

R101

o.a

**ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN Y REPLICACIÓN DEL  
GENOMA 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

Maritza Gladys Ríos Villablanca

Noviembre, 1995.

Director de Tesis: Dr. Eugenio Spencer Ossa.



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

MARITZA GLADYS RIOS VILLABLANCA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el Día 25 de Julio de 1995.

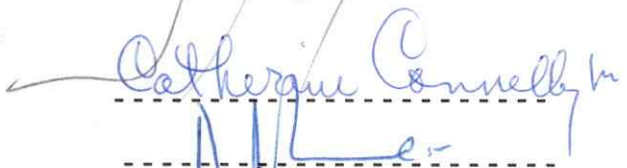
Director de Tesis:

Dr. Eugenio Spencer O.

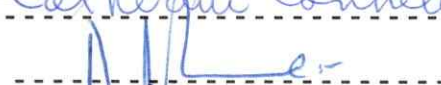


Comisión de Evaluación de la Tesis

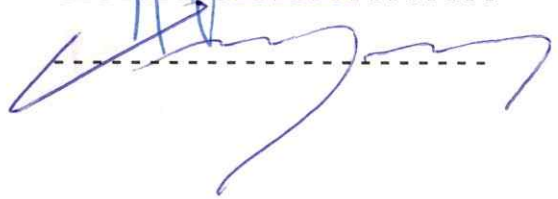
Dra. Catherine Connelly



Dr. Romilio Espejo



Dr. Juan Kuznar



**... A EUGENIO**

**... A TIARE Y PAULA**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer la ayuda brindada por la abuelita Mora, quien con su apoyo incondicional en todo momento hizo posible la realización de esta tesis y de las distintas actividades curriculares durante mi permanencia en este Programa. A mis padres y hermanos por estar junto a mí siempre. A Eugenio y nuestras hijas, por el amor, alegría y comprensión que permitieron superar los momentos difíciles y estimular la continuación de este trabajo.

Deseo agradecer al Dr. Eugenio Spencer por dirigir y estimular el trabajo realizado en esta tesis y a todos quienes se interesaron y aportaron con su crítica, su experiencia y/o ideas al desarrollo de este trabajo, en forma especial a Eugenio, Ana María, Jorge y Marianne.

A María Angélica, Marcela, Sofía, Jorge, Ximena, Marcelo, Macu, Claudio, María Teresa, Marisol, Marianne, Maritza G., Javier y Rodrigo por los gratos momentos de amistad, compañerismo y calidez que disfruté durante mi estadía en el Laboratorio de Virología, INTA. A Javier por su inapreciable ayuda en el uso de P.C. A Marianne, Maritza G. y Jorge por la amistad que perdura.

A Don Oscar, Patricio y María Teresa quienes con su quehacer y colaboración facilitaron este trabajo, en especial a Don Oscar por su gran voluntad. A Ricardo Guerra y Leopoldo Salgado por confeccionar el material fotográfico utilizado durante toda esta investigación.

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 7.6.-   | Efecto de análogos de nucleótidos sobre la actividad transcripcional de SA11 y de mutantes termosensibles. | 73 |
| 7.6.1.- | Efecto de 3'-AdTTP sobre la transcripción <i>in vitro</i> de SA11.   | 73 |
| 7.6.2.- | Estudio del efecto de foscarnet en la morfogénesis de rotavirus.   | 73 |
| 8.-     | <b>DISCUSION</b>   | 78 |
| 9.-     | <b>CONCLUSIONES</b>  | 95 |
| 10.-    | <b>REFERENCIAS</b>   | 97 |

## INDICE DE MATERIAS

|   | Página |
|---|--------|
| 1.- <b>ABREVIATURAS</b>   | xi     |
| 2.- <b>RESUMEN</b>  | 1      |
| 3.- <b>SUMMARY</b>  | 3      |
| 4.- <b>INTRODUCCION</b>   | 5      |
| 5.- <b>MATERIALES</b>   | 18     |
| 6.- <b>METODOS</b>  | 19     |
| 6.1.- Cultivo celular e infección viral.  | 19     |
| 6.2.- Estudio del efecto de antivirales <i>in vivo</i> .  | 20     |
| 6.2.1.- Ensayos de citotoxicidad.   | 20     |
| 6.2.2.- Efecto de interferón sobre la síntesis de RNA y subpartículas virales en células MA104 infectadas con rotavirus SA11.                 | 20     |
| 6.2.3.- Efecto de foscarnet sobre la síntesis de RNA y subpartículas virales en células MA104 infectadas con rotavirus SA11.                  | 21     |
| 6.2.4.- Efecto de análogos de nucleósidos derivados de 3'-AdT sobre la síntesis de RNA viaral en células MA104 infectadas con rotavirus SA11. | 22     |
| 6.3.- Purificación de rotavirus.  | 23     |
| 6.3.1.- Obtención de partículas virales para ensayos de actividad RNA polimerasa: transcripción de la hebra positiva del RNA de rotavirus.    | 23     |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 6.3.2.-   | Obtención de partículas virales para ensayos de actividad RNA polimerasa: síntesis de la hebra negativa del RNA de rotavirus.                           | 24 |
| 6.4.-     | Ensayo de actividad RNA polimerasa de rotavirus <i>in vitro</i> .   | 24 |
| 6.4.1.-   | Ensayo de síntesis de RNA(+)-   | 24 |
| 6.4.2.-   | Ensayo de síntesis de RNA(-).   | 25 |
| 6.4.2.1.- | Ensayo de síntesis de RNA(-) utilizando como RNA molde mRNA viral exógeno.  | 26 |
| 6.4.2.2.- | Análisis de subpartículas asociadas a productos de la reacción de síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> mediante gradientes continuos de sacarosa 20%-45%. | 28 |
| 7.-       | <b>RESULTADOS</b>   |    |
| 7.1.-     | Desarrollo del ensayo <i>in vitro</i> de la síntesis del RNA(-).  | 29 |
| 7.1.1.-   | Estudio de las condiciones de la reacción.  | 29 |
| 7.1.1.1.- | Cinética de síntesis de RNA genómico por células MA104 infectadas con rotavirus SA11.   | 30 |
| 7.1.1.2.- | Efecto de la concentración de subpartículas.  | 30 |
| 7.1.1.3.- | Efecto del tiempo de obtención de las subpartículas.  | 31 |
| 7.1.1.4.- | Efecto de pH, temperatura de incubación y concentración de sales.   | 31 |
| 7.1.1.5.- | Efecto de la concentración de nucleótidos y magnesio.   | 34 |
| 7.1.1.6.- | Efecto del tiempo de incubación de la reacción.   | 37 |
| 7.1.1.7.- | Efecto de Rnasa A.  | 37 |
| 7.1.2.-   | Estudio de la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> utilizando como RNA molde mRNA viral exógeno.  | 38 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 7.1.3.- | Estudio de la asociación de los productos de síntesis de RNA(-) a subpartículas virales.                                      | 44 |
| 7.2.-   | Estudio del efecto de análogos de nucleótidos sobre la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> .                                   | 46 |
| 7.2.1.- | Efecto de Ara-ATP en la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> .  | 46 |
| 7.2.2.- | Efecto de Ara-CTP en la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> .  | 46 |
| 7.2.3.- | Efecto de Cord-TP en la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> .  | 47 |
| 7.2.4.- | Efecto de ATP-IO <sub>4</sub> en la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> .  | 50 |
| 7.3.-   | Estudio del efecto de interferón en la morfogénesis de rotavirus.   | 53 |
| 7.3.1.- | Efecto de interferón sobre la síntesis de RNA y subpartículas virales en células MA104 infectadas con rotavirus SA11.         | 53 |
| 7.3.2.- | Efecto de 2',5'-oligoadenilatos y 3',5'-oligoadenilatos sobre la síntesis de mRNA viral <i>in vitro</i> .                     | 55 |
| 7.3.3.- | Efecto de 2',5'-oligoadenilatos sobre la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> .   | 57 |
| 7.4.-   | Estudio del efecto de foscarnet en la morfogénesis de rotavirus.  | 63 |
| 7.4.1.- | Efecto de foscarnet sobre la síntesis de subpartículas virales de rotavirus SA11 en células MA104.                            | 63 |
| 7.4.2.- | Efecto de foscarnet sobre la síntesis de mRNA <i>in vitro</i> .   | 66 |
| 7.4.3.- | Efecto de foscarnet sobre la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> .   | 69 |
| 7.4.4.- | Efecto de foscarnet sobre la actividad transcripcional de rotavirus SA11 y de la mutante termosensible de rotavirus SA11,tsC. | 69 |
| 7.5.-   | Efecto de análogos de nucleótidos derivados de 3'-AdT sobre la replicación de rotavirus SA11 en células MA104.                | 71 |



## LISTA DE FIGURAS

|                  |   | Página |
|------------------|---|--------|
| <b>FIGURA 1</b>  | Cinética de síntesis de RNA de doble hebra viral en células MA104 infectadas con rotavirus SA11.                                | 32     |
| <b>FIGURA 2</b>  | Efecto de la concentración y tiempo de obtención de subpartículas de rotavirus SA11 sobre la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> | 33     |
| <b>FIGURA 3</b>  | Efecto de la temperatura, pH y concentración de sales sobre la síntesis de RNA(-) de rotavirus SA11.                            | 35     |
| <b>FIGURA 4</b>  | Efecto de las concentraciones de nucleótidos y magnesio sobre la síntesis de RNA(-) de rotavirus <i>in vitro</i> .              | 36     |
| <b>FIGURA 5</b>  | Efecto de RNasa A sobre los productos de la síntesis de RNA(-) de rotavirus <i>in vitro</i> .                                   | 39     |
| <b>FIGURA 6</b>  | Síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> utilizando como RNA molde mRNA viral homólogo exógeno.                                       | 41     |
| <b>FIGURA 7</b>  | Síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> utilizando como RNA molde mRNA viral heterólogo exógeno.                                     | 42     |
| <b>FIGURA 8</b>  | Análisis de subpartículas asociadas a productos de síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> .   | 45     |
| <b>FIGURA 9</b>  | Efecto de AraATP sobre la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> catalizada por subpartículas de rotavirus SA11.                    | 48     |
| <b>FIGURA 10</b> | Efecto de AraCTP sobre la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> catalizada por subpartículas de rotavirus SA11.                    | 49     |
| <b>FIGURA 11</b> | Efecto de CordTP sobre la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> catalizada por subpartículas de rotavirus SA11.                    | 51     |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>FIGURA 12</b> | Efecto de ATP-dialdehído sobre la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> catalizada por subpartículas de rotavirus SA11.                                | 52 |
| <b>FIGURA 13</b> | Efecto de interferón sobre la síntesis de RNA y subpartículas virales en células MA104 infectadas con rotavirus SA11.                               | 54 |
| <b>FIGURA 14</b> | Efecto de 2',5'-oligoadenilatos sobre la transcripción de rotavirus SA11 <i>in vitro</i> .  | 58 |
| <b>FIGURA 15</b> | Efecto de 3',5'-oligoadenilatos sobre la transcripción de rotavirus SA11 <i>in vitro</i> .  | 59 |
| <b>FIGURA 16</b> | Cinética de inhibición de la transcripción de rotavirus <i>in vitro</i> por 5'-monofosfato 2',5'-tetraadenilato.                                    | 60 |
| <b>FIGURA 17</b> | Efecto de 2',5'-oligoadenilatos y 3',5'-oligoadenilatos sobre la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> catalizada por subpartículas de rotavirus SA11. | 62 |
| <b>FIGURA 18</b> | Efecto de foscarnet sobre la replicación de rotavirus SA11 en células MA104 infectadas.   | 65 |
| <b>FIGURA 19</b> | Efecto de foscarnet sobre la transcripción de rotavirus SA11 <i>in vitro</i> .  | 67 |
| <b>FIGURA 20</b> | Efecto de foscarnet sobre la síntesis de RNA(-) <i>in vitro</i> catalizada por subpartículas de SA11.   | 70 |
| <b>FIGURA 21</b> | Efecto de foscarnet sobre la transcripción <i>in vitro</i> catalizada por partículas virales de rotavirus SA11 y de la mutante termosensible, tsC.  | 72 |
| <b>FIGURA 22</b> | Efecto de análogos de nucleótidos sobre la transcripción <i>in vitro</i> de rotavirus SA11.   | 75 |
| <b>FIGURA 23</b> | Efecto de AraATP y CordTP sobre la transcripción <i>in vitro</i> catalizada por las mutantes termosensibles tsC y tsB.                              | 76 |

## LISTA DE CUADROS

|                 |  | Página |
|-----------------|--|--------|
| <b>CUADRO 1</b> | Características de los polipéptidos codificados por los segmentos genómicos de rotavirus SA11. | 8      |

## ABREVIATURAS

|                     |   |  |
|---------------------|---|--|
| Ara-ATP             | : | Adenosina-9--D-arabinofuranosido-5'-trifosfato.              |
| Ara-CTP             | : | Citosina-9--D-arabinofuranosido-5'-trifosfato.               |
| AraC                | : | Citosina-9--D-arabinofuranosido.                             |
| ATP-IO <sub>4</sub> | : | Adenosina-2'-3'-dialdehído-5'-trifosfato.                    |
| Cord-TP             | : | Cordicepina-5'-trifosfato (3'-deoxiadenosina-5'-trifosfato). |
| 2',5'-A             | : | 2',5'-oligoadenilatos.                                       |
| 3'-AdT              | : | 3'-amino-3'-deoxitimidina.                                   |
| 3'-MMAdT            | : | 3'-N-metil-amino-3'-deoxitimidina.                           |
| 3'-DMAdT            | : | 3'-N-dimetil-amino-3'-deoxitimidina.                         |
| 3'-MEAdT            | : | 3'-N-etil-amino-3'-deoxitimidina.                            |
| 3'-DEAdT            | : | 3'-N-dietil-amino-3'-deoxitimidina.                          |
| 3'-MPrAdT           | : | 3'-N-propil-amino-3'-deoxitimidina.                          |
| 3'-DPrAdT           | : | 3'-N-dipropil-amino-3'-deoxitimidina.                        |
| 3'-AdTTP            | : | 3'-amino-3'-deoxitimidina-5'-trifosfato.                     |
| cpm                 | : | Cuentas por minuto.  |
| DTE                 | : | Ditioeritritol.  |
| EDTA                | : | Acido Etilendiaminotetraacético.                             |
| Hepes               | : | Acido N-2-hidroximetil piperazin-N'-2-etanosulfónico         |
| IFN                 | : | Interferón.  |
| MME                 | : | Medio Mínimo Escencial.                                      |
| m.o.i.              | : | multiplicidad de infección.                                  |
| mRNA                | : | Acido ribonucleico mensajero.                                |

|            |   |  |
|------------|---|--|
| PFA        | : | Foscarnet.                               |
| u.f.p./cél | : | unidades formadoras de placa por célula. |
| RER        | : | Retículo Endoplásmico Rugoso.            |
| rpm        | : | revoluciones por minuto.                 |
| SAM        | : | S-Adenosilmetionina.                     |
| SFB        | : | Suero Fetal de Bovino.                   |
| TCA        | : | Acido tricloroacético.                   |
| TRIS       | : | Tri-(hidroximetil)aminometano.           |
| U.I.       | : | Unidades internacionales.                |
| VSV        | : | Virus de la estomatitis vesicular.       |

## RESUMEN

Rotavirus, miembro de la familia Reoviridae , es el principal agente viral causante de gastroenteritis aguda en niños y pacientes inmunodeprimidos.

El genoma viral, constituido por once segmentos de RNA de doble hebra, se encuentra en el interior del "core" viral, el que está rodeado por una doble cápside proteica, de estructura icosaédrica.

La síntesis de mRNA y del RNA de doble hebra viral son procesos que se diferencian por la naturaleza del RNA utilizado como molde, por el tipo de producto y por el tipo de subpartículas virales que los efectúan. Estas subpartículas, sin embargo, comparten algunos polipéptidos estructurales.

El objetivo de esta tesis fué estudiar los eventos de la morfogénesis de rotavirus que conducen a la síntesis de los diferentes tipos de RNA viral, mediante el uso de diversos compuestos antivirales que afectan la síntesis de ácidos nucleicos.

Se estudió el efecto de análogos de nucleótidos, de análogos de oligonucleótidos y del análogo de pirofosfato, foscarnet, sobre la síntesis de los dos tipos de RNA viral utilizando sistemas libres de células que permiten separar ambas actividades. Además, *in vivo*, se estudió el efecto de interferón, foscarnet y compuestos derivados de deoxitimidina sobre la síntesis de RNA viral y de subpartículas virales en células MA104 infectadas con la cepa de rotavirus de simio SA11.

El ensayo de síntesis del RNA(-) *in vitro* fue desarrollado en esta tesis y utiliza subpartículas virales aisladas a tiempos tempranos post-infección, las que producen los 11 segmentos de RNA de doble hebra virales utilizando como molde los mRNAs derivados

de cepas homólogas o heterólogas. El RNA de doble hebra sintetizado se encontró asociado a una población de estas subpartículas.

Los estudios de la síntesis de mRNA y de la síntesis de RNA(-) realizadas *in vitro* con los antivirales muestran que foscarnet y los análogos de nucleótidos inhiben con similar eficiencia ambos procesos de síntesis de RNA. Estos compuestos aparentemente afectan directamente a la RNA polimerasa (VP1). Los análogos de oligoadenilatos, sin embargo, inhiben la síntesis de mRNA *in vitro*, pero no afectan la síntesis de RNA(-) *in vitro* y podrían interferir por ejemplo con una función topoisomerasa y/o metilasa requerida sólo en la síntesis del mRNA viral. Las etapas de la morfogénesis de rotavirus, síntesis de mRNA, síntesis de RNA genómico y síntesis de subpartículas virales, fueron inhibidas sólo por los antivirales interferón y foscarnet *in vivo*. La caracterización de estos efectos demostró que la acción del interferón se debe, al menos en parte, a la inhibición directa de la síntesis de mRNA por 2',5'-oligoadenilatos, mientras que el efecto de foscarnet se explica por una inhibición directa tanto de la síntesis de mRNA como de la síntesis del RNA genómico viral por este análogo de pirofosfato.

## SUMMARY

Rotavirus, a member of *Reoviridae* family, is the major viral agent that causes acute gastroenteritis in young children and immunocompromised patients.

The viral genome, that consists of eleven double-stranded RNA segments, is found within the viral core surrounded by an icosahedric double-layered protein capsid.

Transcription and replication of viral RNA (mRNA and double-stranded RNA synthesis, respectively) are processes that differ in the nature of RNA template and product. In addition, during viral morphogenesis both processes are carried out by different viral particles that, however, share some structural polypeptides.

The purpose of this thesis was to study the events of rotavirus morphogenesis that lead to viral RNA synthesis using different antiviral compounds that affect nucleic acids synthesis.

The effect of nucleotide and oligonucleotide analogues and the pyrophosphate derivative foscarnet on both RNA synthesis processes was studied using cell-free systems that allow separation of both activities. In addition, the *in vivo* effect of interferón, foscarnet and deoxythymidine derivatives on *de novo* viral RNA synthesis and the assembly of subviral particles was studied using MA104 cells infected with simian rotavirus SA11.

A system that supports *de novo* RNA(-) synthesis was developed during this research. Subviral particles used in the assay catalyze *in vitro* initiation and elongation of negative-strand RNA using both, homologous or heterologous mRNA segments as template. The double-stranded RNA produced was associated to a part of the



subparticles population.

The *in vitro* studies of the mRNA and RNA(-) synthesis carried out with the antivirals showed that foscarnet and the nucleotide analogues evaluated inhibit both RNA synthesis processes with similar efficiency. However, oligoadenylate analogues that inhibited *in vitro* mRNA but not RNA(-) synthesis might affect for example a topoisomerase and/or methylase activity necessary only in viral mRNA synthesis.

In vivo, the viral morphogenesis events of mRNA, genomic RNA and subviral particles synthesis were inhibited by the antivirals interferon and foscarnet but not by deoxythymidine derivatives. Characterization of the effects of interferon suggests that its antirotaviral action is a consequence of direct inhibition of mRNA synthesis by 2',5'-oligoadenylates, whereas the foscarnet effect is a consequence of both mRNA and viral genomic RNA synthesis inhibition by the pyrophosphate.

## INTRODUCCION

Rotavirus, clasificado como un género en la familia Reoviridae, es el principal agente etiológico responsable de la gastroenteritis viral aguda en distintas especies animales, incluyendo al hombre (Cukor y Blacklow 1984, Christensen 1989, Kapikian y Chanock 1990, Blacklow y Greenberg 1991). Las infecciones por rotavirus producen alta mortalidad en la población infantil en los países en desarrollo, mientras que en países desarrollados, aunque la mortalidad es mucho más baja, la morbilidad es alta (Cukor y Blacklow 1984, Ho y col. 1988, Kapikian y Chanock 1990). En niños inmunodeprimidos, rotavirus puede causar gastroenteritis crónica y hepatitis (Saulsburry y col. 1980, Hundley y col. 1987, Gilger y col. 1992).

Este virus ingresa al organismo por vía oral, infecta las células epiteliales maduras de las vellosidades del intestino delgado y provoca su lisis. Las células muertas son reemplazadas por células inmaduras incapaces de realizar las funciones de absorción (Kapikian y Chanock, 1990). Además de la vía de transmisión fecal-oral, es posible que los rotavirus se transmitan por vía respiratoria (Ushijima y col. 1994).

El virión está formado por una doble cubierta proteica, de estructura icosaédrica, que rodea a un core central compuesto por las proteínas VP1, VP2 y VP3 y el genoma viral. La cápside más externa está formada por las proteínas VP4 y VP7 y la cápside interna por la proteína VP6 (Estes y Cohen 1989, Estes 1990).

El genoma de rotavirus está constituido por 11 segmentos de RNA de doble hebra de diferente tamaño, con pesos moleculares de  $2 \times 10^5$  a  $2,2 \times 10^6$  daltons. Los diferentes segmentos genómicos se numeran en relación a la migración electroforética en

geles de poliacrilamida, correspondiendo el segmento 1 al de mayor tamaño (Kapikian y Chanock 1990). El análisis de la secuencia nucleotídica de los genes de rotavirus ha revelado que cada segmento posee al menos un marco de lectura abierto, limitado en sus extremos por secuencias terminales muy conservadas en los 11 segmentos, que comienzan con una guanina en el extremo 5' y finalizan con una citidina en el extremo 3' (Estes y Cohen 1989, Estes 1990). Los segmentos genómicos no tienen secuencias poliadeniladas en el extremo 3' y poseen una estructura  $\text{cap m}^7\text{GpppG}^{(m)}\text{GPy}$  en el extremo 5' de la hebra positiva (Imai y col. 1983, McCrae y McCorquodale 1983). El hecho de que existan secuencias terminales fuertemente conservadas en los segmentos genómicos sugiere que éstos contienen señales importantes para la transcripción, la síntesis del RNA genómico o la encapsidación ordenada de éstos en la partícula viral.

De las once proteínas codificadas por el genoma de rotavirus (Smith y col. 1980, Arias y col. 1982, McCrae y McCorquodale 1982, Estes 1990), se han mencionado las seis que forman parte de la estructura viral (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7); las restantes cinco son no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 y NSP5). Todas estas proteínas son requeridas durante el ciclo replicativo (Estes 1990, Patton 1993). En el Cuadro 1 se relacionan los distintos segmentos genómicos de la cepa de rotavirus de simio SA11 con los polipéptidos codificados y con la función y características principales de ellos.

Los polipéptidos que forman la cápside externa, VP4 y VP7, se han identificado como antígenos de neutralización independientes, que definen los serotipos P y serotipos G respectivamente (Fielding y col. 1994, Isegawa y col. 1994). Se han descrito siete diferentes serogrupos (A - G), de los cuales sólo los grupos A, B y C infectan a humanos (Bridger y col. 1986, Blacklow y Greenberg 1991). VP4 es una proteína que tiene actividad hemoaglutinina en muchas cepas de rotavirus (Kalika y col 1983, Fiore y col.

1991). En el proceso de infección VP4 experimenta un corte proteolítico por una enzima tipo tripsina, lo cual produce un aumento importante en la infectividad (Clark y col. 1981, Espejo y col. 1981). Se ha observado que rotavirus tratado con tripsina entra a la célula directamente a través de la membrana celular y no por endocitosis, proceso este último bastante menos eficiente (Fukuhara y col. 1988, Kaljot y col. 1988). La acción de tripsina sobre VP4 da origen a dos polipéptidos de menor tamaño, VP5\* y VP8\*. Debido a que el fragmento mayor, VP5\*, posee regiones hidrofóbicas semejantes a las de los virus Sindbis y Semliki, se piensa que esta proteína sería responsable de la fusión a la membrana celular, permitiendo la penetración directa al interior de la célula (Mackow y col. 1988). Hay evidencias que apoyan la participación tanto de VP4 como de la glicoproteína VP7 en la unión del virus a la célula infectada, en sitios receptores cuya naturaleza no ha sido definida (Sabara y col. 1985, Fukuhara y col. 1988, Ruggeri y col 1991, Xu y Woode 1994).

La proteína VP6 es la más abundante en el virión y el único componente de la cubierta interna del virus. Esta proteína también tiene características antigénicas, definiendo los subgrupos antigénicos I y II (Greenberg y col. 1983 a y b, Kapikian y Chanock 1990). VP6 participa en la transcripción del RNA viral, proceso que requiere la integridad de la partícula de cubierta simple *in vitro* e *in vivo* (Cohen y col. 1979, Helmberger-Jones y Patton 1986, Sandino y col. 1986). En este proceso, la capacidad de formar trímeros de VP6 se ha relacionado con la formación de estructuras de tipo canales, que permitirían la salida de los mensajeros a medida que se transcriben (Clapp y Patton 1991, Sandino y col. 1994).

**CUADRO 1: CARACTERISTICAS DE LOS POLIPEPTIDOS CODIFICADOS POR LOS SEGMENTOS GENOMICOS DE ROTAVIRUS.**

| <b>SEGMENTO GENOMICO</b> | <b>PRODUCTO POLIPEPTIDICO</b> | <b>PM (KDa)</b> | <b>CARACTERISTICAS</b>   |
|--------------------------|-------------------------------|-----------------|--|
| 1                        | VP1                           | 125             | Ubicado en el "core". RNA polimerasa viral.  |
| 2                        | VP2                           | 94              | Ubicado en el "core". Une RNA de simple y doble hebra.   |
| 3                        | VP3                           | 88              | Ubicado en el "core". Guanililtransferasa. Responsable de formación de estructura cap en el extremo 5' del mRNA. Posible ATPasa.   |
| 4                        | VP4                           | 86,7            | Componente de la cubierta externa del virus. Sufre corte proteolítico con tripsina, relacionado con infectividad. Hemaglutinina viral, antígeno de neutralización, define serotipos. |
| 5                        | NS53                          | 58,6            | Polipéptido no estructural, capaz de unir RNA. Participa en replicación viral.   |

|    |      |      |   |
|----|------|------|---|
| 6  | VP6  | 44,8 | Constituye la cubierta interna del virus. Participa en la transcripción viral y define serogrupos.  |
| 7  | NS34 | 34   | Polipéptido no estructural, capaz de unir RNA. Participa en la replicación viral.   |
| 8  | NS35 | 36,7 | Polipéptido no estructural, capaz de unir RNA. Participa en la replicación viral.   |
| 9  | VP7  | 33,9 | Componente de la cubierta externa del virus. Relacionado con la unión del virus a la célula blanco, es antígeno de neutralización y define serotipos. |
| 10 | NS28 | 20,3 | Polipéptido no estructural. Glicoproteína de transmembrana del RER, participa en el paso del virus a través del RER.                                  |
| 11 | NS26 | 21,7 | Polipéptido no estructural.   |

VP1 y VP3 son componentes menores del core central (Liu y col. 1988, Estes 1990, Patton 1993). Se ha postulado que estas proteínas podrían constituir el complejo RNA polimerasa viral, ya que ambas poseen importante homología con otras RNA polimerasas RNA dependientes (Cohen y col. 1989, Fukuhara y col. 1989, Liu y Estes 1989, Mitchell y Both 1990). Sin embargo, mediante utilización del análogo de nucleótido 8-AzidoATP se identificó a VP1, el polipéptido de más alto peso molecular, como la polimerasa viral (Valenzuela y col. 1991). Por otro lado, evidencias sugieren que VP3 es la guanilil transferasa, responsable de la formación del cap presente en el extremo 5' de los mRNA sintetizados durante la transcripción de rotavirus (Pizarro y col. 1991 a, Pizarro y col. 1991 b, Liu y col. 1992). Además, VP3 también parece tener una actividad de ATPasa que es requerida en la síntesis del mRNA viral (Spencer y Arias 1981, Spencer y García 1984, Pizarro y col. 1991 b).

VP2, la proteína más abundante del core, se organiza en la superficie constituyendo el esqueleto de esta estructura (Labbé y col. 1991). Análisis de la secuencia nucleotídica de VP2 de distintas cepas virales indica la presencia de dominios homólogos a los encontrados en otras proteínas que unen ácidos nucleicos. VP2 une al RNA viral y podría ser necesaria en la replicación y encapsidación de los segmentos de RNA de doble hebra dentro del core (Boyle y Holmes 1986, Kumar y col. 1989, Chen y col. 1990, Mansell y Patton 1990, Labbé y col. 1991).

Los polipéptidos no estructurales NSP1 (NS53), NSP2 (NS35), NSP3 (NS34) y NSP5 (NS26) se han encontrado asociados a intermediarios morfogénicos durante el ensamblaje viral (Helmberger-Jones y Patton 1986, Patton y Gallegos 1988, Sandino y col. 1988, Gallegos y Patton 1989). Por la capacidad de unir ácidos nucleicos que presentan algunas de estas proteínas, y por el fenotipo RNA de doble hebra negativo de mutantes termosensibles que mapean en los segmentos genómicos que las codifican, su

posible función en la replicación se ha relacionado principalmente con el ordenamiento de los mensajeros que son utilizados como templados en la síntesis del RNA de doble hebra o "genome assortment" (Boyle y Holmes 1986, Ramig y Petrie 1984, Chen y col. 1990, Kattoura y col. 1992). Este proceso es vital para asegurar el éxito de la infección, permitiendo que la partícula viral se ensamble con la dotación genética correcta (Gallegos y Patton, 1989). No se han identificado las señales de reconocimiento en el RNA viral que median el "assortment". Estudios recientes indican que además de unir el RNA viral, NSP2 interacciona con VP1, la RNA polimerasa viral (Kattoura y col. 1994).

La proteína NSP5 también se ha encontrado asociada a subpartículas virales que replican el RNA de rotavirus, pero su función en el ciclo aún se desconoce. Por su parte, NSP4 (NS28) es una glicoproteína de transmembrana que cumple un papel fundamental durante la morfogénesis de rotavirus. Se encuentra en las membranas del retículo endoplásmico rugoso (RER) y actúa como receptor de la partícula de cubierta simple que en su paso a través de estas estructuras completa el ensamblaje viral (Shahrabadi y col. 1987, Au y col. 1989, Meyer y col. 1989, Poruchynsky y Atkinson 1991, Taylor y col. 1993).

En el ciclo infeccioso, durante la penetración viral, rotavirus pierde su cápside externa lo que activa a la transcriptasa viral asociada a la partícula de cubierta simple (Cohen y col. 1979, Patton 1993). La actividad RNA polimerasa RNA dependiente presente en esta partícula sintetiza los 11 RNA mensajeros, RNA(+), utilizando como molde cada uno de los segmentos de RNA de doble hebra (Patton 1986). Los mensajeros sintetizados son liberados de la partícula al citoplasma, donde cumplen una doble función en el ciclo replicativo viral: por una parte participar en la síntesis de proteínas, proceso que utiliza la maquinaria celular y por otra parte servir de molde en la síntesis del RNA(-). Los segmentos de RNA(-) sintetizados permanecen asociados al RNA(+)



utilizado como molde, dando origen a los 11 segmentos de RNA genómico de doble hebra, proceso conocido como "replicación del RNA viral" (Patton 1986, Estes 1990, Patton 1993).

La síntesis del RNA genómico requiere de la síntesis previa de proteínas virales, las que se acumulan junto a las proteínas virales en estructuras citoplásmicas llamadas viroplasmos (Petrie y col.1982, Estes 1990). En estas estructuras se ha propuesto que ocurren en forma simultánea la síntesis del RNA genómico y las primeras etapas del ensamblaje de las partículas virales, que conducen a la formación de virus de cubierta simple. Este virus de cubierta simple puede también sintetizar moléculas adicionales de mRNA, permitiendo la amplificación de la infección viral y/o completar la morfogénesis viral, adquiriendo las proteínas de la cápside externa, luego de yemar desde el RER. En esta etapa se obtiene un intermediario viral rodeado por membrana, característica distintiva del ciclo infeccioso de rotavirus si se lo compara con reovirus, cuyo ciclo infeccioso presenta en general muchas similitudes con el de rotavirus. En la etapa final de la morfogénesis se pierde la membrana que rodea a la partícula, completándose la formación del virus de cubierta doble que es liberado por lisis celular (Estes 1990, Patton 1993).

Tanto la síntesis del RNA(+) como la del RNA(-) ocurre asociada a partículas virales. Sin embargo, la actividad RNA polimerasa presente en las partículas de cubierta simple sólo permite la síntesis del RNA(+) y no del RNA(-). Asimismo, las partículas de doble cubierta y los core obtenidos a partir de rotaviriones purificados tampoco realizan la síntesis del RNA(-) *in vitro*. Por esto es que se ha postulado que la síntesis del RNA(+) y del RNA(-) de rotavirus no sería realizada por el mismo tipo de partículas virales y que en la síntesis del RNA(-) se requeriría de la participación de proteínas no estructurales.

La actividad de síntesis de RNA(-) se ha asociado a varios intermediarios

morfogénicos aislados a partir de células infectadas, denominados "precore-RI" (precore replicative intermediate), "core-RI" y "single shelled-RI". Estos intermediarios corresponden a subpartículas virales de composición variada, encontradas en la fracción de viroplasma, que contienen polipéptidos no estructurales asociados a proteínas estructurales además de RNA de doble hebra naciente. Los tres tipos de intermediarios difieren en densidad y composición polipeptídica de las partículas capaces de sintetizar los segmentos de mRNA viral. El intermediario mayor "ss-RI" (75 nm, 320-390 S), que contiene las proteínas del virus de cubierta simple, VP1, VP2, VP3 y VP6 junto con NSP2, NSP3 y NSP5, se organizaría de una manera muy similar a la partícula viral de cubierta simple. El intermediario "core RI" no tiene VP6 pero sí las proteínas del core viral, VP1, VP2 y VP3, además de NSP2, NSP3 y NSP5, presentando un tamaño mayor que el del core viral (60 nm y 45 nm respectivamente), debido seguramente a la presencia de estas proteínas no estructurales (Helmberger-Jones y Patton 1986, Mansell y Patton 1990, Patton 1993). Por último, el intermediario "precore-RI", de 45 nm, estaría compuesto sólo por las proteínas estructurales VP1 y VP3 junto con las no estructurales NSP1, NSP2, NSP3 y NSP5. Tanto los intermediarios "precore-RI" como "core-RI" se han encontrado asociados a RNA de doble hebra recién sintetizado, por lo que se dedujo que las proteínas estructurales VP6 y VP2 no son requeridas obligadamente para la actividad de síntesis del RNA(-) (Mansell y Patton 1990).

Las etapas de la morfogénesis de rotavirus que conducen a la síntesis de RNA viral, síntesis del mRNA y del RNA(-), han sido difíciles de estudiar debido a que en ambos procesos la actividad RNA polimerasa se encuentra asociada a subpartículas virales y no a proteínas solubles, considerándose estas subpartículas como verdaderos complejos ribonucleoproteicos. La composición polipeptídica de las subpartículas que realizan la síntesis del RNA(+) es diferente de aquellas que realizan la síntesis del

RNA(-), aunque comparten algunas proteínas estructurales. Otra diferencia importante radica en el RNA molde que utilizan para la síntesis del RNA(+) y del RNA(-) respectivamente. En la síntesis de los mRNA, la partícula de cubierta simple utiliza como molde cada uno de los segmentos genómicos presentes en la partícula de rotavirus (RNA de doble hebra), mientras que en la síntesis del RNA(-) sólo los mRNA virales sirven de molde (RNA de simple hebra). Estas diferencias sugieren que dependiendo de su organización, los mismos polipéptidos podrían catalizar la síntesis de diferentes productos RNA y que la interacción de un mismo polipéptido con otra proteína diferente y/o con el RNA utilizado como molde en una partícula viral podría resultar en cambios en las propiedades enzimáticas que presenta.

El estudio del efecto de compuestos análogos de nucleótidos, los cuales pueden inhibir en forma específica distintas actividades involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos afectando su función, ha sido de mucha utilidad para conocer la función de algunas proteínas virales durante la transcripción de rotavirus (Spencer y Arias 1981, Pizarro y col. 1991 b). De esta forma se logró identificar la RNA polimerasa de rotavirus utilizando el análogo 8-AzidoATP, que al unirse a la proteína VP1 inhibía la transcripción (Valenzuela y col. 1991). El uso de otro análogo de ATP, ATP dialdehído, permitió asociar una actividad ATPasa, previamente informada en rotavirus, con la proteína VP3 (Pizarro y col. 1991). Estos estudios se han complementado con la caracterización de mutantes termosensibles en los genes que codifican para los polipéptidos VP1 y VP3, determinando que ambas son requeridas en la replicación del RNA viral (Vásquez y col 1993, Muñoz y col. 1995).

