante la transcripción de la partícula viral de cubierta simple, se pensó que podría existir algún tipo de interacción entre Vp6 y los transcritos virales. Por este motivo se realizaron experimentos de inmunoprecipitación utilizando como RNA marcado, el RNA mensajero viral. Con el fin de obtener el RNA mensajero viral marcado se hizo un ensayo de transcripción en presencia de UTP ^{32}p . Al término de la incubación se precipitó el virus por centrifugación, el RNA mensajero contenido en el sobrenadante se extrajo con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y se resuspendió en tampón Tris HCl 50 mM pH 7,0. Luego se incubó en presencia de la proteína Vp6 y se llevó a cabo la inmunoprecipitación siguiendo el mismo protocolo anterior. En este caso tampoco se pudo determinar la presencia de algún tipo de complejo (Dato no mostrado).

**INMUNOPRECIPITACION DEL COMPLEJO FORMADO ENTRE LA PROTEINA VP6 Y
EL SEGMENTO 11 DE RNA GENOMICO DE ROTAVIRUS HUMANO**

Este ensayo corresponde a lo mismo descrito en la figura anterior con la diferencia que se utilizó $1,3 \times 10^4$ cpm de segmento 11 de RNA genómico viral en vez del segmento 10.

FIGURA 11



1,5x 10 ⁴ cpm RNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
80 μg tRNA		+	+	+	+		+	+	+	+
VP6 μg			0,2	0,4	0,8		0,2	0,4	0,8	
Anticuerpo dil. 1:100 anti VP6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

ENTRECruzAMIENTO DE LOS POLIPEPTIDOS VIRALES MEDIANTE REACTIVOS BIFUNCIONALES.

Tomando en cuenta los resultados de los experimentos anteriormente descritos, con los que se puede descartar la posibilidad de que la proteína Vp6 forme un complejo de unión con el RNA viral, se estudió la posible interacción de Vp6 con alguno de los polipéptidos que forman el core viral. Estos experimentos se realizaron utilizando reactivos que pueden entrecruzar proteínas que se encuentran cerca una de otra. Estos reactivos, en general, reaccionan con aminas primarias formando enlaces covalentes, ya sea con los grupos amino epsilon de las lisinas o con grupos amino terminales (Hantula y Bamford 1988). La reacción produce la aparición de complejos de proteínas de mayor peso molecular, que son detectados cuando el conjunto de polipéptidos involucrados son sometidos a electroforesis en condiciones no reductoras, observandose la aparición de bandas de menor movilidad que corresponden al complejo de mayor peso molecular. Actualmente existen reactivos que además, tienen la particularidad de tener puentes disulfuro en el centro de la molécula, los cuales pueden ser reducidos, con lo que se separan las proteínas que están formando el complejo y con esto pueden ser fácilmente detectadas por electroforesis en geles en una segunda dimensión. El reactivo que se utilizó en estos experimentos se denomina ditiobis (succinimidilpropionato) o DSP, que es el más ampliamente usado. Este puede entrecruzar polipéptidos que se encuentren en la organización macromolecular a una distancia de 12 Å.

Para realizar este experimento se requiere tener las proteínas marcadas y con este fin se obtuvieron rotavirus radioactivos de la cepa SA-11 marcados con metionina ^{35}S y rotavirus humanos marcados con ^{125}I como se describe en "materiales y métodos". Ambos virus radiactivos fueron ensayados respecto a su actividad transcripcional luego de la marcación. Los transcritos sintetizados por cada uno de los virus fueron analizados por electroforesis en geles al 5% de poliacrilamida 8M urea, como se muestra en la figura 12. Se puede observar que los transcritos sintetizados por las partículas virales marcadas con ^{125}I (líneas 6 y 7) son idénticos a los obtenidos con los virus sin marcar (líneas 4 y 5), lo que permite descartar que la iodinación introduce cambios que puedan conducir a la inactivación de las partículas. Resultados idénticos se obtuvieron para los virus marcados con metionina ^{35}S de la cepa SA-11 (líneas 1, 2 y 3).

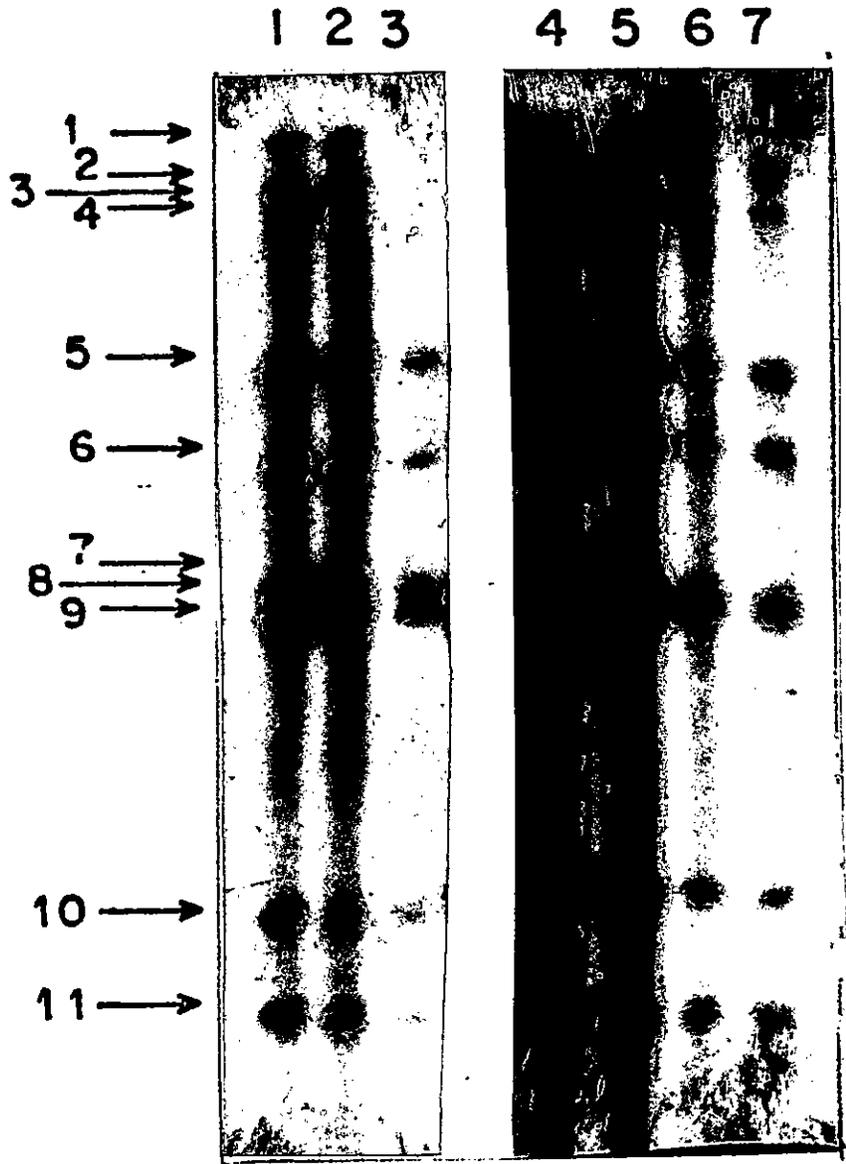
El experimento de entrecruzamiento de proteínas consiste en incubar las partículas virales radioactivas, en este caso virus de cubierta simple, con distintas concentraciones de el reactivo de entrecruzamiento, luego se hace electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12% en condiciones no reductoras, como se describe en "materiales y métodos". Una vez terminada la electroforesis se embebe el gel en una solución reductora, que contiene tampón Tris HCl 0,5 M pH 6,8 con 2-mercaptoetanol al 2%, durante 10 min. a 37°C , para romper los puentes disulfuro. A continuación se somete la línea del gel que contiene las proteínas a electroforesis en segunda dimensión, en otro gel de

**ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE TRANSCRIPCION SINTETIZADOS POR
DISTINTAS PARTICULAS DE ROTAVIRUS RADIOACTIVAS MEDIANTE
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-UREA:**

Los transcritos sintetizados por las distintas partículas virales fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 5%-8M urea. Líneas: 1) rotavirus SA-11 completo activado con shock de calor, 2) rotavirus SA-11 de cubierta simple, 3) rotavirus SA-11 de cubierta simple marcado con metionina ^{35}S , 4) rotavirus humano completo activado con shock de calor, 5) rotavirus humano de cubierta simple, 6) rotavirus humano de cubierta simple marcado con ^{125}I obtenido de la fracción 3 de la columna de Sephadex G-25, 7) rotavirus humano de cubierta simple marcado con ^{125}I obtenido de la fracción 4 de la columna de Sephadex G-25.

Los RNA mensajeros están marcados con UMP ^{32}P , por lo tanto el gel se secó y se sometió a radioautografía.

FIGURA 12



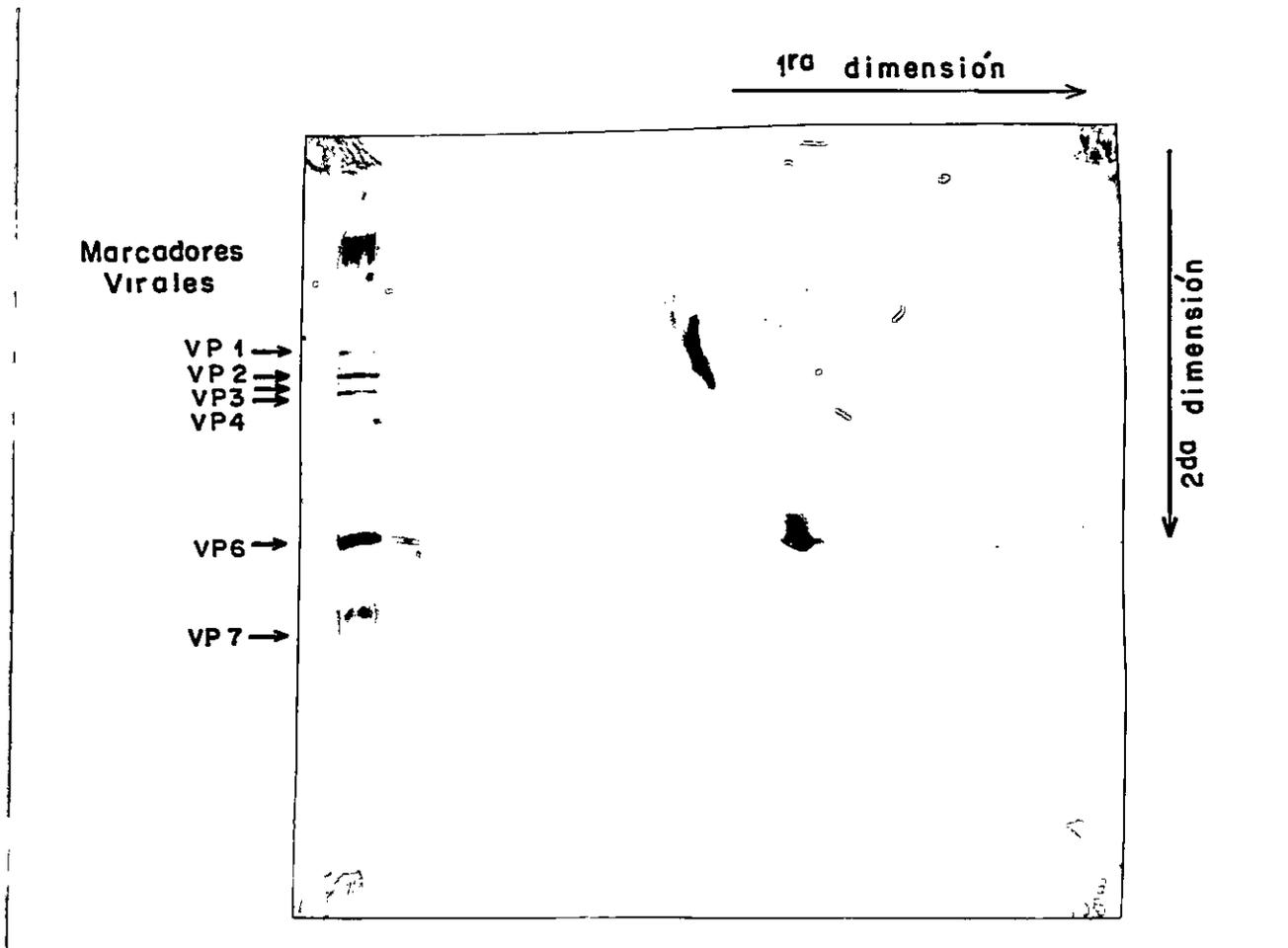
poliacrilamida-SDS al 12%. Finalmente el gel se seca y se somete a radioautografía. Las proteínas no entrecruzadas migran en el gel según su peso molecular, formando una diagonal en la segunda dimensión. Sin embargo, las proteínas entrecruzadas que en la primera dimensión migran más lento, al ser reducidas y romper el complejo de mayor peso molecular formado, en la segunda dimensión caen fuera de la diagonal, por lo tanto pueden ser fácilmente detectadas. Se buscaron las concentraciones óptimas del reactivo de entrecruzamiento, se probaron concentraciones desde 5 $\mu\text{g/ml}$ hasta 500 $\mu\text{g/ml}$. La concentración óptima de DSP encontrada fue de 62,5 $\mu\text{g/ml}$.

En las figuras 13 y 14 se muestran los resultados de los experimentos realizados en las condiciones óptimas, con las partículas de cubierta simple de la cepa SA-11 marcada con metionina ^{35}S , los resultados obtenidos con los virus humanos marcados con ^{125}I son idénticos (datos no mostrados). Se utilizaron como marcadores de peso molecular las proteínas virales de la misma cepa. La figura 13 corresponde a la electroforesis en dos dimensiones de las proteínas virales provenientes de las partículas de cubierta simple de virus SA-11 marcadas, sin el tratamiento con el reactivo de entrecruzamiento. En ésta se puede observar la diagonal que forman las proteínas virales migrando según peso molecular, justo frente a los marcadores virales. La figura 14 corresponde a la electroforesis en dos dimensiones de las proteínas virales de las partículas tratadas con la concentración óptima de DSP (62,5 $\mu\text{g/ml}$), donde se puede observar que aparecen polipéptidos que migran hacia la izquierda de la diagonal, lo que indica que estos fueron

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE LOS POLIPEPTIDOS DE LAS PARTICULAS VIRALES DE CUBIERTA SIMPLE EN AUSENCIA DE DSP

Los polipéptidos de rotavirus SA-11 de cubierta simple marcados con metionina ^{35}S fueron sometidos a electroforesis bidimensional. Luego se secó el gel y se expuso a radioautografía. Ambas dimensiones se realizaron en geles de poliacrilamida al 12%, sin embargo la primera dimensión se llevó a cabo en condiciones no reductoras. La primera dimensión se corrió de izquierda a derecha y la segunda de arriba hacia abajo. A la izquierda del gel se indican los polipéptidos virales que se usaron como marcadores.