Debido a que la formación del cap en el extremo 5' del mRNA y la presencia de ATP son dos eventos indispensables en la transcripción de rotavirus, anteriormente se estudió el efecto de distintos análogos de nucleótidos sobre la transcripción de rotavirus

*in vitro*. Los compuestos estudiados poseían modificaciones en el enlace  $\beta$ - $\gamma$  pirofosfórico, en la base púrica, en el azúcar o tanto en la base como en la porción azúcar. De éstos, CordTP, AraATP, AraCTP y ATP-IO4, todos con modificación en el azúcar, mostraron tener un fuerte efecto inhibitorio sobre el proceso de transcripción *in vitro*. La inhibición por ATP-IO4 presentaba la característica de ser irreversible a diferencia de la inhibición ejercida por AraATP, AraCTP y CordTP que presentaban inhibiciones reversibles con mecanismos de inhibición competitiva, no competitiva y mixta respectivamente (Pizarro y col. 1991 b).

El objetivo de esta tesis es estudiar los eventos de la morfogénesis de rotavirus que conducen a la síntesis de los diferentes tipos de RNA viral, caracterizando funcionalmente las subpartículas virales que realizan la síntesis del RNA(-) y del RNA(+) mediante el uso de diversos compuestos que afectan la síntesis de ácidos nucleicos. Considerando que se han descrito diferencias estructurales relacionadas con la composición polipeptídica y con el RNA utilizado como molde por las subpartículas que realizan la síntesis del RNA(-) y del RNA(+), es posible suponer que estas actividades enzimáticas podrían ser afectadas diferencialmente por compuestos inhibidores de reacciones enzimáticas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos.

En este estudio, los compuestos antivirales seleccionados para ser analizados *in vivo* (cultivos de células MA104 infectadas con rotavirus de simio SA11) corresponden a análogos de nucleósidos, el análogo de pirofosfato ácido fosfonofórmico (foscarnet, PFA), e interferón. Del mismo modo, *in vitro*, el análisis de la síntesis de RNA(+) y RNA(-) se realizó con análogos de nucleótidos, con compuestos de la serie 2',5'-oligoadenilatos, 3',5'-oligoadenilatos y foscarnet.

Los 2',5'- oligoadenilatos actúan como intermediarios en una de las vías de respuesta a la acción antiviral del interferón (De Benedetti y col. 1987, Joklik 1990,

Schröder y col. 1992, Dorr 1993). Interferón induce la síntesis de la enzima oligoadenilato sintetasa que en presencia de RNA de doble hebra sintetiza los 2',5'-oligoadenilatos (Hovanessian y Kerr 1979, Minks y col. 1979, Slattery y col. 1979, Yang y col. 1981, De Benedetti y col. 1987, Joklik 1990). La actividad antiviral de estos compuestos se manifiesta, en algunos sistemas virales, al activar una endoribonucleasa celular latente que en último término actúa degradando los mRNA virales (Slattery y col. 1979, Nielsen y col. 1981, Nielsen y col. 1982, Baglioni y col. 1984, Kumar y col. 1988, Joklik 1990, Schröder y col. 1992). En otros sistemas, los 2',5'-A interfieren directamente con actividades enzimáticas virales requeridas en la síntesis de los ácidos nucleicos virales (Goswami y col. 1982, Henderson y col. 1982, Liu y Owens 1987, Montefiori y col. 1989, Subramanian y col. 1990, Schröder y col. 1992). Considerando que la administración de interferón a terneros y cerdos recién nacidos permite evitar y controlar la diarrea producida experimentalmente por inoculación con rotavirus (Schwers y col. 1985, Derbyshire 1989), el estudio con los 2',5'-oligoadenilatos nos permitiría entender a que nivel del ciclo replicativo se manifiesta el efecto antirotavirus de interferón.

Foscarnet es un análogo de pirofosfato cuyo amplio espectro antiviral incluye virus RNA, DNA y retrovirus (Helgstrand y col. 1978, Nicholson 1984, Sandstrom y col. 1985, Strid y col. 1989, Hirsch y Kaplan 1990, Crumpacker 1992). Es un inhibidor no competitivo que afecta directamente a las polimerasas virales al interactuar con el sitio de unión de pirofosfato (Sundquist y Oberg 1979, Cheng y col. 1981, Datta 1981, Derse y col. 1982, Lin y col. 1983, Crumpacker 1992). Hasta ahora, no se ha informado si este compuesto tiene o no algún efecto sobre infecciones producidas por rotavirus pero, considerando la información que se dispone acerca de sus efectos sobre otros sistemas virales, es esperable que este compuesto afecte también la actividad de la RNA polimerasa de rotavirus.

En esta tesis, el estudio de las etapas de la morfogénesis de rotavirus que conducen a la síntesis de RNA se abordó en primer lugar determinando el efecto de antivirales, como interferón  $\alpha$ -2a, foscarnet, 3'-amino-3'-deoximidina (3'-AdT) y derivados de 3'-AdT, sobre la replicación de rotavirus en cultivos celulares, analizando la síntesis *de novo* de RNA viral. Se utilizó para esto la línea celular MA104, la cual se infectó con la cepa de rotavirus de simio SA11. En estas células, también se analizó el efecto de los compuestos antivirales sobre la síntesis de subpartículas virales.

*In vitro*, se analizó el efecto de 2',5'-oligoadenilatos, 3',5'-oligoadenilatos y de foscarnet sobre las actividades de síntesis de los dos tipos de RNA viral, utilizando sistemas libres de células que permiten separar las actividades asociadas a la síntesis de RNA(-) y RNA(+). El sistema que permite la síntesis *de novo* del RNA(-) *in vitro* fue desarrollado en esta tesis. Utilizando este sistema se analizó además el efecto de análogos de nucleótidos como Ara-ATP, Ara-CTP, Cord-TP y ATP-IO<sub>4</sub> sobre la actividad de la RNA polimerasa RNA dependiente de rotavirus en la síntesis de RNA(-), compuestos cuyo efecto inhibitor sólo se había determinado anteriormente en la transcripción viral (síntesis de RNA(+)). Se analizó, además, el efecto de análogos de nucleótidos sobre la síntesis de RNA por mutantes termosensibles en los genes que codifican para las proteínas VP1 y VP3, la RNA polimerasa y guanililtransferasa/ATPasa respectivamente.

## MATERIALES

Los 2',5'-oligoadenilatos y 3',5'-oligoadenilatos utilizados en este estudio fueron sintetizados por el Dr. Paul Torrence, Section of Biomedical Chemistry, Laboratory of Medicinal Chemistry, National Institutes of Health, Maryland USA.

El interferón alfa-2a (Roferon-A) fue una donación del Dr. Claudio Blanch, Laboratorio Roche. El Roferon-A es una proteína recombinante producida en una cepa de E.coli que contiene el gen para interferón alfa humano.

Los stocks virales de SA11 fueron un regalo del Dr. Romilio Espejo. Las mutantes termosensibles tsB y tsC se obtuvieron por mutagénesis química de la cepa SA11 y fueron un regalo del Dr. Frank Ramig. La cepa CC86 de rotavirus de cerdo es una cepa reordenante que posee una duplicación parcial del segmento genómico 11 y fue proporcionada por el Dr. José Latorre.

## METODOS

### 1.- CULTIVO CELULAR E INFECCION VIRAL

Monocapas de células MA104 se cultivaron con Medio Mínimo Esencial (MME) suplementado con 5% de Suero Fetal de Bovino (SFB), incubando a 37 °C. Las células se subcultivaron utilizando Verseno para desprender la monocapa, luego se resuspendieron en MME y se homogenizaron suavemente antes de realizar el pasaje.

Las infecciones se realizaron con la cepa de rotavirus de simio SA11, con cepas termosensibles de SA11 tsB y tsC y con la cepa de rotavirus de cerdo CC86, siguiendo los procedimientos descritos (Sandino y col. 1988, Sandino y col. 1994). El virus se activó previamente con 10 µg/ml de tripsina incubando a 37 °C durante 30 min y se agregó a monocapas frescas de células MA104 con 90-100% de confluencia para una etapa de adsorción de 1 hora a 37 °C. Posteriormente se retiró el inóculo viral y se agregó MME sin SBF, suplementado con 2 µg/ml de tripsina. A continuación se incubó a 37 °C las células infectadas con las cepas SA11 y CC86 ó a 31 °C las cepas termosensibles de SA11.

Con el fin de marcar el ácido nucleico viral sintetizado durante una infección de células MA104 con SA11, luego de la adsorción el inóculo se reemplazó por MME deficiente en fosfatos sin SFB y suplementado con 20 µCi/ml de <sup>32</sup>P-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y 2 µg/ml de tripsina. Se permitió el avance de la infección incubando las células a 37 °C, la cual se detuvo a diferentes tiempos postinfección según el experimento. En el caso de realizar el análisis a tiempos tempranos post-infección, ésta se detuvo reemplazando el medio de incubación por un pequeño volumen de tampón hipotónico (Tris-HCl 3. mM pH 8,1,



MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, NaCl 3 mM). Las células se dejaron en hielo 10 min., se cosecharon con ayuda de un raspador de goma e inmediatamente se realizó la extracción de los ácidos nucleicos virales con fenol-cloroformo, los que se precipitaron con etanol durante la noche. Posteriormente, el RNA se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% y autorradiografía. El control sin infectar se obtuvo sometiendo las células a las mismas condiciones descritas, pero en ausencia de virus. El RNA presente en partículas liberadas al medio de cultivo se extrajo directamente con fenol cloroformo y luego se trató como se describió más arriba.

## **2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE ANTIVIRALES *in vivo*.**

### **2.1.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD**

El efecto citotóxico de los antivirales sobre las células MA104 se determinó visualizando la aparición de efecto citopático al incubar las células sin infectar en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos a evaluar. Los ensayos se realizaron en duplicado y en cada experimento individual.

Además, se determinó el efecto de los antivirales sobre la viabilidad celular por el método de exclusión del colorante azul de tripán. Se cuantificó en un hemocitómetro el número de células viables provenientes de cultivos no incubados o incubados en presencia de diferentes concentraciones del compuesto a analizar.

### **2.2.- EFECTO DE INTERFERON SOBRE LA SINTESIS DE RNA Y SUBPARTICULAS VIRALES EN CELULAS MA104 INFECTADAS CON ROTAVIRUS SA11.**

El efecto de interferón sobre la síntesis de RNA viral se determinó preincubando células MA104 con 0, 1000, 2000, 5000 y 10000 U.I./ml de IFN  $\alpha$ -2a, por 24 horas.

Transcurrida la preincubación, los cultivos se lavaron y se infectaron con SA11 10 u.f.p./célula. Al término de la adsorción se retiró el inóculo y las células se incubaron en MME sin SFB, deficiente en  $H_3PO_4$ , suplementado con 20  $\mu Ci/ml$  [ $^{32}P$ ]-  $H_3PO_4$  y 2  $\mu g/ml$  de tripsina, nuevamente en presencia de las mismas concentraciones de interferón que en la etapa de preincubación. Las células infectadas se incubaron a 37 °C durante 9 horas. Al término de la incubación se extrajo el RNA viral presente en las células y se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 % y autorradiografía.

Para determinar el efecto de interferón sobre la síntesis de subpartículas virales, las células se preincubaron con 0 y 10000 U.I./ml de IFN-2a por 24 horas. Luego, la infección se realizó con 10 u.f.p./célula de SA11 y después de la adsorción, el inóculo viral se reemplazó por MME deficiente en metionina suplementado con 20  $\mu Ci$  de Tran $^{35}S$ -Label 1136 Ci/mmol, en ausencia o presencia de 10000 U.I./ml de IFN  $\alpha$ -2a. La incubación se realizó por 6 horas a 37 °C, después de lo cual las subpartículas se cosecharon, se resuspendieron en tampón HGD (Hepes-HCl pH 7,6, Glicerol 10%, DTE 2 mM) y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando como tampón de corrida Tris-Glicina (gel de TGA) con posterior autorradiografía, como se ha descrito anteriormente (Gallegos y Patton 1989, Vásquez y col. 1993).

### **2.3.- EFECTO DE FOSCARNET SOBRE LA SINTESIS DE RNA Y SUBPARTICULAS VIRALES EN CELULAS MA104 INFECTADAS CON ROTAVIRUS SA11.**

Para analizar el efecto de foscarnet sobre la replicación de SA11 en células MA104 se estudiaron diferentes condiciones de incubación, las que incluyeron determinación del efecto de la concentración de PFA, efecto de preincubación con PFA, efecto de la multiplicidad de infección (m.o.i.) de SA11 y efecto de DEAE-dextrán.

El efecto de foscarnet sobre la síntesis de RNA viral se determinó preincubando las células MA104 con foscarnet en concentraciones 0-3 mM durante 2,5 horas a 37 °C, en presencia de 20 µg/ml DEAE-dextrán. Posteriormente, las células se infectaron con SA11 activado con tripsina utilizando m.o.i. de 1 y 10, incubándolas nuevamente esta vez en MME deficiente en fosfato suplementado con 20 µCi/ml de [<sup>32</sup>P]-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 2 µg/ml tripsina y las mismas concentraciones de foscarnet que las utilizadas en la preincubación. A las 8 horas post-infección se analizó el efecto de foscarnet sobre la síntesis de RNA viral, verificando la presencia de los 11 segmentos de RNA de doble hebra luego de PAGE y autorradiografía del gel. El probable efecto citotóxico de foscarnet se determinó tratando células no infectadas en las mismas condiciones de incubación que las células infectadas y, además, extendiendo el período de incubación por 24 horas. Para determinar el efecto de foscarnet sobre la síntesis de subpartículas virales se preincubaron las células con 0 y 3 mM de PFA por 2,5 horas. Luego, la infección se realizó con SA11 10 u.f.p./célula y después de la adsorción el inóculo viral se reemplazó por MME deficiente en metionina suplementado con 20 µCi de Tran<sup>35</sup>S-Label 1136 Ci/mmol, en ausencia o en presencia de 3 mM de foscarnet. La incubación se realizó por 6 horas a 37 °C, después de lo cual las subpartículas se cosecharon, se resuspendieron en tampón HGD y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (gel de TGA) y autorradiografía.

#### **2.4.- EFECTO DE ANALOGOS DE NUCLEOSIDOS DERIVADOS DE 3'-AdT SOBRE LA SINTESIS DE RNA VIRAL EN CELULAS MA104 INFECTADAS POR RÓTAVIRUS SA11.**

Se estudió el efecto de los siguientes análogos: 3'-AdT, 3'-MMAdT, 3'-DMAdT, 3'-MEAdT, 3'-DEAdT, 3'-MPrAdT y 3'-DPrAdT, determinando en primer lugar el rango de concentraciones en las cuales estos compuestos no presentaban citotoxicidad.

Posteriormente, se determinó el efecto de estos compuestos sobre la síntesis de RNA de doble hebra en células MA104 infectadas con SA11 en distintas condiciones, siempre dentro del rango en que los compuestos no presentaron efecto citotóxico. Las células MA104 se infectaron con SA11 (5 u.f.p./célula) y, luego de la adsorción, el inóculo se reemplazó por MME que contenía los análogos de nucleósidos en concentraciones que variaron entre 0 y 2 mM. Al término del período de incubación, de 20 horas, se analizó el RNA viral sintetizado en las células infectadas siguiendo el método descrito anteriormente (Sandino y col. 1988), tiñendo con nitrato de plata los segmentos de RNA de doble hebra de SA11. Estos estudios se realizaron en presencia y ausencia de actinomicina D y también se analizó el efecto de DEAE-dextrán.

### **3.- PURIFICACION DE ROTAVIRUS**

#### **3.1.- OBTENCION DE PARTICULAS VIRALES PARA ENSAYOS DE ACTIVIDAD RNA POLIMERASA: SINTESIS DE LA HEBRA POSITIVA DEL RNA DE ROTAVIRUS.**

La purificación de las partículas virales se realizó según procedimiento descrito anteriormente (Sandino y col. 1988), con las siguientes modificaciones: una vez desprendida la monocapa celular infectada con SA11 y de realizar el procedimiento de descongelamiento-congelamiento, el medio de cultivo se ultracentrifugó a 75.000 x g por 2.5 horas. El precipitado obtenido se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 y se extrajo dos veces con Freón para eliminar desechos celulares, centrifugando a 3000 rpm por 15 min en centrífuga Sorvall modelo RC2-B, rotor SA-600, con el fin de separar las fases. La fase acuosa obtenida se ultracentrifugó a 108.000 x g por 2,5 horas, obteniendo un precipitado que se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y se sometió a una nueva ultracentrifugación esta vez a través de un colchón de sacarosa al

25 % durante 2 horas a 150.000 x g. Las ultracentrifugaciones se realizaron en ultracentrífuga Beckman, modelo L2-65B. El precipitado obtenido se resuspendió en un pequeño volumen de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, manteniéndose a 4 °C hasta realizar el análisis de la migración de su RNA genómico en geles de poliacrilamida al 7% y determinar la actividad transcripcional del virus purificado. Posteriormente, la suspensión viral se alicuotó y las alícuotas se congelaron a -20 °C.

### **3.2.- OBTENCION DE SUBPARTICULAS VIRALES PARA ENSAYOS DE ACTIVIDAD RNA POLIMERASA: SINTESIS DE LA HEBRA NEGATIVA DEL RNA DE ROTAVIRUS.**

Para la obtención de las subpartículas virales se procedió siguiendo el método descrito anteriormente (Gallegos y Patton 1989), cosechando las subpartículas a las seis horas p.i.. La fracción de subpartículas virales purificadas se resuspendió en un pequeño volumen de tampón HGD y se dejó en hielo durante la noche, para luego resuspender y almacenar a -20 °C.

Para la obtención de las subpartículas virales marcadas con  $^{35}\text{S}$ -metionina, la infección viral se realizó en MME deficiente en metionina agregando 20  $\mu\text{Ci/ml}$  de Tran $^{35}\text{S}$ -Label (1136 Ci/mmol) al finalizar el período de adsorción y se procedió de igual forma que en el caso anterior.

## **4.- ENSAYO DE ACTIVIDAD RNA POLIMERASA DE ROTAVIRUS *in vitro*.**

### **4.1.- ENSAYO DE SINTESIS DE RNA(+).**

La actividad RNA polimerasa de rotaviriones activados por calor se cuantificó determinando la incorporación de  $^3\text{H}$ -UMP a material insoluble en ácido, según método

descrito anteriormente (Pizarro y col. 1991 b). Estas condiciones de transcripción *in vitro* fueron ATP, CTP, GTP 4 mM de cada uno; 0,24 mM de [<sup>3</sup>H]-UTP (A.E.: 100 cpm/pmol); MgCl<sub>2</sub> 14 mM; SAM 0,2 mM y 20 µg de bentonita. En los estudios destinados a analizar el efecto de oligonucleótidos y de AraATP, la concentración de nucleótidos ATP, CTP, GTP fué 0,2 mM de cada uno; 0,24 mM de [<sup>3</sup>H]-UTP (A.E.: 100 cpm/pmol); MgCl<sub>2</sub> 1 mM; SAM 0,1 mM; y 20 µg de bentonita. Los análogos se agregaron en concentraciones crecientes a mezclas de transcripción y se procedió de la forma descrita más arriba. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la actividad RNA polimerasa comparada con una reacción control efectuada sin la adición de análogo (Pizarro y col. 1991 b).

La síntesis de los mRNA virales también se analizó en algunos casos visualizando la migración de los productos de transcripción *in vitro* luego de electroforesis en geles de poliacrilamida-urea. Para esto, la reacción se realizó utilizando α-<sup>32</sup>P-UTP 0,04 mM (A.E.: 300cpm/pmol) en lugar de <sup>3</sup>H-UTP.

Para estudiar el mecanismo de inhibición de la transcripción por 2',5'-oligoadenilatos, se utilizó el compuesto p(A2'p5')3A en concentración 144 M. La reacción utilizó rotaviriones activados por calor incubados en una mezcla que contenía 0,24 mM de <sup>3</sup>H-UTP (A.E.: 100cpm/pmol) y concentraciones de ATP, CTP y GTP que variaron entre 0 y 200 µM de cada uno. La reacción se incubó por 15 min a 45C. Los resultados se analizaron por gráfica de Lineweaver-Burk.

#### 4.2.- ENSAYO DE SINTESIS DE RNA(-).

Se desarrolló un ensayo *in vitro* que permite determinar la actividad RNA polimerasa de rotavirus en la síntesis de la hebra negativa del RNA tomando como base un ensayo descrito anteriormente, que utiliza subpartículas virales aisladas durante la

infección (Patton 1986). En el ensayo descrito por Patton, las subpartículas se suspendieron en una mezcla de reacción que contenía Hepes-HCl 10 mM pH 7,6; ATP 1 mM, CTP y GTP 0,6 mM de cada uno; UTP 0,01 mM, Acetato de potasio 14 mM; Cloruro de amonio 66 mM; Acetato de magnesio 2 mM; 25  $\mu$ Ci/mmol, ICN y DTE 2 mM. Esta mezcla era incubada por 60 minutos a 30 °C y luego se analizaba la síntesis de RNA por electroforesis de los productos en geles de poliacrilamida y posterior autorradiografía. Las condiciones de la reacción del ensayo desarrollado en esta investigación se analizan en Resultados. El procedimiento para aislar estas subpartículas ya se describió más arriba.

Para determinar el efecto de análogos de nucleótidos, de oligoadenilatos y de foscarnet sobre la actividad del complejo RNA polimerasa de rotavirus que sintetiza los segmentos de RNA(-) *in vitro*, se agregaron distintas concentraciones de los compuestos a mezclas de reacción y se compararon con reacciones efectuadas en ausencia de éstos. El análisis de los productos de la reacción se realizó por autorradiografía después de electroforesis en geles de poliacrilamida al 7 %, comparando la intensidad de la marca radioactiva asociada a cada una de las bandas de RNA de doble hebra viral en las reacciones efectuadas en presencia de análogo respecto a la reacción control efectuada sin la adición de análogo.

#### **4.2.1.- ENSAYO DE SINTESIS DE RNA(-) UTILIZANDO COMO RNA MOLDE mRNA VIRAL EXOGENO.**

Con el fin de determinar si las subpartículas de SA11, aisladas 6 horas post-infección, pueden sintetizar RNA(-) utilizando un RNA molde exógeno se procedió de la siguiente forma: Se realizaron ensayos de transcripción *in vitro* utilizando partículas virales de distintas cepas de rotavirus (SA11, tsC y CC86) en las condiciones de reacción

estándar descritas pero utilizando  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -UTP 40 M, (A.E. 5.000 cpm/pmol) e incubando a 45 °C durante 30-45 min. Al final de la incubación la mezcla se centrifugó a 14.900 x g por 30 min a 4 °C, para precipitar el virus. Luego, el mRNA viral sintetizado se purificó por extracción con Fenol-Cloroformo y precipitación con Etanol.

Los mensajeros sintetizados en los ensayos de transcripción *in vitro* se recuperaron por centrifugación de la muestra precipitada con etanol a 14.900 x g durante 30 min a 4 °C, verificando la síntesis de los segmentos correspondientes a cada cepa por autorradiografía luego de electroforesis de los productos de la reacción en gel de poliacrilamida-urea. Además se cuantificó la radioactividad precipitable con TCA de los transcritos purificados.

El  $^{32}\text{P}$ -mRNA obtenido se resuspendió junto con subpartículas de SA11 aisladas 6 horas p.i. en una mezcla de síntesis de RNA(-) no radioactiva que contenía UTP 0,24 mM en lugar de  $^{32}\text{P}$ -UTP 0,04 mM (A.E.:3000 cpm/pmol). La reacción se incubó por 90 minutos a 45 °C, se trató con 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de RNasa A por 5 min a 37 °C y se procedió a purificar los productos sintetizados por extracción con Fenol-Cloroformo y precipitación con etanol. En forma paralela se realizó un ensayo de síntesis del RNA (-) *in vitro* en las condiciones estándar, utilizando subpartículas de SA11 y  $^{32}\text{P}$ -UTP como sustrato para marcar la hebra de RNA(-) de cada uno de los segmentos de RNA de doble hebra de SA11 producidos en la reacción.

Los productos de la reacción de síntesis de RNA(-) que utiliza como RNA molde segmentos de mRNA virales exógenos y del ensayo estándar de síntesis de RNA(-) *in vitro* se obtuvieron por centrifugación a 14.900 x g durante 30 minutos a 4 °C y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 %. Posteriormente, el gel se secó y fue autorradiografiado.



#### 4.2.2.- ANALISIS DE SUBPARTICULAS ASOCIADAS A PRODUCTOS DE LA REACCION DE SINTESIS DE RNA(-) *in vitro* MEDIANTE GRADIENTES CONTINUAS DE SACAROSA 20%-45%.

Se centrifugaron subpartículas de SA11 marcadas con  $^{35}\text{S}$ -metionina, aisladas 6 horas p.i. y purificadas según el procedimiento descrito para las SVP utilizadas en los ensayos de síntesis de RNA(-), en gradientes continuas de sacarosa del 20% al 45%. Las subpartículas se resuspendieron en tampón HGD y se diluyeron con tampón TMN (Tris-HCl 3mM pH 8,1,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  66 mM, acetato de magnesio 14 mM, DTE 1 mM) antes de ser depositados sobre la gradiente que contenía un volumen de 3,8 ml. La gradiente se ultracentrifugó por 2 horas a 150.000 x g (35.000 rpm) y posteriormente se colectaron fracciones de 220 l cada una, desde la parte superior, a las cuales se les cuantificó la radioactividad asociada a material insoluble en TCA.

El mismo procedimiento descrito más arriba se aplicó al producto de una reacción estándar de síntesis de RNA(-) *in vitro* realizada con subpartículas de SA11 y  $^{32}\text{P}$ -UTP y al producto de una reacción de síntesis del RNA(-) *in vitro* realizada con subpartículas de SA11 y utilizando como RNA molde exógeno  $^{32}\text{P}$ -mRNA viral sintetizado *in vitro* por viriones de la cepa tsC de rotavirus. En estas condiciones se obtuvo la síntesis de segmentos de RNA de doble hebra cuya migración electroforética era idéntica a la de los segmentos de la cepa tsC.

## RESULTADOS

### 1.- DESARROLLO DEL ENSAYO *in vitro* DE LA SINTESIS DEL RNA(-).

Para desarrollar un ensayo *in vitro*, que permitiera determinar la actividad RNA polimerasa en la síntesis de la hebra negativa del RNA, se tomó como base un ensayo diseñado anteriormente (Patton, 1986), que utiliza subpartículas virales aisladas durante la infección.

#### 1.1.- ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE LA REACCION.

Durante la síntesis de la hebra RNA(-) de rotavirus, ésta permanece asociada a su templado RNA(+) dando como producto final de la reacción el RNA de doble hebra viral. La síntesis de RNA(-) se determinó por incorporación de  $^{32}\text{P}$ -UMP a los 11 segmentos de RNA de doble hebra genómico, luego de tratar la mezcla de reacción con RNasa A. a la mezcla de reacción, como se describió en Métodos. El RNA viral sintetizado se visualizó por autorradiografía después de electroforesis en geles de poliacrilamida. La autorradiografía del gel permitió detectar los 11 segmentos de RNA de doble hebra genómico sintetizados durante la reacción, cuya migración característica se comparó con el patrón electroforético del genoma de rotavirus SA11 purificado.

El ensayo de síntesis de RNA(-) *in vitro*, utiliza una fracción de subpartículas virales (viroplasma), obtenida desde células infectadas a tiempos tempranos post-infección. Las fracciones obtenidas a diferentes tiempos post infección se incubaron en diversas condiciones, determinándose el efecto de: pH, temperatura y tiempo de incubación, concentración de nucleótidos fríos y marcados, concentración de sales, y

concentración de subpartículas sobre la síntesis de RNA(-).

### **1.1.1.- CINETICA DE SINTESIS DE RNA GENOMICO POR CELULAS MA104 INFECTADAS CON ROTAVIRUS SA11.**

Para determinar el momento en que, en las condiciones experimentales utilizadas, se puede detectar la síntesis del RNA de doble hebra viral en las células MA104 infectadas con 10 u.f.p./célula de rotavirus SA11, éstas fueron incubadas en presencia de  $^{32}\text{P}$ -ácido ortofosfórico como se describió en Métodos. A diferentes tiempos post-infección, el  $^{32}\text{P}$ -RNA viral sintetizado se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior autorradiografía.

Los resultados se muestran en la Figura 1. El carril 1 corresponde al control sin infectar, obtenido 6 horas post-infección. Los carriles 2 al 6 corresponden al RNA viral sintetizado en las células 1, 2, 3, 4 y 6 horas post-infección, respectivamente. La migración de los 11 segmentos de RNA genómico de rotavirus se indica en la Figura.

Se puede observar que en las condiciones de infección ensayadas, la síntesis de RNA de doble hebra viral comienza a detectarse 4 horas post-infección (carril 5). A las 6 horas post-infección se observa una mayor síntesis de RNA genómico viral, que corresponde al tiempo en el cual existe la más alta relación de subpartículas que realizan la síntesis de RNA(-), respecto a partículas que realizan la síntesis de RNA(+).

### **1.1.2.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUBPARTICULAS.**

Se estableció que la incorporación de  $^{32}\text{P}$ -UMP a los productos de síntesis de RNA(-) es directamente proporcional a la cantidad de subpartículas agregadas a la mezcla de reacción (Figura 2, carriles 1-7). La síntesis del RNA de doble hebra viral se detectó claramente al utilizar SVP preparadas desde aproximadamente  $1,4 \times 10^6$  células

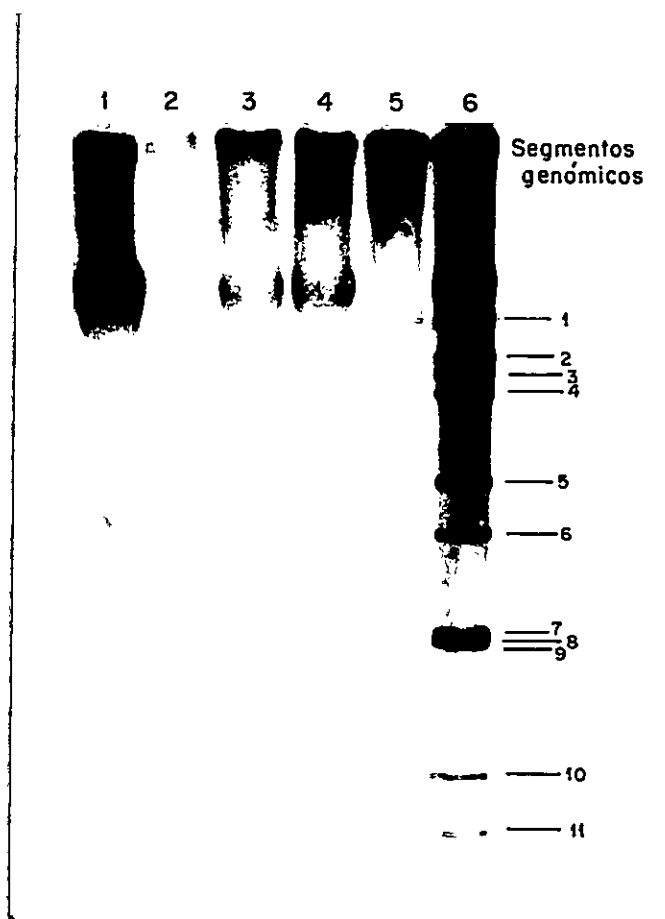
infectadas (Figura 2, carriles 3 y 6) o más (carriles 4 y 7).

### 1.1.3.- EFECTO DEL TIEMPO DE OBTENCION DE SUBPARTICULAS.

El efecto del tiempo de cosecha de la subpartículas virales se analiza en la Figura 2. Se obtuvo mayor actividad de síntesis de RNA(-) al utilizar subpartículas aisladas entre 6-8 horas p.i.. A tiempos menores (4 horas p.i.), la fracción de subpartículas presentó menor actividad de síntesis de RNA(-) (Figura 2, carriles 2, 3, 4 versus carriles 5, 6, 7), lo cual se correlaciona con que el RNA genómico de rotavirus obtenido desde las células infectadas también es menor en las primeras horas después de la infección que a las 6 horas postinfección, como se muestra en la Figura 1. A tiempos mayores postinfección, aumenta el RNA de doble hebra acumulado en las células infectadas, sin embargo, la actividad RNA polimerasa presentada *in vitro* por la fracción de subpartículas aisladas a estos tiempos postinfección es mayor para la síntesis de RNA(+) que para la síntesis de RNA(-) (Patton 1986, Muñoz, M. 1994).

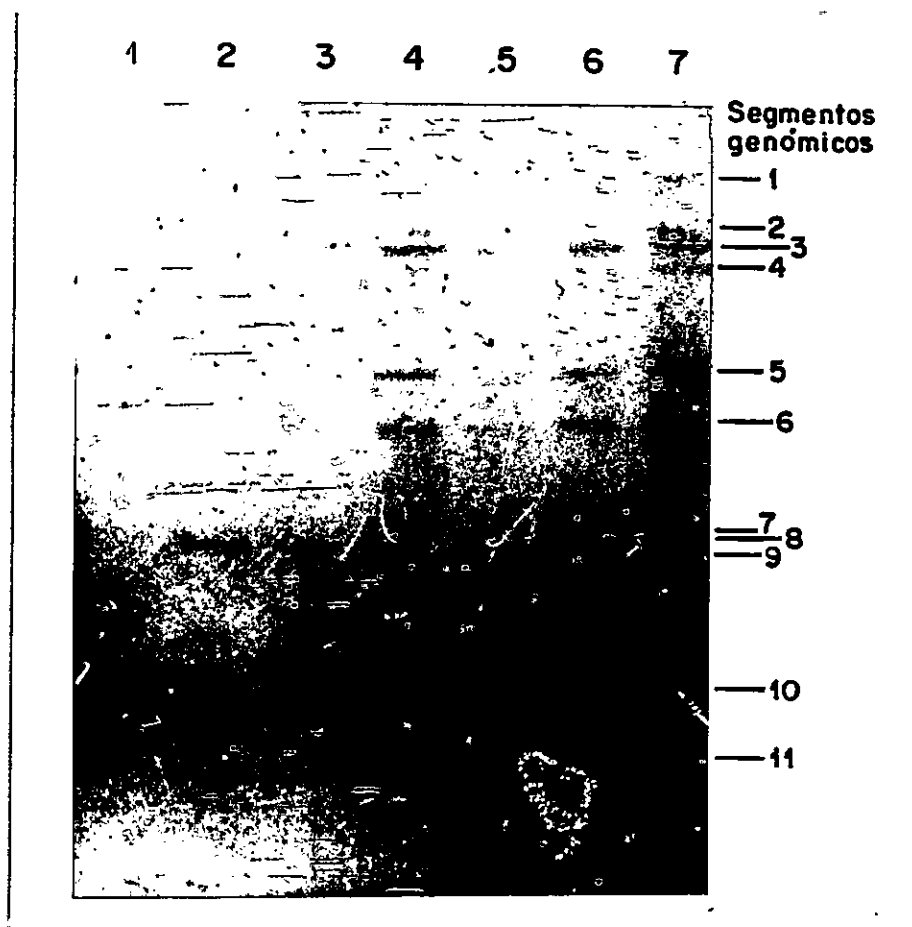
### 1.1.4.- EFECTO DE pH, TEMPERATURA DE INCUBACION Y CONCENTRACION DE SALES.

Se analizaron distintas condiciones para la reacción de síntesis de RNA(-) *in vitro*, tomando como base las condiciones de un ensayo descrito anteriormente (Patton 1986) y las condiciones para la síntesis de mRNA *in vitro* utilizadas en nuestro laboratorio, ambas descritas en Métodos. Se determinó el efecto del pH, de la temperatura de incubación y de la presencia de algunas sales.



**FIGURA 1**  
**CINETICA DE SINTESIS DE RNA DE DOBLE HEBRA VIRAL EN CELULAS MA104 INFECTADAS CON ROTAVIRUS SA11.**

Se infectaron monocapas de células MA104 con 10 u.f.p./célula de rotavirus SA11, en presencia de 20  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{32}\text{P-H}_3\text{PO}_4$ . A diferentes tiempos postinfección, las células fueron cosechadas y sometidas a una extracción de RNA, el que fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida al 7 % y autorradiografía. En la figura se indica la migración de los 11 segmentos de RNA genómico de rotavirus SA11. El carril 1 representa al control sin infectar, que fue analizado 6 horas post-infección; los carriles 2 - 6 corresponden al RNA obtenido desde las células 1, 2, 3, 4 y 6 horas postinfección, respectivamente.



**FIGURA 2**

**EFFECTO DE LA CONCENTRACION Y TIEMPO DE OBTENCION DE SUBPARTICULAS DE ROTAVIRUS SA11 SOBRE LA SINTESIS DE RNA(-) *in vitro*.**

La síntesis de RNA(-) *in vitro* se ensayó incubando subpartículas de SA11 en una mezcla de reacción que contiene  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -UTP. Luego de una hora de incubación, realizada a 45 °C, las muestras se incubaron con RNasa A y los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y autorradiografía.