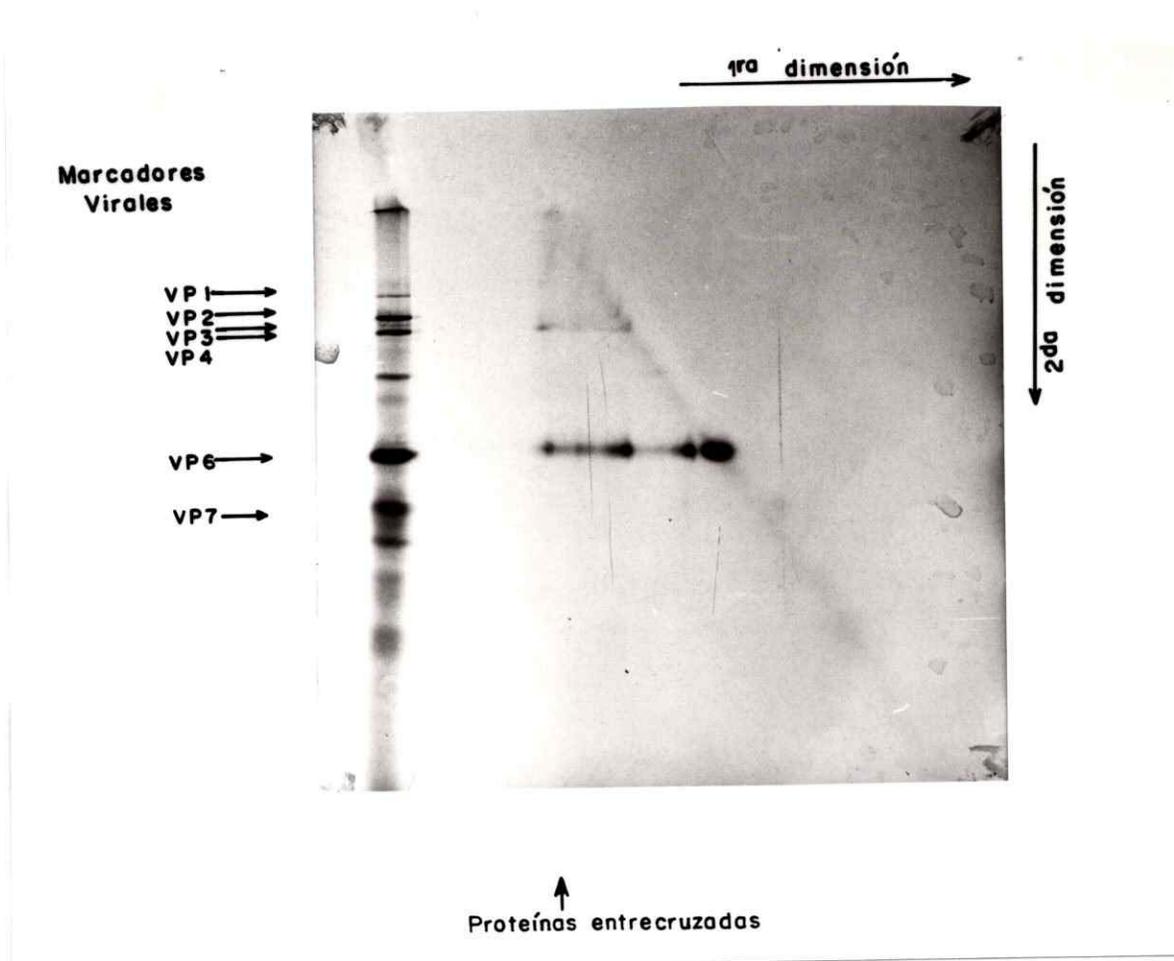
FIGURA 13



**ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE LOS POLIPETIDOS DE LAS PARTICULAS
VIRALES DE CUBIERTA SIMPLE TRATADAS CON 62,5 µg/ml DE DSP**

Los polipéptidos virales de rotavirus SA-11 marcados con metionina ³⁵S se sometieron al mismo procedimiento descrito en la figura anterior, con la diferencia que previo a la electroforesis fueron incubados con 62,5 µg/ml de reactivo de entrecruzamiento (DSP) como se describe en "materiales y métodos".

FIGURA 14



entrecruzados por el reactivo. Los polipéptidos entrecruzados migran en la posición correspondiente a la migración de Vp3 y Vp6. Además se observa entrecruzamiento de la proteína Vp6 entre sí, formando tres complejos distintos, lo que es lógico de esperar, puesto que esta proteína se encuentra formando trímeros en el virus.

UTILIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA DETERMINAR LA REGION DE LA PROTEINA VP6 INVOLUCRADA EN LA TRANSCRIPCION.

Una manera de determinar cuál es la región de la proteína Vp6 involucrada en la transcripción, es utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos hacia distintos epítopes de este polipéptido, de modo de estudiar si la unión de alguno de ellos a Vp6 previo a la reconstitución de la partícula logra interferir con la unión de Vp6 al core, y con esto inhibir la transcripción.

La proteína Vp6 se incubaba con distintos anticuerpos monoclonales, bajo condiciones de máxima unión entre ambas fracciones, de modo de asegurar que la totalidad de Vp6 agregado reacciona con el anticuerpo. Las condiciones para cada anticuerpo fueron determinadas mediante un ensayo de ELISA, como se indica en "materiales y métodos". El ensayo utilizado consiste inicialmente en formar el complejo anticuerpo-Vp6 en las condiciones ya descritas y luego incubar este complejo con el core, de modo de permitir que ocurra la reconstitución de la partícula viral de cubierta simple. Finalmente se reaisla la partícula viral reconstituída por centrifugación, se resuspende de modo tal que su concentración sea equivalente al virus de cubierta simple usado en forma inicial y se ensaya para

determinar la actividad RNA polimerasa, con el fin de observar el grado de recuperación de la transcripción.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales dirigidos contra distintos epítopes de la proteína Vp6: a) dirigidos hacia un epítope de subgrupo común a ambos subgrupos, b) específicos para el subgrupo II, debido a que el aislado usado en estos ensayos es de tipo II, c) dirigidos hacia el extremo amino terminal de Vp6 denominado 50, d) dirigidos hacia un epítope ubicado en la zona central de la proteína denominado 443 y e) dirigidos hacia el extremo carboxilo terminal de Vp6 denominado 1026. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla III. En este experimento a modo de referencia, al virus de cubierta simple se le asignó el 100% de la actividad transcripcional. A partir de este se obtuvo un core con un 9% de actividad, que corresponde a las condiciones en las cuales el core sufre el menor grado de deterioro durante el tratamiento con altas concentraciones de calcio y a su vez la proteína Vp6 purificada en estas condiciones tiene un máximo de capacidad de reconstitución, sin tener actividad de polimerasa. Al incubar ambas fracciones virales se observa que se puede recuperar hasta un 56% de la actividad que presenta el virus de cubierta simple, que es un valor muy cercano al máximo logrado en estas condiciones. Como control del experimento se incubó el core viral con los anticuerpos monoclonales anti la proteína Vp6, observándose que ninguno de ellos logra modificar la actividad transcripcional residual. Esto indica que los anticuerpos no tienen interacción alguna de importancia en la reacción de

transcripción con el core.