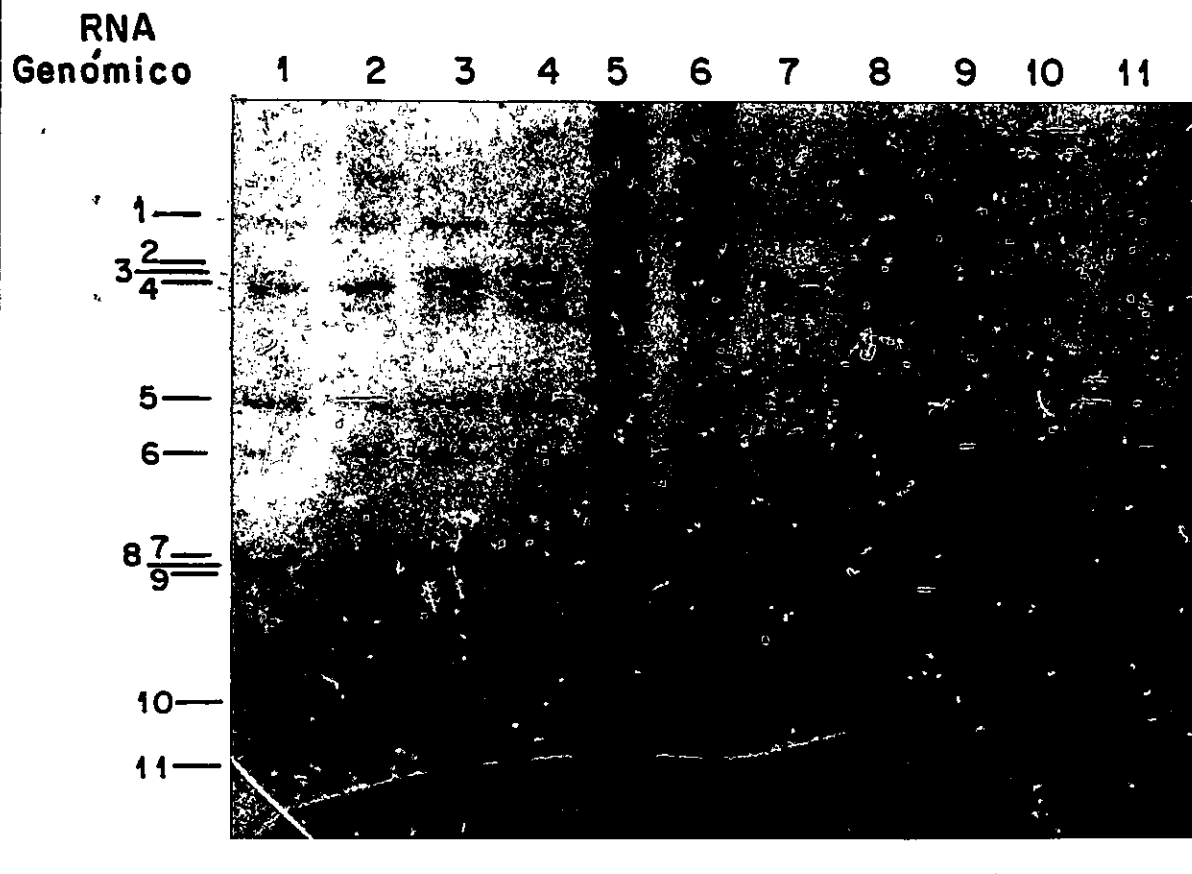
En el carril 1 se cargó el producto de una reacción efectuada en ausencia de subpartículas de SA11. Los carriles 2 y 5 corresponden a reacciones efectuadas con subpartículas purificadas desde  $7 \times 10^5$  células infectadas, a las 4 y 6 horas p.i. respectivamente. Los carriles 3 y 6 corresponden a reacciones efectuadas con subpartículas purificadas desde  $1,4 \times 10^6$  células infectadas, a las 4 y 6 horas p.i. respectivamente. Los carriles 4 y 7, corresponden a reacciones efectuadas con subpartículas purificadas desde  $2,1 \times 10^6$  células infectadas, a las 4 y 6 horas p.i. respectivamente. Se indica en la figura la migración de los 11 segmentos de RNA de SA11.

En la Figura 3 se observa que las reacciones realizadas a pH 7,7, incubadas a 30 °C, en presencia de Acetato de Potasio 14 mM y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  66 mM, Acetato de Magnesio 2 mM y DTE 2 mM, resultaron en una menor incorporación de  $^{32}\text{P}$ -UMP a los productos de síntesis de RNA(-) *in vitro* (Figura 3, carriles 2,4 y 7-11) respecto a reacciones efectuadas a pH 8,5, incubadas a 45 °C y en presencia de NaCl 40 mM y  $\text{MgCl}_2$  14 mM (carriles 1, 3, 5 y 6).

#### 1.1.5.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NUCLEOTIDOS Y MAGNESIO.

Se determinó el efecto de la concentración de los nucleótidos ATP, CTP y GTP y de  $\text{MgCl}_2$  sobre la síntesis de RNA(-) *in vitro* utilizando subpartículas de SA11 aisladas 6 horas p.i., las que se incorporaron a una mezcla que contenía Tris-HCl 120 mM, pH 8,5; NaCl 40 mM;  $^{32}\text{P}$ -UTP 40  $\mu\text{M}$  (A.E.: 3.000 cpm/pmol) y 20  $\mu\text{g}$  de bentonita. A esta mezcla se agregaron diferentes concentraciones de una mezcla de los nucleótidos ATP, CTP y GTP (XTP) y de  $\text{MgCl}_2$ , buscando la o las proporciones óptimas para una eficiente síntesis de RNA de doble hebra. Posteriormente, el análisis del RNA de doble hebra sintetizado se realizó en las condiciones ya descritas.

En la Figura 4 se indican las condiciones de cada reacción. Se observa que la condición óptima se encuentra utilizando concentraciones 4 mM de cada uno de los nucleótidos y 14 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Figura 4, carril 15). Al utilizar 1 mM de cada uno de los nucleótidos la concentración óptima de  $\text{MgCl}_2$  resultó ser de 3 mM (carril 9), mientras que con 0,2 mM de XTP se requiere 1 mM de  $\text{MgCl}_2$  para una máxima síntesis de RNA de doble hebra (carril 2).



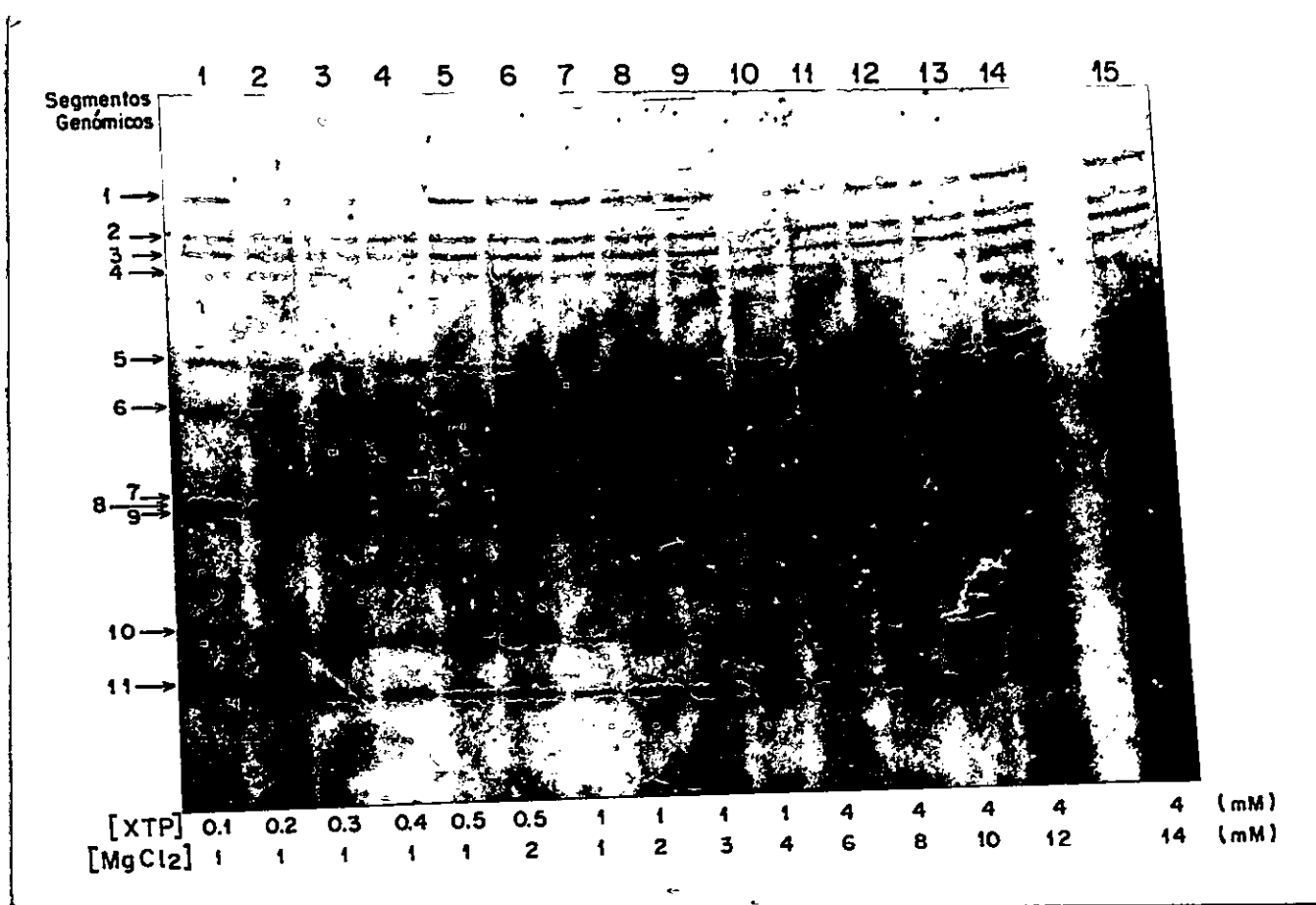
**FIGURA 3**

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA, pH Y CONCENTRACION DE SALES SOBRE LA SINTESIS DE RNA(-) DE ROTAVIRUS *in vitro*.**

La síntesis de RNA(-) *in vitro* se ensayó incubando subpartículas de SA11, aisladas seis horas postinfección desde  $1,4 \times 10^6$  células infectadas, en una mezcla de reacción que contenía  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -UTP y 4mM de XTP. Luego de la incubación, realizada en diferentes condiciones, las muestras se trataron con RNasa A. Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y autorradiografía.

En la figura se indica la migración de los productos de la reacción. Las diferentes reacciones de síntesis de RNA(-), se efectuaron incubando las subpartículas de SA11 a 30 °C (carriles 2, 4 y 10) y a 45 °C (carriles 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 11), por 60 minutos (carriles 1, 2 y 5-11) o por 90 minutos (carriles 3 y 4). Los carriles 1, 2, 3, 4 y 6 corresponden a reacciones realizadas a pH 8,5 en presencia de NaCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 14 mM y bentonita. El carril 11 corresponde a una reacción efectuada como en 1, pero a pH 7,7 y el carril 5 a una reacción efectuada como en 1, pero en ausencia de bentonita. En los carriles 7, 8, 9 y 10, el NaCl y MgCl<sub>2</sub> se reemplazó por Acetato de Potasio 14 mM y NH<sub>4</sub>Cl 66mM, además de DTE 1 mM (carriles 8, 9 y 10).





**FIGURA 4**  
**EFEECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE NUCLEOTIDOS Y MAGNESIO**  
**SOBRE LA SÍNTESIS DE RNA(-) DE ROTAVIRUS *in vitro*.**

La figura muestra una autorradiografía del gel de poliacrilamida donde se analizaron mediante electroforesis los productos de reacciones de síntesis de RNA(-) *in vitro*, realizadas con subpartículas de SA11 en presencia de diferentes concentraciones de XTP y MgCl<sub>2</sub>. Las subpartículas virales se incubaron durante 1 hora a 45 °C, en una mezcla compuesta por Tris-HCl 120 mM pH 8,5, NaCl 40 mM, <sup>32</sup>P-UTP 0,04 mM (A.E.:3000 cpm/pmol) y las concentraciones indicadas de XTP (ATP, CTP, GTP) y MgCl<sub>2</sub>.

### 1.1.6.- EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION DE LA REACCION.

El efecto de la duración del período de incubación de la reacción sobre la síntesis de RNA(-) *in vitro* se estudió en diferentes condiciones. Los diferentes ensayos se incubaron durante períodos que variaron entre 0 y 2 horas (Datos no mostrados y Figura 3). Los segmentos de RNA de doble hebra producidos en la reacción de síntesis de RNA(-) *in vitro* son detectados claramente al incubar la mezcla durante al menos 1 hora con una fracción de subpartículas de SA11 proveniente de  $1,4 \times 10^6$  células infectadas.

### 1.1.7.- EFECTO DE RNasa A.

Con el fin de visualizar sólo el RNA de doble hebra viral producido en el ensayo de síntesis de RNA(-) *in vitro*, después de incubar la mezcla de reacción con la fracción de subpartículas de rotavirus SA11, los productos RNA de simple hebra y RNA de doble hebra se separaron por tratamiento controlado con RNasa A, en diversas condiciones. Se analizó el efecto de la concentración de RNasa y del tiempo de incubación de la mezcla con la enzima. En la Figura 5 se muestra la mejor condición del tratamiento con RNasa A. Se obtuvo un resultado óptimo al incubar la mezcla de reacción, luego del ensayo, con  $10 \mu\text{g/ml}$  de la enzima a  $37^\circ\text{C}$  por 5 minutos. Al incubar por un tiempo más prolongado o con una mayor concentración de RNasa A se observó que era degradado no sólo el RNA de simple hebra sino también el RNA de doble hebra viral.

Como resultado de este análisis (Resultados 1.1.1. al 1.1.7.), las condiciones escogidas para realizar la síntesis de RNA(-) *in vitro* fueron las siguientes: Las subpartículas de rotavirus SA11 aisladas 6 horas post-infección se incubaron durante 1 hora a  $45^\circ\text{C}$ , en una mezcla que contiene Tris-HCl  $120 \text{ mM}$  pH 8,5; NaCl  $40 \text{ mM}$ ;  $\text{MgCl}_2$   $14 \text{ mM}$ ; ATP, CTP y GTP  $4 \text{ mM}$  cada uno;  $0,04 \text{ mM}$  de  $^{32}\text{P}$ -UTP (A.E.:  $3000 \text{ cpm/pmol}$ ) y  $20 \mu\text{g}$  de bentonita. Al término de la reacción, la mezcla se incubó con

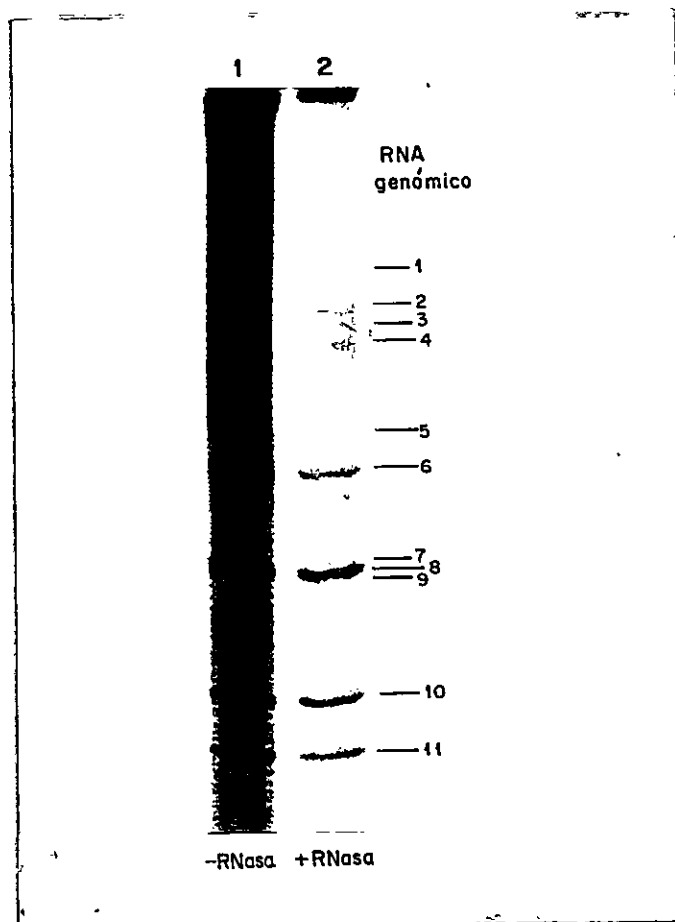
10µ g/ml de RNasa A a 37 °C por 5 min. El producto final de la reacción, el RNA de doble hebra viral, se detectó por autorradiografía después de electroforesis en geles de poliacrilamida al 7 %. La migración característica de los 11 segmentos de RNA de doble hebra sintetizados durante la reacción, se comprobó al realizar la electroforesis del genoma purificado de rotavirus en el mismo gel.

Para estudiar el efecto de análogos de oligonucleótidos sobre la síntesis de RNA(-) *in vitro* la mezcla de reacción, además de las subpartículas de SA11, se componía de Tris 120 mM pH 8,5; NaCl 20 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; ATP, CTP, GTP 0,2 mM de cada uno; 0,04 mM de [<sup>32</sup>P]-UTP (A.E.: 3000 cpm/pmol) y 20 µg de bentonita.

## **1.2.- ESTUDIO DE LA SINTESIS DE RNA(-) *in vitro* UTILIZANDO COMO RNA MOLDE mRNA VIRALES EXOGENOS.**

Para demostrar si las subpartículas de SA11 pueden realizar la síntesis de RNA(-) *in vitro* utilizando de RNA molde un RNA mensajero viral exógeno, a una mezcla de reacción que no contenía nucleótidos radioactivos se agregó <sup>32</sup>P-RNA(+) viral y los productos de la reacción se analizaron por electroforesis y autorradiografía, como se describió en Métodos. Se comparó la migración electroforética de los productos de la reacción realizada con RNA molde exógeno respecto a la migración, en el mismo gel, del producto de un ensayo de síntesis de RNA(-) *in vitro* realizado con subpartículas de SA11 en condiciones estándar, es decir, sin agregar mRNA viral exógeno y en presencia de <sup>32</sup>P-UTP.

Los <sup>32</sup>P-RNA(+) exógenos agregados a la reacción de síntesis de RNA(-) se obtuvieron por transcripción *in vitro* en presencia de <sup>32</sup>P-UTP, utilizando viriones de diferentes cepas de rotavirus activados por tratamiento con calor y posteriormente se



**FIGURA 5**

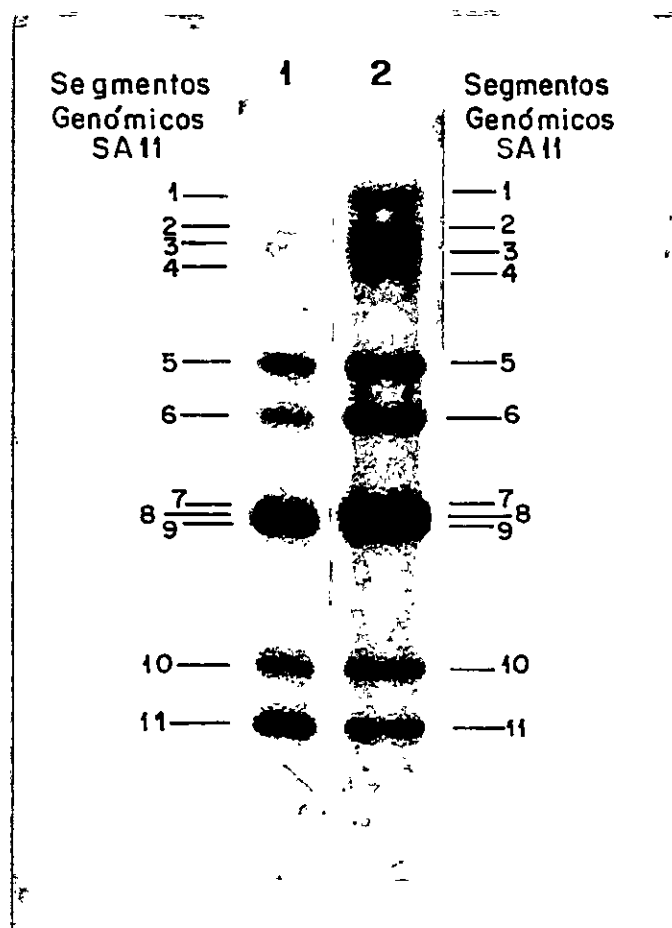
**EFECTO DE RNasa A SOBRE LOS PRODUCTOS DE LA SÍNTESIS DE RNA(-) DE ROTAVIRUS *in vitro*.**

La figura muestra una autorradiografía de un gel de poliacrilamida donde se analizaron mediante electroforesis los productos de reacciones de síntesis de RNA(-) *in vitro* realizadas con subpartículas de SA11. Las subpartículas virales aisladas desde  $1,4 \times 10^6$  células infectadas se incubaron a  $45^\circ\text{C}$  durante 1 hora, en una mezcla de reacción que contenía  $^{32}\text{P}$ -UTP. Posteriormente, las muestras se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  con  $10\ \mu\text{g/ml}$  de RNasa A, durante 0 y 5 minutos (carriles 1 y 2, respectivamente). Se indica en la figura la migración de los 11 segmentos de RNA de doble hebra sintetizados en la reacción.

purificaron por extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. En estas reacciones, la síntesis de los 11 mensajeros virales se comprobó por electroforesis en gel de poliacrilamida-urea el que fue teñido con nitrato de plata y/o autorradiografiado.

Cuando el ensayo de síntesis de RNA(-) se realizó agregando  $^{32}\text{P}$ -RNA(+) de SA11 (RNA molde homólogo), los productos de la reacción fueron los 11 segmentos de RNA de doble hebra con migración electroforética correspondiente a la de los segmentos genómicos de SA11, como se observa en la Figura 6.

Resultados similares se obtuvieron utilizando como RNA molde exógeno el  $^{32}\text{P}$ -RNA(+) obtenido por transcripción *in vitro* con la cepa termosensible de SA11, tsC, (RNA molde heterólogo). La cepa tsC tiene un ligero cambio en el patrón electroforético respecto a SA11 silvestre (Figura 7 A, carriles 1 y 2). La síntesis de RNA(-), realizada en estas condiciones, dió como producto RNA de doble hebra con migración electroforética correspondiente a la cepa tsC (carril 2). Al utilizar como RNA molde exógeno para la síntesis de RNA(-) el  $^{32}\text{P}$ -RNA(+) sintetizado *in vitro* por la cepa de rotavirus de cerdo CC86 (templado heterólogo), los productos de la reacción con subpartículas de SA11 fueron los 11 segmentos de RNA de doble hebra de la cepa CC86 (Figura 7 B, carriles 2 y 3). Los segmentos genómicos de CC86 presentan una migración electroforética diferente a la que presentan los segmentos de RNA de doble hebra de SA11. La diferencia más clara radica en la migración del gen 11 de ambas cepas: la cepa CC86 presenta una duplicación en el gen 11, por lo cual su migración es mucho más lenta y permite evidenciar una banda un poco más abajo de la posición en que migran los genes 7, 8 y 9 de la cepa SA11. En estas condiciones, también se pueden ver diferencias en la migración de los segmentos 3 y 5 de estas dos cepas de rotavirus (carriles 1 y 3). En la Figura 7 B se puede observar que la síntesis de RNA de doble hebra fue proporcional a la cantidad de RNA molde exógeno agregado (carriles 2 y 3 respectivamente). Además, en



**FIGURA 6**  
**SINTESIS DE RNA(-) *in vitro* UTILIZANDO COMO RNA MOLDE mRNA VIRAL HOMOLOGO EXOGENO.**

Las reacciones de síntesis de RNA(-) se realizaron utilizando subpartículas de rotavirus SA11 aisladas desde  $1,4 \times 10^6$  células infectadas, las que se incubaron a  $45^\circ\text{C}$  durante 1,5 horas en una mezcla de reacción que en lugar de <sup>32</sup>P-UTP contenía <sup>32</sup>P-mRNA viral exógeno, producido por transcripción *in vitro* con partículas de SA11 activadas por calor. El carril 1 corresponde a una reacción efectuada agregando aproximadamente 200.000 cpm de <sup>32</sup>P-mRNA-SA11 a la mezcla de reacción. El carril 2, corresponde a los productos de una reacción de síntesis de RNA(-) *in vitro* realizada en presencia de <sup>32</sup>P-UTP, sin agregar <sup>32</sup>P-mRNA-SA11. La migración de los 11 segmentos de RNA de doble hebra de la cepa de rotavirus SA11 está indicada en la figura.

**FIGURA 7**  
**SINTESIS DE RNA(-) *in vitro* UTILIZANDO COMO RNA MOLDE mRNA VIRAL HETEROLOGO EXOGENO.**

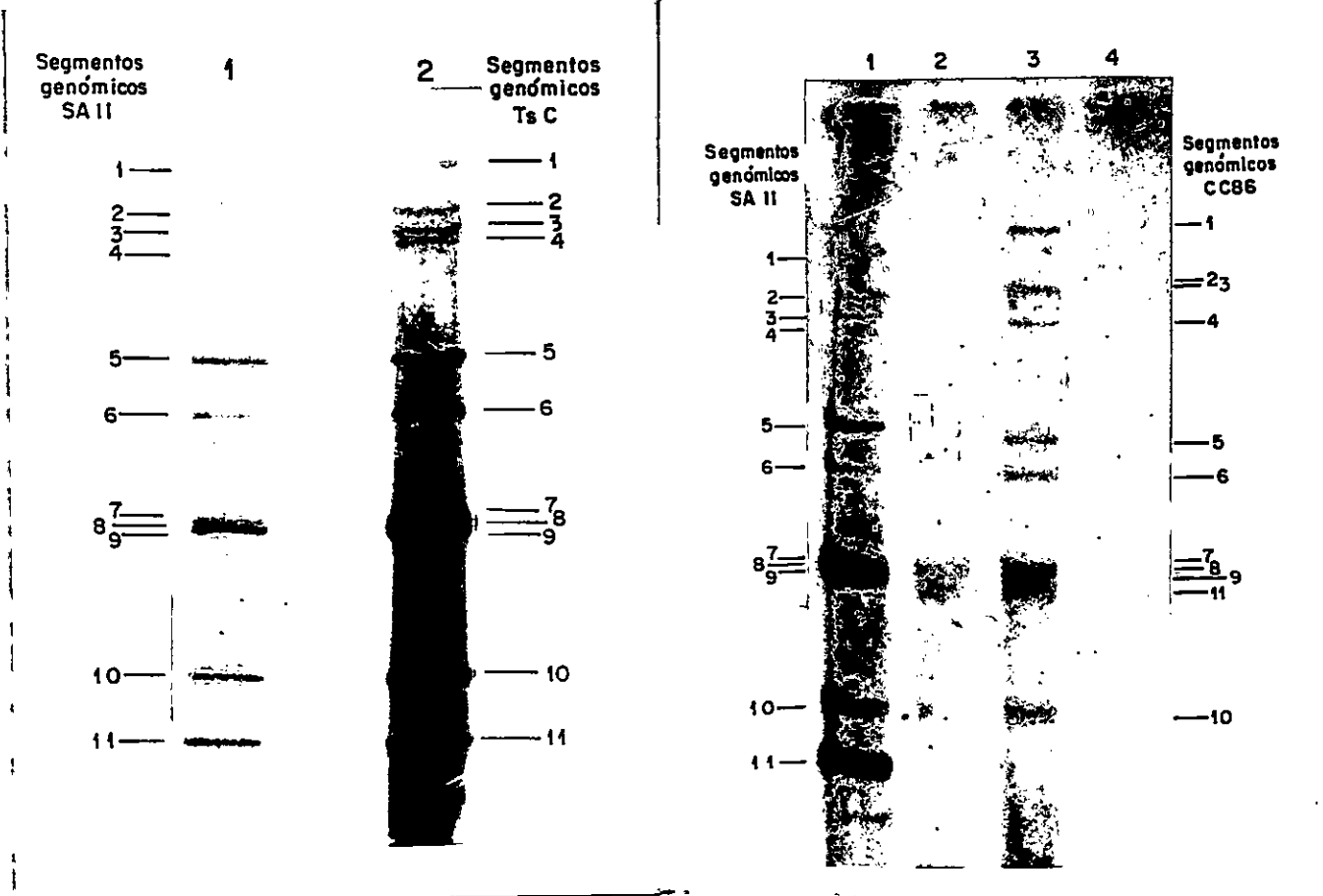
Las reacciones de síntesis de RNA(-) se realizaron utilizando subpartículas de rotavirus SA11 aisladas desde  $1,4 \times 10^6$  células infectadas, las que se incubaron a 45 °C durante 1,5 horas en una mezcla de reacción que en lugar de  $^{32}\text{P}$ -UTP contenía  $^{32}\text{P}$ -mRNA viral exógeno, producido por transcripción *in vitro* con partículas activadas por calor, de las cepas tsC (Panel A) y CC86 (Panel B).

**PANEL A:** El carril 1 corresponde a los productos de una reacción de síntesis de RNA(-) *in vitro* realizada con subpartículas de SA11 en condiciones estándar, en presencia de  $^{32}\text{P}$ -UTP. El carril 2 corresponde a una reacción de síntesis de RNA(-) realizada con subpartículas de SA11 en presencia de aproximadamente 200.000 cpm de  $^{32}\text{P}$ -mRNA-tsC. Se indica la migración de los 11 segmentos de RNA de doble hebra de las cepas SA11 y tsC sintetizados respectivamente en cada reacción.

**PANEL B:** El carril 1 corresponde al producto de una reacción estándar de síntesis de RNA(-) *in vitro* con subpartículas de SA11 realizada en presencia de  $^{32}\text{P}$ -UTP. Los carriles 2 y 3 corresponden a reacciones efectuadas agregando respectivamente 90.000 y 180.000 cpm de  $^{32}\text{P}$ -mRNA-CC86 a mezclas de reacción que no contenían  $^{32}\text{P}$ -UTP. El carril 4 corresponde a una reacción realizada en ausencia de subpartículas de SA11. Se indica en la figura la migración de los 11 segmentos de RNA de doble hebra de SA11 y de CC86 sintetizados en cada reacción.

A

B





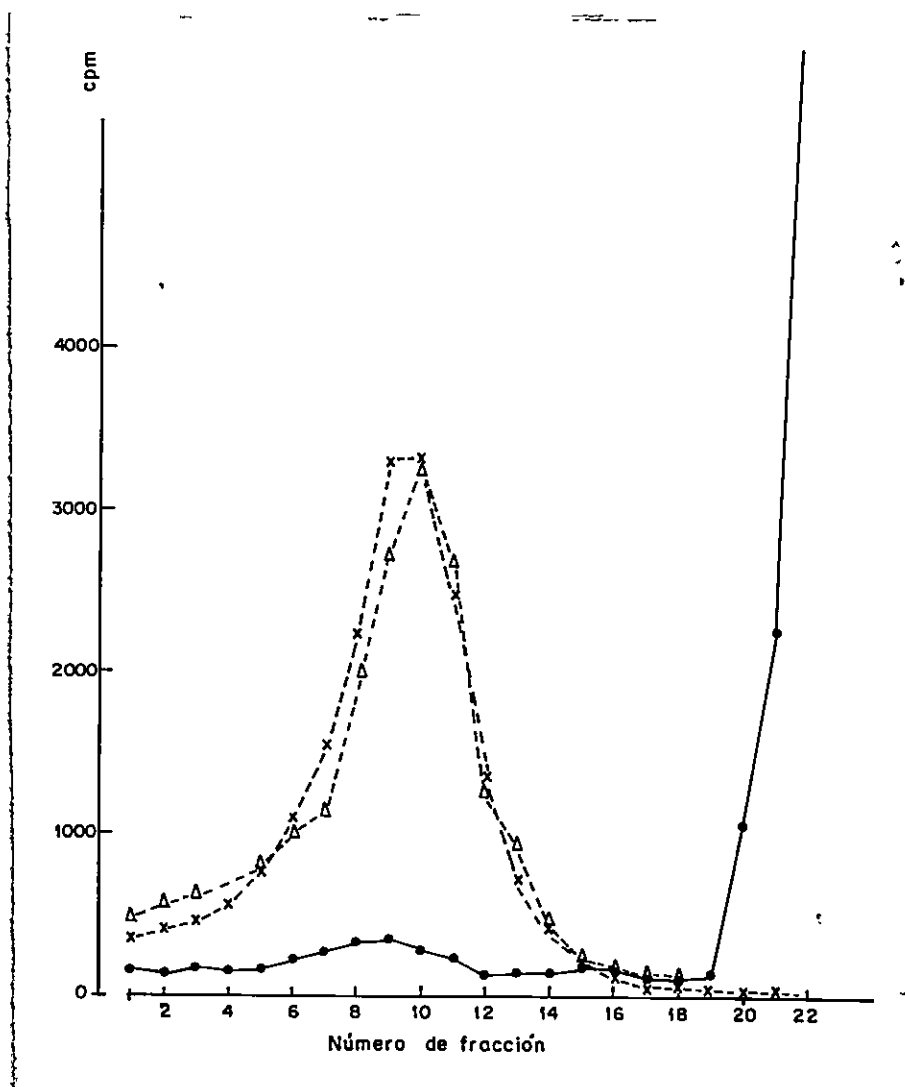
ausencia de  $^{32}\text{P}$ -RNA(+)-CC86 exógeno no se obtuvo síntesis de RNA de doble hebra de CC86 (carril 4).

### 1.3.- ESTUDIO DE LA ASOCIACION DE LOS PRODUCTOS DE SINTESIS DE RNA(-) *in vitro* A SUBPARTICULAS VIRALES.

Con el fin de determinar si el RNA de doble hebra producto de la reacción de síntesis de RNA(-) *in vitro* se encuentra asociado a subpartículas virales, se analizó la distribución de los productos en una gradiente de sacarosa 20%-45% la que se comparó con la distribución de subpartículas de SA11 marcadas con  $^{35}\text{S}$ -metionina, analizada en las mismas condiciones.

Como se muestra en la Figura 8, al ultracentrifugar  $^{35}\text{S}$ -subpartículas de SA11 a través de una gradiente de sacarosa 20% - 45% se detectaron dos fracciones de material proteico marcado radiactivamente. El primero, que sedimenta al centro de la gradiente, según antecedentes anteriores correspondería a subpartículas virales tipo "core" ó "pre-core" (Bican y col. 1982). La segunda fracción, que se ubicó en el fondo de la gradiente, corresponde a virus de cubierta simple y de cubierta doble.

Al analizar la distribución de los productos obtenidos en una reacción de síntesis de RNA(-) *in vitro* estándar y en una reacción de síntesis de RNA(-) *in vitro* agregando como RNA molde exógeno el  $^{32}\text{P}$ -RNA(+) sintetizado por la cepa tsC se observa en ambos casos un pico de radioactividad asociada a una población de subpartículas cuya posición en la gradiente se corresponde con la subpartículas tipo "core" o "precore".



**FIGURA 8**  
**ANÁLISIS DE SUBPARTÍCULAS ASOCIADAS A PRODUCTOS DE SÍNTESIS DE RNA(-) *in vitro*.**

En una gradiente continua de sacarosa del 20% al 45% se analizaron subpartículas de SA11 marcadas con  $^{35}\text{S}$ -metionina (•), los productos de una reacción de síntesis de RNA(-) *in vitro* por subpartículas de SA11 (×) y los productos de una reacción de síntesis de RNA(-) *in vitro* realizada con subpartículas de SA11 y  $^{32}\text{P}$ -mRNA-tsC como RNA molde heterólogo exógeno (Δ). A fracciones de 220 ul c/u colectadas desde la parte superior de la gradiente se les cuantificó la radiactividad asociada a material ácido-insoluble.

## **2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE ANALOGOS DE NUCLEOTIDOS SOBRE LA SINTESIS DE RNA(-) *in vitro*.**

Se analizó si el ensayo desarrollado anteriormente permite la evaluación del efecto directo de compuestos antivirales sobre la actividad de la RNA polimerasa de rotavirus. El estudio se realizó con análogos de nucleótidos cuyo efecto inhibitorio directo de la síntesis de RNA(+) *in vitro* había sido determinada previamente (Pizarro y col. 1991 b).

### **2.1.- EFECTO DE ARA-ATP EN LA SINTESIS DE RNA(-) *in vitro*.**

El efecto de Ara-ATP sobre la síntesis de RNA(-) *in vitro* se determinó agregando concentraciones crecientes del análogo a mezclas de reacción que contenían subpartículas de SA11, XTP 0,2 mM de cada uno y <sup>32</sup>P-UTP 40 μM (A.E.: 3.000 cpm/pmol).

En la Figura 9 se observa una autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el cual se analizaron por electroforesis los productos de reacciones realizadas en presencia de 0; 0,1; 0,2; 0,4 y 0,8 mM de Ara-ATP; al final de la reacción todas las muestras se trataron con RNasa A en las condiciones descritas (carriles 1 - 5). Se indica en la figura la migración de los 11 segmentos de RNA de doble hebra genómico de rotavirus.

Se observa que la adición de Ara-ATP inhibe la síntesis de RNA(-) de rotavirus *in vitro* en forma dependiente de la concentración, con una concentración inhibitoria del 50 % de la actividad aproximada del 50 % de 0,2 mM (C.I.<sub>50</sub> = 0,2 mM). Entre un 80 % - 90 % de inhibición se obtuvo con 0,8 mM de Ara-ATP.

### **2.2.- EFECTO DE ARA-CTP EN LA SINTESIS DE RNA(-) *in vitro*.**

El efecto de Ara-CTP sobre la síntesis de RNA de doble hebra *in vitro* se determinó agregando concentraciones crecientes del análogo a mezclas de reacción

estándar que contenían subpartículas de SA11, XTP 4 mM cada uno y  $^{32}\text{P}$ -UTP 40 M (A.E.: 3000 cpm/pmol).

En la Figura 10 se observa una autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el cual se analizaron mediante electroforesis los productos de reacciones realizadas en presencia de 0, 1, 2, 4 y 8 mM de Ara-CTP; al final de la reacción todas las muestras se trataron con RNasa A (carriles 1 - 5).