La preincubación de la proteína Vp6 con los monoclonales anti subgrupo, ya sea con el anticuerpo común a ambos subgrupos o con el anticuerpo específico de subgrupo II y posterior incubación con el core viral, permite recuperar la actividad transcripcional en un valor similar al obtenido en la ausencia de los anticuerpos. Estos resultados indican que la región de Vp6 que define los subgrupos antigénicos de rotavirus, no estaría involucrada en la interacción con el core que determina la actividad de transcripción, puesto que los anticuerpos monoclonales subgrupo específicos no son capaces de inhibir la reacción. Lo mismo se observa que ocurre con los anticuerpos monoclonales denominados 1026 y 443, mostrando que la región central y carboxilo terminal de la proteína Vp6 tampoco está involucrada en la transcripción asociada a la interacción del core con Vp6. Sin embargo, existe un anticuerpo monoclonal capaz de inhibir la recuperación de la transcripción, a un valor cercano al control realizado en ausencia de Vp6, que corresponde al monoclonal 50. Este resultado sugiere que el anticuerpo monoclonal 50 sería capaz de unirse al sitio de la proteína Vp6 involucrado en la transcripción, impidiendo o alterando seriamente la capacidad de unión de Vp6 al core y en consecuencia inhibiendo la actividad RNA polimerasa. De estos resultados se desprende que, aparentemente la región amino terminal de la proteína Vp6 estaría involucrada en la interacción con el core viral que hace posible la transcripción.

TABLA III

Recuperación de la actividad de RNA polimerasa de rotavirus humano en presencia de anticuerpos monoclonales anti Vp6.

Fracción viral	Preincubación con anticuerpos	Adición posterior	% de recuperación de la actividad de RNA polimerasa
virus cubierta simple 0,8 µg	-	-	100 (b)
core 0,3 µg	-	-	9
Vp6 0,4 µg	-	-	0,1
core + Vp6	-	-	56
core	monoclonal anti subgrupos	-	10
Vp6	"	core	53
core	monoclonal anti subgrupo II	-	11
Vp6	"	core	60
core	monoclonal anti Vp6 50	-	13
Vp6	"	core	12
core	monoclonal anti Vp6 1026	-	7
Vp6	"	core	54
core	monoclonal anti Vp6 443	-	8
Vp6	"	core	58

(a) Los anticuerpos fueron incubados bajo condiciones que aseguran un 100% de unión a la proteína Vp6.

(b) El 100% corresponde a 379 pmoles de UMP (³H) incorporado a material ácido insoluble por 30 min. a 45°C.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que existe una relación estequiométrica óptima entre el core y la proteína Vp6 para recuperar la actividad transcripcional del virus de cubierta simple. Los datos indican que tan pronto como se empieza a adicionar proteína Vp6 al core, se comienza a recuperar la actividad transcripcional (figura 5) y los productos de transcripción sintetizados durante la incubación de estas dos fracciones virales son idénticos a los sintetizados por el virus de cubierta simple (figura 6). Sin embargo, la función que cumple esta proteína en el proceso de transcripción aún no se conoce. De acuerdo a nuestras condiciones de estudio, la Vp6 purificada no presenta actividades enzimáticas asociadas a la transcripción, tales como: RNA polimerasa, ATPasa y nucleasa (Sandino 1984, Sandino y col. 1986). Siendo Vp6 la proteína más abundante del virus, es poco probable que actúe en forma catalítica como lo haría una enzima. Posiblemente actúe en forma estequiométrica, como sería en el caso de cumplir una función estructural.

La observación al microscopio electrónico de la partícula viral obtenida después de incubar ambas fracciones virales, muestra que ésta tiene la misma apariencia que el virus de cubierta simple, es decir, la proteína Vp6 se vuelve a ubicar alrededor del core, ordenándose del mismo modo, como se encuentra en el virus de cubierta simple. De esta manera, se demuestra que se reconstituye la partícula viral de simple cubierta, junto con

recuperar la actividad transcripcional. Esta conclusión se refuerza por el hecho que coincide exactamente el porcentaje de partículas reconstituídas, observadas al microscopio electrónico, con el porcentaje de recuperación de la actividad transcripcional.

La reconstitución de la partícula viral de cubierta simple "in vitro" constituye algo excepcional, ya que no ha sido descrita para otros virus, aún de la misma familia. Esto podría significar que no basta sólo con la presencia de la proteína Vp6 para recuperar la actividad transcripcional, sino que cuando interacciona con el core forma la estructura que es fundamental para cumplir su función.

El hecho de que al incubar el core con la proteína Vp6 ocurra reconstitución de la partícula viral de cubierta simple, sugiere que esta proteína tiene una función estructural, es decir, al unirse al core le da a éste una estructura tal que permite que ocurra la transcripción. Probablemente la interacción entre ambas fracciones virales permite que la RNA polimerasa tenga acceso al templado o que el templado se acerque a la polimerasa.

Con el propósito de probar si la proteína Vp6 cumple un papel estructural en el proceso de transcripción, se utilizaron anticuerpos policlonales contra el core viral, de modo de permitir que estos anticuerpos se unieran al sitio de unión de Vp6 al core, para reemplazar a Vp6 y conferirle a éste la estructura necesaria para transcribir. Sin embargo, los resultados de la Tabla II muestran que al incubar el core con el suero que contiene los anticuerpos policlonales anti core, no hay

recuperación de la transcripción, por lo tanto la proteína Vp6 no es reemplazada por estos anticuerpos. Además, al agregar proteína Vp6 al core previamente incubado con los anticuerpos se recupera la actividad transcripcional, lo que indica que el suero no contiene anticuerpos que se unan al mismo sitio de unión de Vp6 en el core. Aunque, si se incubaba la proteína con los anticuerpos y luego se agrega el core viral se obtiene inhibición de la actividad transcripcional, por lo tanto el suero policlonal contiene anticuerpos dirigidos contra el sitio de unión de Vp6 al core.

Basandose en las siguientes evidencias: a) las posibilidades de interacción de la proteína Vp6 con el core son de dos tipos, una con el genomio viral y la otra con algún polipéptido del core. b) Los resultados obtenidos con los anticuerpos policlonales nos sugirieron que el sitio de interacción de Vp6 al core podría ser el RNA genómico viral más que un polipéptido del core, debido a que no se encontraron anticuerpos contra el core que interfieran en la reacción de transcripción, lo que probablemente se deba a que resulta muy difícil obtener anticuerpos anti ácidos nucleicos. A pesar que no se puede descartar que el sitio de unión podría ser un polipéptido que no se encuentra expuesto en la superficie del core. c) Tomando en cuenta que por hibridación se ha demostrado que el RNA genómico viral se transcribe de principio a fin, lo que indica la ausencia de promotores tipo RNA polimerasa II (Spencer y García 1984). Se pensó que la proteína Vp6 interactuaría preferentemente con el genomio viral, funcionando como una especie de partidor de la síntesis de RNA, como se ha observado que ocurre en otros

sistemas virales. Con el fin de demostrar esta idea, se realizaron una serie de experimentos clásicos utilizados para estudiar la unión de una proteína a un ácido nucleico, como son los de filtración del complejo proteína-RNA a través de filtros de nitrocelulosa, unión del RNA genómico viral marcado a las proteínas virales transferidas a nitrocelulosa, retardo en la movilidad electroforética de alguno de los segmentos de RNA genómico viral y finalmente inmunoprecipitación del complejo proteína-RNA. Sin embargo, se constató que mediante ninguno de estos procedimientos se pudo detectar la unión de la proteína Vp6 al core viral.