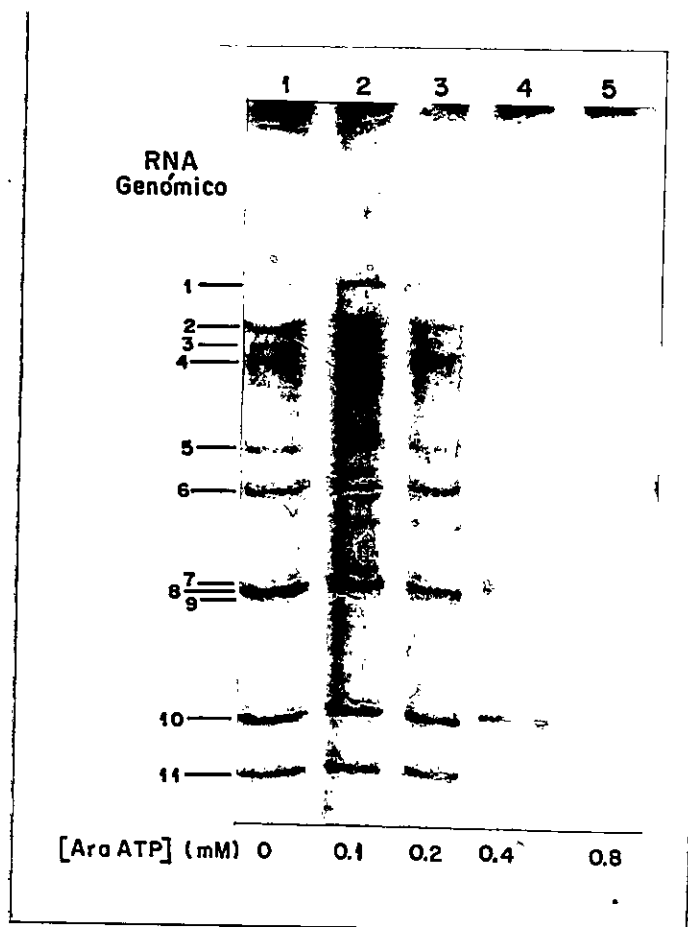
Se observa que la adición de Ara-CTP al ensayo de síntesis de RNA(-) *in vitro* inhibe la síntesis de los 11 segmentos de RNA de doble hebra en forma dependiente de la concentración, con una C.I.<sub>50</sub> de aproximadamente 2 mM. Esta inhibición es total al utilizar concentraciones mayores que 8 mM.

### 2.3.- EFECTO DE CORD-TP EN LA SÍNTESIS DE RNA(-) *in vitro*.

El efecto de Cord-TP sobre la síntesis de RNA(-) *in vitro* se determinó agregando concentraciones crecientes del análogo a mezclas de reacción estándar que contenían subpartículas de SA11, XTP 4 mM cada uno y  $^{32}\text{P}$ -UTP 40 M (A.E.: 3000 cpm/pmol).

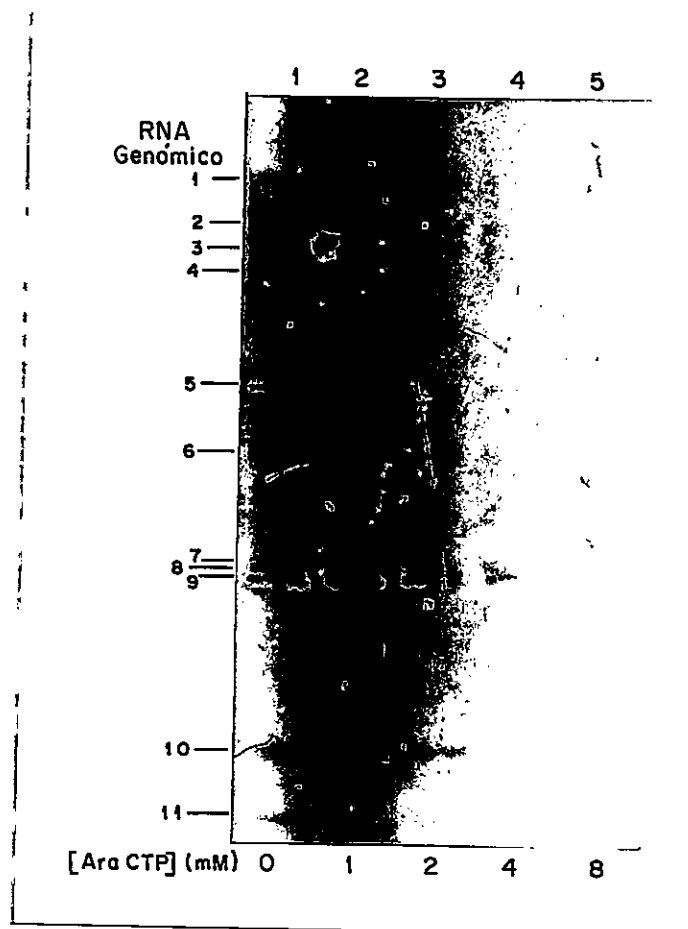
En la Figura 11 se observa una autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el cual se analizaron por electroforesis los productos de reacciones realizadas en presencia de 0, 2, 4, 8 y 16 mM de Cord-TP; al final de la reacción todas las muestras se trataron con RNasa A (carriles 1 - 5). Además, en esta figura se muestra una reacción control realizada en ausencia de subpartículas (carril 6).

Se observa que la adición de Cord-TP inhibe la síntesis de la hebra negativa del RNA de rotavirus en forma dependiente de la concentración. La adición de 2 mM de Cord-TP, reduce la incorporación de  $^{32}\text{P}$  a los segmentos de RNA de doble hebra viral en aproximadamente un 50 % (C.I.<sub>50</sub> = 2 mM).



**FIGURA 9**  
**EFEECTO DE ARA-ATP SOBRE LA SINTESIS DE RNA(-) *in vitro***  
**CATALIZADA POR SUBPARTICULAS DE ROTAVIRUS SA11.**

La figura muestra una autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el cual se analizaron mediante electroforesis los productos de reacciones de síntesis de RNA(-) *in vitro* realizadas con subpartículas de SA11, en presencia de XTP 0,2 mM de cada uno, de  $^{32}\text{P}$ -UTP 40  $\mu\text{M}$  (A.E.: 3.000 cpm/pmol) y de AraATP en concentraciones de 0; 0,1; 0,2; 0,4 y 0,8 mM (carriles 1 al 5, respectivamente). Al final de la reacción las muestras se trataron con RNasa A. Se indica en la figura la migración de los 11 segmentos de RNA de doble hebra genómico de rotavirus.



**FIGURA 10**  
**EFFECTO DE ARA-CTP SOBRE LA SINTESIS DE RNA(-) *in vitro***  
**CATALIZADA POR SUBPARTICULAS DE ROTAVIRUS SA11.**

La figura muestra una autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el cual se analizaron mediante electroforesis los productos de reacciones de síntesis de RNA(-) *in vitro* realizadas en presencia de subpartículas de SA11, XTP 4 mM cada uno,  $^{32}\text{P}$ -UTP 40  $\mu\text{M}$  (A.E.: 3000 cpm/pmol) y de AraCTP en concentraciones de 0, 1, 2, 4 y 8 mM (carriles 1 al 5 respectivamente). Al final de la reacción todas las muestras se trataron con RNasa A. Se indica en la figura, la migración de los 11 segmentos de RNA de doble hebra sintetizados en la reacción.

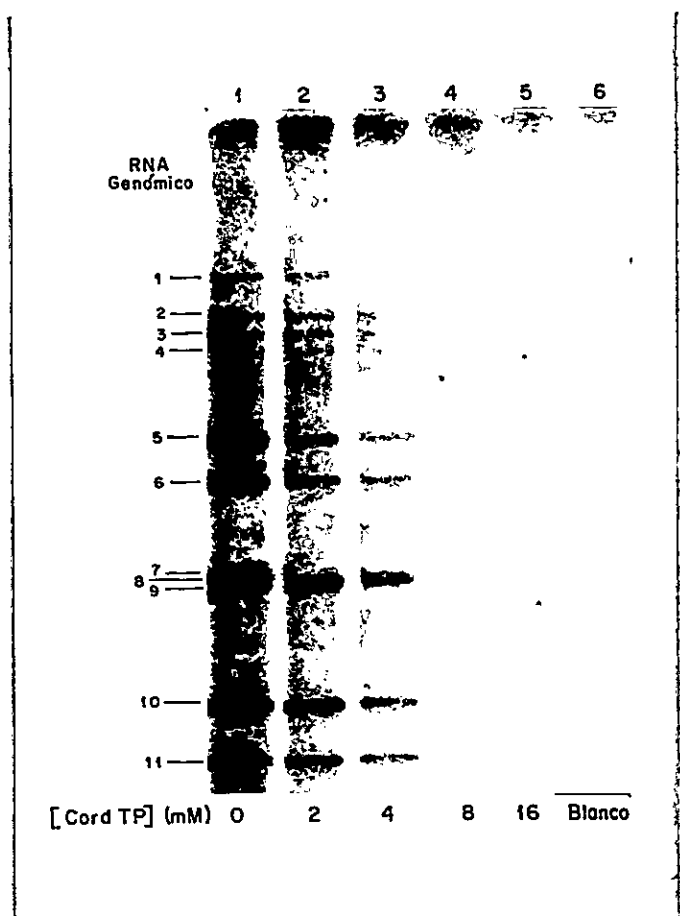
#### 2.4.- EFECTO DE ATP-IO<sub>4</sub> EN LA SINTESIS DE RNA(-) *in vitro*.

El efecto de ATP-IO<sub>4</sub> sobre la síntesis de RNA(-) *in vitro* se determinó agregando concentraciones crecientes del análogo a mezclas de reacción estándar que contenían subpartículas de SA11, XTP 4 mM cada uno y <sup>32</sup>P-UTP 40 μM (A.E.: 3000 cpm/pmol).

En la Figura 12 se observa una autorradiografía de un gel de poliacrilamida, en el cual se analizaron por electroforesis los productos de reacciones realizadas en presencia de 0, 0,4, 1 , 4 , 8 y 16 mM de ATP-IO<sub>4</sub>; al final de la reacción todas las muestras se trataron con RNasa A (carriles 1 - 6).

Los resultados muestran que la adición de ATP-IO<sub>4</sub> al ensayo de síntesis de RNA(-) *in vitro* inhibe en forma dependiente de la concentración la producción de los 11 segmentos de RNA de doble hebra de rotavirus. Como es posible observar en la figura 12, utilizando una concentración de 1 mM de ATP-IO<sub>4</sub> se obtuvo una inhibición superior al 50% (C.I.<sub>50</sub> 1 mM) con 4 mM de ATP-IO<sub>4</sub> la inhibición de la síntesis de los 11 segmentos de RNA de doble hebra es ya completa; esta concentración es igual a la de cada uno de los XTP (ATP, CTP, GTP) utilizados en este ensayo.

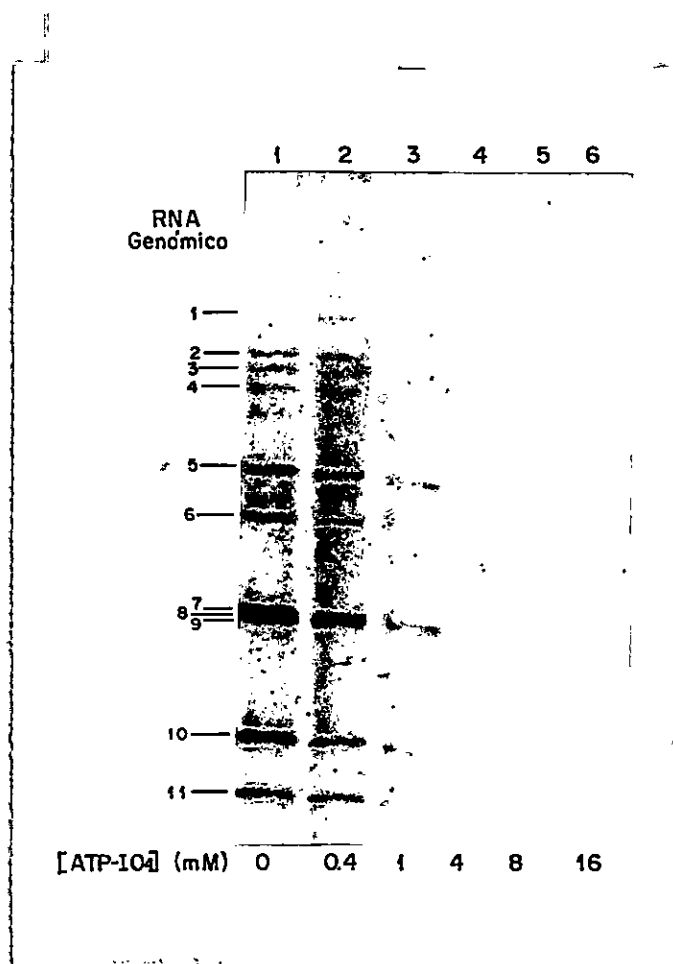
Utilizando el ensayo desarrollado, se analizó también el efecto de 2',5'-oligoadenilatos, de 3',5'-oligoadenilatos y de foscarnet sobre la síntesis de RNA(-) *in vitro*. Estos resultados se presentan mas adelante, con el fin de orientar posteriormente la discusión, en un contexto que considera el efecto *in vivo* de interferón y de foscarnet sobre la morfogénesis de rotavirus.



**FIGURA 11**  
**EFEECTO DE CORD-TP SOBRE LA SÍNTESIS DE RNA(-) *in vitro***  
**CATALIZADA POR SUBPARTÍCULAS DE ROTAVIRUS SA11.**

La figura corresponde a una autorradiografía de un gel de poliacrilamida, en el cual se sometieron a electroforesis los productos de reacciones de síntesis de RNA(-) realizadas en presencia de subpartículas de SA11, XTP 4 mM cada uno,  $^{32}\text{P}$ -UTP 40  $\mu\text{M}$  (A.E.: 3000 cpm/pmol) y de Cord-TP en concentraciones de 0, 2, 4, 8, y 16 mM (carriles 1 al 5, respectivamente). Al final de la reacción todas las muestras se trataron con RNasa A. Se muestra además en esta figura una reacción de control realizada en ausencia de subpartículas (carril 6). Se indica la migración de los 11 segmentos de RNA genómico sintetizados en la reacción.





**FIGURA 12**  
**EFFECTO DE ATP-DIALDEHIDO SOBRE LA SINTESIS DE RNA(-) *in vitro***  
**CATALIZADA POR SUBPARTICULAS DE ROTAVIRUS SA11.**

La figura muestra una autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el cual se analizaron mediante electroforesis los productos de reacciones de síntesis de RNA(-) realizadas en presencia de subpartículas de SA11, XTP 4 mM cada uno, <sup>32</sup>P-UTP 40 μM (A.E.: 3000 cpm/pmol) y de ATP-IO<sub>4</sub> (ATP-dialdehído) en concentraciones de 0, 0,4, 1, 4, 8 y 16 mM (carriles 1 al 6, respectivamente), al final de la reacción todas las muestras se trataron con RNasa A. En la figura se indica la migración de los 11 segmentos genómicos sintetizados.

### **3.- ESTUDIO DEL EFECTO DE INTERFERON EN LA MORFOGENESIS DE ROTAVIRUS (Ríos y col. 1995 a).**

#### **3.1.- EFECTO DE INTERFERON SOBRE LA SINTESIS DE RNA Y SUBPARTICULAS VIRALES EN CELULAS MA104 INFECTADAS CON ROTAVIRUS SA11.**

Se determinó el efecto de IFN  $\alpha$ -2a sobre la replicación de SA11 en células MA104. Las células se preincubaron por 24 horas con distintas concentraciones de IFN  $\alpha$ -2a (0,1000, 2000, 5000 y 10000 U.I./ml). A continuación, los cultivos se infectaron con 10 u.f.p./cél de SA11. Después de retirado el inóculo, las células se mantuvieron en presencia de interferón. El RNA viral sintetizado se marcó utilizando como precursor radioactivo  $^{32}\text{P-H}_3\text{PO}_4$  y se determinó como se describe en Métodos. Las células infectadas se incubaron a 37 C durante 9 horas. Las células controles pseudo-infectadas no presentaron efectos citopáticos evidentes con ninguna de las concentraciones de interferón utilizadas, por al menos 48 horas de incubación.

En la Figura 13 A se muestra el efecto de la adición de interferón sobre la síntesis de RNA viral en células MA104 infectadas con rotavirus SA11. Se puede observar la síntesis de los 11 segmentos de RNA genómico en células no tratadas con interferón (carril 1). Al tratar las células con IFN  $\alpha$ -2a se observó inhibición de la replicación de rotavirus SA11, en forma dependiente de la concentración, lo cual se relaciona con la disminución de la incorporación de radioactividad a los segmentos genómicos de rotavirus al aumentar la dosis de interferón agregada (carriles 1 - 5). Se observó inhibición de la síntesis de RNA genómico cuando las células infectadas se trataron con una concentración de 2000 U.I./ml de IFN $\alpha$ -2a y con 10000 U.I./ml de IFN $\alpha$ -2a hubo

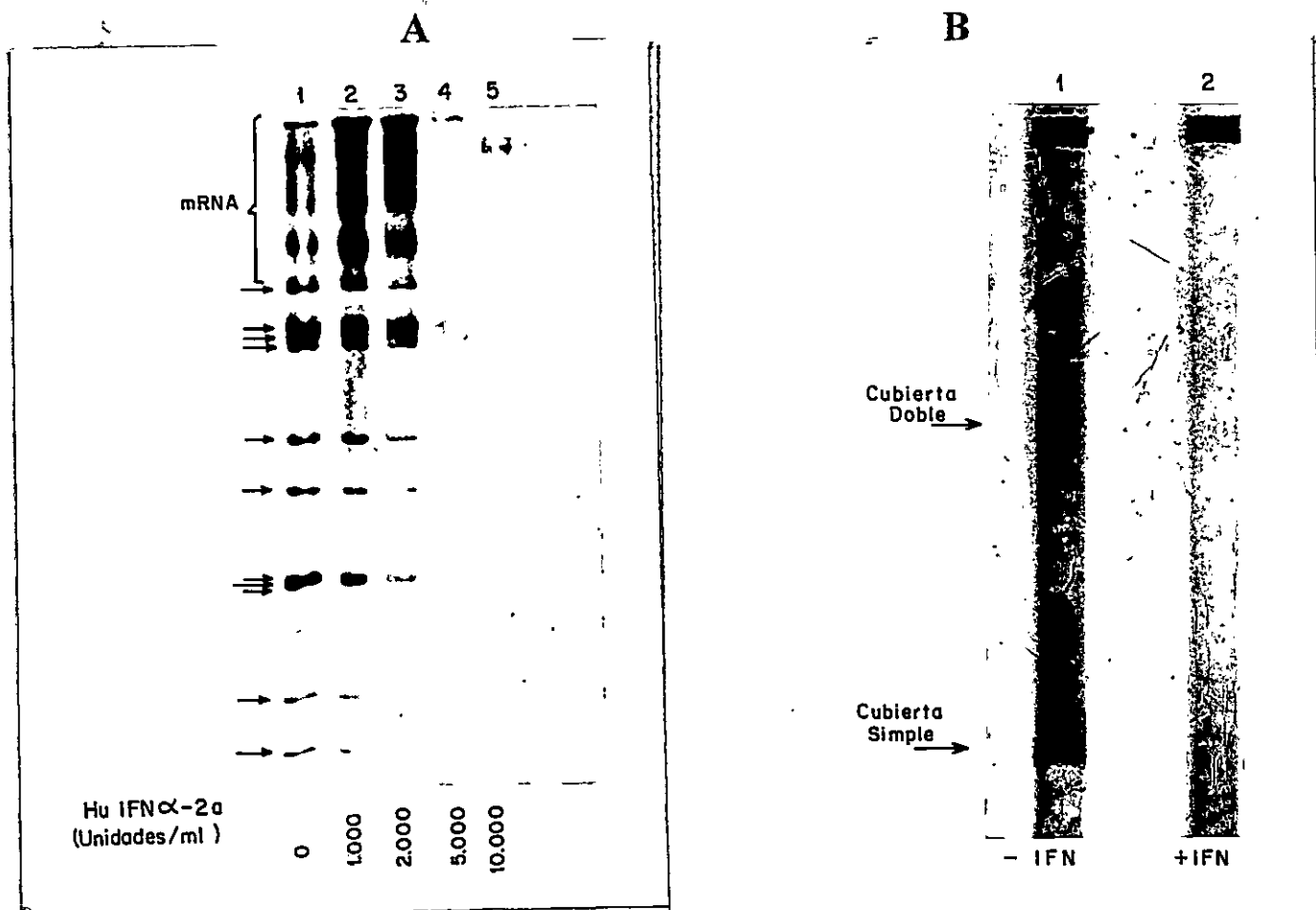


FIGURA 13

**EFFECTO DE INTERFERON SOBRE LA SINTESIS DE RNA Y SUBPARTICULAS VIRALES EN CELULAS MA104 INFECTADAS CON ROTAVIRUS SA11.**

**PANEL A:** Células MA104, preincubadas por 24 horas con las concentraciones indicadas de IFN  $\alpha$ -2a, se infectaron con 10 u.f.p/célula de SA11 y posteriormente se incubaron en presencia de 20  $\mu$ Ci/ml de  $^{32}$ P- $H_3PO_4$  y 0, 1000, 2000, 5000 y 10000 U.I./ml de interferón (carriles 1 al 5 respectivamente). La figura muestra una autorradiografía de un gel de poliacrilamida donde se analizó mediante electroforesis el RNA viral sintetizado a las 9 horas post-infección.

**PANEL B:** La figura muestra una autorradiografía de un gel de agarosa en el cual se analizaron mediante electroforesis subpartículas virales de SA11 marcadas con  $^{35}$ S-metionina, purificadas desde células MA104 no tratadas o tratadas con 10000 U.I./ml de IFN  $\alpha$ -2a (carriles 1 y 2 respectivamente). Las subpartículas se cosecharon a las 6 horas post-infección.

observar que la fracción correspondiente a los mRNAs, que migran en la parte superior del gel, también se encuentra disminuída por el tratamiento con interferón. Al infectar con una menor multiplicidad de infección (1 u.f.p./célula) y analizar el RNA viral sintetizado a las 24 horas postinfección, también fue evidente el efecto inhibitor del interferón (Datos no mostrados).

El efecto de interferón sobre la síntesis de subpartículas virales, en células infectadas con SA11, se determinó infectando las células con una multiplicidad de infección de 10 e incubando en presencia de  $^{35}\text{S}$ -metionina con el fin de marcar radioactivamente las proteínas virales. Las subpartículas virales sintetizadas en ausencia o en presencia de 10000 U.I./ml de IFN  $\alpha$ -2a se analizaron por electroforesis en gel de TGA y autorradiografía.

En la Figura 13 B, carril 1, se observa que las células infectadas con SA11, no tratadas con IFN, sintetizaron subpartículas de rotavirus cuya migración corresponde a la de partículas de cubierta simple y doble. No se observó banda en posiciones inferiores del gel que pudieran corresponder a subpartículas tipo "core". Sin embargo, en células incubadas con 10000 U.I./ml de IFN  $\alpha$ -2a, e infectadas con rotavirus SA11, no se detectaron bandas correspondientes a subpartículas de rotavirus (carril 2).

### **3.2.- EFECTO DE 2',5'-OLIGOADENILATOS Y 3',5'-OLIGOADENILATOS SOBRE LA SÍNTESIS DE mRNA VIRALES *in vitro*.**

Los 2',5'-oligoadenilatos son los intermediarios de la acción antiviral de interferón que podrían afectar en forma directa la síntesis de ácidos nucleicos virales, como se ha descrito para otros virus (Goswami y col. 1982, Henderson y col. 1982, Liu y Owens 1987, Montefiori y col. 1989, Subramanian y col. 1990, Schröder y col. 1992). Para determinar si la acción antiviral del interferón está mediada por un efecto directo sobre las

etapas de la morfogénesis de rotavirus, síntesis de RNA(+) y/o síntesis de RNA(-), se analizó el efecto de 2',5'-oligoadenilatos sobre estas etapas, utilizando los respectivos ensayos descritos en Métodos.

El efecto de análogos de 2',5'-oligoadenilatos sobre la transcripción *in vitro* de rotavirus se determinó agregando concentraciones crecientes de cada análogo a mezclas de transcripción que contenían viriones activados por calor, XTP 0,2 mM cada uno y [<sup>3</sup>H]-UTP 0,24 mM (A.E.: 100 cpm/pmol). Luego de una incubación de 30 minutos se determinó la radioactividad incorporada a material ácido insoluble. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la actividad RNA polimerasa comparada con una reacción control efectuada sin la adición de análogo.

Los resultados se muestran en la Figura 14 A y 14 B. El panel A de la Figura 14, representa el efecto de la adición de 2',5'-oligoadenilatos con distinto largo de cadena y con su extremo 5' no fosforilado. Se observa que 2',5'-oligoadenilatos no fosforilados en su extremo 5', que contienen 4 o más residuos de adenina, inhiben la síntesis de RNA en forma dosis dependiente. Aquellos oligoadenilatos con menos de 4 residuos de adenina no inhibieron la transcripción de rotavirus. El pentaoligoadenilato inhibió más del 50% la transcripción de rotavirus con una concentración de 0,2 mM (C.I.<sub>50</sub> = 0,15 mM).

El panel B de la Figura 14 representa el efecto de la adición de 2',5'-oligoadenilatos con distinto número de residuos de adenina y con su extremo 5' monofosforilado. Se observa un incremento en el efecto inhibitorio de la transcripción de rotavirus con 2',5'-oligoadenilatos fosforilados en su extremo 5', respecto al obtenido con 2',5'-oligoadenilatos no fosforilados en el extremo 5'. La C.I.<sub>50</sub> para el 2',5'-tetraadenilato-5'-monofosfato fue de 0,18 mM y para el 2',5'-hexaadenilato-5'-monofosfato de 0,15 mM. Al comparar el efecto del tetraoligoadenilato fosforilado y no fosforilado se observa hasta un 80 % de inhibición

con el análogo fosforilado, mientras que con el análogo no fosforilado la inhibición llegó hasta un 35 %.

Para determinar la especificidad de este efecto sobre la síntesis de RNA(+) de rotavirus *in vitro* se determinó el efecto de algunos compuestos 3',5'-oligoadenilatos. En la Figura 15 se representa el efecto de la adición de 3',5'-oligoadenilatos, con distinto largo de cadena y con su extremo 5' no fosforilado, sobre la síntesis de RNA(+) de rotavirus *in vitro*. Se observa que 3',5'-oligoadenilatos con 6 o menos residuos de adenina no inhiben la transcripción de rotavirus. Sólo el 3',5'- decaoligoadenilato inhibió la actividad de la RNA polimerasa en forma dosis dependiente, con una C.I.<sub>50</sub> de 0,18 mM.

Las características de la inhibición de la transcripción *in vitro* por 2',5'-oligoadenilatos se determinaron utilizando el análogo (p(A2'p5'))<sub>3</sub>A en concentración 144 M. Las concentraciones de la mezcla de nucleótidos (ATP, CTP, GTP) variaron entre 0 y 200 µM de cada uno y la reacción se incubó por 15 minutos a 45 °C. En la Figura 16 se muestra una gráfica de Lineweaver-Burk, la cual indica que el 2',5'-oligonucleótido presentó un mecanismo de inhibición de tipo competitivo con una Ki de 256 µM.

### 3.3.- EFECTO DE 2',5'-OLIGOADENILATOS SOBRE LA SÍNTESIS DE RNA(-) *in vitro*.

El efecto de los 2',5'-oligoadenilatos sobre la síntesis de RNA(-) se determinó utilizando subpartículas de SA11 aisladas 6 horas post-infección. Las subpartículas se incubaron en una mezcla de reacción que contenía XTP 0,2 mM de cada uno, α-[<sup>32</sup>P]-UTP 40 M, (A.E.:3000 cpm/ pmol) y los diferentes análogos de oligonucleótidos en concentración 0,6 mM. La síntesis de RNA de doble hebra en la reacción se determinó como se describe en Métodos.

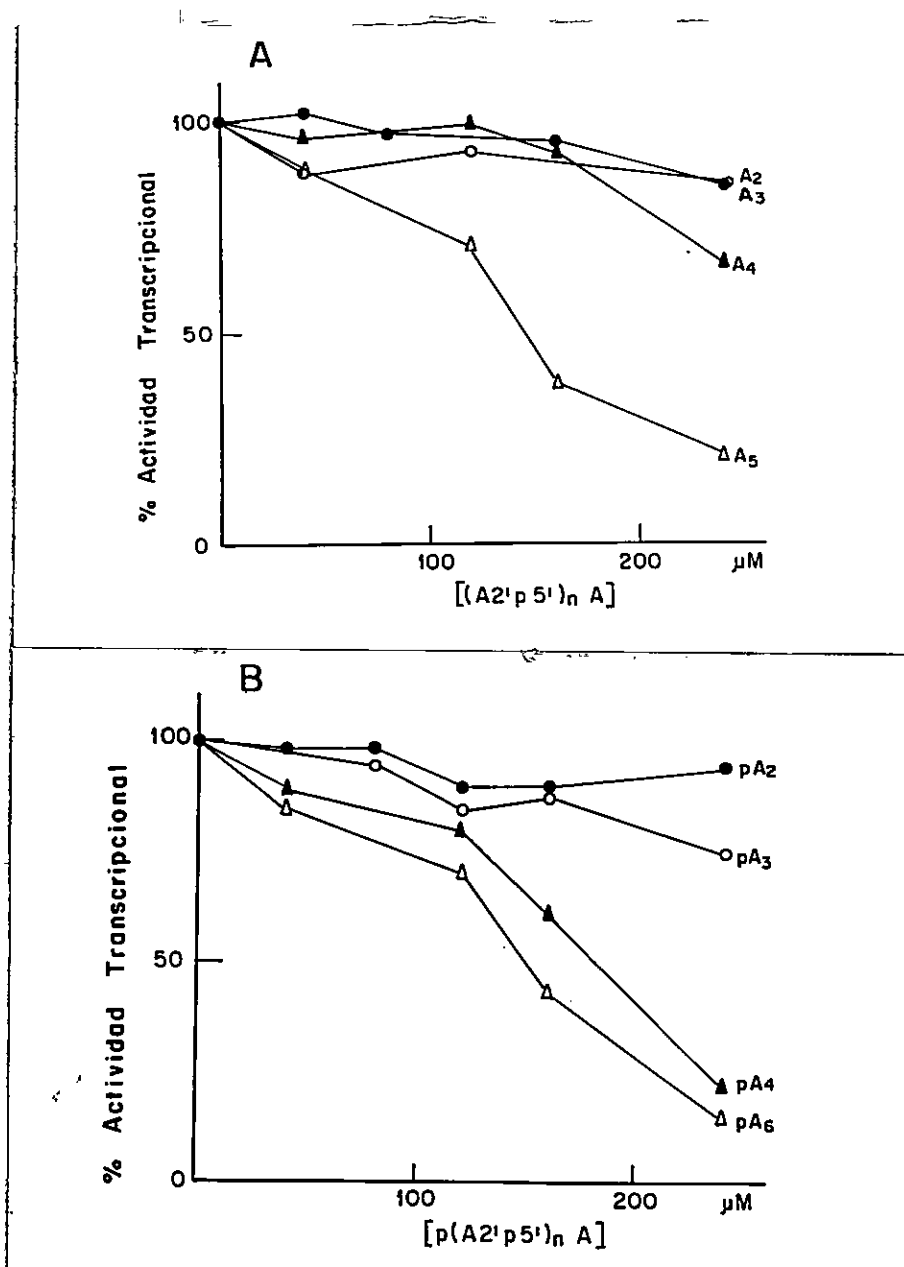
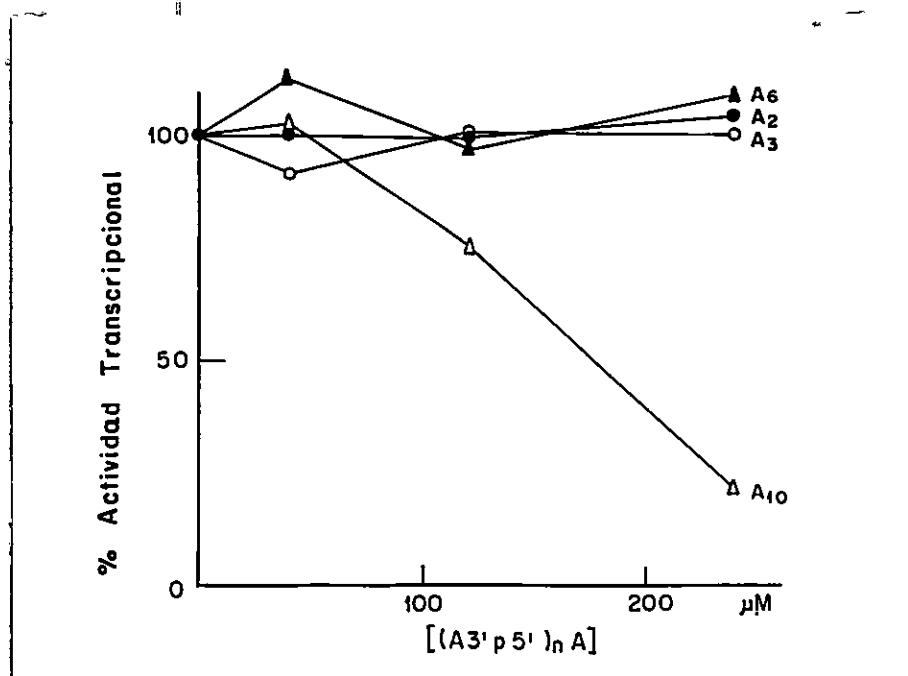


FIGURA 14

**EFFECTO DE 2',5'-OLIGOADENILATOS SOBRE LA TRANSCRIPCION DE ROTAVIRUS SA11 *in vitro*.**

La actividad RNA polimerasa de viriones de SA11 silvestre tratadas con calor se determinó a través de la incorporación de  $^3\text{H}$ -UMP a material insoluble en ácido, en presencia de XTP 0,2 mM cada uno,  $[\text{H}^3]$ -UTP 0,24 mM (A.E.: 100 cpm/pmol) y de concentraciones crecientes de: A.- 2',5'-oligoadenilatos 5'-no fosforilados de diferente largo de cadena y B.- 2',5'-oligoadenilatos 5'-monofosforilados de distinto largo de cadena. Los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad transcripcional remanente respecto a una reacción control efectuada en ausencia de análogo.

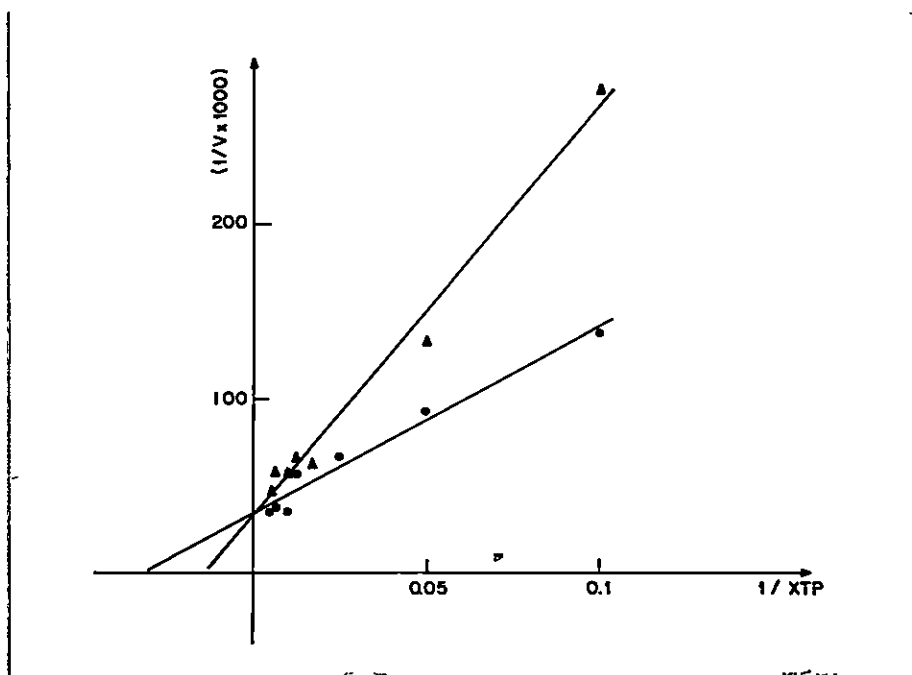


**FIGURA 15**

**EFFECTO DE 3',5'-OLIGOADENILATOS SOBRE LA TRANSCRIPCION DE ROTAVIRUS *in vitro*.**

La actividad RNA polimerasa de partículas purificadas de SA11, tratadas con calor se determinó a través de la incorporación de  $^3\text{H}$ -UMP a material insoluble en ácido, en presencia de XTP 0,2 mM cada uno,  $[\text{H}^3]$ -UTP 0,24 mM (A.E.: 100 cpm/pmol) y de concentraciones crecientes de 3',5'-oligoadenilatos no fosforilados, de distinto largo de cadena. Los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad transcripcional remanente, respecto a una reacción control efectuada en ausencia de análogo.





**FIGURA 16**  
**CINETICA DE INHIBICION DE LA TRANSCRIPCION DE ROTAVIRUS *in vitro* POR 5'-MONOFOSFATO 2',5'-TETRAADENILATO.**

La figura muestra la gráfica de Lineweaver-Burk, donde se analiza el mecanismo de inhibición de la transcripción *in vitro* de rotavirus por 2',5'-oligoadenilatos utilizando el análogo  $(p(A2'p5'))_3A$  en concentración  $144 \mu M$ . Las reacciones efectuadas, en ausencia (•) o en presencia de análogo (▲), utilizaron viriones de SA11 activados por calor e incubados en una mezcla de transcripción *in vitro* que contenía concentraciones de la mezcla de nucleótidos (ATP, CTP, GTP) que variaron entre 0 y  $200 \mu M$  de cada uno. Las reacciones se incubaron a  $45^\circ C$  por 15 minutos.