Resultados obtenidos por crio-microscopía electrónica, que muestran que la proteína Vp6 forma canales que van desde el core hasta la cubierta externa del virus (Prasad y col. 1988), sugieren que la proteína Vp6 podría interactuar con los mensajeros virales recién sintetizados, en el proceso conocido como extrusión del mRNA. Sin embargo, tampoco se detectó una unión estable de la proteína Vp6 al RNA de simple hebra mediante experimentos de inmunoprecipitación, que se realizaron utilizando como ácido nucleico marcado, los once RNA mensajeros radioactivos (datos no mostrados). En los experimentos que estudian la transcripción de rotavirus nunca se ha observado que el RNA mensajero permanezca asociado a la partícula viral de cubierta simple, sino que aparentemente éste es rápidamente extruído de la partícula viral (Spencer y Arias 1981).

Por otra parte, existen datos recientes que apoyan los resultados antes descritos. Estos consistieron en el estudio del

potencial de entrecruzamiento por irradiación con la luz ultravioleta del ácido nucleico radioactivo con proteínas, utilizando extractos de células infectadas. Los resultados obtenidos indican que mediante este procedimiento tampoco es posible unir Vp6 con mRNA o RNA genómico y que sólo se obtiene la unión de otros polipéptidos virales a mRNA (comunicación personal del Dr. John Patton).

Los resultados obtenidos del conjunto de experimentos realizados para detectar la unión de la proteína Vp6 el ácido nucleico viral indican que esta proteína no interacciona en forma estable con el RNA viral.

Si el requerimiento de Vp6 como cápside interna en la partícula de cubierta simple no se debe a su interacción con el RNA genómico viral, debería estar relacionada con algún polipéptido del core. Para comprobar esta idea, se realizaron una serie de experimentos con el fin de conocer cuales son los polipéptidos del core que interactúan con Vp6. Con este propósito se usaron reactivos capaces de entrecruzar proteínas covalentemente, los cuales se han utilizado ampliamente en biología molecular, con el fin de conocer la relación que existe entre proteínas cercanas o para estudiar la estructura de algunos virus. En estos experimentos se utilizó el DSP, uno de los reactivos homobifuncionales más usados, el cual es capaz de entrecruzar proteínas que se encuentren hasta 12 Å de distancia (Hantula y Bamford 1988). Las partículas virales radioactivas obtenidas con el fin de realizar estos experimentos, no perdieron su actividad transcripcional luego de ser marcadas con metionina ^{35}S o con ^{125}I , como se muestra en la figura 12. Lo que no sólo

asegura que la interacción de Vp6 con el core permanece intacta, sino que además se mantiene la integridad funcional de la partícula.

Los resultados de las figuras 13 y 14 muestran que a la concentración óptima de DSP de 62,5 $\mu\text{g/ml}$, se detecta claramente que las moléculas de Vp6 interaccionan entre sí formando varios complejos multiméricos y que ésta a su vez interacciona con el polipéptido Vp3 del core. El hecho que la proteína Vp6 interaccione entre sí, no es sorprendente. Más aún era algo esperado, ya que se ha demostrado que esta proteína existe como un homotrímero, tanto en células infectadas como en el virión purificado. Se ha propuesto que los trímeros de Vp6 o multímeros de estos trímeros son los que se unen al core viral para formar el virus de cubierta simple (Gorziglia y col. 1985, Sabara y col. 1987). En experimentos anteriores, hemos observado al microscopio electrónico que en el sobrenadante que contiene Vp6, esta proteína es capaz de formar redes uniéndose entre sí (Sandino 1984). Por lo tanto este resultado estaría comprobando una vez más la capacidad de Vp6 para interactuar entre sí, propiedad que al parecer es clave para su posterior interacción con el core viral. Sin embargo, lo más relevante de estos resultados es haber encontrado que Vp6 está interactuando con la proteína Vp3 del core. Esto es sorprendente, porque se esperaba que Vp6 interactuara preferentemente con los polipéptidos Vp1 o Vp2 del core, por los siguientes motivos. 1) Se esperaba que Vp6 activara el aparato transcripcional probablemente a través de una interacción directa con la polimerasa viral, la cual

aparentemente corresponde a la proteína Vp1 del core. Considerando que el análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína Vp1, indica que ésta tiene similitudes con otras polimerasas virales, además de compartir otras características similares con éstas tales como: su tamaño molecular y su bajo número de copias por virión (Cohen y col. 1989). 2) La otra posibilidad más factible era que Vp6 interactuara con Vp2, puesto que mediante experimentos de iodinación, catalizada por la lactoperoxidasa, sugieren que Vp2 es la proteína que se encontraría más expuesta en el core, incluso por microscopía electrónica se ha observado que la proteína Vp2 se encontraría parcialmente expuesta en el virus de simple cubierta (Novo y Esparza 1981, Prasad y col. 1988), lo que implica que debe atravesar la cubierta interna formada por Vp6. Además, la morfogénesis viral al parecer se inicia con la formación de una subpartícula viral denominada "pre core", que contiene las proteínas estructurales Vp1 y Vp3, a la cual más tarde se asociaría Vp2, lo que podría apoyar la idea que la proteína Vp2, se encontraría más afuera en el core. Lo interesante de destacar es que aparentemente Vp2 no tiene actividad enzimática, la única propiedad que se le ha descrito hasta el momento a esta proteína es la capacidad de unirse a RNA de doble hebra (Boyle y Holmes 1985). En cambio, a Vp3 se la han asignado dos actividades enzimáticas asociadas a la transcripción, que son guanililtransferasa y ATPasa, que podrían explicar el mecanismo por el cual se activa la transcripción cuando la proteína Vp6 interactúa con Vp3 en el core (Spencer y col. 1990, Pizarro y col. 1990).

Se ha demostrado que la proteína Vp3 tiene actividad de guanililtransferasa debido a que es capaz de unir específica y covalentemente GTP, esta enzima es requerida para la formación de la estructura cap del RNA mensajero viral durante la transcripción (Spencer y col. 1990). Sin embargo, la formación de la estructura cap durante la transcripción de rotavirus no determina la síntesis de mRNA, sino que estimula transcripción alrededor de 5 veces, por lo tanto no bastaría para explicar la activación del aparato transcripcional.

Mediante el uso de análogos de ATP no hidrolizables, se ha observado que durante transcripción de rotavirus se requiere de la hidrólisis continua de ATP, tanto en la iniciación como en la elongación de la cadena de RNA naciente, posiblemente con el propósito de separar las hebras del templado de RNA de doble hebra o para desplazar los de transcritos del RNA de hebra negativa (Pizarro y col. 1990). Esta actividad también ha sido asociada a Vp3 (datos no publicados). La interacción de Vp6 con Vp3, posiblemente esté relacionada con la activación de la ATPasa, con lo cual se podría iniciar la síntesis de mRNA. Estudios de transcripción "in vitro" y de replicación en células infectadas, han demostrado que la hidrólisis de ATP es un evento que sólo se requiere durante la transcripción y que durante la replicación no se requiere de la hidrólisis ATP ni de la presencia de Vp6, lo que apoyaría la idea que la interacción de Vp6 con Vp3 podría permitir la transcripción a través de la activación de la propiedad de ATPasa que posee Vp3.

Por otro lado, basandose en que a pesar que el core viral

no presenta actividad de polimerasa RNA dependiente, aparentemente contiene todas las enzimas necesarias para realizar la polimerización de nucleótidos. (Sandino 1984, Sandino y col. 1986, Patton y Gallegos 1989), se podría pensar que la función de la proteína Vp6 en la transcripción es mantener unido el complejo multienzimático ubicado en el core, encargado de realizar la síntesis de RNA mensajero, como sucede en otros sistemas virales.

En consecuencia, la posible función de Vp6 en la transcripción podría deberse al hecho que esta interactuando con Vp3, que tiene actividades enzimáticas directamente relacionadas con la transcripción viral o a que esta interactuando con la polimerasa viral en forma indirecta a través de otra proteína del core que sería la proteína Vp3.

La utilización de anticuerpos monoclonales con el fin de determinar la región de la proteína Vp6 involucrada en la transcripción, muestran que los epítopes que definen los subgrupos antigénicos de rotavirus, no están involucrados en la función asociada a la transcripción de Vp6 (Tabla III). Esto es un resultado esperado por dos motivos, primero porque previamente se habían realizado experimentos de recuperación de la actividad transcripcional utilizando cores y proteína Vp6 purificados de aislados virales que pertenecían a subgrupos distintos y al incubar estos cores con Vp6 heterólogos se obtenía recuperación de la transcripción (Sandino 1984, Sandino y col. 1986). Lo que sugiere que el epítope que define los subgrupos no es el de unión de la proteína Vp6 al core y que probablemente éste último corresponde a un sitio relativamente conservado. Segundo, los

epítopes que definen los subgrupos antigénicos deben estar ubicados en la superficie del virus de cubierta simple, en cambio, se espera que el sitio de unión de Vp6 al core esté hacia el interior de esta partícula, pero accesible para interaccionar con Vp6 soluble. Los resultados de la Tabla III indican que la región amino terminal de esta proteína está involucrada en el proceso de transcripción, ya que el anticuerpo monoclonal 50, dirigido hacia la región amino terminal de Vp6, fue el único capaz de unirse a la proteína e inhibir con esto la transcripción.

Experimentos realizados con mutantes termosensibles en la proteína Vp6 tanto "in vivo" como "in vitro" nos podrían dar un indicio del mecanismo por el cual, el anticuerpo monoclonal 50 inhibiría la transcripción. Se ha observado que la infección de células en cultivo de la línea MA-104, con la mutante termosensible en la proteína Vp6, denominada TsG, a la temperatura restrictiva 39 °C, da como resultado una progenie viral formada por core virales y proteína Vp6 diseminada en el citoplasma celular, la cual no es capaz de unirse al core viral para formar virus de cubierta simple. Sin embargo, la progenie obtenida luego de infectar células con este mutante a la temperatura permisiva 31 °C, consiste en partículas virales de cubierta simple y virus completos (comunicación personal Dr. John Patton). Tanto los virus completos activados como los virus de cubierta simple, obtenidos a la temperatura permisiva son capaces de transcribir "in vitro" igual que la cepa silvestre. Es más, se obtiene reconstitución "in vitro" de estas partículas

virales de cubierta simple, luego de incubar el core y la proteína Vp6 mutada, a cualquier temperatura (datos no mostrados).

La secuenciación del gen 6 que codifica para la proteína Vp6 mutada mostró que la mutación radica en el sector amino terminal de esta proteína (comunicación personal del Dr. John Patton). Aparentemente lo que ocurre con esta mutación es que a la temperatura restrictiva se impide la trimerización de la proteína Vp6 y por lo tanto no se puede unir al core viral, encontrándose diseminada en el citoplasma celular. Sin embargo, a la temperatura permisiva ocurriría la trimerización de Vp6 y con esto la proteína es capaz de unirse al core para formar virus de cubierta simple. Una vez ocurrida la trimerización de la proteína Vp6, aparentemente cambia el fenotipo y la mutante TsG se comporta como normal "in vitro".

Estos resultados nos permiten sugerir que el anticuerpo monoclonal 50, el cual está dirigido hacia la región amino terminal de la proteína Vp6, al parecer impide la trimerización de la proteína y como consecuencia de esto podría impedir la unión de Vp6 al core viral, inhibiendo de este modo la transcripción.

La importancia de la capacidad de trimerización de la proteína Vp6, está relacionada con la capacidad de esta proteína de formar la cápside interna. La Vp6 purificada no sólo tiene la propiedad de formar oligómeros sino que también es capaz de ensamblarse espontáneamente en túbulos semejantes a los observados en la cápside interna (Ready y Sabara 1987, Sabara y col. 1987, Estes y col. 1987). Estudios realizados mediante

crio-microscopía electrónica muestran que la proteína Vp6 forma canales que van desde el core a la cubierta externa del virus (Prasad y col. 1988), estos probablemente se requieran para la salida del mRNA del core. En otros sistemas virales se ha observado que la extrusión del mRNA es un proceso activo que requiere de la hidrólisis de ATP (Bartlett y col. 1974), lo que podría relacionarse de algún modo con la interacción de la proteína Vp6 con la proteína Vp3 que posee actividad de ATPasa. Esto también estaría de acuerdo con que durante la replicación no se requiera la presencia de Vp6, puesto que el RNA de hebra negativa sintetizado permanece asociado a su hebra positiva complementaria y no es liberado de la subpartícula viral que realiza la replicación (Stacy-Phipps y Patton 1987, Patton y Gallegos 1988).

En resumen, los resultados de esta tesis indican que la proteína Vp6 interactúa con la proteína Vp3 del core viral y que la trimerización de Vp6 es crítica para que ocurra la transcripción. Sin embargo, no se puede determinar exactamente cuál es el mecanismo mediante el cual ocurre la activación del aparato transcripcional, aparentemente se requiere tanto de la estructura que forma Vp6 para la extrusión del mRNA como de la actividad de ATPasa que posee la proteína Vp3.

Finalmente tomando en cuenta algunos resultados obtenidos en esta tesis y evidencias que se disponen actualmente, se puede sugerir que la morfogenesis de la partícula viral de cubierta simple ocurre de la siguiente manera. En primer lugar ocurriría la unión de las proteínas Vp1, Vp3 y los once mRNA que servirán

como templado del genomio viral, en presencia de las proteínas no estructurales NS34, NS35 y NS53. Probablemente las proteínas no estructurales sean las encargadas de elegir los once mRNA que van a corresponder a cada uno de los segmentos de RNA de doble hebra, ya que se le ha asignado la propiedad de unir RNA de simple hebra a alguna de estas proteínas. Además, de tener posiblemente una participación activa en la síntesis de RNA de hebra negativa. Aparentemente, la partícula viral formada por las proteínas estructurales Vp1 y Vp3, las proteínas no estructurales NS34, NS35 y NS54, junto con los once segmentos de mRNA, denominada "pre core", es la que iniciaría la replicación viral. Luego se uniría al "pre core", la proteína Vp2, con lo cual se produciría el término de la replicación viral. En esta etapa, aparentemente ocurriría una reestructuración de la partícula viral en formación. Este cambio puede ser detectado porque la partícula viral se hace insensible a nucleasas y se observa un cambio en el coeficiente de sedimentación de ella. Probablemente este cambio estructural esté provocado por la pérdida de las proteínas no estructurales y podría corresponder al momento en que se obtiene el core viral "in vivo". A continuación se uniría al core viral la proteína Vp6, la cual se encontraría en forma de trímeros en los viroplasma, obteniéndose así la partícula viral de cubierta simple. Esto estaría de acuerdo con lo que se ha observado "in vitro", respecto a que la proteína Vp6 es capaz de reconstituir la partícula viral de cubierta simple uniéndose al core viral, por la simple incubación de ambas fracciones virales, en ausencia de las proteínas no estructurales. Contrariamente a lo que se proponía anteriormente, el hecho tan particular de este

virus, de obtener reconstitución "in vitro" de la partícula viral de cubierta simple, sugiere que la proteína Vp6 no requiere de las proteínas no estructurales como andamiaje para unirse al core, durante la formación de la partícula de cubierta simple "in vivo".