La Figura 17 corresponde a una autorradiografía del gel correspondiente, en la cual se señala la migración de los 11 segmentos de RNA de doble hebra de rotavirus sintetizados en las diferentes condiciones ensayadas. El carril 1 corresponde a los productos de una reacción control efectuada en ausencia de cualquier análogo. El carril 2 corresponde a una reacción control efectuada en presencia de 0,2 mM de AraATP. Los siguientes carriles corresponden a los productos de reacciones efectuadas en presencia de los siguientes análogos de oligoadenilatos, todos en concentración 0,6 mM: 2',5'-diadenilato, 2',5'-diadenilato-5'-monofosfato, 2',5'-triadenilato, 2',5'-triadenilato-5'-monofosfato, 2',5'-triadenilato-5'-trifosfato, 2',5'-tetraadenilato, 2',5'-tetraadenilato-5'-monofosfato, 2',5'-tetraadenilato-5'-trifosfato, 2',5'-pentaadenilato, 2',5'-pentaadenilato-5'-monofosfato, 3',5'-triadenilato, 3',5'-hexaadenilato y 3',5'-decaadenilato (carriles 3-15 respectivamente).

Se observa que en la reacción control efectuada en ausencia de análogo se sintetizan los 11 segmentos de RNA de doble hebra (carril 1) de la cepa SA11. A diferencia de lo que se observó en los estudios de inhibición de la transcripción *in vitro*, ninguno de los oligoadenilatos ensayados afectó significativamente la síntesis de RNA de doble hebra de rotavirus *in vitro*, independientemente del largo de cadena, de la presencia de grupos fosfato en el extremo 5' y del tipo de enlace fosfodiéster (carriles 3-15).

En estas reacciones se utilizaron concentraciones de los oligoadenilatos 2,5 veces superiores a las máximas concentraciones utilizadas para determinar el efecto de estos compuestos sobre la transcripción de rotavirus *in vitro*. En estas mismas condiciones de reacción, la adición de AraATP en concentración 0,2 mM provocó una fuerte inhibición en la síntesis de RNA(-) *in vitro* (carril 2).

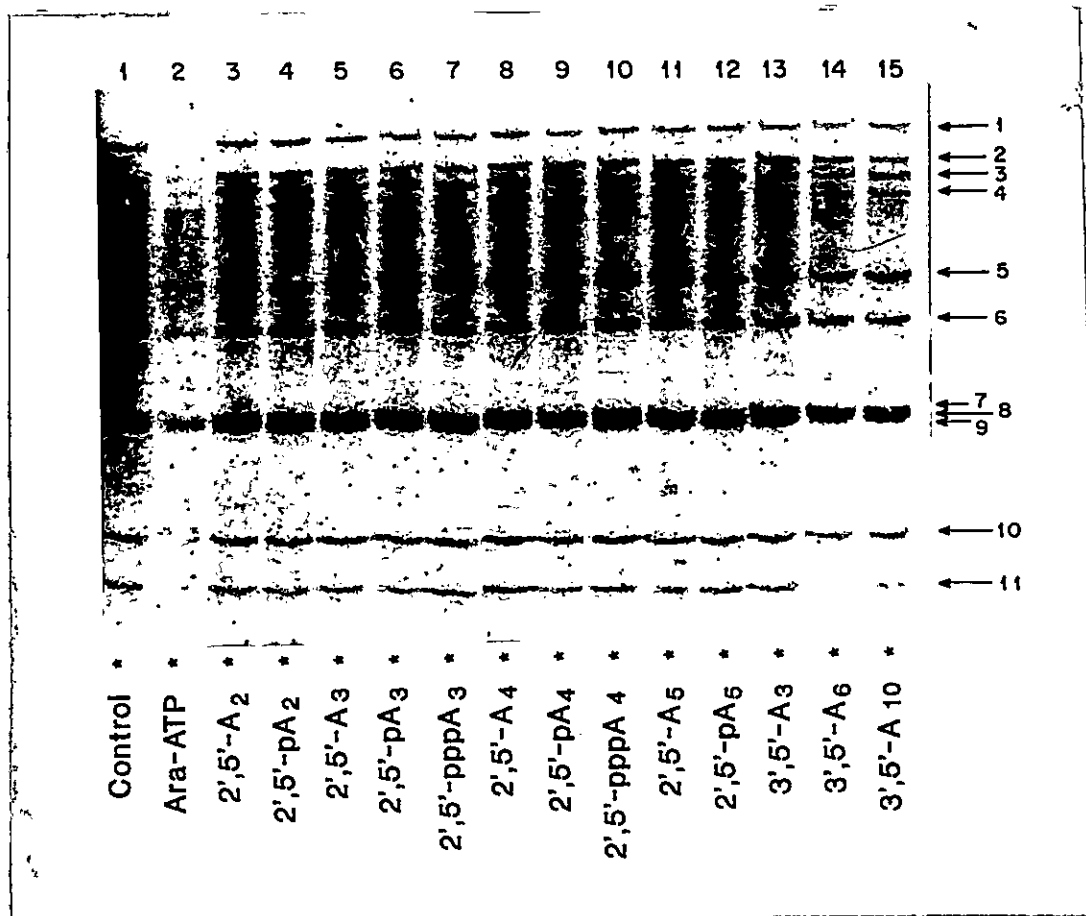


FIGURA 17

**EFFECTO DE 2',5'-OLIGOADENILATOS Y 3',5'-OLIGOADENILATOS SOBRE LA SINTESIS DE RNA(-) *in vitro* CATALIZADA POR SUBPARTICULAS DE ROTAVIRUS SA11.**

El efecto de 2',5'-oligoadenilatos y 3',5'-oligoadenilatos sobre la síntesis de RNA(-) *in vitro* por subpartículas de SA11 se determinó mediante la incorporación de  $^{32}\text{P}$ -UMP a los segmentos de RNA de doble hebra sintetizados en la reacción. La figura corresponde a una autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el cual se analizaron mediante electroforesis los productos de reacciones realizadas en presencia de XTP 0,2 mM de cada uno,  $\beta$ - $^{32}\text{P}$ -UTP 40  $\mu\text{M}$  (A.E.:3000 cpm/pmol) y de los diferentes oligoadenilatos, cada uno en concentración 0,6 mM. En la figura se señala la migración de los 11 segmentos de RNA de doble hebra de rotavirus sintetizados en las diferentes condiciones ensayadas. El carril 1, corresponde a los productos de una reacción control efectuada en ausencia de cualquier análogo. El carril 2, corresponde a una reacción control efectuada en presencia de 0,2 mM de AraATP. Los carriles 3 al 15 corresponden a reacciones efectuadas en presencia de: 2',5'-diadenilato; 2',5'-diadenilato-5'-monofosfato; 2',5'-triadenilato; 2',5'-triadenilato-5'-monofosfato; 2',5'-triadenilato-5'-trifosfato; 2',5'-tetraadenilato; 2',5'-tetraadenilato-5'-monofosfato; 2',5'-tetraadenilato-5'-trifosfato; 2',5'-pentaadenilato; 2',5'-pentaadenilato-5'-monofosfato; 3',5'-triadenilato; 3',5'-hexaadenilato y 3',5'-decaadenilato, respectivamente.

#### **4.- ESTUDIO DEL EFECTO DE FOSCARNET EN LA MORFOGENESIS DE ROTAVIRUS (Ríos y col. 1995 b).**

##### **4.1.- EFECTO DE FOSCARNET SOBRE LA SINTESIS DE RNA Y SUBPARTICULAS VIRALES DE ROTAVIRUS SA11 EN CELULAS MA104.**

Para determinar el efecto de foscarnet sobre la síntesis de RNA viral *in vivo* se infectaron células MA104 con diferentes multiplicidades de infección de SA11 y luego se incubaron a 37 °C, en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de foscarnet.

Las células MA104 se preincubaron con foscarnet en concentraciones 0-3 mM y DEAE-dextrán 20 µg/ml, durante 2,5 horas. Posteriormente, las células se infectaron con rotavirus SA11 activado con tripsina utilizando multiplicidades de infección de 1 y 10, incubándolas nuevamente con las mismas concentraciones de foscarnet que las utilizadas en la preincubación y en presencia de  $^{32}\text{P-H}_3\text{PO}_4$ . A las 8 horas post-infección se analizó el efecto de foscarnet sobre la síntesis de RNA viral, siguiendo el procedimiento descrito en Métodos. Al igual que en los experimentos anteriores, células no-infectadas se incubaron con foscarnet en las mismas condiciones que las células infectadas, no observando efecto citopático con ninguna de las concentraciones de foscarnet utilizadas, hasta al menos 24 horas de incubación.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18. Cuando las células se infectaron con 10 u.f.p./célula, después de 8 horas de infección, la cantidad de RNA de doble hebra detectada en las células infectadas disminuyó en forma importante al ser tratadas con concentraciones crecientes de foscarnet, pero en ningún caso la inhibición fué completa (Panel A, carriles 1-4). Sin embargo, al analizar el RNA viral presente en el medio de incubación (Panel B, carriles 1-4), se observó una gran disminución de la síntesis de los segmentos de RNA de doble hebra de rotavirus al aumentar la

concentración de foscarnet.

Al analizar el efecto de PFA sobre células infectadas con 1 u.f.p./célula de SA11, la inhibición de la multiplicación viral se observó en forma importante con una concentración de foscarnet de 1 mM y con 2 mM fue casi total (Panel A, carriles 5-7). En estas condiciones, no se detectó RNA de doble hebra en el medio de incubación de las células infectadas, control y tratadas con PFA.

Cuando se determinó el efecto de PFA sobre la síntesis de subpartículas de SA11 en células MA104 infectadas se procedió como en el experimento descrito anteriormente, preincubando las células en ausencia y presencia de 3 mM de foscarnet, durante 2,5 horas. Luego, se infectó con 10 u.f.p./célula de SA11 y se incubó durante 6 horas en presencia de [<sup>35</sup>S]-metionina en las mismas condiciones de la preincubación. Las subpartículas virales se analizaron según el procedimiento ya descrito en Métodos. En las células infectadas con SA11, en ausencia de foscarnet, se observó la síntesis de subpartículas de cubierta simple y doble; sin embargo, cuando las células se trataron con foscarnet se observó inhibición de la síntesis de subpartículas virales, al igual que en el caso del interferón (Datos no mostrados).

Para determinar cual de las etapas de la morfogénesis de rotavirus que conducen a la síntesis de RNA y subpartículas virales se encuentra afectada por la acción antirotavirus de foscarnet, utilizando los sistemas libres de células descritos anteriormente en esta tesis, se analizó si este análogo de pirofosfato presentaba un efecto directo sobre la síntesis de mRNA y RNA(-) de rotavirus.

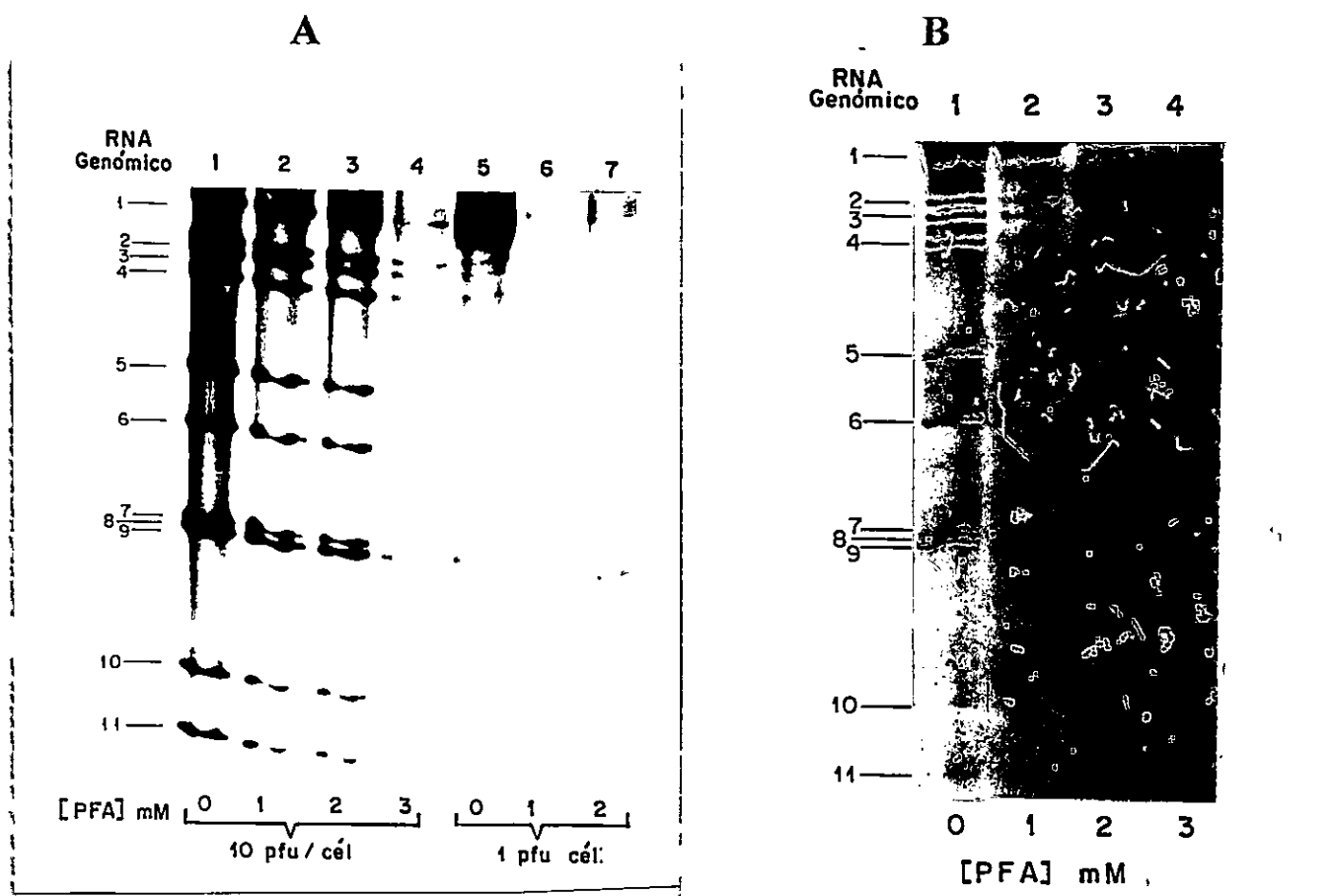


FIGURA 18

**EFFECTO DE FOSCARNET SOBRE LA REPLICACION DE ROTAVIRUS SA11, EN CELULAS MA104 INFECTADAS.**

**PANEL A:** Células MA104, preincubadas 2,5 horas con las concentraciones indicadas de Foscarnet, se infectaron con 1 y 10 u.f.p./célula de SA11 y posteriormente se incubaron en presencia de 20  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{32}\text{P-H}_3\text{PO}_4$  y con las siguientes concentraciones de foscarnet: 0 mM (carriles 1 y 5), 1 mM (carriles 2 y 6), 2 mM (carriles 3 y 7) y 3 mM (carril 4). La figura corresponde a una autorradiografía de un gel de poliacrilamida, donde se analizó mediante electroforesis el RNA viral extraído desde las células 8 horas postinfección. Se indica la migración de los 11 segmentos de RNA genómico de rotavirus.

**PANEL B:** La figura corresponde a una autorradiografía de un gel de poliacrilamida, donde se analizó mediante electroforesis el RNA viral extraído 8 horas postinfección, desde el medio de incubación de células MA104 infectadas con 10 u.f.p./célula de SA11 y tratadas con las concentraciones indicadas de foscarnet. Se indica la migración de los 11 segmentos de RNA genómico de rotavirus.

#### 4.2.- EFECTO DE FOSCARNET SOBRE LA SINTESIS DE mRNA *in vitro*.

El efecto de foscarnet sobre la transcripción de rotavirus *in vitro* se determinó utilizando viriones de SA11 purificados y activados por calor, así como también subpartículas virales aisladas, que se agregaron a mezclas de transcripción estándar y se incubaron en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de foscarnet, utilizando 4 mM de cada uno de los XTP y  $^3\text{H}$ -UTP 0,24 mM (A.E.: 100 cpm/pmol). Al término de la incubación se determinó la actividad de la RNA polimerasa de rotavirus mediante la incorporación de radioactividad asociada a material insoluble en ácido. El efecto de PFA se expresó como el porcentaje de actividad transcripcional obtenido respecto a una reacción realizada en ausencia del análogo de pirofosfato.

Los resultados de la curva dosis-respuesta se muestran en la Figura 19 A. Se observa que foscarnet inhibe la transcripción de rotavirus en forma dosis-dependiente. Cuando se utilizaron viriones purificados, el 50 % de inhibición se observó con concentraciones aproximadamente de 180  $\mu\text{M}$  llegando al 80 % con concentraciones de 800  $\mu\text{M}$ . Una curva dosis-respuesta casi idéntica a la anterior se obtuvo con subpartículas de rotavirus aisladas desde células MA104 infectadas con SA11; estas preparaciones de subpartículas catalizan tanto la síntesis de RNA(+) como de RNA(-), producto que no fue tratado con RNasa A. En estas condiciones, el 50 % de inhibición se obtuvo con aproximadamente 150  $\mu\text{M}$  de foscarnet y el 80 % de inhibición con 800 M del análogo.

En reacciones catalizadas por rotaviriones activados por calor, el efecto de foscarnet sobre los productos de transcripción se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-urea, visualizando los productos por autorradiografía del gel. En la Figura 19 B se observa el efecto inhibitorio dosis-dependiente de foscarnet sobre la síntesis de los 11 segmentos de mRNA de rotavirus, los cuales fueron afectados en igual

**FIGURA 19**  
**EFFECTO DE FOSCARNET SOBRE LA TRANSCRIPCION DE ROTAVIRUS SA11 *in vitro*.**

**PANEL A:** La actividad RNA polimerasa de viriones de SA11 activados por calor ( • ) y de subpartículas de SA11 aisladas 6 horas p.i ( ▲ ) se determinó a través de la incorporación de  $^{32}\text{P}$ -UMP en material insoluble en ácido en presencia de XTP 4 mM cada uno,  $^{32}\text{P}$ -UTP 40  $\mu\text{M}$  (A.E.: 3000 cpm/pmol) y de concentraciones crecientes de foscarnet. Los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad transcripcional remanente, respecto a una reacción control efectuada en ausencia del análogo de pirofosfato.

**PANEL B:** La figura corresponde a una autorradiografía de un gel de poliacrilamida-urea donde se analizaron mediante electroforesis los productos de reacciones de transcripción *in vitro*, efectuadas en presencia de XTP 4 mM cada uno,  $^{32}\text{P}$ -UTP 40  $\mu\text{M}$  (A.E.: 3000 cpm/pmol) y de concentraciones crecientes de foscarnet. Se indica en la figura la migración de los 11 segmentos de mRNA sintetizados.





proporción. La adición de concentraciones de foscarnet superiores a 0,8 mM inhiben prácticamente en forma total la transcripción de rotavirus.

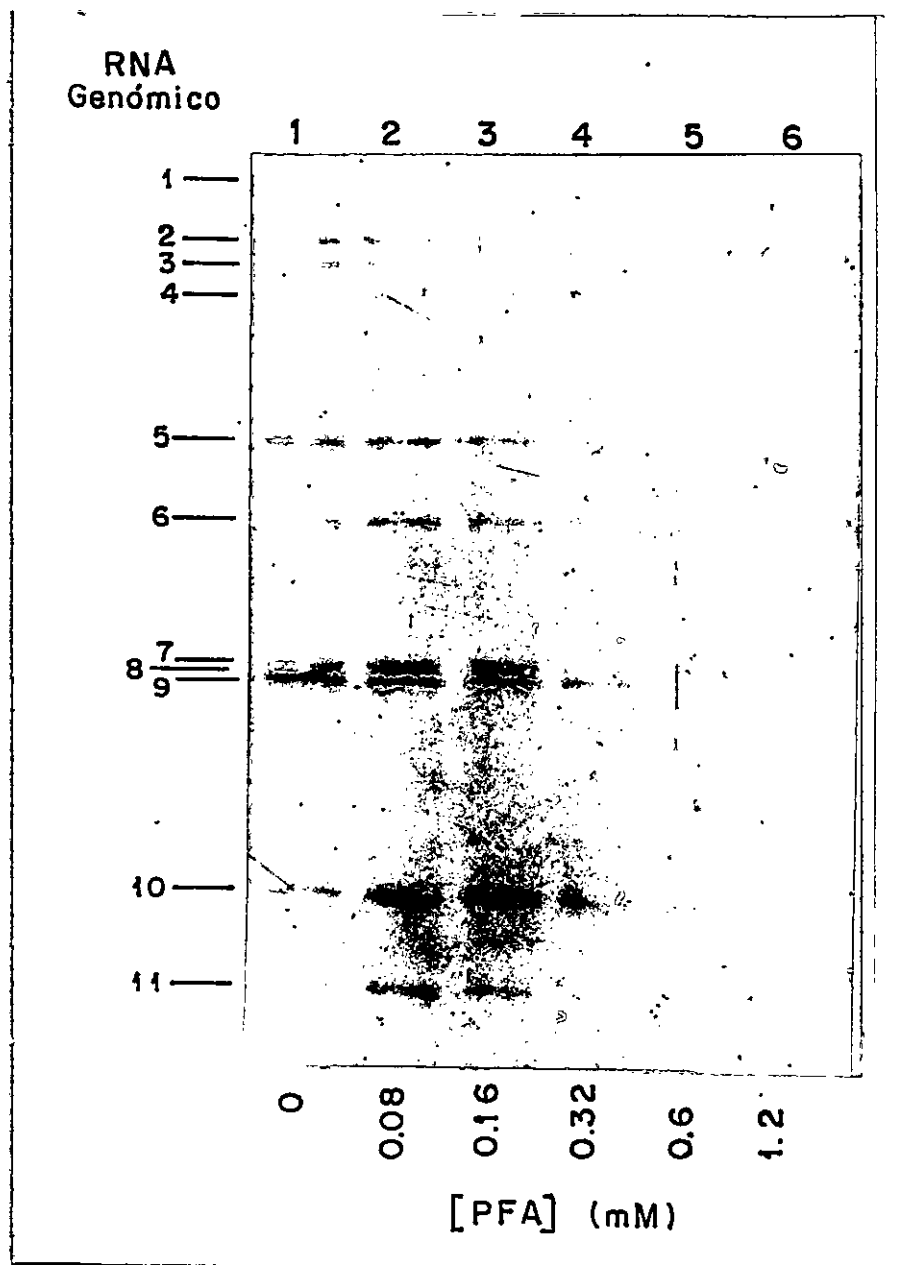
#### **4.3.- EFECTO DE FOSCARNET SOBRE LA SINTESIS DE RNA(-) *in vitro*.**

El efecto de foscarnet sobre la síntesis de RNA de doble hebra *in vitro* se determinó agregando concentraciones crecientes del análogo a mezclas de reacción estándar que contenían subpartículas de SA11, XTP 4 mM cada uno y  $^{32}\text{P}$ -UTP 40  $\mu\text{M}$ , (A.E.: 3000 cpm/pmol). Al término de la incubación y luego del tratamiento con RNasa A, las muestras se analizaron como está descrito anteriormente.

En la Figura 20 se observa una autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el cual se analizaron mediante electroforesis los productos de reacciones realizadas en presencia de 0; 0,08; 0,16; 0,32; 0,6 y 1,2 mM de foscarnet (carriles 1 - 6). Se indica la migración de cada uno de los 11 segmentos de RNA de doble hebra de rotavirus. Es posible observar que el foscarnet inhibió en forma dosis-dependiente a la RNA polimerasa viral, en el mismo rango de concentración en que ocurre la inhibición de la actividad de transcripción del RNA de rotavirus *in vitro* (Figura 19). Así, con una concentración de foscarnet de 320  $\mu\text{M}$  se observa una inhibición superior al 80 %.

#### **4.4.- EFECTO DE FOSCARNET SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE ROTAVIRUS SA11 Y DE LA MUTANTE TERMOSENSIBLE DE ROTAVIRUS SA11, tsC.**

Considerando que foscarnet inhibe la transcripción de rotavirus en forma dosis dependiente, y que está descrito que actúa sobre RNA polimerasas, se comparó el efecto de foscarnet sobre la actividad de síntesis de mRNA por viriones de SA11 y de la mutante



**FIGURA 20**  
**EFFECTO DE FOSCARNET SOBRE LA SINTESIS DE RNA(-) *in vitro***  
**CATALIZADA POR SUBPARTICULAS DE ROTAVIRUS SA11.**

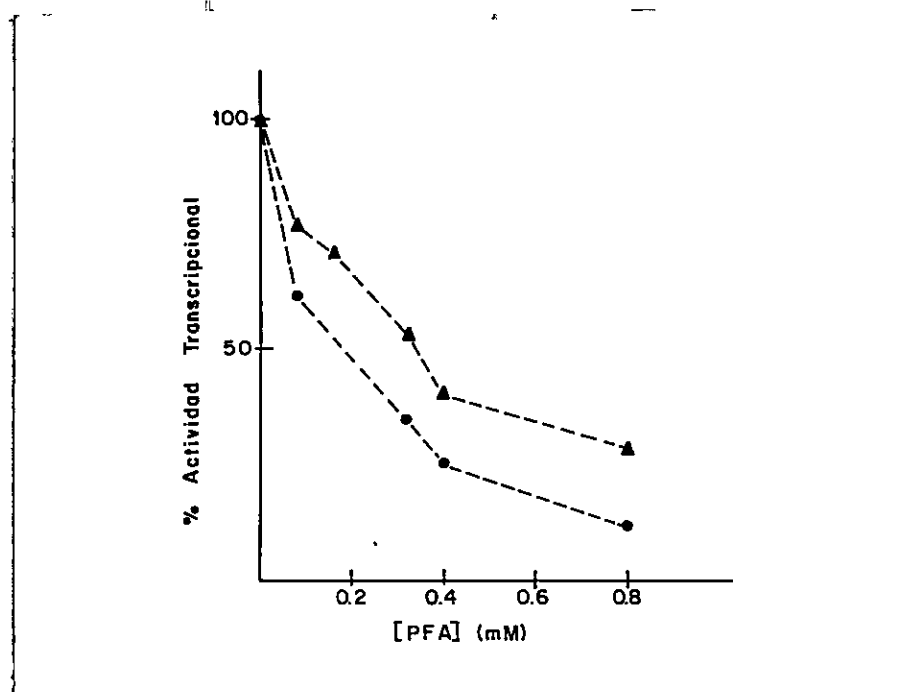
La figura muestra una autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el cual se analizaron mediante electroforesis los productos de reacciones de síntesis de RNA(-) *in vitro* realizadas en presencia de XTP 4 mM cada uno,  $^{32}\text{P}$ -UTP 40  $\mu\text{M}$  (A.E.: 3000 cpm/pmol) y las concentraciones indicadas de foscarnet. Al final de la reacción todas las muestras se trataron con RNasa A. Se indica en la figura la migración de los 11 segmentos genómicos sintetizados.

termosensible de SA11, tsC. La mutante tsC posee una mutación en el gen 1, que codifica para la proteína VP1, la cual se postula es la RNA polimerasa viral. Tanto el virus silvestre como el virus mutante se incubaron en iguales condiciones a 45 °C por 30 minutos, temperatura permisiva *in vitro* para la mutante (Muñoz y col. 1995).

En la Figura 21 se observa el comportamiento de las dos cepas virales cuando se analizó la síntesis de RNA(+) en presencia de concentraciones crecientes del análogo de pirofosfato. La actividad de ambos virus fueron inhibidas por foscarnet en forma dosis-dependiente; sin embargo, la mutante tsC presenta una mayor resistencia a la inhibición de la transcripción por foscarnet (C.I.<sub>50</sub> de 0,18 mM para SA11 silvestre y de 0,37 mM para la mutante tsC).

##### **5.- EFECTO DE ANALOGOS DE NUCLEOSIDOS DERIVADOS DE 3'-AdT SOBRE LA REPLICACION DE ROTAVIRUS SA11 EN CELULAS MA104.**

Se analizó el efecto de análogos de nucleósidos sobre la síntesis de RNA de doble hebra de SA11 en células infectadas. Se estudiaron los siguientes compuestos: 3'-AdT, 3'-MMAAdT, 3'-DMAAdT, 3'-MEAdT, 3'-DEAdT, 3'-MPrAdT y 3'-DPrAdT, determinando en primer lugar el rango de concentraciones en las cuales estos compuestos no presentaban citotoxicidad. Posteriormente, se determinó el efecto de estos compuestos sobre la síntesis de RNA de doble hebra en células MA104 infectadas con rotavirus SA11 en distintas condiciones, siempre dentro del rango en que los compuestos no presentaron efecto citotóxico, no observando disminución de la síntesis de RNA de doble hebra en ninguna de las condiciones utilizadas (Datos no mostrados). Cuando se incorporó DEAE-dextrán al sistema, el que se utiliza para aumentar la entrada de compuestos que tienen



**FIGURA 21**  
**EFEECTO DE FOSCARNET SOBRE LA TRANSCRIPCION *in vitro***  
**CATALIZADA POR PARTICULAS VIRALES DE ROTAVIRUS SA11 Y DE LA**  
**MUTANTE TERMOSENSIBLE, tsC.**

La actividad RNA polimerasa de partículas purificadas de SA11 silvestre (●) y de la mutante termosensible tsC (▲), activadas por calor, se determinó en presencia de XTP 4 mM cada uno,  $^{32}\text{P}$ -UTP 40  $\mu\text{M}$  (A.E.: 3000 cpm/pmol) y de concentraciones crecientes de foscarnet mediante la incorporación de  $^3\text{H}$ -UMP a material ácido-insoluble. Los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad transcripcional remanente, respecto a una reacción control efectuada en ausencia de análogo.

dificultades para atravesar la membrana celular, tampoco se observó inhibición de la producción de RNA genómico viral por el tratamiento con 3'-AdT y sus derivados. No se analizó el efecto de preincubar las células con estos compuestos antes de la infección viral.

## **6.- EFECTO DE ANALOGOS DE NUCLEOTIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE SA11 Y DE MUTANTES TERMOSENSIBLES.**

### **6.1.- EFECTO DE 3'-AdTTP SOBRE LA TRANSCRIPCION *in vitro* DE SA11.**

El efecto de 3'-AdTTP sobre la síntesis de RNA(+) de SA11 *in vitro*, se determinó en las condiciones descritas en Métodos, usando XTP 0,1 mM cada uno y <sup>3</sup>H-UTP 0,24 mM (A.E.:100 cpm/pmol). En la figura 22 A se observa que 3'-AdTTP inhibió la síntesis de mRNA *in vitro* en forma dependiente de la concentración, con una C.I.<sub>50</sub> de 0,4 mM. Este efecto, sin embargo, se observó a concentraciones mayores de 3'-AdTTP que las requeridas, en las mismas condiciones, para obtener un efecto inhibitor de la transcripción *in vitro* con los análogos de ATP: AraATP, AraCTP o CordTP, cuyas C.I.<sub>50</sub> en estas condiciones fueron de 0,03; 0,04 y 0,02 mM respectivamente (Figura 22 B). Cuando se analizó el efecto de 3'-AdTTP sobre la síntesis de RNA(-) *in vitro* se observó también un efecto inhibitor en el mismo rango de concentración en el cual se observó el efecto sobre la transcripción *in vitro* (Datos no mostrados).

### **6.2.- EFECTO DE ARA-ATP Y CORD-TP EN LA TRANSCRIPCION *in vitro* DE SA11 Y DE LAS MUTANTES TERMOSENSIBLES tsB Y tsC (Muñoz y col 1995).**

Se comparó el efecto de los análogos de nucleótidos AraATP y CordTP sobre la síntesis de mRNA efectuada por viriones de SA11 y de las mutantes termosensibles en los genes que codifican para VP1 y VP3, tsC y tsB respectivamente. En reacciones

efectuadas con XTP 0,1 mM cada uno,  $^3\text{H}$ -UTP 0,24 mM (A.E.:100 cpm/pmol) y concentraciones crecientes del análogo de nucleótido, las C.I.<sub>50</sub> observadas fueron respectivamente de 0,02 mM, 0,06 mM y 0,07 mM para SA11, tsC y tsB al analizar el efecto de CordTP sobre la síntesis de mRNA viral y de 0,04 mM, 0,06 mM y 0,11 mM para SA11, tsC y tsB al realizar las reacciones en presencia de concentraciones crecientes de AraATP. Los resultados de reacciones efectuadas en presencia de 0,16 mM de cada uno de los análogos se muestran en la Figura 23. Se observa que los compuestos analizados afectaron en forma diferente la transcripción de la mutante tsC respecto de la cepa silvestre, presentando tsC una mayor resistencia a la inhibición de la síntesis de mRNA por estos compuestos. La cepa termosensible tsB también mostró una mayor resistencia a la acción de CordTP, mientras que en presencia de AraATP la transcripción *in vitro* de tsB es semejante a la observada con la cepa de SA11 silvestre. Esto puede estar de acuerdo con los mecanismos de inhibición competitivo y mixto para AraATP y CordTP respectivamente (Pizarro y col. 1991 b).

**FIGURA 22**  
**EFFECTO DE ANALOGOS DE NUCLEOTIDOS SOBRE LA TRANSCRIPCION**  
***in vitro* DE ROTAVIRUS SA11.**

**PANEL A: EFECTO DE 3'-AdTTP.**

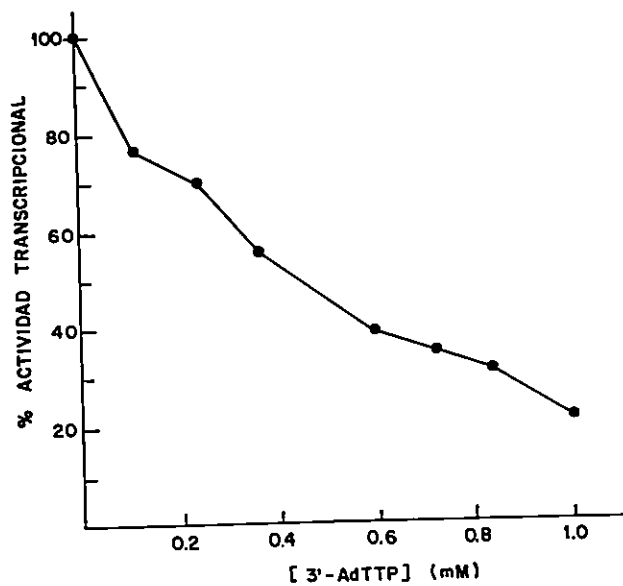
La actividad RNA polimerasa de viriones de SA11 activados por calor, se determinó en presencia de concentraciones crecientes de 3'-AdTTP, mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-UMP a material ácido-insoluble en reacciones efectuadas con 0,1 mM de cada uno de los XTP. Los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad transcripcional remanente, respecto a una reacción control efectuada en ausencia de análogo.

**PANEL B: EFECTO DE ARA-ATP, ARA-CTP Y CORD-TP.**

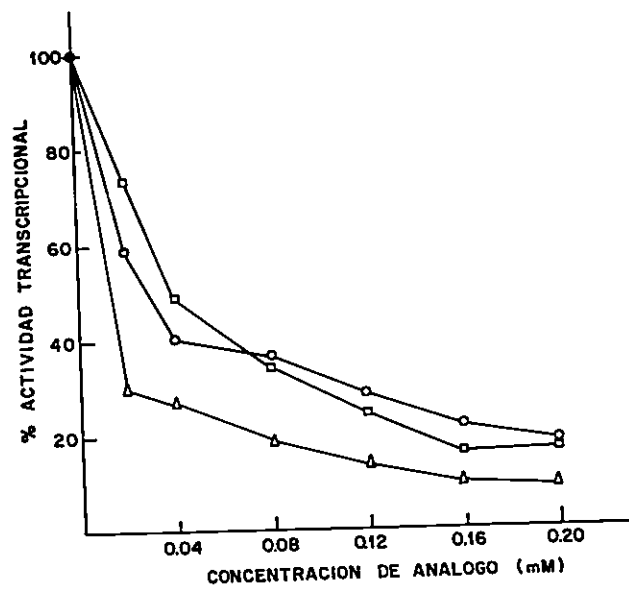
La actividad RNA polimerasa de viriones de SA11 activados por calor, se determinó en presencia de concentraciones crecientes de Ara-ATP ( ○ ), Ara-CTP ( □ ), y Cord-TP ( Δ ) mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-UMP a material ácido-insoluble en reacciones efectuadas con 0,1 mM de cada uno de los XTP. Los resultados se expresaron como el porcentaje de actividad transcripcional remanente, respecto a una reacción control efectuada en ausencia de análogo.

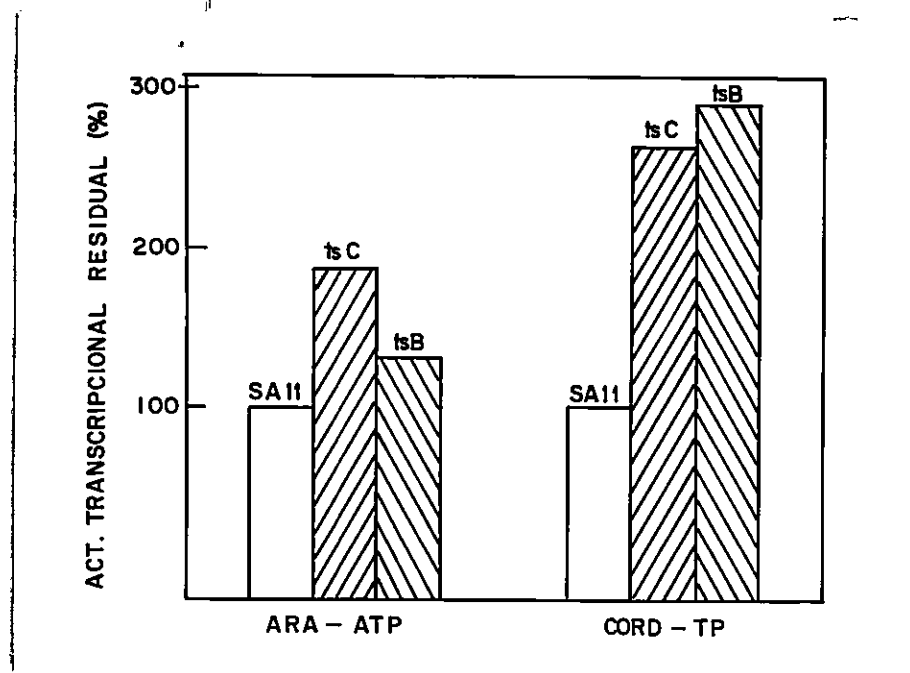


A



B





**FIGURA 23**

**EFEECTO DE ARA-ATP Y CORD-TP SOBRE LA TRANSCRIPCION *in vitro* CATALIZADA POR LAS MUTANTES TERMOSENSIBLES tsC Y tsB.**

La actividad RNA polimerasa de viriones de SA11 silvestre y de las mutantes tsB y tsC, activados por calor, se determinó en presencia de XTP 0,1 mM cada uno,  $^3\text{H}$ -UTP 0,24 mM (A.E.:100 cpm/pmol) y de 0,16 mM de AraATP ó 0,16 mM de CordTP, mediante la incorporación de  $^3\text{H}$ -UMP a material ácido-insoluble. Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición respecto a una reacción control efectuada en ausencia de análogo. Las barras representan el aumento en la resistencia a la acción del análogo, comparado con la cepa de SA11 silvestre.