Aparentemente tanto el proceso de replicación como el de transcripción en rotavirus están gobernados por cambios conformacionales o en la estructura de las partículas encargadas de realizar estos procesos. Durante la replicación por ejemplo, a medida que va ocurriendo la síntesis de RNA de doble hebra se va detectando una reestructuración de los intermediarios de replicación, hasta llegar al momento en que concluye la replicación viral, donde se forma una partícula viral más compacta denominada core. Este core viral pierde la capacidad de replicar y tampoco tiene actividad transcripcional, aunque aparentemente contiene todas las enzimas necesarias para realizar estas funciones. Sin embargo, la posterior formación de la cápside interna por la adición de la proteína Vp6 al core, produciría un cambio estructural en la partícula que permitiría la activación de la transcripción, ya que el virus de cubierta simple formado es el único que tiene capacidad de transcribir. Probablemente debido a la formación de canales de Vp6, que permiten la salida del mRNA del core. La partícula viral de cubierta simple también sufre un cambio en su estructura con la formación de la cubierta externa, el cual se detecta por la inhibición de la transcripción, ya que la partícula viral de cubierta doble no tiene capacidad de transcribir, aparentemente

debido a que la cubierta externa impide el paso de los reactivos necesarios para que ocurra la síntesis de mRNA. Esto explica porqué el virión debe ser activado "in vitro", ya sea mediante un shock de calor o por remoción de la cubierta externa, para obtener una activa síntesis de RNA. Lo mismo que ocurriría durante la infección celular cuando entra el virus a la célula.

CONCLUSIONES

- Existe una relación óptima entre el core y la proteína Vp6 para recuperar la actividad transcripcional, que coincide con la relación molar en que se encuentran ambas fracciones virales en el virus de cubierta simple.
- Los productos sintetizados por la partícula viral obtenida luego de incubar el core con la proteína Vp6 en las condiciones de recuperación de la actividad transcripcional, son idénticos a los obtenidos con el virus de cubierta simple.
- La utilización de anticuerpos monoclonales contra distintos epítopes de la proteína Vp6 para interferir la reacción de recuperación de la actividad transcripcional, muestra que los epítopes que definen los subgrupos antigénicos no están involucrados en la transcripción, en cambio la región amino terminal de esta proteína aparentemente esta involucrada en la unión de Vp6 al core viral.
- No se encontró una interacción estable entre la proteína Vp6 y el RNA viral mediante experimentos de filtración del complejo proteína-RNA en filtros de nitrocelulosa, unión del RNA genómico marcado a las proteínas virales transferidas a papel de nitrocelulosa, retardo en la movilidad electroforética de un segmento de RNA genómico viral e inmunoprecipitación del complejo proteína-RNA.
- Se determinó mediante el uso de reactivos de entrecruzamiento que la proteína Vp6 interacciona con el polipéptido Vp3 del core.
- La activación del aparato transcripcional podría ocurrir por la interacción de la proteína Vp6 con Vp3 y por la estructura que forma Vp6 cuando se une al core viral.

BIBLIOGRAFIA

- Almeida J.D., Bradburne A.F., Wreghitt T.G. (1979) Effect of sodium thiocyanate on virus structure. *J. Med. Virol.* 4:29-277.
- Arias C., Lopez S., Espejo R. (1982) Gene protein products of SA-11 simian rotavirus genome. *J. Virol.* 41: 42-49.
- Bartlett N.M., Gillies S.C., Ballivant S., Bellamy A.R. (1974) Electron microscopy study of reovirus reaction cones. *J. Virol.* 14:315-326.
- Bican P., Cohen J., Charpilienne A., Scherrer R. (1982) Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J. Virol.* 43:1113-1117.
- Boyle J.F., Holmes K.V. (1985) RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J. Virol.* 58:51-58
- Brenner M.B., Trowbridge I.S., Strominger J.L. (1985) Cross-linking of human T cell receptor proteins: association between the T cell idiotype β subunit and the T₃ glycoprotein heavy subunit. *Cell* 40:183-190.
- Bruce A.G., Uhlemberg O.C. (1978) Reactions at the termini of tRNA with T₄ RNA ligase. *Nucl. Ac. Res.* 5:3665-3677.
- Chan W-K, Au K-S, Estes MK (1988) Topography of the simian rotavirus nonstructural glycoprotein (NS28) in the endoplasmic reticulum membrane. *Virology* 164:435-4422
- Chasey D. (1977) Different particle types in tissue and intestinal epithelium infected with rotavirus. *J. Gen. Virol.* 37: 443-451.
- Clark S.M., Spendlove R.S., Barnett B.B. (1980) Role of two particle types in bovine rotavirus morphogenesis. *J. Virol.* 34:272-276.
- Cohen J., Laporte J., Charpilienne A., Scherrer R. (1979) Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60:177-186.
- Cohen J., Charpilienne A., Chilmonczyk S., Estes M.K. (1989) Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene in baculovirus. *Virology* 171:131.
- Cortés P., Buckbinder L., Leza M.A., Rak N., Hearing P., Merino A., Reinberg D. (1988) *Genes Dev.* 2:975-990.

- Cukor, G., and N.R. Blacklow. (1984) Human viral gastroenteritis. *Microbiol. Rev.* 48:157-179.
- De Ioannes A. Manual de trabajos prácticos del curso internacional "Hibridomas en Biología Celular y Biotecnología"(anticuerpos monoclonales) 1985. U. Católica de Chile.
- Espejo R.T., López S., Arias, C. (1981) Structural polypeptides of simian rotavirus and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37: 156-160.
- Estes M.K., Palmer E.L., Obijeski J.F. (1983) Rotaviruses: a review. *Curr Topics Microbiol Immunol* 105:123-184.
- Estes, M.K.,S.E. Craowford, M.F., Penaranda, B.L. Petrie, J.W. Burns, W.K. Chan, B. Ericson, G.E., Smith, and M.D. Summers. (1987) Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J. Virol.* 61:1488-1494.
- Estes M.K.,Cohen J. (1989) Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53:410-449.
- Flewett. T.H., A.S. Bryden, H. Davies, G.N. Woode, J.C. Bridger, and J.M. Derrick. (1974) Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* ii: 61-63.
- Fukuhara N., Yoshie O., Kitaoka S.,Konno T. (1988) Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J. Virol.* 62:2209-2218.
- Gallegos CO, Patton J.T. (1989) Characterization of rotavirus replication intermediates: A model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* 172:616-627.
- Gershoni J.,Palade G. (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochemistry* 131:1-15.
- Gorziglia M., Larrea C., Liprandi F., Esparza J. (1985) Biochemical evidence for the oligomeric (possibly trimeric) structure of the major inner capsid polypeptide (45K) of rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 66:1889-1900
- Greenberg H.,Anliffe V.,Valdesuso J.,Wyatt R.,Flores J.,Kalika A.,Hoshino Y.,Singh N. (1983a) Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 39:91-99.
- Greenberg, H.B., J. Flores, A.R. Kalica, R.G. Wyatt, and R. Jones. (1983b) Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the W and DS-1 strains of human rotavirus. *J. Gen Virol.* 64: 313-30.