## DISCUSION

La formación de la progenie viral requiere de una serie interaccionada de eventos, que ocurren a tiempos muy definidos del ciclo infeccioso. Al igual que en el resto de los virus de la familia Reoviridae, la partícula de rotavirus tiene asociada una actividad RNA polimerasa RNA dependiente que es activada tanto por la pérdida de la cubierta externa o por acción de la temperatura (Sandino y col 1986, Cohen y col. 1979, Spencer y Arias 1981). La RNA polimerasa utiliza como templado el RNA de doble hebra genómico en la síntesis de la hebra de RNA(+) (mRNA viral), que es extruída de la partícula al medio. Parte del RNA(+) sintetizado es utilizado en la síntesis de proteínas y otra como templado en la síntesis de la hebra de RNA(-), la que permanece asociada al RNA(+) generando el RNA de doble hebra. Esta síntesis ocurre con cada uno de los mRNA, por lo que se generan los 11 segmentos de RNA genómico (Estes y Cohen 1989, Estes 1990, Patton 1993). La actividad RNA polimerasa que cataliza la síntesis del RNA(-) es parte de una familia de subpartículas virales, que son diferentes de las que sintetizan el RNA(+) (Patton 1986, Gallegos y Patton 1989, Mansell y Patton 1990).

El objetivo de esta tesis fue estudiar los eventos que conducen a la síntesis de los diferentes tipos de RNA viral y su efecto en la morfogénesis viral. Basado en los resultados que muestran que tanto la composición polipeptídica y el RNA molde utilizado varía en las subpartículas que tienen actividad de síntesis de mRNA, respecto a las que sintetizan RNA de doble hebra, se analizó el comportamiento de estas subpartículas frente a la acción de compuestos antivirales que afectan directamente la actividad de enzimas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos. Los compuestos

antivirales analizados *in vivo* fueron análogos de nucleósidos, el análogo de pirofosfato foscarnet e interferón, mientras que *in vitro*, el análisis de la síntesis de RNA(+) y RNA(-) se realizó con AraATP, AraCTP, CordTP, 3'-AdTTP y ATP-dialdehído, con foscarnet y con compuestos de la serie 2',5'-oligoadenilatos, que son intermediarios de la acción de interferón.

Este estudio utiliza un ensayo *in vitro* que permite determinar la actividad RNA polimerasa en la síntesis del RNA(+) (transcripción) (Spencer y Arias 1981, Pizarro y col. 1991) y un ensayo *in vitro* que permite determinar la actividad RNA polimerasa en la síntesis del RNA(-), el que se desarrolló en esta tesis. La utilización de estos sistemas libres de células, para caracterizar funcionalmente las partículas que realizan la síntesis de RNA de rotavirus, ofrece la ventaja de determinar que el efecto de los análogos en la morfogénesis de rotavirus no se deba necesariamente a una interferencia con actividades enzimáticas celulares, no asociadas a procesos directamente relacionados con la morfogénesis viral.

Para la síntesis de RNA(-) *in vitro* se utilizaron subpartículas virales aisladas a tiempos tempranos post-infección cuando, en nuestras condiciones experimentales, ya se detecta la síntesis de RNA de doble hebra en células infectadas con SA11, lo que indica que un activo proceso de síntesis de RNA(-) se está llevando a efecto *in vivo*. El ensayo de síntesis de RNA(-) *in vitro*, desarrollado en esta tesis, se basó inicialmente en un método descrito (Patton 1986), que en nuestras condiciones de trabajo presentó una baja eficiencia en la síntesis de RNA de doble hebra. Considerando que VP1, identificada como la RNA polimerasa que cataliza la síntesis de mRNA (Valenzuela y col. 1991), también se encuentra presente en las subpartículas que catalizan la síntesis de RNA(-), la síntesis de RNA(-) se estudió en las condiciones en que se efectúa la transcripción *in vitro* en nuestro laboratorio.

La actividad RNA polimerasa que cataliza la síntesis de los segmentos de RNA(-) *in vitro* es dependiente de la concentración de subpartículas y del tiempo post-infección al cual éstas se obtienen. Las subpartículas virales obtenidas 3-4 horas postinfección sintetizan menos RNA de doble hebra *in vitro* que subpartículas aisladas 6-8 horas postinfección desde igual cantidad de células infectadas. Esto se relaciona directamente con la cantidad de RNA de doble hebra sintetizado en las células a estos tiempos postinfección. Los resultados anteriores pueden explicarse porque el ensamblaje de las diferentes subpartículas virales requiere, además de RNA, de la síntesis previa y en cantidad apropiada de las proteínas que las componen, cuya síntesis varía durante el ciclo infeccioso (Johnson y McCrae 1989).

La temperatura de incubación y el pH de la reacción fueron también factores analizados, encontrando que al efectuar la reacción a 45 °C y a un pH 8,5 (condiciones idénticas a las utilizadas para la transcripción *in vitro*), se obtenía mayor cantidad de producto que si la incubación se realizaba a 30 °C y pH 7,7, como se había descrito anteriormente (Patton 1986). La concentración óptimas de nucleótidos y de sales para una eficiente síntesis de RNA(-) *in vitro* también correspondieron a las requeridas en la síntesis de los mRNA virales *in vitro* (Spencer y Arias 1981, Pizarro y col. 1991 b). La principal diferencia entre las reacciones de transcripción y de replicación del RNA *in vitro* radica en la calidad de las partículas virales utilizadas y en que la cantidad de producto RNA de doble hebra no es dependiente de la presencia de S-adenosilmetionina (Datos no mostrados).

Los resultados obtenidos muestran que el ensayo desarrollado permite determinar tanto la síntesis de RNA(+) como de RNA(-), lo cual indica que la fracción de subpartículas utilizada es heterogénea y está compuesta por varios tipos de subpartículas que tienen diferente función, corroborando resultados obtenidos anteriormente por otros

investigadores (Helmberger-Jones y Patton 1986). Con un tratamiento controlado con RNasa A, enzima que degrada con mayor eficiencia el RNA de simple hebra que el RNA de doble hebra, fué posible eliminar el RNA(+) sintetizado y discriminar exclusivamente la actividad de subpartículas que catalizan la síntesis de RNA(-), cuyo producto es el RNA de doble hebra viral.

En el sistema desarrollado, las subpartículas de SA11 también pueden sintetizar RNA(-) utilizando como molde RNA mensajeros virales exógenos, obtenidos por transcripción *in vitro* con partículas virales de distintas cepas de rotavirus. Esta característica se comprobó al incubar  $^{32}\text{P}$ -mRNA viral exógeno con subpartículas de SA11, en una mezcla de reacción para la síntesis de RNA(-) que contenía UTP frío. El resultado de esta reacción *in vitro* fué la síntesis de 11 segmentos de RNA de doble hebra marcados radioactivamente con  $^{32}\text{P}$ , que tienen una migración electroforética idéntica a la de los segmentos genómicos de la cepa de rotavirus utilizada para generar los  $^{32}\text{P}$ -mRNA. La síntesis de RNA(-), realizada en estas condiciones, se observó tanto al incubar las subpartículas de SA11 con mRNA homólogo ( $^{32}\text{P}$ -mRNA-SA11), como al incorporar al sistema de síntesis de RNA(-) *in vitro*, mRNAs heterólogos ( $^{32}\text{P}$ -mRNA-CC86 o  $^{32}\text{P}$ -mRNA-tsC). El genoma de las cepas virales utilizadas para generar los mensajeros heterólogos, utilizados como RNA molde exógeno en la síntesis de RNA(-), presenta una movilidad electroforética diferente al de la cepa de rotavirus SA11. Los resultados anteriores tienen gran importancia puesto que hasta ahora, los estudios realizados por el grupo de Patton indicaban que las subpartículas sólo eran capaces de elongar cadenas de RNA(-) preiniciadas. En rotavirus se desconoce actualmente como ocurre el proceso de iniciación de la síntesis de RNA, pero aparentemente no se requiere de la síntesis de un RNA partidor, así como tampoco se han encontrado proteínas asociadas covalentemente con el RNA, las cuales en algunos sistemas proporcionan el grupo -OH libre al cual se

une el primer nucleótido. El hecho de que en nuestro sistema ocurriera síntesis de RNA de doble hebra de una cepa heteróloga de rotavirus, al incorporar un mRNA molde exógeno, es una evidencia de que este ensayo de síntesis de RNA(-) *in vitro* permite tanto la iniciación como la elongación de las cadenas de RNA(-).

En células infectadas con rotavirus no se ha encontrado RNA(-) y tampoco RNA de doble hebra libre en el citoplasma, sino que siempre están asociados a subpartículas virales (Patton 1986, Patton 1993, Estes 1990). Es por esto que las subpartículas que catalizan la síntesis de RNA(-) se han considerado verdaderos intermediarios morfogénicos de la ruta de armado de la progenie viral (Patton 1986, Patton 1993, Estes 1990). La composición polipeptídica de estos intermediarios, que se han denominado "precore-R1", "core-R1" y "ss-R1", es variable y contienen tanto proteínas estructurales como no estructurales (Gallegos y Patton 1989).

En este estudio se analizó si los productos de la reacción de síntesis de RNA(-) *in vitro* se encontraban asociados a las distintas subpartículas de rotavirus. Se encontró que efectivamente al realizar la reacción en las condiciones descritas, los productos RNA de doble hebra se encontraban asociados a una fracción de subpartículas tipo "core" ó "pre-core". La asociación de los productos de síntesis de RNA(-) *in vitro* con las subpartículas del tipo descrito se dedujo al comparar su distribución en gradientes de sacarosa, respecto a subpartículas virales marcadas *in vivo* con <sup>35</sup>S-metionina. Estos resultados sugieren que en el ensayo de síntesis de RNA(-) *in vitro*, el mRNA exógeno es utilizado como molde en la síntesis de la hebra negativa e incorporado en una subpartícula (transencapsidación del RNA de doble hebra sintetizado). En estas condiciones no se obtuvo RNA viral encapsidado en subpartículas de mayor tamaño, tipo virus de cubierta simple o cubierta doble, probablemente debido a la falta de cantidades apropiadas de las proteínas que componen la cubierta viral interna y externa. Las

subpartículas formadas en esta reacción deben estar formadas por proteínas virales de la fracción viroplasma de SA11, única fuente de proteínas presente en la reacción.

El hecho de que el genoma de rotavirus sea segmentado ofrece una dificultad adicional al proceso de síntesis de la progenie viral correcta, cual es requerir de una etapa que permita el adecuado ordenamiento ó "assortment" de los 11 segmentos de RNA(+) utilizados como molde en la síntesis del genoma viral. Se ha postulado que en este proceso es determinante la participación de las proteínas no estructurales de rotavirus NSP1 (NS53), NSP2 (NS35), NSP3 (NS34) y NSP5 (NS26), ya que se han encontrado asociadas a los intermediarios morfogénicos aislados desde las células infectadas con rotavirus: "precore-RI", "core-RI" y "ss-RI" (Patton 1993, Gallegos y Patton 1989).

Trabajos recientes (Chen y Ramig 1993a, Chen y Ramig 1993b) han demostrado que la conversión de partículas core en partículas de cubierta simple, y de éstas en partículas de cubierta doble, puede ocurrir en ausencia de proteínas no estructurales *in vitro*, resultados que sugieren que in vivo las proteínas no estructurales asociadas a los intermediarios de replicación no participarían necesariamente en la unión de proteínas estructurales a intermediarios morfogénicos. Por otro lado, recientemente también se informó que partículas core obtenidas por desensamblaje *in vitro* de rotaviriones maduros, tratados posteriormente para vaciar el contenido de RNA de doble hebra ("core abierto"), son capaces de catalizar la síntesis de RNA de doble hebra *in vitro* en ausencia de proteínas no estructurales (Chen y col. 1994), con lo cual aparentemente se descartaría también la participación de proteínas no estructurales como parte del complejo con actividad RNA polimerasa que cataliza la síntesis del RNA(-). Sin embargo, a diferencia del sistema de síntesis de RNA de doble hebra *in vitro* descrito (Chen y col. 1994), donde los diferentes segmentos de RNA de doble hebra de rotavirus no se sintetizan en cantidades equimolares y algunos de los cuales no se sintetizan, el ensayo desarrollado en



esta tesis, que utiliza una fracción particulada que contiene tanto proteínas virales estructurales como no estructurales, permite obtener los 11 segmentos de RNA de doble hebra de la cepa heteróloga usada para generar los mRNA que sirven de RNA molde. Es importante señalar que en estos geles sólo se observan bandas discretas y no aparecen otros productos de RNA de doble hebra de menor tamaño. Estos resultados sugieren que aparentemente la síntesis de RNA(-) ocurre de extremo a extremo del gen y que en nuestras condiciones, además de actividad RNA polimerasa, podría estar ocurriendo "assortment" con lo cual los 11 segmentos genómicos se ordenan y encapsidan en una partícula. Un estudio densitométrico de la radioactividad asociada a cada uno de los segmentos genómicos sintetizados y asociados a subpartículas sería de vital significancia para determinar si los segmentos de RNA de doble hebra que se producen en la reacción de síntesis de RNA(-) *in vitro* se encuentran en cantidades equimolares.

Considerando que estudios anteriores han mostrado que las secuencias en los extremos 3' y 5' son conservadas en los 11 segmentos genómicos de rotavirus (Imai y col. 1983, McCrae y McCorquodale 1983), estudios de delección y/o mutación en estas regiones podrían entregar la clave respecto a las señales que median el reconocimiento de los segmentos genómicos que serán incorporados a la partícula viral. Por otro lado, en estudios destinados a aclarar este proceso una herramienta promisoría sería la utilización de "RNA antisense" para inhibir no sólo el "assortment" sino también la síntesis de RNA. Los ensayos de transencapsidación *in vitro* desarrollados por Chen y col. permiten el rescate de progenie viral infectiva a partir de partículas core, las cuales por adición secuencial de VP6 y luego de VP4 y VP7 dan lugar a la formación de partículas de cubierta simple y de cubierta doble respectivamente (Chen y col. 1993 a, Chen y col. 1993 b). El ensayo descrito en este trabajo podría convertirse en un eslabón importante de la ruta de morfogénesis de rotavirus *in vitro*, si las subpartículas tipo core o precore

obtenidas sirven de sustrato al cual adicionar las proteínas de la cubierta interna y externa del virus. De esta forma, la reacción de transencapsidación del RNA de doble hebra de rotavirus *in vitro*, descrita en esta tesis, podría tener importantes proyecciones posteriores en estudios destinados a examinar los roles de proteínas estructurales y no estructurales en el ensamblaje de las partículas virales y en la síntesis del RNA de doble hebra. Para ésto, la expresión de proteínas estructurales y no estructurales expresadas en baculovirus, utilizadas individualmente o en conjunto, será de importante utilidad. Por otro lado, este ensayo podría ser de utilidad en investigaciones destinadas a determinar las señales presentes en los segmentos de mRNA que posibilitan el adecuado ordenamiento de los 11 segmentos que se utilizarán como molde en la síntesis del RNA de doble hebra, así como podría convertirse en un mecanismo para introducir genes virales alterados por manipulación genética en estudios destinados a la obtención de nuevas cepas virales posibles de utilizar como vacunas.

A diferencia de otros virus en los cuales el genoma sintetizado se incorpora a cápsides virales preformadas, en rotavirus y en otros virus cuyo genoma es RNA de doble hebra parece ser que la síntesis del genoma viral ocurre en forma simultánea con el ensamblaje de las partículas virales en el proceso de formación de la progenie. Por lo tanto, en la reacción de transencapsidación del RNA viral *in vitro* posiblemente los segmentos de RNA(+) se asocian a proteínas virales y en forma concomitante dan lugar a la formación de subpartículas virales que presentan la actividad RNA polimerasa RNA dependiente requerida para la síntesis de las hebras de RNA(-). Alternativamente, los segmentos de RNA(+) podrían ser incorporados en procápsides con actividad RNA polimerasa, y de esta forma dar lugar a la síntesis de RNA(-). Los resultados de Chen y cols., serían evidencia de esta última posibilidad, ya que tanto "cores abiertos" obtenidos de virus nativo, o partículas obtenidas por coexpresión de genes de rotavirus que

codifican para VP1, VP2 y VP3, usaban mRNA exógeno como molde en la síntesis de RNA de doble hebra (Chen y col. 1994). Otros resultados obtenidos con proteínas virales expresadas en baculovirus, las cuales son capaces de asociarse y formar estructuras similares a partículas virales que no contienen ácido nucleico en su interior, pueden ser evidencia de la formación de procápsides virales (Zeng y col. 1994, Labbé y col. 1991, Sabara y col. 1991). En todo caso, de formarse procápsides, éstas no incorporarían RNA de doble hebra ni RNA(-) sino que RNA(+), como lo indican estudios realizados *in vitro* e *in vivo* (Chen y col. 1994, Gorziglia y Collins 1992).

Utilizando el ensayo de síntesis de RNA(-) *in vitro*, desarrollado en esta tesis, y el ensayo de síntesis de RNA(+) *in vitro*, ya disponible, se estudió el efecto de diferentes análogos de: nucleótidos (AraATP, AraCTP, CordTP, ATP-dialdehído, 3'-AdTTP), de oligonucleótidos (compuestos de la serie 2',5'-oligoadenilatos y algunos 3',5'-oligoadenilatos) y de pirofosfato (foscarnet), sobre la síntesis de ambos tipos de RNA viral.

Los análogos de nucleótidos AraATP, AraCTP, CordTP y ATP-dialdehído, inhibieron tanto la síntesis de mRNA como la síntesis de RNA(-) de rotavirus *in vitro*, y ambos procesos con eficiencia muy similar. El análisis del efecto de estos compuestos sobre la transcripción se realizó anteriormente (Pizarro J. M. 1990, Pizarro J. M y col. 1991) y además en esa tesis obteniendo aproximadamente un 50 % de inhibición del proceso *in vitro* (C.I.<sub>50</sub>) utilizando respectivamente 2,4; 2,6; 2,0; y 1,4 mM de los análogos AraATP, AraCTP, CordTP y ATP-dialdehído, en una mezcla de reacción que contenía 4 mM de cada uno de los nucleótidos. Aún cuando no es posible establecer en forma precisa las C.I.<sub>50</sub> en los estudios de inhibición de la síntesis de RNA(-) *in vitro* con los análogos de nucleótidos, ya que no se realizaron estudios densitométricos de la radioactividad asociada a los segmentos de RNA de doble hebra producidos en la

reacción, se observa en las Figuras 9-11 que la síntesis de RNA(-) *in vitro* fue inhibida alrededor del 50 % o más con 2mM de AraCTP, 2 mM de CordTP y con 1 mM de ATP-dialdehído respectivamente, en reacciones que contenían 4 mM de ATP, CTP y GTP. En el caso de AraATP, tanto en la síntesis de RNA(+) como en la síntesis de RNA(-) *in vitro* y en mezclas de reacción que contenían 0,2 mM de cada uno de los nucleótidos las C.I.<sub>50</sub> fueron de aproximadamente 0,2 mM de AraATP. Otro análogo de nucleótido estudiado, 3'-AdTTP, también mostró tener un efecto inhibitor en ambos procesos de síntesis de RNA viral *in vitro* en un rango similar de concentración, con una C.I.<sub>50</sub> de 0,42 mM en la síntesis de mRNA y de 0,6 mM aproximadamente en la síntesis de RNA(-). El hecho que el ATP-dialdehído inhiba más fuertemente la síntesis de RNA de rotavirus que los otros análogos de nucleótidos, puede relacionarse con su capacidad de unirse en forma covalente a la proteína VP1, la RNA polimerasa viral, que de esta forma es inactivada. Los otros compuestos, en cambio, inhiben en forma reversible la actividad RNA polimerasa.

En el proceso de elongación, compuestos como CordTP, ATP-dialdehído y 3'-AdTTP pueden actuar como terminadores de cadena al sustituir a un ribonucleótido en la cadena de RNA que se está sintetizando por acción de la RNA polimerasa e impedir que el siguiente enlace se forme, al no poseer estas moléculas el grupo 3' hidroxilo libre. Los análogos AraATP y AraCTP no son terminadores de cadena obligados, pero su incorporación a cadenas en crecimiento dificulta la elongación (Reid y col. 1988). Los análogos de ATP estudiados podrían interferir además con la iniciación y/o con la elongación de las cadenas de RNA al interferir con la hidrólisis de ATP, lo que ha sido descrito en otros virus (Shuman y col. 1980, Broyles y Moss 1988, Broyles y col. 1988, Testa y Banerjee 1979).

Un comportamiento similar al mostrado por los análogos de nucleótidos se

obtuvo con el análogo de pirofosfato foscarnet, compuesto que inhibió casi totalmente la actividad RNA polimerasa de subpartículas virales en la síntesis de RNA(+) y RNA(-) y de rotaviriones activados por calor en la síntesis de RNA(+), a una concentración de 2 mM. Por analogía con el efecto que presenta sobre DNA polimerasas, este compuesto puede inhibir la síntesis de RNA viral al interactuar con la RNA polimerasa de rotavirus en el sitio de unión de pirofosfato.

Varias evidencias señalan que la proteína VP1 es la RNA polimerasa que cataliza la síntesis de mRNA en rotavirus (Chen y col. 1990, Muñoz y col. 1995, Cohen y col. 1989, Mitchell y Both 1990, Valenzuela y col. 1991). Con el objeto de determinar si la actividad enzimática de esta proteína, era afectada por foscarnet, se comparó el efecto de este compuesto sobre la actividad de síntesis de mRNA por partículas virales de SA11 y de la mutante termosensible en VP1, tsC. La cepa tsC fue obtenida por mutagénesis química de la cepa SA11 silvestre y su caracterización ha demostrado que posee un fenotipo de síntesis de RNA de simple hebra y de doble hebra negativo a temperatura restrictiva (Chen y col. 1990). La mutante tsC presentó una mayor resistencia a la inhibición de la transcripción por foscarnet que la cepa de rotavirus silvestre (C.I.<sub>50</sub> de 0,37 y 0,18 mM respectivamente, utilizando una concentración de XTP de 4 mM), resultado que también se observó con AraATP (C.I.<sub>50</sub> de 0,11 y 0,04 mM respectivamente, al utilizar una concentración de 0,1 mM de XTP) y CordTP (C.I.<sub>50</sub> de 0,02 y 0,06 mM respectivamente al utilizar una concentración de 0,1 mM de XTP). Estos resultados aportan nuevas evidencias que avalan que la actividad RNA polimerasa que cataliza la síntesis de los mensajeros de rotavirus está presente en la proteína VP1, alterando la mutación termosensible los sitios de unión de nucleótidos y de pirofosfato.

Algunos estudios, señalan que otra proteína del core con funciones enzimáticas es VP3. Al igual que VP1, VP3 se encuentra en bajo número de copias por virión y se le han

detectado actividades de guanililtransferasa y ATPasa (Pizarro y col. 1991 a, Pizarro y col. 1991 b, Vásquez y col. 1993, Liu y Estes 1989, Mitchell y Both 1990, Liu y col. 1992). Al utilizar los análogos de nucleótidos AraATP y CordTP para caracterizar el comportamiento en transcripción de la mutante termosensible en el gen que codifica para VP3, tsB, se observó que a diferencia de tsC, tsB presentó mayor resistencia sólo a la acción de CordTP (C.I.<sub>50</sub> de 0,07 y 0,02 respectivamente, utilizando 0,1 mM de cada uno de los XTP). Este resultado, que es evidencia de la participación de la proteína VP3 en la síntesis del mRNA de rotavirus, puede estar de acuerdo con los mecanismos de inhibición competitivo y mixto para AraATP y CordTP respectivamente (Pizarro, 1991).

En relación al efecto de análogos de oligonucleótidos, la síntesis de RNA(+) *in vitro* fue inhibida por 2',5'-A de cadena más bien larga (igual o superior a cuatro residuos de adenina), a diferencia de lo observado para otras polimerasas virales (transcriptasa reversa de HIV-1 y RNA polimerasa del virus de la estomatitis vesicular) donde son compuestos de cadena corta los que provocan inhibición de la actividad enzimática (Liu y Owens 1987, Montefiori y col. 1989). La inhibición de la transcripción *in vitro* por 2',5'-oligoadenilatos no dependió sólo del largo de la cadena, sino que además de la fosforilación del extremo 5' y de la característica del enlace fosfodiéster del oligoadenilato.

Con ninguno de los oligoadenilatos analizados se observó inhibición de la síntesis de RNA(-) *in vitro*, resultado que es significativo puesto que en estas reacciones se utilizaron concentraciones de oligoadenilatos 2,5 veces superiores a las máximas concentraciones utilizadas para determinar el efecto de estos compuestos sobre la transcripción *in vitro*. Además, cabe hacer notar que en estas mismas condiciones de reacción, la adición de AraATP provocó una fuerte inhibición en la síntesis de los productos RNA de doble hebra.

Al analizar el mecanismo de inhibición de la transcripción *in vitro* con 2',5'-tetraoligoadenilato monofosfato se obtuvo una inhibición de tipo competitiva con una  $K_i$  de 144  $\mu\text{M}$ , en forma similar a lo descrito para el mecanismo de inhibición de compuestos 2',5'-A sobre la actividad de DNA topoisomerasas (Castora y col. 1991). Además del efecto sobre topoisomerasas, se ha descrito la inhibición de la metilación del cap por compuestos 2',5'-oligoadenilatos (Castora y col. 1991, Goswami y col. 1982). En el caso de rotavirus es posible que estas actividades las catalice la proteína VP3, cuya actividad ATPásica podría facilitar la abertura de las hebras del RNA utilizado como molde en la transcripción (Pizarro y col. 1991, Spencer y García 1984). Se desconoce cual es la proteína que tiene la función de metilar el cap presente en el mRNA de rotavirus, pero es posible que también esta actividad la efectúe VP3 en conjunto con su función de guanililtransferasa. Si los 2',5'-oligoadenilatos están afectando la función de VP3, los resultados obtenidos *in vitro* pueden significar que aún cuando la proteína VP3 es muy importante también en la síntesis del RNA(-) de rotavirus, como se ha determinado por estudios realizados con la mutante termosensible tsB (Vásquez y col. 1993), debido a la naturaleza del RNA utilizado como molde, que es de simple hebra, en la síntesis de RNA(-) no sería fundamental una actividad enzimática que permitiera la separación de hebras de RNA. Además, en este trabajo se observó que la adición de SAM no estimulaba la síntesis de RNA(-) *in vitro* (Datos no mostrados). Por otro lado, si la actividad enzimática inhibida por 2',5'-A es requerida sólo en la iniciación de la síntesis de RNA, ya sea del RNA(+) o del RNA(-), y no durante el proceso de elongación, y considerando que el ensayo de síntesis de RNA(-) *in vitro* desarrollado en esta tesis, mayoritariamente estaría dando cuenta de la elongación de hebras de RNA(-) preiniciadas, es posible suponer que en estas condiciones no sea posible observar un efecto inhibitor de los oligoadenilatos sobre la síntesis de RNA(-).

En esta tesis también se estudió el efecto *in vivo* de antivirales cuyo mecanismo de inhibición de la replicación de rotavirus puede ser explicado en base al efecto del mismo, o de intermediarios inducidos por el antiviral en cuestión, sobre la síntesis de RNA viral *in vitro*.

Los resultados obtenidos con los oligoadenilatos permiten proponer un mecanismo para explicar la acción que en la morfogénesis de rotavirus tendría el interferón, ya que los 2',5'- oligoadenilatos actúan como intermediarios en una de las vías de respuesta a la acción antiviral del interferón y pueden interferir directamente con la síntesis de ácidos nucleicos virales (Joklik 1990, Schröder y col. 1992, Subramanian y col. 1990, Liu y Owens 1987, Montefiori y col. 1989). Estudios anteriores mostraron la efectividad de la administración de interferón a animales recién nacidos en el control de diarreas producidas experimentalmente con rotavirus (Schwers y col. 1985, Derbyshire 1989). Sin embargo no se estudió a que nivel del ciclo replicativo de rotavirus se manifiesta esta acción antiviral de interferón.

En esta tesis, al analizar el efecto de interferón  $\alpha$ -2a sobre la morfogénesis de rotavirus en células infectadas, se observó una acción temprana de interferón sobre el ciclo replicativo del virus, resultando en una inhibición de la síntesis de mRNA, de RNA de doble hebra y de subpartículas virales. Para determinar si la acción antirotavirus de interferón está mediada por un efecto directo sobre las etapas de la morfogénesis de rotavirus, síntesis de RNA(+) y/o síntesis de RNA(-), se analizó el efecto de 2',5'- oligoadenilatos sobre estos procesos *in vitro*. Los resultados obtenidos con los 2',5'- oligoadenilatos indican que la acción temprana del interferón durante el ciclo replicativo de rotavirus se manifiesta, al menos en parte, a través de un efecto inhibitorio directo de la síntesis de mRNA. Esta inhibición de la transcripción viral se traduce en una disminución de los mensajeros que son requeridos en la síntesis de proteínas y que además son



utilizados como molde en la síntesis del RNA(-) de rotavirus, con las consecuencias ya descritas en la síntesis de RNA de doble hebra genómico y de subpartículas virales.

En relación al efecto de foscarnet sobre la morfogénesis de rotavirus en células infectadas, al igual que con interferón, se observó inhibición de la síntesis de mRNA, RNA de doble hebra y subpartículas virales. Los estudios in vivo con foscarnet muestran que la multiplicidad de infección es un factor importante para obtener una inhibición máxima de la replicación de rotavirus por este antiviral; al realizar la infección con 1 u.f.p./célula, se necesitó sólo una concentración 1 mM de PFA para obtener una inhibición completa de la replicación de rotavirus, mientras que al infectar con 10 u.f.p./célula la síntesis de RNA viral genómico observada en las células 8 horas postinfección decreció también en forma dependiente de la concentración utilizada pero nunca totalmente. Las concentraciones utilizadas en estos estudios no causaron citotoxicidad, lo que se comprobó por observación del efecto citopático en ausencia de infección y por estimación de la viabilidad celular utilizando el método de exclusión del colorante Azul de Tripán.

El mecanismo de la acción antirotavirus de foscarnet, observada en los cultivos infectados tratados con este compuesto, pueden ser explicados por el efecto que foscarnet tiene sobre la síntesis de RNA viral en los sistemas libres de células utilizados en este estudio. Debido a que este compuesto inhibe tanto la síntesis de mRNA catalizada por viriones purificados, como la de RNA(-) catalizada por subpartículas aisladas desde células infectadas, y que la mutante termosensible en VP1 presenta una mayor resistencia a la acción de este compuesto que la cepa silvestre, la actividad antiviral de foscarnet sobre la replicación de rotavirus está muy probablemente relacionada con la inhibición directa de la RNA polimerasa viral que cataliza la síntesis de ambos tipos de RNA. Este efecto sobre la síntesis de RNA, al igual que en el caso de interferón, conduce a una

inhibición de la síntesis de proteínas y por ende de la síntesis de subpartículas virales (Datos no mostrados).

En los estudios *in vivo* también se analizó el efecto del análogo de timidina 3'-amino-3'-deoxitimidina (3'-AdT) y algunos derivados de este compuesto sobre la morfogénesis de rotavirus, no observando inhibición de la replicación viral con ninguno de ellos. Esto se determinó por la aparición del efecto citopático y por la síntesis de RNA genómico viral en las células infectadas, en los rangos de concentración en los cuales el compuesto no presentaba signos de citotoxicidad. Es posible que la falta de inhibición de 3'-AdT sobre la replicación de rotavirus en las células se deba a problemas en la entrada del compuesto, o bien a dificultades en su conversión a la forma nucleotídica requerida para presentar su efecto, ya que el análogo de nucleótido 3'-AdTTP inhibió la síntesis de RNA(+) y de RNA(-) de rotavirus *in vitro*. Observaciones similares con 3'-AdT y 3'-AdTTP fueron realizadas anteriormente en retrovirus (Kedar y col. 1990) y en rotavirus con AraC, cuyo nucleósido trifosfato AraCTP también inhibió tanto la síntesis de RNA(+) como de RNA(-) *in vitro* (Pizarro y col. 1991 b).

En resumen el conjunto de los resultados obtenidos durante este estudio permitieron el desarrollo y caracterización de un ensayo de síntesis *in vitro* de RNA de doble hebra. Contando con este ensayo y con un ensayo de transcripción *in vitro* se realizó una caracterización de la actividad funcional de las partículas virales que catalizan la síntesis de RNA(+) y de RNA(-) mediante el uso de análogos de nucleótidos, análogos de oligonucleótidos y del análogo de pirofosfato foscarnet. Este ensayo también podría permitir la caracterización de las señales presentes en los genes virales que median el ordenamiento de estos dentro de la partícula viral y de la síntesis de RNA misma, utilizando mRNAs modificados o bien secuencias nucleotídicas sintéticas, puesto que fue posible la síntesis de los 11 segmentos de RNA de doble hebra viral al agregar mRNAs

virales exógenos que fueron utilizados como RNA molde en este proceso. Sería interesante intentar combinar este ensayo con aquellos ensayos de transencapsidación desarrollados por Ramig ya que de esta forma quizás sería posible obtener partículas virales infectivas que posean características especiales, determinadas por las modificaciones que portan los genes introducidos. A futuro métodos de esta naturaleza podrían conducir por ejemplo a la obtención de vacunas atenuadas de rotavirus. Por otro lado, los resultados obtenidos, que explican el mecanismo de la actividad antirotavirus de compuestos como interferón y foscarnet, pueden tener implicancias en futuros estudios clínicos destinados al establecimiento de terapias antivirales apropiadas para controlar las infecciones producidas por rotavirus, especialmente en pacientes inmunodeprimidos. En este contexto, los resultados obtenidos con las mutantes termosensibles indican que sería muy interesante realizar estudios que conduzcan a seleccionar mutantes de rotavirus resistentes a la acción de antivirales, como foscarnet por ejemplo, y mapear donde se ubica la lesión genética que confiere la resistencia, ya que permitiría establecer bases que conduzcan al desarrollo de mejores antivirales contra rotavirus.

## CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado un ensayo *in vitro* de la actividad RNA polimerasa de rotavirus que permite la síntesis del RNA(-). La reacción es catalizada por subpartículas virales, aisladas desde células infectadas con rotavirus, las que pueden utilizar como molde RNA mensajeros virales exógenos, tanto homólogos como heterólogos. El producto de la reacción de síntesis de RNA(-) *in vitro* son los once segmentos de RNA de doble hebra viral, que se encuentran asociados a intermediarios de replicación.
- Las condiciones óptimas para la síntesis de RNA(-) *in vitro* son similares a las utilizadas en la síntesis de mRNA *in vitro* y ambas reacciones son inhibidas en un rango de concentración semejante por los análogos de nucleótidos analizados y por el análogo de pirofosfato, foscarnet. La mayor resistencia a la inhibición de la transcripción *in vitro* presentada por la mutante termosensible en VP1 respecto a SA11 silvestre sugiere que AraATP, CordTP y foscarnet inhiben directamente a la RNA polimerasa viral.

- Análogos de oligoadenilatos inhiben la síntesis de mRNA *in vitro* en forma competitiva, pero no afectan la síntesis de RNA(-) *in vitro* de rotavirus. Los resultados sugieren que los oligoadenilatos podrían afectar, por ejemplo, una función topoisomerasa requerida en la síntesis de mRNA viral.
- Estudios recientes han mostrado que las proteínas no estructurales asociadas a los intermediarios morfogénicos que sintetizan el RNA(-) son prescindibles en este proceso. Esto ha conducido a postular que las actividades enzimáticas que posibilitan la síntesis del RNA(-), tal como ocurre con la síntesis del mRNA, se asociarían a las proteínas estructurales presentes en el core viral. Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan esta hipótesis y sugieren que las proteínas no estructurales presentes en la fracción de subpartículas que catalizan la síntesis del RNA(-) participan en el ordenamiento ("assortment") de los segmentos de mRNA utilizados como RNA molde en la síntesis de los 11 segmentos de RNA genómicos que formarán parte de la partícula viral infectiva.
- Las etapas de la morfogénesis de rotavirus, síntesis de mRNA, síntesis de RNA genómico y síntesis de subpartículas virales son inhibidas *in vivo* por los antivirales interferón y foscarnet. El efecto de interferón se debe, al menos en parte, a la inhibición directa de la síntesis de mRNA por 2',5'-oligoadenilatos, mientras que el efecto de foscarnet se explica por una inhibición directa tanto de la síntesis de mRNA, como de la síntesis del RNA genómico viral.