- Hantula J., Bamford D. (1988) Chemical Crosslinking of bacteriophage 06 nucleocapsid proteins. *Virology* 165:482-488.
- Helmberger-Jones M., Patton J. (1986) Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA-11. *Virology* 155:655-665.
- Herring A.J., Inglis N.F., Ojeh C.K., Snodgrass D.R., Menzies J.D. (1982) Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 16:473-477.
- Holmes I.H. (1983) Rotaviruses. In: Joklik W.K. (ed) *The Reoviridae*. Plenum Press, New York, pp 359-423.
- Hoshino V., Sereno M., Midthun K., Flores J., Kapikian A., Chanock M. (1985) Independent segregation of two antigenic specificities (Vp3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:8701-8704.
- Imai M., Akatani K., Ikegami N., Furuichi Y. (1983) Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J. Virol.* 47: 125-136.
- Johnson A., Meyer E., Patashne M. (1979) Interactions between DNA-bound repressor govern regulation by the lambda repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:5061-5065.
- Johnson M.A., McCrac, M.A. (1989) Molecular Biology of Rotaviruses. VIII. Quantitative analysis of regulation of gene expression during virus replication. *J. Virol.* 63:2048-2055.
- Kabcenell, A.K., Poruchynsky M.S., Bellamy R., Greenberg H.B., Atkinson P.H. (1988) Two forms of VP7 are involved in assembly of SA11 rotavirus in endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 62:2929-2941.
- Kaljot K., Shaw R., Rubin D., Greenberg H. (1988) Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* 62:1136-1144.
- Kalica A., Greenberg H., Wyatt R., Flores J., Sereno M., Kapikian A., Chanock R. (1981) Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology* 112:385-390.
- Kapikian A.Z., Chanock R.M. (1985) Rotaviruses. In: Fields B.N. (ed) *Virology*. Raven Press, New York, pp 863-906
- Kapikian, A.Z., W.I., Cline, H.B. Greenberg, R.G. Wyatt, A.R. Kalica, C.E., Banks, H.D. James, J. Flores, and R.M. Chanock. (1981) Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay (IAHA):evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infect. Immun.* 33: 415-425.

- Liu M., Offit P.A., Estes M.K. (1988) Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* 163:2-32.
- Mackow E.R., Shaw R.D., Matsui S.M., Vo P.T., Dang M.N., Greenberg, H.B. (1988) The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: Location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 645-649.
- Mason B.B., Graham D.Y., Estes M.K. (1983) In vitro transcription and translation of simian rotavirus SA11 gene products. *J. Virol.* 33:1111-1121.
- Mc Crae M.A., Faulkner-Valle G.P. (1981) Molecular biology of rotaviruses: I. Characterization of basic growth parameters and pattern of macromolecular synthesis. *J. Virol.* 39: 490-496.
- Mc Crae M.A., McCorquodale J.G (1983) Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology* 126:204-212.
- Mc Crae M., Mc Corquodale J. (1982) Molecular Biology of Rotaviruses. *Virology* 117:435-441.
- Meyer J.C., Bergmann C.C., Bellamy A.R. (1989) Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. *Virology* 170:98-107.
- Novo E., Esparza J. (1981) Composition and topography of structural polypeptides of bovine rotavirus. *J. Gen. Virol.* 56:325-335.
- Offit, P.A., and G. Blavat. (1986) Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. *J. Virol.* 57: 376-378.
- Patton J. (1986) Synthesis of simian rotavirus SA-11 double stranded RNA in a cell free system. *Virus Res.* 6:217-233.
- Patton J., Gallegos C. (1988) Structure and protein composition of the rotavirus replicase particle. *Virology* 166:358-365.
- Petrie B.L. Graham D.Y., Estes M.K. (1981) Identification of rotavirus particle types. *Intervirology* 16: 220-228.
- Petrie B.L., Graham D.Y., Hanssen H., Estes M.K. (1982) Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. *J. Gen. Virol.* 63:457-47
- Petrie B.L., Greenberg H.G., Graham D.Y., Estes M.K. (1984) Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Res* 1:133-152.

- Pizarro J.M., Sandino A.M., Pizarro J.L., Fernández J., Spencer E. (1990) Effect of nucleotide analogs on transcription and replication of rotavirus. *J. Gen. Virol.* en prensa.
- Prasad, B.V.V., G.J. Wang, J.P.M. Clerx, and W. Chiu. (1988) Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199: 269-275.
- Ready, K.F. M., and M. Sabara. (1987) In vitro assembly of bovine rotavirus nucleocapsid protein. *Virology* 157: 189-198.
- Riggs A., Suzuki H., Bourgeois S. (1970) Lac repressor-operator interaction. *J. Mol. Biol.* 48:67-83.
- Rodríguez W.J., Kim H.W., Arrobio J.O., Brandt C.D., Chanock R.M., Kapikian A.Z., Wyatt R.G., Parrott R.H. (1977) Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agents in infants and young children. *J. Pediatr.* 91:188-193.
- Sabara M., Ready K.F.M., Frenchick P.J., Babiuk L.A. (1987) Biochemical evidence for the oligomeric arrangement of bovine rotaviruses nucleocapsid protein and its possible significance in the immunogenicity of this protein. *J. Gen. Virol.* 8:123-133
- Sandino A.M. Tesis para optar al título de Bioquímico (1984) Rol de la proteína Vp6 en la transcripción "in vitro" catalizada por la RNA polimerasa de rotavirus humano.
- Sandino A.M., Jashés M., Faúndez G., Spencer E. (1986) Role of the inner protein capsid on "in vitro" human Rotavirus transcription. *J. Virology* 60:797-802.
- Sandino A.M., Pizarro J., Fernández J., Fellay M.C., Spencer E. (1988) Involment of structural and nonstructural polypeptides on rotavirus RNA synthesis. *Arch. Biol. Med. Exp.* 21:381-392.
- Shuman S., Spencer E., Furneaux H., Hurwitz J. (1980) The role of ATP in in vitro vaccinia virus RNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 255:5396.
- Silva C., Tully D., Petch L., Jewell C., Cidlowski J. (1987) Application of a protein blotting procedure to the study of human glucocorticoid receptor interactions with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1744-1748.
- Smith M., Lazdins I., Holmes I. (1980) Coding assignments of double stranded RNA segments of SA-11 rotavirus established by in vitro translation *J. Virol.* 33:976-981.
- Smolarsky M., Tal M. Novel method for measuring polyuridylic acid binding to ribosomes. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 199:447-452.
- Spencer E., Arias M.L. (1981) In vitro transcription catalyzed by heat-treated human rotavirus. *J. Virol.* 40:1-10.

-Spencer E., Avendaño L.F. and Araya M. (1983) Characteristic and analysis of Electropherotypes of human rotavirus isolated in Chile. *J. Inf. Dis.* 148:41-50.

-Spencer E.,García B. (1984) Effect of S-adenosylmethionine on human rotavirus RNA synthesis. *J. Virol.* 52:188-197.

-Spencer E.,Pizarro J.L.,Pizarro J.M.,Fernández J.,Sandino A.M. (1990) Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated to Vp3. *J. Gen. Virol.* en prensa.

-Stacy-Phipps S., Patton J.T. (1987) Synthesis of plus- and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells. *J Virol* 61:3479-3484

-Suzuki H., Kitaoka S., Konno T. Sato T., Ishida N. (1985) Two modes of human rotavirus entry into MA104 cells. *Arch Virol* 85:225-34

-Suzuki H., Kitaoka S., Sato T., Konno T., Iwasaki Y., Numazaki Y., Ishida N. (1986) Further investigation on the mode of entry of human rotavirus into cells. *Arch. Virol.* 91: 135-144

-Towbin H.,Staehelin T.,Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocelulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.