## REFERENCIAS

- Au, K. S., Chan, W-K., Burns, J. W. y Estes, M. K. 1989. Receptor activity of the rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J. Virol.* 63:4553-4562.
- Arias, C., López, S. y Espejo, R. 1982. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J. Virol.* 41:42-49.
- Baglioni, C., De Benedetti, A. y Williams, G. J. 1984. Cleavage of nascent reovirus mRNA by localized activation of the 2',5'-oligoadenylate-dependent endorribonuclease. *J. Virol.* 52:865-871.
- Bican, P., Cohen, J., Charpilienne, A. y Scherrer, R. 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J. Virol.* 43:1113-1117.
- Blacklow, N. R. y Greenberg, H. B. 1991. Viral gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 325:252-264.
- Boyle, J. F. y Holmes, K. V. 1986. RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J. Virol.* 58:561-568.
- Bridger, J. C., Pedley, S. y McCrae, M. A. 1986. Group C rotaviruses in humans. *J. Clin. Microbiol.* 23:760-763.
- Broyles, S. y Moss, B. 1988. DNA-dependent ATPase activity associated with vaccinia virus early transcription factor. *J. Biol. Chem.* 263: 10761- 10765.
- Broyles, S., Yuen, L., Shuman, S., Moss, B. 1988. Purification of a factor required for transcription of vaccinia virus early genes. *J. Biol. Chem.* 263: 10754-10760.
- Castora, F. J., Erickson, C. E., Kovács, T., Iesiak, K. y Torrence, P. F. 1991. 2',5'-oligoadenylates inhibit relaxation of supercoiled DNA by calf thymus DNA topoisomerase I. *J. Interferon Res.* 11:143-149.

- Chen, D., Gombold, J. L. and Ramig, R. F. 1990. Intracellular RNA synthesis directed by temperature-sensitive mutant of simian rotavirus SA11. *Virology* 178:143-151.
- Chen, D. y Ramig, R. F. 1993a. Rescue of infectivity by *in vitro* transcapsidation of rotavirus single-shelled particles. *Virology* 192:422-429.
- Chen, D. y Ramig, R. F. 1993b. Rescue of infectivity by sequential *in vitro* transcapsidation of rotavirus core particles with inner capsid and outer capsid proteins. *Virology* 194:743-751.
- Chen, D., Zeng, C. Q-Y., Wentz, M. J., Gorziglia, M., Estes, M.K. y Ramig, R. F. 1994. Template-dependent, *in vitro* replication of rotavirus RNA. *J. Virol.* 68:7030-7039.
- Cheng, Y-C., Grill, S., Derse, D., Chen, J-Y., Caradonna, S. J. y Connor, K. 1981. Mode of action of phosphonoformate as an anti-herpes simplex virus agent. *Biochem. Biophys. Acta* 652:90-98.
- Christensen, M. S. 1989. Human viral gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 51-89.
- Clapp, L. L. y Patton, J. T. 1991. Rotavirus morphogenesis: Domains in the inner capsid protein essential for binding to single-shelled particles and for trimerization. *Virology* 180:697-708.
- Clark, S. M. Roth, J. R., Clark, M. L. Barnett, B. B. y Spendlove, R. S. 1981. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *J. Virol.* 39:816-822.
- Crumpacker, C. S. 1992. Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *The American Journal of Medicine* 92(suppl. 2 A), 3S-7S.
- Cukor, G. y Blacklow, N. R. 1984. Human viral gastroenteritis. *Microbiol. Rev.* 48:157-179.
- Cohen, J., Laporte, J., Charpinienne, A. y Scherrer, R. 1979. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60:177-186.

- Cohen, J., Charpilienne, A., Chilmónczyk, S. y Estes, M. K. 1989. Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology* 171:131-140.
- Datta, A. K. y Hood, R. E. 1981. mechanism of inhibition of Epstein-Barr virus replication by phosphonoformic acid. *Virology* 114:52-59.
- De Benedetti, A. Pytel, B. A. y Baglioni, C. 1987. Loss of (2'-5')oligoadenylate synthetase activity by production of antisense RNA results in lack of protection by interferon from viral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:658-662.
- Derbyshire, J. B. 1989. The interferon sensitivity of selected porcine virus. *Can. J. Vet. Res.* 53:52-55.
- Derse, D., Bastow, W. F. y Cheng, Y-C. 1982. Characterization of the DNA polymerase included by a group of herpes simplex virus type I variants selected for growth in the presence of phosphonoformic acid. *J. Biol. Chem.* 257:10251-10260.
- Dorr, R. T. 1993. Interferon- in malignant and viral diseases. A review. *Drugs* 45:177-211.
- Espejo, R. T., López, S. y Arias, C. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37:156-160.
- Estes, M. K. (1990). Rotaviruses and their replication. En *Virology*, 2nd edn., pp. 1329-1352. Editado por B.N.Fields and D. M. Knipe. New York: Raven Press.
- Estes, M. K. y Cohen, J. 1989. Rotaviruses gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53: 410-449.
- Fielding, P. A., Lambden, P. R., Caul, E. O. y Clarke, I. N. 1994. Molecular characterization of the outer capsid spike protein (VP4) gene human group C rotavirus. *Virology* 204:442-446.
- Fiore, L., Greenberg, H. B. y Mackow, E. R. 1991. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* 181:553-563.
- Fukuhara, N., Yoshie, O., Kitaoka, S. y Konno, T. 1988. Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J. Virol.* 62:2209-2218.



- Fukuhara, N., Nishikawa, K., Gorziglia, M. y Kapikian, A. Z. 1989. Nucleotide sequence of gene segment 1 of a porcine rotavirus strain. *Virology* 173:743-749.
- Gallegos, C. O. y Patton, J. T. 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates: A model for the assembly of single-shelled particles. *Virology* 172:616-627.
- Gilger, M. A., Conner, M. E., Matson, D. O., Rosenblatt, H. M. Hanson, C. G. y Estes, M. K. 1992. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J. Pediatr.* 120:912-917.
- Gorziglia, M. I. y Collins, P. L. 1992. Intracellular amplification and expression of a synthetic analog of rotavirus genomic RNA bearing a foreign marker gene: mapping cis-acting nucleotides in the 3'-noncoding region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:5784-5788.
- Goswami, B. B., Crea, R., Van Boom, J. H. y Sharma, O. K. 1982. 2',5'-linked oligo(adenylic acid) and its analogs. A new class of inhibitors of mRNA methylation. *J. Biol. Chem.* 257:6867-6870.
- Greenberg, H., Anliffe, V., Valdesuso, J., Wyatt, R., Flores, J., Kalika, A., Hoshino, Y., Singh, N. 1983 a. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 39:91-99.
- Greenberg, H. B., Flores, J. Kalika, A. R., Wyatt, R. G. y Jones, R. 1983 b. 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- 330.
- Helgstrand, E., Eriksson, B., Johanson, N. G., Lannero, B., Larsson, A., Misiorny, A., Norén, J. O., Sjoberg, K., Stening, G., Stridh, S. y Oberg, B. 1978. trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound. *Science* 201:819-821.
- Helmberger-Jones, M. y Patton, J. T. 1986. Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. *Virology* 155:655-665.
- Henderson, E.E., Doetsch, P. W., Charubala, R., Pfliegerer, W. y Suhadolnik, R. J. 1982. Inhibition of Epstein-Barr Virus-Associated Nuclear Antigen (EBNA) induction by (2',5')oligoadenylate and the cordycepin analog: mechanism of action for inhibition of EBV-induced transformation. *Virology* 122:198-201.
- Hirsch, M. S. y Kaplan, J. C. 1990. Antiviral Agents. En *Virology*, 2nd edn., pp. 441-468. Editado por B.N.Fields and D. M. Knipe. New York: Raven Press.

- Ho, M. S., Glass, R. I., Pinsky, P. F. y Anderson, L. J. 1988. Rotavirus as a cause of diarrheal morbidity and mortality in the United States. *J. Infect. Dis.* 158:1112-1116.
- Hovanessian, A. G. y Kerr, I. M. 1979. The (2'-5')oligoadenylate(pppA2'-5'A2'-5'A)synthetase and protein kinase(s) from interferon-treated cells *Eur. Biochem.*93:515-526.
- Hundley, F., McIntyre, M., Clark, B. 1987. Heterogeneity of genome rearrangements in rotavirus isolated from chronically infected immunodeficient child. *J. Virol.* 61:3365-3372.
- Imai, M., Kantani, K. A., Ikegami, N. y Furiuchi, Y. 1983. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J. Virol.* 47:125-136.
- Isegawa, Y., Nakagomi, O., Brüssow, H., Minamoto, N. Nakagomi, T. y Ueda, S. 1994. A unique VP4 gene allele carried by an unusual bovine rotavirus strain, 993/83. *Virology* 198:366-369.
- Johnson, M. A. y McCrae, M. A. 1989. Molecular biology of rotaviruses. VIII. Quantitative analysis of regulation of gene expression during virus replication. *J. Virol.* 63: 2048-2055.
- Joklik, W. K. 1990. Interferons. En B. N. Fields, D. M: Knipe et al. (Eds.), *Virology*, pp. 383-410. Raven Press, Ltd., New York.
- Kalika, A. R., Flores, J. y Greenberg, H. B. 1983. Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology* 125:194-205.
- Kaljot, K. T., Shaw, R. D., Rubin, D. H. y Greenberg, H. B. 1988. Infectious rotavirus enter cells by direct membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* 62:1136-1144.
- Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. (1990). Rotaviruses. En *Virology*, 2nd edn., pp. 1353-1404. Editado por B.N.Fields and D. M. Knipe. New York: Raven Press.

- Kattoura, M. D., Clapp, L. L. y Patton, J. T. 1992. The rotavirus nonstructural protein, NS35, possesses RNA-binding activity *in vitro* and *in vivo*. *Virology* 191:698-708.
- Kattoura, M. D., Chen, X. y Patton, J. T. 1994. The rotavirus RNA-binding protein NS35 (NSP2) forms 10S multimers and interacts with viral RNA polymerase. *Virology* 202:803-813.
- Kedar, P. S., Abbots, J., Kovács, T., Lesiak, K., Torrence, P. y Wilson, S. H. 1990. Mechanism of HIV transcriptase enzyme-primer interaction as revealed through studies of a dNTP analogue, 3'-azido-dNTP. *Biochemistry* 29:3603-3611.
- Kumar, R., Choubey, D., Lengyel, P. y Sen, G. C. 1988. Studies on the role of the 2',5'-oligoadenylate synthetase-RNase pathway in beta interferon-mediated inhibition of encephalomyocarditis virus replication. *J. Virol.* 62: 3175-3181.
- Kumar, A., Charpilienne, A. y Cohen, J. 1989. Nucleotide sequence of the gene encoding for the RNA binding protein (VP2) of Rf bovine rotavirus. *Nucleic Acids. Res.* 17:2126.
- Labbé, M. Charpilienne, A., Crawford, S. E., Estes, M. K. and Cohen J. 1991. Expression of rotavirus VP2 produces empty core-like particles. *J. Virol.* 65:2946-2952.
- Lin, H. J., Kwan, J. P., Wu, P. C. y Chack, W. 1983. Phosphonoformic acid-inhibitable nucleotide incorporation as a measure of hepatitis B viral DNA polymerase activity. *J. Med. Virol.* 12:61-70.
- Liu, D. K. y Owens, G. F. 1987. Inhibition of viral reverse transcriptase by 2',5'-oligoadenylates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 291-297.
- Liu, M., Offit, P.A., Estes, M. K. 1988. Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* 163:26-32.
- Liu, M. y Estes, M. K. 1989. Nucleotide sequence of the simian rotavirus SA11 genome segment 3. *Nucleic Acids. Res.* 17:7991.
- Liu, M., Mattion, N. M. y Estes, M. K. 1992. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology* 188:77-84.

- Mackow, E. R., Shaw, R. D., Matsui, S. M. Vo, P. T., Dang, M. N. y 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-
- Mansell, E. A., y Patton, J. T. 1990. Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *J. Virol.* 64:4988-4996.
- McCrae, M., McCorquodale, J. 1982. Molecular Biology of rotaviruses. *Virology* 117:435-441.
- McCrae, M. A. y McCorquodale, J. G. 1983. Molecular Biology of rotavirus. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology* 126:204-212.
- Meyer, J. C., Bergmann, C. C. y Bellamy, A. R. 1989. Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. *Virology* 171:98-107.
- Minks, M. A., West, D. K., Benven, S. y Baglioni, C. 1979. Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A)polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 254:10180-10183.
- Mitchell, D. B. y Both, G. W. 1990. Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2 and 3. *Virology* 177:324-331.
- Montefiori, D. C., Sobol, R. W., Li, S. H., Reichenbach, N. L., Suhadolnik, R. J., Charubala, R., Pfeleiderer, W., Modliszewski, A., Robinson, W. E. y Mitchell, W. M. 1989. Phosphorothioate and cordycepin analogues of 2',5'-oligoadenylate: inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and infection *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:7191-7194.
- Muñoz, M., Ríos, M. y Spencer, E. 1995. Characteristics of the single and double stranded RNA synthesis of a rotavirus SA11 mutant in the RNA polymerase gene. (Aceptado para publicación en revista *Intervirology*).
- Nicholson, K. G. 1984. properties of antiviral agents.1. *Lancet* 2(8401):503-506.
- Nielsen, T. W., Wood, D. L. y Baglioni, C. 1981. 2',5'-oligo(A)-activated endorribonuclease: tissue distribution and characterization withh a binding assay. *J. Biol. Chem.* 256, 10751-10754.

- Nielsen, T. W., Maroney, P. A. y Baglioni, C. 1982. Synthesis of (2'-5')oligoadenylate and inactivation of an endorribonuclease in interferon-treated HeLa cells infected with reovirus. *J. Virol.* 42: 1039-1045.
- Patton, J. T. 1986. Synthesis of simian rotavirus SA11 double stranded RNA in a cell-free system. *Virus Res.* 6:217-233.
- Patton, J. T. 1993. Rotavirus replication. Current topics in microbiology and immunology. vol. 185. Springer- Verlag Berlin-Heidelberg.
- Patton, J. T. y Gallegos, C. O. 1988. Structure and protein composition of the rotavirus replicase particle. *Virology* 166:358-365.
- Petrie, B. L., Graham, D. Y., Hanssen, H. y Estes, M. K. 1982. Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. *J. Gen. Virol.* 63:457-467.
- Pizarro, J. L., Sandino, A. M., Pizarro, J. M., Fernández, J. y Spencer, E. 1991 a. Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. *J. Gen. Virol.* 72:325-332.
- Pizarro, J. M., Pizarro, J. L., Fernández, J., Sandino, A. M. y Spencer, E. 1991 b. Effect of nucleotide analogues on rotavirus transcription and replication. *Virology* 184:768-772.
- Poruchynsky, M. S. y Atkinson, P. H. 1991. Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J. Virol.* 65:4720-4727.
- Ramig, R. F. y Petrie, B. L. 1984. Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11: protein synthesis and morphogenesis. *J. Virol.* 49: 665-673.
- Reid, R., Mar, E-C., Huang, E-S. y Topal, M. D. 1988. Insertion and extension of acyclic, dideoxy, and ara nucleotides by herpesviridae, human and human polymerases. *J. Biol. Chem.* 263: 3898-3904.
- Ríos, M., Muñoz, M., Torrence, P. F., y Spencer, E. 1995 a. Effect of interferon and 2';5'-oligoadenylates on rotavirus RNA synthesis. *Antiviral Research* 26: 133-143.

- Ríos, M., Muñoz, M., y Spencer E. 1995 b. Antiviral activity of phosphonoformate on rotavirus transcription and replication. *Antiviral Research* 27: 71-83.
- Ruggeri, F. M. y Greenberg, H. B. 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8\* neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in cell culture. *J. Virol.* 65:2211-2219.
- Sabara, M., Gilchrist, J. E., Hudson, G. R. y Babiuk, L. A. 1985. Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. *J. Virol.* 53:58-63.
- Sabara, M., Parker, M., Aha, P., Cosco, C., Gibbons, E., Parsons, S. y Babiuk, L. A. 1991. Assembly of double-shelled rotaviruslike particles by simultaneous expression of recombinant VP6 y VP7 proteins. *J. Virol.* 65: 6994-6997.
- Sandino, A. M.; Jashés, M., Faúndez, G. y Spencer, E. 1986. Role of the inner protein capsid on *in vitro* human rotavirus transcription. *J. Virol.* 60:797-802.
- Sandino, A. M., Pizarro, J., Fernández, J., Fellay, M. C. y Spencer, E. 1988. Involvement of structural and nonstructural polypeptides on rotavirus RNA synthesis. *Arch. Biol. Med. Exp.*, 21:381-392.
- Sandino, A. M., Fernández, J., Pizarro, J., Vásquez, M. y Spencer, E. 1994. Structure of rotavirus particle: interaction of the inner capsid protein VP6 with the core polypeptide VP3. *Biol. Res.* 27:39-48.
- Sandstrom, E. G., Kaplan, J. C., Byington, R. E. y Hirsch, M. S. 1985. Inhibition of human T-cell lymphotropic virus type III *in vitro* by phosphonoformate. *Lancet* i:1480-1482.
- Saulsbury, F. T., Winkelstein, J. A. y Yolken, R. H. 1980. Chronic rotavirus infection in immunodeficiency. *J. Pediatr.* 97:61-65.
- Schröder, H. C., Suhadolnik, R. J., Pfeleiderer, W., Charubala, R. y Müller, W. 1992. (2'-5')oligoadenylate and intracellular immunity against retrovirus infection. *Int. J. Biochem.* 24:55-63.
- Schwers, A., Vanden, C., Maenhoudt, M., Beduin, J. M. Werenne, J. y Pastoret, P. P. 1985. Experimental rotavirus diarrhoea in colostrum-deprived newborn calves: assay of treatment by administration of bacterially produced human interferon (Hu-IFN alpha 2). *Ann. Rech. Vet.* 16:213-218.

- Shahrabadi, M. S., Babiuk, L. A. y Lee, P. W. K. 1987. Further analysis of the role of calcium in rotavirus morphogenesis. *Virology* 158:103-111.
- Shuman, S., Spencer, E., Furneaux, H., Hurwitz, J. 1980. The role of ATP in *in vitro* vaccinia virus RNA synthesis: effects of AMP-PNP and ATP  $\beta$ S. *J. Biol. Chem.* 255:5396-5400.
- Slattery, E., Ghosh, N., Samanta, H. y Lengyel, P. 1979. Interferon, double stranded RNA, and RNA degradation: activation of a endonuclease by (2',5')A<sub>n</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4778-4782.
- Smith, M., Lazdins, I. y Holmes, I. 1980. Coding assignments of double stranded RNA segments of SA11 rotavirus established by *in vitro* translation. *J. Virol.* 33:976-981.
- Spencer, E. y Arias, M. I. 1981. *In vitro* transcription catalyzed by heat-treated human rotavirus. *J. Virol.* 40:1-10.
- Spencer, E. y García, B. I. 1984. Effect of S-adenosylmethionine on human rotavirus RNA synthesis. *J. Virol.* 52:188-197.
- Strid, S., Ekstrom, C. y Datema, R. 1989. Comparison of foscarnet and foscarnet esters as anti-influenza virus agents. *Chemotherapy* 35:69-76.
- Subramanian, M., Kovacs, T., Lesiak, K., Torrence, P. F. y Lenard, J. 1990. Inhibition of the RNA polymerase of vesicular stomatitis virus by ppp5'A2'p5'A and related compounds. *Antiviral Res.* 13:81-90.
- Sundquist, B. O. y Oberg, B. O. 1979. Phosphonoformate inhibits reverse transcriptase. *J. Gen. Virol.* 45:273-281.
- Taylor, J. A., O'Brien, J. A., Lord, V. J. Meyer, J. C. y Bellamy, R. 1993. The RER-localized rotavirus intracellular receptor: a truncated purified soluble form is multivalent and binds virus particles. *Virology* 194:807-814.
- Testa, D., Banerjee, A. 1979. Initiation of RNA synthesis *in vitro* by vesicular stomatitis virus: role of ATP. *J. Biol. Chem.* 254::2053-2058.

- Ushijima, H., Xin, K-Q., Nishimura, S., Morikawa, S. y Abe, T. 1994. Detection and sequencing of rotavirus VP7 gene from human materials (stools, sera, cerebrospinal fluids and throat swabs) by reverse transcription and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32:2893-2897.
- Valenzuela, S., Pizarro, J., Sandino, A. M., Vásquez, M., Fernández, J., Hernández, O., Patton, J. y Spencer, E. 1991. Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J. Virol.* 65:3964-3967.
- Vásquez, M., sandino, A. M., Pizarro, J. M., Fernández, J., Valenzuela, S. y Spencer, E. 1993. Function of rotavirus VP3 polypeptide in viral morphogenesis. *J. Gen. Virol.* 74:937-941.
- Xu, Z. y Woode, G. 1994. Studies on the influence of the VP7 gene on rotavirus replication. *Virology* 198:394-398.
- Yang, K., Samanta, H., Doughety, J., Jayaram, B., Broeze, R. y Lengyel, P. 1981. Interferons, double-stranded RNA and RNA degradation:isolation and characterization of homogeneous human (2'-5') (A)<sub>n</sub> synthetase. *J. Biol. Chem.* 256:9324-9328.
- Zeng, C. Q-Y., Labbé, M. Cohen, J., Prasad, B. V. V., Chen, D., Ramig, R. y Estes, M. K. 1994. Characterization of rotavirus VP2 particles. *Virology* 201: 55-65.





## Effect of interferon and 2',5'-oligoadenylates on rotavirus RNA synthesis

Maritza Ríos <sup>a</sup>, Marianne Muñoz <sup>a</sup>, Paul F. Torrence <sup>b</sup>,  
Eugenio Spencer <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Unidad de Virología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Macul 5540, Santiago-11, Chile*

<sup>b</sup> *Section on Biomedical Chemistry, Laboratory of Medicinal Chemistry, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA*

Received 18 July 1994; accepted 28 September 1994

### Abstract

Based on the antiviral effect of interferon on rotavirus replication the inhibitory effect of 2',5'-oligoadenylates on mRNA and double-stranded RNA synthesis was studied using an in vitro assay. The chemically synthesized oligonucleotides were used to determine several characteristics of the inhibitory effect, such as chain length, presence of phosphate residues at the 5'-end, and the 2',5'-phosphodiester bond itself. In vitro transcription was inhibited by oligos with 5 or more adenine residues at a final concentration of 100  $\mu$ M or greater. This result makes rotavirus transcriptase different from other viruses in which the inhibitory effects are associated with dinucleotides and trinucleotides. The inhibitory effect was increased when the oligo contained a phosphate residue at the 5'-end; in this case, inhibition was also seen at lower oligo concentrations as well as at shorter oligo chain length. The study of the kinetics of inhibition showed that the inhibition by p(A2'p5')<sub>3</sub>A was competitive with a  $K_i$  value of 256  $\mu$ M. The effect of the oligonucleotides on the in vitro viral RNA replication showed that the 2',5'-oligoadenylates were not able to significantly inhibit the in vitro rotavirus RNA synthesis. The lack of inhibition in the in vitro assay was very peculiar since RNA transcription and replication involves the viral RNA polymerase, VP1.

**Keywords:** Interferon; 2',5'-Oligoadenylate; Rotavirus

\* Corresponding author.

## 1. Introduction

In interferon-treated cells, the synthesis of several new proteins has been reported, including the 2',5'-oligoadenylate synthetase that catalyzes the synthesis of 2',5'-oligoadenylates of different chain lengths (Hovanessian and Kerr, 1979; Yang et al., 1981; Joklik, 1990). The 2',5'-oligoadenylates have been associated with the activation of ribonuclease L, which has been shown to be directly involved in the degradation of newly synthesized viral mRNA, by interference with the early stages of viral infection (Slattery et al., 1979; Nilsen et al., 1981; Joklik, 1990). Also, the presence of double-stranded RNA in the cytoplasm of viral infected cells has been suggested to be a mechanism for the activation of the oligoadenylate synthetase (Minks et al., 1979; Slattery et al., 1979; Yang et al., 1981). The involvement of the oligoadenylate synthetase and ribonuclease L in the specific degradation of viral mRNA was determined primarily in picornavirus- and reovirus-infected cells (Nilsen et al., 1982; Kumar et al., 1988). In cell free systems wherein replicative intermediates of both viruses were incubated with a interferon-treated HeLa cell extract, viral mRNA was degraded thereby showing the relation between the synthesis of oligoadenylates and the antiviral response (Nilsen and Baglioni, 1979; Baglioni et al., 1984).

2',5'-Oligoadenylates have been implicated in the suppression of viral transcription and replication by their ability to inhibit the activity of enzymes involved in viral morphogenesis (Henderson et al., 1982; Liu and Owens, 1987; Subramanian et al., 1990; Schroder et al., 1992). The VSV RNA polymerase and topoisomerases are inhibited by different mechanisms since the dependence upon the chain length of the oligo seems to differ for each enzyme (Subramanian et al., 1990; Castora et al., 1991).

In the present paper, we describe the effect of the 2',5'-oligonucleotides, taking advantage of an in vitro transcription and replication assay for rotavirus RNA synthesis that obviates problems derived from cell uptake and intracellular degradation of the 2',5'-oligoadenylates.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Virus and cells

SA-11 virus stocks were a gift from Dr. John Patton. The SA-11 rotavirus strains were grown by infection of MA-104 cells, using m.o.i. of 1–2 as described elsewhere (Sandino et al., 1988). The virus was purified from the cell lysate as previously described (Sandino et al., 1988).

### 2.2. Preparation of viral particles

Single-shelled particles were obtained by EDTA treatment from purified double-shelled virus particles, as previously described (Cohen et al., 1979; Sandino et al., 1986). Intracellular viral particles with double-stranded RNA synthesis activity were obtained from confluent monolayers of MA-104 cells infected with virus stock at a m.o.i. of 5, at

6 h postinfection. From the infected cell lysates, the replicative subviral particles were then purified as previously described (Patton, 1986). Subviral particles were resuspended in a final volume of 10  $\mu$ l of HGD buffer (10 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethanesulfonic acid (HEPES)-HCl, pH 7.6/10% glycerol/2 mM DTE) per starting tissue culture flask. Particles were used in reactions immediately or stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until needed.

### 2.3. Interferon effect on rotavirus-infected MA-104 cells

MA-104 cells were seeded on 5-cm<sup>2</sup> culture tubes and incubated for 24 h at 37°C in MEM containing 5% fetal bovine serum. Confluent monolayers were washed twice with MEM and pretreated with MEM without serum containing 0, 1000, 2000, 5000 or 10,000 units/ml of IFN- $\alpha_{2a}$  (recombinant human leukocyte interferon- $\alpha_{2a}$ , Roferon A, was provided by Dr. Claudio Blank, Laboratorio Roche, Chile) and incubated for 24 h at 37°C. The cultures were then washed twice with MEM and infected with 10 PFU/cell or 1 PFU/cell of trypsin-activated SA-11 rotavirus (10  $\mu$ g/ml trypsin, 30-min incubation at 37°C). Following 1-h adsorption at 37°C, the inoculum was removed and replaced with phosphate-free MEM containing 20  $\mu$ Ci/ml [<sup>32</sup>P]orthophosphoric acid and the same IFN- $\alpha_{2a}$  concentrations as the monolayers had in the preincubation period. The tubes infected with 10 m.o.i. of trypsin-activated SA-11 rotavirus were incubated for 9 h at 37°C, whereas for those tubes infected with 1 m.o.i., the period of incubation was 24 h. At the end of the incubation, the medium was removed and the cells were resuspended in hypotonic buffer (3 mM Tris-HCl, pH 8.1; 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 3 mM NaCl), extracted with phenol-chloroform and ethanol precipitated. After overnight incubation at  $-20^{\circ}\text{C}$  with ethanol, the viral RNA was obtained by centrifugation at 12,000 *g* for 30 min at 4°C. Rotavirus double-stranded RNA genome segments were analyzed by 7% polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. Control mock-infected cells treated for 48 h with the same IFN- $\alpha_{2a}$  doses as in the above-described experiment, did not present any cytopathic effect.

### 2.4. Synthesis of 2',5'-oligoadenylates

The 5'-monophosphorylated 2',5'-oligoadenylates used in this study were prepared by the lead ion-catalyzed oligomerization of adenosine 5'-phosphoroimidazolidate as previously described (Torrence et al., 1984). 5'-Triphosphates were made by reaction of the corresponding phosphoroimidazolidate with tri-*n*-butylammonium pyrophosphate (Imai and Torrence, 1985). The 2',5'-oligoadenylates (lacking a 5'-phosphate moiety) were obtained from commercial sources (Calbiochem, Sigma) and repurified as described previously (Torrence et al., 1984).

### 2.5. RNA polymerase assay

#### *mRNA synthesis*

Purified single-shelled rotavirus particles were assayed for RNA polymerase activity by incubation in a 25- $\mu$ l reaction mixture containing 120 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1 mM

MgCl<sub>2</sub>, 40 mM NaCl, 0.1 mM *S*-adenosylmethionine, 0.2 mM each ATP, CTP and GTP and 0.24 mM of [<sup>3</sup>H]UTP (SA: 40 cpm/pmol). The mixture was incubated for 30 min at 45°C. To analyze the transcriptional product, the acid-soluble radioactivity was determined.

#### *Double-stranded RNA synthesis*

In the assay to determine the replicase activity, conditions identical to those described above for mRNA synthesis were used, except that [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (SA: 3000 cpm/pmol) was used instead of tritium-labeled UTP and the *S*-adenosylmethionine was eliminated from the mixture. The reaction was then incubated at 45°C for 60 min. The replicase activity was determined by analysis of the reaction products after phenol extraction and ethanol precipitation by RNA gel electrophoresis in 8% polyacrylamide gels where the presence of the 11 double-stranded RNA segments was determined as described elsewhere (Patton and Gallegos, 1988). Viral particles assayed to measure RNA replication activity were purified from infected cells as described above.

### 3. Results

The effect of interferon on rotavirus infection was determined by pretreatment of MA-104 cells with different amounts of recombinant human IFN- $\alpha_{2a}$ , before infection of cell monolayers. The interferon effect on rotavirus multiplication was assayed by determining radioactivity associated with the double-stranded viral RNA by gel electrophoresis after labeling the virus RNA with [<sup>32</sup>P]orthophosphoric acid. As seen in Fig. 1, MA-104 cells were effectively protected, in a concentration-dependent manner, against SA-11 rotavirus infection by IFN, based on the decrease of the viral double-stranded RNA synthesis detected by PAGE. When the cells were infected at an m.o.i. of 10, the effect of interferon was observed at a concentration of 2000 IU/ml and total inhibition at 10,000 IU/ml of IFN. Using this high virus-to-cell m.o.i. the IFN effect was observed as early as 9 h postinfection. At lower m.o.i. (1 PFU/cell) with multiple rounds of infection (24 h.p.i.), the effect of IFN was also evident. This shows that the IFN probably inhibits early steps of rotavirus morphogenesis.

Based on the effect that IFN has on the synthesis of 2',5'-oligoadenylates, the effect of several 2',5'-oligoadenylates on *in vitro* rotavirus transcription was determined using purified single-shelled SA-11 rotavirus particles. The assay involved the addition of different amounts of 2',5'-oligoadenylates to the reaction mixture, and after 30 min of incubation at 45°C, the amount of RNA synthesized was determined as acid-insoluble radioactivity. The effect on the reaction of the different 2',5'-oligoadenylates was expressed as the percentage of the RNA polymerase activity compared with a control with no additions. In Fig. 2, the effect of chain length is shown. Non-5'-phosphorylated oligomer containing 4 residues was able to inhibit MRNA synthesis of rotavirus by about 30%, but one with 5 adenosines was more than 50% inhibitory at a concentrations lower than 0.2 mM. Oligos with less than 4 adenosine residues did not inhibit, even at higher concentrations (Fig. 2A). When 2',5'-oligoadenylates with the 5'-terminal monophosphates were used, an increase of the inhibitory effect was obtained. As seen in

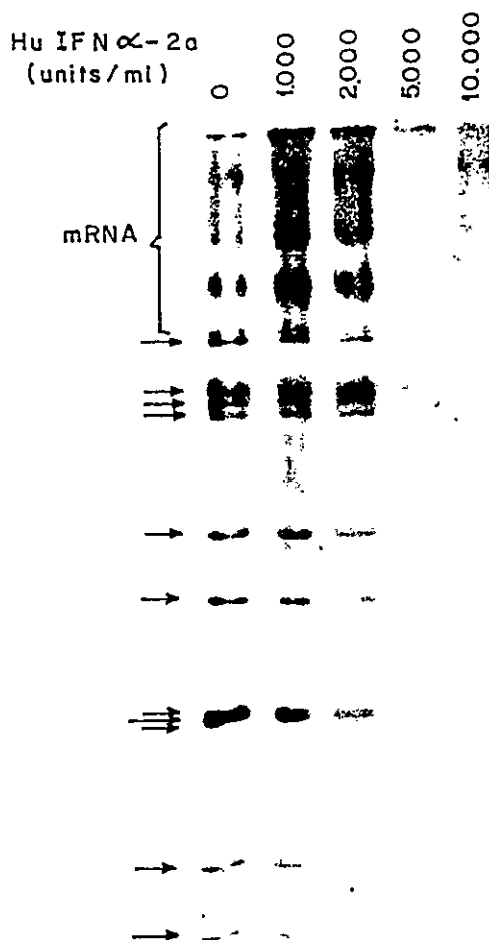
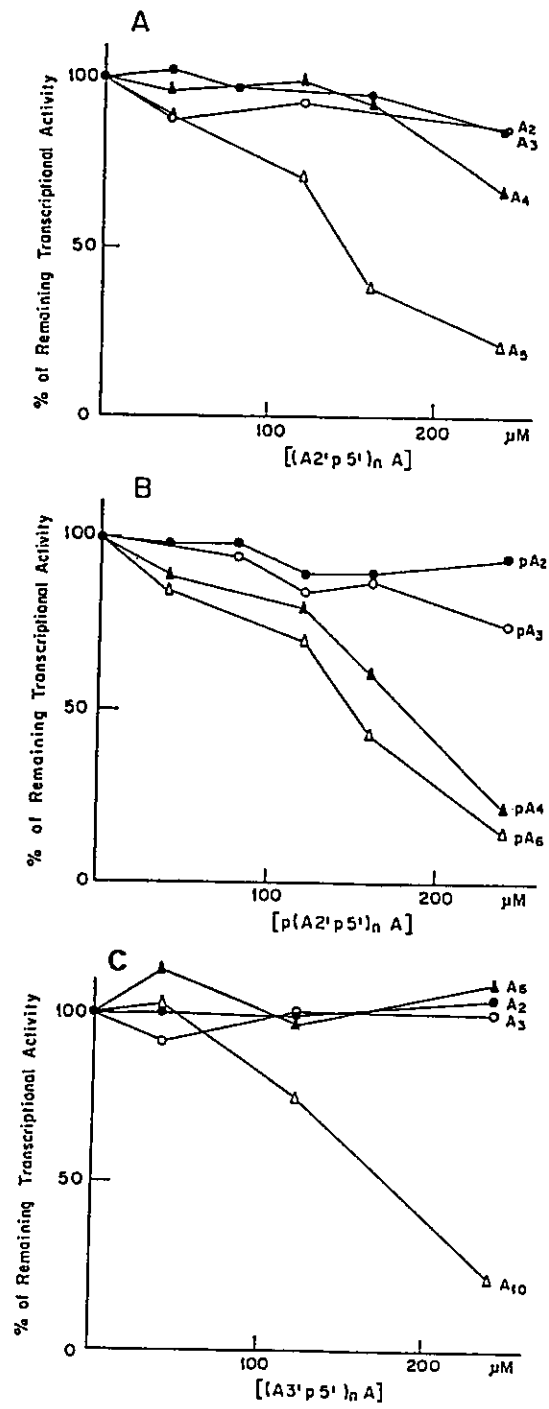


Fig. 1. Inhibition of SA-11 multiplication by interferon. The effect of interferon on rotavirus infection was determined by pretreatment of MA-104 cells for 24 h with 0-10,000 units per ml of recombinant human interferon- $\alpha_2$ . Control and IFN-treated cells were infected with rotavirus SA-11 at a m.o.i. of 10, at 9 hours postinfection, the cells were harvested, and the RNA purified and analyzed by PAGE and autoradiography as described in Materials and methods. In the figure, the IFN doses used, as well as the 11 dsRNA segments of the rotavirus genome, are indicated.

Fig. 2B, an 80% inhibition was obtained with the 2',5'-tetraadenylate 5'-monophosphate as compared with the non-phosphorylated oligo, which at a similar concentration yielded only 35% inhibition. In order to determine the specificity of the inhibitory effect exerted by the 2',5'-bond in the oligonucleotides, the effect of 3',5'-oligoadenylates was studied. As seen in Fig. 2C, only oligonucleotides with a chain length over 7 were able to inhibit, and oligos containing less than 6 adenine residues were not inhibitory. In these experiments, an inhibitory effect could be detected at concentrations over 200  $\mu$ M for a 3',5'-oligoadenylate of a chain length of 10 residues.



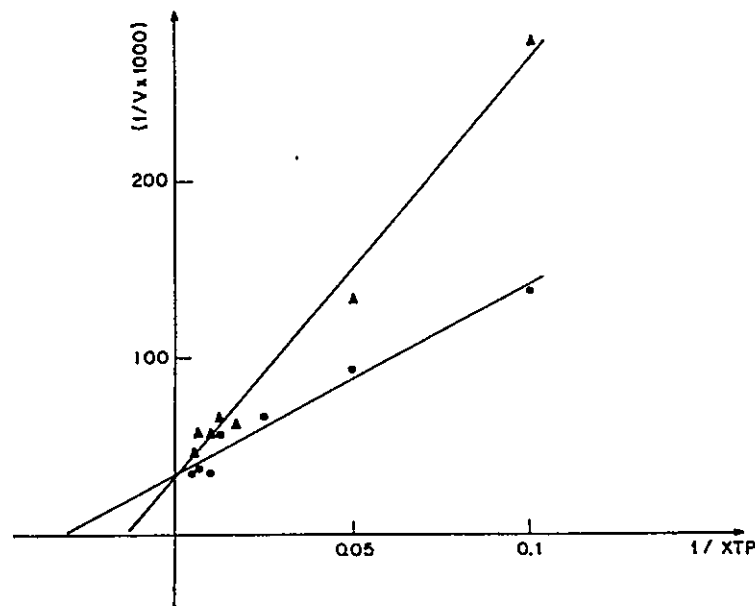


Fig. 3. Kinetics of inhibition of rotavirus mRNA synthesis by 5'-monophosphate 2',5'-tetraadenylate. Double-reciprocal plot of the reaction rate in the presence of different concentrations of XTP (ATP, CTP, GTP), and with  $p(A2'p5')_3A$ . The initial velocities were expressed as cpm of  $[^3H]UMP$  incorporated into acid-insoluble material.  $p(A2'p5')_3A$  concentrations were 0 (●) and 144  $\mu M$  (▲).

The kinetic parameters of the reaction were studied for the 5'-monophosphate 2',5'-tetraadenylate. The characteristics of the inhibition were determined using a concentration of the oligo of 144  $\mu M$  that inhibited over 50% the RNA polymerase activity. In Fig. 3, the Lineweaver-Burk plot indicated that the oligo exerted a competitive mechanism of inhibition with a  $K_i$  of 256  $\mu M$ .

The study of the inhibitory effect exerted by the 2',5'-oligoadenylates on the viral RNA polymerase, was extended to the ability to inhibit the viral enzyme when catalyzing the synthesis of the double-stranded viral RNA. The only difference between the viral activity involved in mRNA and dsRNA synthesis, is that for the transcription activity, RNA polymerase (VP1) is active in a single-shelled particle that contains the 11

Fig. 2. Inhibition mRNA synthesis catalyzed by single-shelled SA-11 virus particles by 2',5'-oligoadenylates. Purified single-shelled SA-11 particles were assayed for RNA polymerase activity for 30 min at 45°C. The RNA polymerase activity was determined as incorporation of  $[^3H]UMP$  into acid-insoluble material in the presence of the indicated amounts of the different 2',5'-oligoadenylates. The results are expressed as percentage of a control reaction carried out without addition of any oligoadenylate (100% corresponds to 257 pmol of  $[^3H]UMP$  incorporated into acid-insoluble material). (A) The effect of the addition of oligoadenylates with a non-phosphorylated 5'-end, from 2–5 adenine residues in length. (B) The effect of 2',5'-oligoadenylates with the 5'-monophosphate end. (C) The effect of the addition of the 3',5'-oligoadenylates.

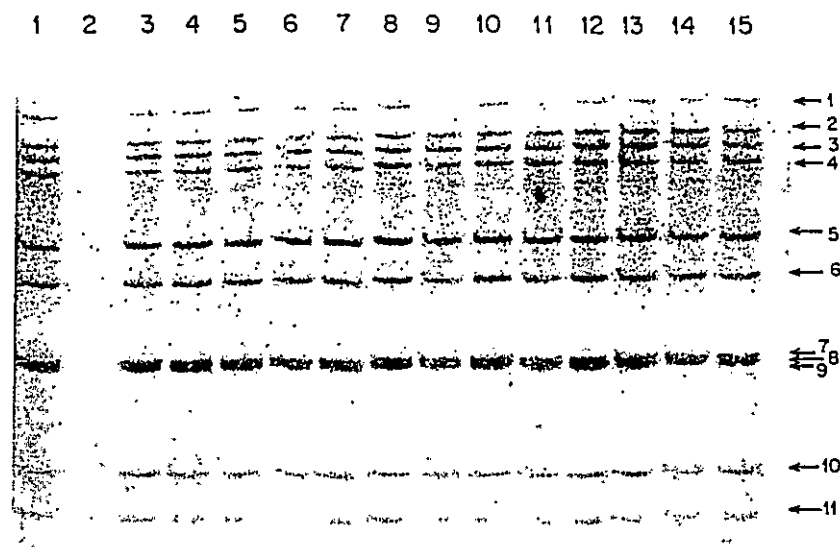


Fig. 4. Effect of the addition of 2',5'-oligoadenylates on the double-stranded RNA synthesis catalyzed by partially purified SA-11 subviral particles. Partially purified SA-11 subviral particles were assayed for double-stranded RNA synthesis by incubation in a 25  $\mu$ l reaction mixture containing 150 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM NaCl, 2 mM each ATP, CTP and GTP and 0.02 mM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (SA: 3000 cpm/pmol). The reaction was then incubated at 45°C for 60 min and the reaction products analyzed by gel electrophoresis in 8% polyacrylamide gels and further autoradiography. Lane 1 corresponds to a reaction carried without the addition of any oligoadenylate. Lane 2 is a control where 200  $\mu$ M of 9( $\beta$ -D-arabinofuranosyl)adenine (Ara-A) was added. In the rest of the autoradiogram, the oligoadenylates were added according to the following order: 2',5'-diadenylate (lane 3); 2',5'-diadenylate-5'-monophosphate (lane 4); 2',5'-triadenylate (lane 5); 2',5'-triadenylate-5'-monophosphate (lane 6); 2',5'-triadenylate-5'-triphosphate (lane 7); 2',5'-tetraadenylate (lane 8); 2',5'-tetraadenylate-5'-monophosphate (lane 9); 2',5'-tetraadenylate-5'-triphosphate (lane 10); 2',5'-pentaadenylate (lane 11); 2',5'-pentaadenylate-5'-monophosphate (lane 12); 3',5'-triadenylate (lane 13); 3',5'-hexaadenylate (lane 14) and 3',5'-decaadenylate (lane 15). The arrows indicate the migration of each of the 11 double-stranded RNA segments determined by marker obtained by direct extraction from purified virus particles and stained with silver nitrate.

RNA genes and polypeptides: VP1, VP2, VP3 and VP6 and the particle with replicase activity is made of VP1, VP3 and non-structural NS34, NS35, and NS54 polypeptides and the mRNA. The assay conditions for the replicase activity were identical to those used to determine in vitro viral mRNA synthesis, but the activity was measured by the specific detection of the 11 double-stranded RNA segments when the reaction products were analyzed by RNA gel electrophoresis. As shown in Fig. 4, the subviral particles were able to synthesize the 11 double-stranded RNA segments (lane 1), and the 2',5'-oligoadenylates at concentrations of 0.6 mM, were unable to inhibit viral RNA replication independent of the chain length or the number of phosphate residues at the 5'-end (lanes 3–12). In this case, 9( $\beta$ -D-arabinofuranosyl)adenine-5'-triphosphate (Ara-ATP), a powerful inhibitor of rotavirus in vitro replication, was used as a control (lane 2).



#### 4. Discussion

The antiviral effects of the 2',5'-oligoadenylates include the inhibition of the synthesis of viral RNA and the degradation of viral mRNA as a direct consequence of the activation of a specific endonuclease. The presence in the infected cells of an increased concentration of 2',5'-oligoadenylates is a direct consequence of the presence of interferon, synthesized in response to viral infection (Nilsen et al., 1981; Slattery et al., 1979; Joklik, 1990). Among the mechanisms involved for the antiviral response to interferon, the direct inhibitory effect of 2',5'-oligoadenylates on viral enzymes has also been reported. The results of the studies on the inhibition of rotavirus replication by interferon, using different m.o.i. showed that inhibition was dependent on the IFN concentration suggesting that inhibition may involve a direct effect on RNA synthesis such as described above.

Here, the effect of 2',5'-oligoadenylates on rotavirus mRNA and double-stranded RNA synthesis was studied using an *in vitro* assay. The chemically synthesized oligonucleotides permitted determination of several characteristics of the inhibitory effect on the *in vitro* mRNA synthesis, such as chain length, presence of phosphate residues at the 5'-end of the oligo, and the importance of the 2',5'-bond itself. Under the assay conditions, used inhibitory effect was observed with the oligos containing 4 or more adenylate residues at a final concentration greater than 100  $\mu\text{M}$ . This result was different from those previously reported for other viruses, where the greater inhibitory effects were obtained with shorter 2',5'-oligonucleotides (Henderson et al., 1982; Liu and Owens, 1987; Subramanian et al., 1990); in those cases the dinucleotides and trinucleotides were highly inhibitory. In the present case, an increased inhibitory effect with the smaller oligo was obtained only when a phosphate residue was present at the 5'-end; in addition, inhibition was seen at lower oligo concentrations. Based on the above results and on the nature of the kinetics of inhibition seen in Fig. 3, where it is shown that the inhibition exerted by the 2',5'-tetraadenylate-5'-monophosphate is competitive, it could be argued that the 2',5'-oligoadenylates may affect initiation of the RNA chains. The value of  $K_i$  of 256  $\mu\text{M}$  is similar to that described by others (Castora et al., 1991). The inhibitory effect of the oligo depended upon the nature of the phosphodiester bond, since inhibition with 3',5'-oligoadenylates was observed, but only at higher concentration and with oligos of more of 6 residues in length. Thus, the results argue in favor of a specific effect of the 2',5'-oligoadenylates and this effect depends upon the chain length.

The study of the effect of the oligonucleotides on the *in vitro* viral RNA replication showed that the 2',5'-oligoadenylates are not able to inhibit in the *in vitro* rotavirus RNA replication assay. The lack of inhibition involves the synthesis of all 11 RNA segments. The lack of inhibition in the *in vitro* assay is very peculiar, since the RNA polymerase activity involved in both transcription and replication is based on the same viral protein, VP1. The difference in the inhibitory effect of the 2',5'-oligoadenylates could be related to differences existing between the viral particles involved in transcription and those involved in replication. An additional explanation could be related to the fact that mRNA synthesis catalyzed by the single-shell particle involves both initiation and elongation of the RNA chain. In contrast, *in vitro* replication seems to involve more

elongation than initiation of new RNA chain. Since most of the RNA synthesizing activity during the in vitro replication assay, is related to elongation of preinitiated chains, the 2',5'-oligo could then exert a more limited inhibitory effect. In the case of transcription, the viral particle is the single-shelled particle made of central core that contains the viral genome and VP1 (the polymerase), VP2 (RNA binding protein) and VP3 (the guanylyltransferase) and the inner capsid made of the major viral protein, VP6 (Sandino et al., 1986, 1988). On the other hand, the replicase particle is not very well defined in terms of structure, but is made by the 11 mRNA and VP1, VP2 and VP3 plus three non-structural polypeptides NS34, NS35 and NS54 (Helmberger-Jones and Patton, 1986; Sandino et al., 1988; Mansell and Patton, 1990). Thus, it is possible that the difference in the template of the reaction and in the interaction of VP1 with different polypeptides in both particles could be responsible for the different sensitivity to 2',5'-oligoadenylates.

Interferon exerts an antiviral effect at several levels of viral morphogenesis. In the particular case of rotavirus, the synthesis of 2',5'-oligoadenylates could be responsible of the inhibition of viral mRNA synthesis, thereby inhibiting viral protein synthesis. However, the antiviral effect of the oligo does not involve the inhibition of viral RNA replication in order to block viral morphogenesis. These considerations do not exclude the possibility that the interferon could inhibit viral replication through any other of the mechanisms described as part of the antiviral response.

### Acknowledgements

M.R. was supported by a CONICYT fellowship. This work was partially supported by grants from SAREC (Swedish Agency for Research Cooperation) and FONDECYT 1067-92 to E.S.

### References

- Baglioni, C., De Benedetti, A. and Williams, G.J. (1984) Cleavage of nascent reovirus mRNA by localized activation of the 2'-5'-oligoadenylate-dependent endoribonuclease. *J. Virol.* 52, 865-871.
- Castora, F.J., Erickson, C.E., Kovács, T., Lesiak, K. and Torrence, P.F. (1991) 2',5'-oligoadenylates inhibit relaxation of supercoiled DNA by calf thymus DNA topoisomerase I. *J. Interferon Res.* 11, 143-149.
- Cohen, J., Laporte, J., Charpilienne, A. and Scherrer, R. (1979) Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60, 177-186.
- Helmberger-Jones, M. and Patton, J.T. (1986) Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. *Virology* 155, 655-665.
- Henderson, E.E., Doetsch, P.W., Charubala, R., Pfeleiderer, W. and Suhadolnik, R.J. (1982) Inhibition of Epstein-Barr Virus-Associated Nuclear Antigen (EBNA) induction by (2',5')oligoadenylate and the cordycepin analog: mechanism of action for inhibition of EBV-induced transformation. *Virology* 122, 198-201.
- Hovanessian, A.G. and Kerr, I.M. (1979) The (2'-5')oligoadenylate (pppA2'-5'A2'-5'A) synthetase and protein kinase(s) from interferon-treated cells. *Eur. Biochem.* 93, 515-526.
- Imai, J., and Torrence, P.F. (1985) Expedient chemical synthesis of sequence-specific 2',5'-oligoadenylates. *J. Org. Chem.* 50, 1418-1420.

- Joklik, W.K. (1990) Interferons. In: B.N. Fields, D.M. Knipe et al. (Eds.), *Virology*, pp. 383–410. Raven Press, New York.
- Kumar, R., Choubey, D., Lengyel, P. and Sen, G.C. (1988) Studies on the role of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase-RNase L pathway in beta interferon-mediated inhibition of encephalomyocarditis virus replication. *J. Virol.* 62, 3175–3181.
- Liu, D.K. and Owens, G.F. (1987) Inhibition of viral reverse transcriptase by 2',5'-oligoadenylates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 291–297.
- Mansell, E.A. and Patton, J.T. (1990) Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *J. Virol.* 64, 4988–4996.
- Minks, M.A., West, D.K., Benveniste, S. and Baglioni, C. (1979) Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 254, 10180–10183.
- Nilsen, T.W. and Baglioni, C. (1979) A mechanism for discrimination between viral and host mRNA in interferon-treated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 2600–2604.
- Nilsen, T.W., Wood, D.L. and Baglioni, C. (1981) 2',5'-oligo(A)-activated endoribonuclease: tissue distribution and characterization with a binding assay. *J. Biol. Chem.* 256, 10751–10754.
- Nilsen, T.W., Maroney, P.A. and Baglioni, C. (1982) Synthesis of (2'-5')oligoadenylate and inactivation of an endoribonuclease in interferon-treated HeLa cells infected with reovirus. *J. Virol.* 42, 1039–1045.
- Patton, J.T. (1986) Synthesis of simian rotavirus SA11 double-stranded RNA in a cell-free system. *Virus Res.* 6, 217–233.
- Patton, J.T. and Gallegos, C.O. (1988) Structure and composition of the rotavirus replicase particle. *Virology* 166, 358–365.
- Sandino, A.M., Jashés, M., Faúndez, G. and Spencer, E. (1986) Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. *J. Virol.* 60, 797–802.
- Sandino, A.M., Pizarro, J., Fernández, J., Fellay, M.C. and Spencer, E. (1988) Involvement of structural and nonstructural polypeptides on rotavirus RNA synthesis. *Arch. Biol. Med. Exp.* 21, 381–392.
- Schroder, H.C., Suhadolnik, R.J., Pfeleiderer, W., Charubala, R. and Muller, W.E.G. (1992) (2'-5')Oligoadenylate and intracellular immunity against retrovirus infection. *Int. J. Biochem.* 24, 55–63.
- Slattery, E., Ghosh, N., Samanta, H. and Lengyel, P. (1979) Interferon, double-stranded RNA, and RNA degradation: activation of an endonuclease by (2',5')A<sub>n</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4778–4782.
- Subramanian, M., Kovacs, T., Lesiak, K., Torrence, P.F. and Lenard, J. (1990) Inhibition of the RNA polymerase of vesicular stomatitis virus by ppp5'A2'p5'A and related compounds. *Antiviral Res.* 13, 81–90.
- Torrence, P.F., Imai, J., Lesiak, K., Jamouille, J.C. and Sawai, H. (1984) Oligonucleotide structural parameters that influence binding of 5'-O-triphosphoadenylyl-(2'-5')-adenylyl-(2'-5')-adenosine to the 5'-O-triphosphoadenylyl-(2'-5')-adenylyl-(2'-5')-adenosine dependent endoribonuclease: chain length, phosphorylation state, and heterocyclic base. *J. Med. Chem.* 27, 726–733.
- Yang, K., Samanta, H., Dougherty, J., Jayaram, B., Broeze, R. and Lengyel, P. (1981) Interferons, double-stranded RNA, and RNA degradation: isolation and characterization of homogeneous human (2'-5') (A)<sub>n</sub> synthetase. *J. Biol. Chem.* 256, 9324–9328.



## Antiviral activity of phosphonoformate on rotavirus transcription and replication

Maritza Ríos, Marianne Muñoz, Eugenio Spencer \*

*Unidad de Virología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Macul 5540, Santiago-11, Chile*

Received 23 August 1994; accepted 21 November 1994

---

### Abstract

The antiviral effect of foscarnet (PFA) on the replication of rotavirus, a member of the *Reoviridae*, was studied. The pyrophosphate analogue is an effective inhibitor of several viral polymerases acting on the enzyme pyrophosphate binding site. Replication of rotavirus in MA104 cells using different u.o.i. was inhibited by PFA in a concentration dependent manner, due to the inhibition of both plus- and minus-strand RNA synthesis. The addition of PFA to infected cells was specific for the inhibition of viral replication since uninfected cells incubated at the same PFA concentrations did not exhibit any cytotoxic effect. The 50% inhibitory effect of PFA on in vitro mRNA synthesis was obtained at a concentration of 150  $\mu$ M.

Over 80% of the in vitro minus-strand RNA synthesis was inhibited at a concentration of 320  $\mu$ M, when PFA was assayed using replicase-enriched cell infected fraction. The results suggest that the effect may be due to an interaction of PFA with the viral polymerase, since this protein catalyses both plus- and minus-strand RNA synthesis. The results of experiments using the temperature-sensitive viral polymerase mutant show that the mutant is less sensitive to PFA, suggesting that this polypeptide is the target for PFA.

*Keywords:* Rotavirus; Transcription-replication; Phosphonoformate

---

### 1. Introduction

Rotaviruses, members of the *Reoviridae* family are the major cause of severe childhood gastroenteritis world wide (Estes, 1990). The prolonged course of the rotaviral

---

\* Corresponding author.

disease in many infants, is caused by continued replication of virus in superficial epithelial cells of the small intestine or by sequential infection (Kapikian and Chanock, 1990; Spencer et al., 1983). At present, the disease is controlled only by treating the symptoms, replacing the body fluids and electrolytes (Kapikian and Chanock, 1990; Kapikian et al., 1978; Santosham et al., 1982). Several efforts have been made to produce rotaviral vaccines, but up to date they have failed or are in experimental stage of development (Conner et al., 1993; Pérez-Schael et al., 1990).

The viral genome consists of eleven segmented double-stranded RNA's contained in a core made of proteins VP1, VP2, VP3, surrounded by a double-shelled protein capsid. The outer shell contains VP4 and VP7 and the inner shell is made of the major viral polypeptide, VP6 (Estes, 1990; Estes and Cohen, 1989). Viral particles lacking the outer shell, called single-shelled particles, obtained either from infected cells or purified from viral particles have *in vitro* transcriptional activity capable to synthesize viral mRNA using as template each double-stranded RNA segment (Spencer and Arias, 1981). The non-structural rotavirus proteins NS53, NS35 and NS34 might play an important role in the minus-strand RNA synthesis (Patton, 1993). They might be responsible for the viral mRNA production and also be part of the subparticle that synthesize and encapsidate the genomic RNA (Gallegos and Patton, 1989; Helmberger-Jones and Patton, 1986; Kattoura et al., 1992; Sandino et al., 1988). The minus-strand synthesis is an asymmetrical process where each one of the eleven mRNA segments acts as a template for the synthesis of negative-strand RNA to produce double-stranded RNAs (Patton, 1986).

In previous reports, the antiviral properties of a series of nucleoside derivatives on rotavirus infected cell cultures and on *in vitro* RNA synthesis were studied (Pizarro et al., 1991; Smee et al., 1982). The results showed that some of these analogues inhibited the virus multiplication by interfering with the plus-RNA (mRNA) synthesis but not the minus-strand RNA synthesis (RNA replication). Other group of analogues such as the 2',5'-oligoadenylates inhibited transcriptions but not the rotavirus minus-strand RNA synthesis *in vitro* (Ríos et al., unpublished). These results might be explained because, the synthesis of the minus- and plus-strand RNA is carried out by different rotavirus subparticles, where participate the same viral polypeptides. These particles, differ by the presence of non-structural polypeptides or the inner capsid made of VP6. (Helmberger-Jones and Patton, 1986; Mansell and Patton, 1990; Sandino et al., 1986).

The purpose of the present communication is to describe investigations of the effect of phosphonoformic acid (foscarnet, PFA), a non-nucleoside pyrophosphate analogue inhibitor of viral polymerases, on the *in vitro* plus- and minus-strand RNA synthesis of simian rotavirus. The effect of PFA on rotavirus replication in infected cells was determined by adding the compound under different conditions to the cell cultures.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *Virus and cells*

Simian rotavirus SA-11 was propagated in MA104 cells infected at different multiplicities of infection (m.o.i.), from 1 to 10. Infected cultures were maintained in

minimum essential media (MEM) without serum but containing 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  trypsin until all cells displayed a cytopathic effect. The virus was purified from the cell lysate as previously described (Sandino et al., 1988).

### 2.2. Phosphonoformate effect on rotavirus infection

MA104 cells were seeded on 5-cm<sup>2</sup> culture tubes and incubated at 37°C for 24 hours in MEM containing 5% fetal calf serum. At 2.5 hours before rotavirus infection, the cells were washed with MEM without serum and incubated with different concentrations of phosphonoformate and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DEAE-Dextran. Then the monolayers were washed and infected with 1 and 10 m.o.i. of rotavirus activated with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of trypsin for 30 min. After 60 min adsorption, the cells were washed with phosphate-free MEM and incubated in phosphate-free MEM containing 20  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [<sup>32</sup>P]-orthophosphoric acid and the same phosphonoformate concentrations for eight hours. At the end of the incubation of the cells were resuspended in hypotonic buffer, extracted with phenol-chloroform and ethanol-precipitated. After overnight incubation at -20°C, the viral RNA was obtained by centrifugation at 14,900 g for 30 minutes and then the double stranded RNA was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography.

### 2.3. Cytotoxicity assay

The assay using MA104 cells, was carried out as described by Shigeta et al. (1992). The foscarnet effect was determined by counting the viable cell numbers with a hemocytometer. The number of viable cells was determined by trypan blue exclusion after 24 hours of incubation with the compound.

### 2.4. Preparation of viral particles for *in vitro* plus- and minus- strand RNA synthesis

The SA-11 rotavirus strains were grown by infection of MA104 cells, using m.o.i. of 1–2, and when 90–100% of cells showed cytopathic effects, the cultures were freeze-thawed three times and centrifugated at 56,800 g for 2.5 hours and processed as described elsewhere (Sandino et al., 1988). Intracellular viral particles with minus-strand RNA synthesis activity were obtained from confluent monolayers of MA104 cells infected with virus stock at a m.o.i. of 5–10, under the same conditions as above. At six hours post-infection, the medium was withdrawn and the monolayers treated with 1–2 ml of hypotonic buffer (3 mM Tris-HCl, pH 8.1; 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 3 mM NaCl) and the replicative subviral particles were then purified as previously described (Helmberger-Jones and Patton, 1986).

### 2.5. Assays for *in vitro* plus- and minus-strand RNA synthesis

Purified rotavirus particles were assayed for RNA polymerase activity for plus-strand synthesis using purified heat-treated double-shelled viral particles incubated in a 25- $\mu\text{l}$  reaction mixture containing 120 mM Tris-HCl (pH 8.5), 14 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM NaCl,

0.2 mM *S*-adenosylmethionine, 4 mM each ATP, CTP and GTP and 0.2 mM of  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] UTP (SA: 400 cpm/pmol) or 0.24 mM of [<sup>3</sup>H] UTP (SA: 100 cpm/pmol). The mixture was then incubated for 30 minutes at 45°C and the reaction products were analyzed by determination of the acid insoluble radioactivity or subjected to electrophoresis in 8 M urea-polyacrylamide gels as described elsewhere (Valenzuela et al., 1991). The effect on the reaction of foscarnet was expressed as the percentage of RNA polymerase activity compared with a control done without the analogue. Minus-strand RNA synthesis was determined by the synthesis of full length double-stranded RNA by the replicase activity associated with subviral particles using a modification of the assay initially described by Patton (1986). The conditions were identical to those described above for plus-strand RNA synthesis except that *S*-adenosylmethionine was eliminated from the mixture and  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] UTP (SA: 3000 cpm/pmol) was used instead of tritium-labelled UTP. The reaction mixture was incubated for 60 minutes at 45°C; at the end of the incubation, the mixture was cooled in ice and incubated for other 10 min at 37°C with 10  $\mu$ g/ml pancreatic RNase A. The replicase activity was determined by analysis of the reaction products, after phenol extraction and ethanol precipitation, by RNA gel electrophoresis in 7% polyacrylamide gels where the presence of the 11 double-stranded RNA segments was determined according to the migration of genomic RNA obtained from purified virus particles described elsewhere (Vásquez et al., 1993).

### 3. Results

#### 3.1. Effect of PFA on SA-11 replication in MA104 cells

To explore the antiviral effect of phosphonoformate, MA104 cells were infected with SA-11 in the presence of different concentrations of the compound. The infection was done, using trypsin-activated SA-11 at a m.o.i. of 10 and then PFA was added to the MA104 cells monolayer in the range 0.01 to 1 mM from the beginning of the infection. Under these conditions, PFA did not have any effect on rotavirus growth, measured as both inhibition of CPE and on the detection of viral double stranded RNA synthesized at 20 hours p.i. This result does not seem to be due to a direct effect on the cells, since under these conditions the mock-infected cells did not show any signs of cytotoxicity. Similar results were obtained when cells were infected at a m.o.i of 1 and the effect of PFA was measured as double stranded RNA synthesis at 48 p.i.; in this case the mock-infected cells treated with phosphonoformate did not present any cytotoxic effect as determined by trypan blue cell exclusion.

To overcome the poor cell permeability of phosphonoformate, the cell cultures were preincubated for 2.5 hours with different PFA concentrations, in the range 0-3 mM, in the presence of DEAE-Dextran. Then, the cells were infected with trypsin-activated SA-11 (m.o.i. varying from 1 to 10). After adsorption for 1 hour, the infected cells were further incubated with PFA for an additional 8 hours. The result of this experiment is shown in Fig. 1A. As seen, when cells were infected at 10 p.f.u./cell, after 8 hours of infection the amount of double-stranded RNA present diminished by the addition of increasing amounts of PFA, but the reduction was incomplete (lanes 1-4). However,

when the viral double-stranded RNA present in the incubation medium was analyzed, it was possible to observe an increased effect of PFA over the synthesis of the viral progeny measured as double-stranded RNA present in the cell supernatant. (Fig. 1B, lanes 1–4).

When we analyzed the effect of PFA on infected cells with SA-11 (m.o.i. 1) the inhibition of rotavirus growth is evident at PFA concentrations of 1 mM, and at 2 mM it was almost total (Fig. 1A, lanes 5–7). In these conditions, it was not possible to detect double-stranded RNA in the incubation medium of SA-11 infected MA104 cells (data not shown).

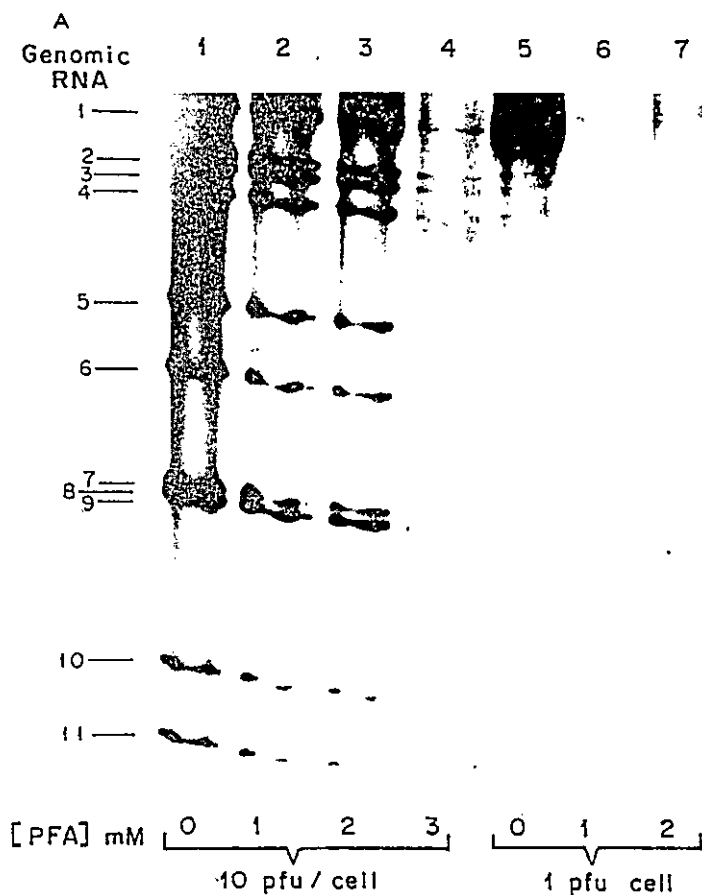


Fig. 1. Effect of foscarnet on SA11 replication in MA104 cells. The effect of foscarnet on rotavirus multiplication was determined by pretreatment of MA104 cells for 2.5 hours with and without the indicated PFA concentrations. Then, control and PFA treated cells were infected with rotavirus SA-11 at a m.o.i. of 10 (Panel A, lanes 1–4), or at a m.o.i. of 1 (Panel A, lanes 5–7). At eight hours post-infection, the cells were harvested and the RNA analyzed, as described in Section 2, by PAGE and autoradiography. The PFA effect on virus released into the incubation medium by infected cells with SA-11 m.o.i. of 10 is shown in Panel B, lanes 1–4.



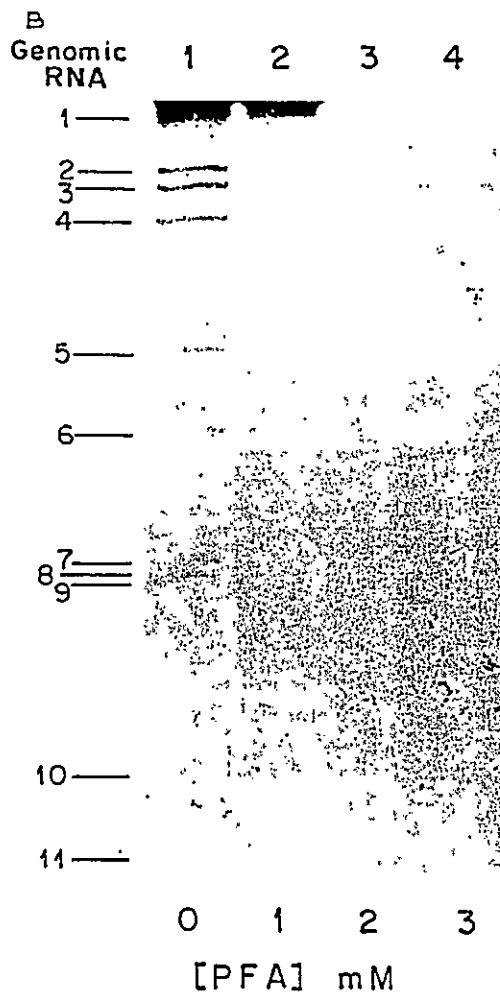


Fig. 1 (continued).

### 3.2. Effect of PFA on rotavirus *in vitro* transcription activity

The effect of PFA on *in vitro* rotavirus transcriptase activity, was tested incubating different concentrations of the pyrophosphate analogue with a standard transcription mixture containing purified heat-activated rotaviral particles. After 30 minutes of incubation at 45°C, the amount of RNA synthesized was determined as acid insoluble radioactivity. The PFA effect on the reaction was expressed as the percentage of RNA polymerase activity compared with a control with no additions. The results of the dose-response curve for the transcriptional reaction assayed at increasing concentrations of PFA are shown in Fig. 2. As seen, the phosphonoformate has a dose-related inhibitory effect on rotavirus transcription, where a 50% inhibition was obtained at PFA concentra-

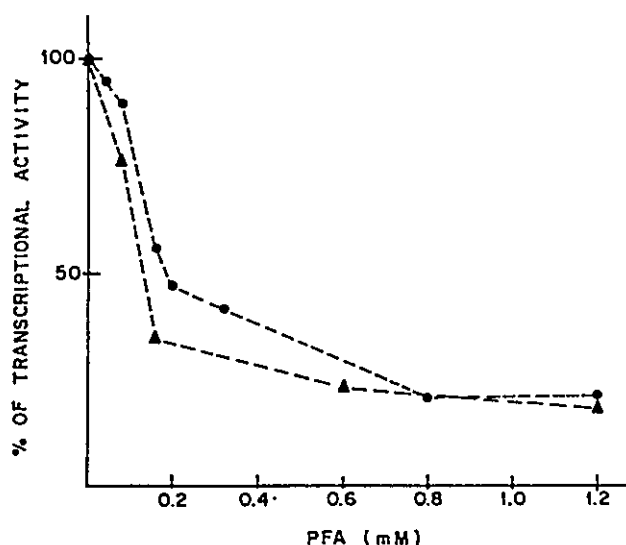


Fig. 2. Inhibition of *in vitro* rotavirus mRNA synthesis by foscarnet. Rotavirus RNA polymerase activity was assayed using purified heat-activated SA11 particles (●-●) or SA11 single-shelled particles present in infected cell extract isolated six hours post-infection (▲-▲). The activity was determined as incorporation of [<sup>3</sup>H]-UMP into acid insoluble material in the presence of the indicated PFA concentrations. The results are expressed as percentage of a control reaction carried out without addition of PFA.

tions as low as 150  $\mu$ M. Addition of 800  $\mu$ M of PFA decreased the activity of rotavirus RNA polymerase up to 80% and increasing concentrations of PFA did not cause further inhibition of rotavirus mRNA synthesis.

The effect of PFA over *in vitro* RNA synthesis was also determined using a subviral particles fraction obtained at 6 hours p.i. from SA-11 infected cultures of MA104 cells. Using these subviral particles preparations, which contain viral particles that catalyze both plus- and minus-strand RNA synthesis, an inhibitory effect similar to purified heat-activated rotavirions was obtained (Fig. 2).

The effect of PFA on RNA synthesis products was determined using purified heat-activated SA-11 particles and the same range of concentration of PFA as the experiment shown in Fig. 2, but in this case, the transcriptional products were subjected to an acrylamide-urea gel electrophoresis and could be visualized by autoradiography of the gel. As seen in Fig. 3, a dose-dependent inhibition of the synthesis of all eleven mRNA elements was obtained; the addition of PFA concentrations over 0.8 mM practically abolished all residual transcription.

### 3.3. Effect of PFA on *in vitro* rotavirus minus-strand RNA synthesis

To determine the effect of phosphonoformate on the replicase activity associated with the synthesis of the minus-strand RNA segments, different concentrations of the compound were incubated with an *in vitro* replication mixture as described in Section 2. After 1 hour incubation at 45°C, the different mixtures were treated with 10  $\mu$ g/ml

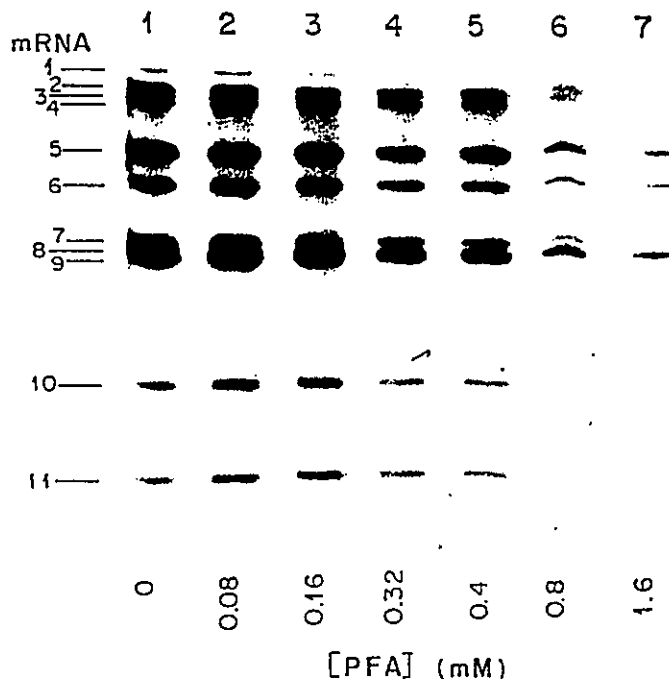


Fig. 3. Effect of foscarnet on in vitro rotavirus transcriptional product synthesis. The effect of different concentrations of PFA on in vitro rotavirus mRNA segments synthesis by the viral RNA polymerase, was determined using purified heat-activated SA-11 rotavirions by incorporation of [ $^{32}$ P]-UMP. The visualization of the eleven rotavirus mRNA segments was possible after autoradiography of a polyacrylamide-urea gel electrophoresis of each reaction conditions tested. In the figure, the PFA concentrations and the eleven transcriptional products are indicated.

RNase A for 10 minutes at 37°C, phenol-chloroform extracted and ethanol precipitated. The treatment with RNase allows to eliminate the background product of the single-stranded RNA synthesis. In this case, the activity of rotavirus RNA polymerase was measured by the specific detection of the 11 double-stranded RNA segment when the reaction products were analyzed by RNA gel electrophoresis and autoradiography. As seen in Fig. 4, PFA inhibited the double-stranded RNA synthesis at the same concentrations of those able to inhibit transcription. Furthermore the synthesis of the eleven [ $^{32}$ P]-double-stranded RNA segments in the presence of 320  $\mu$ M PFA was inhibited by > 80%.

#### 3.4. Effect of PFA on in vitro transcriptional activity of rotavirus SA-11 and the temperature sensitive SA-11 mutant tsC

As suggested by the above presented results phosphonoformate is an effective inhibitor of both in vitro transcription and replication of rotavirus. Although the plus- and minus-strand RNA synthesis is carried out by different viral particles, both type of

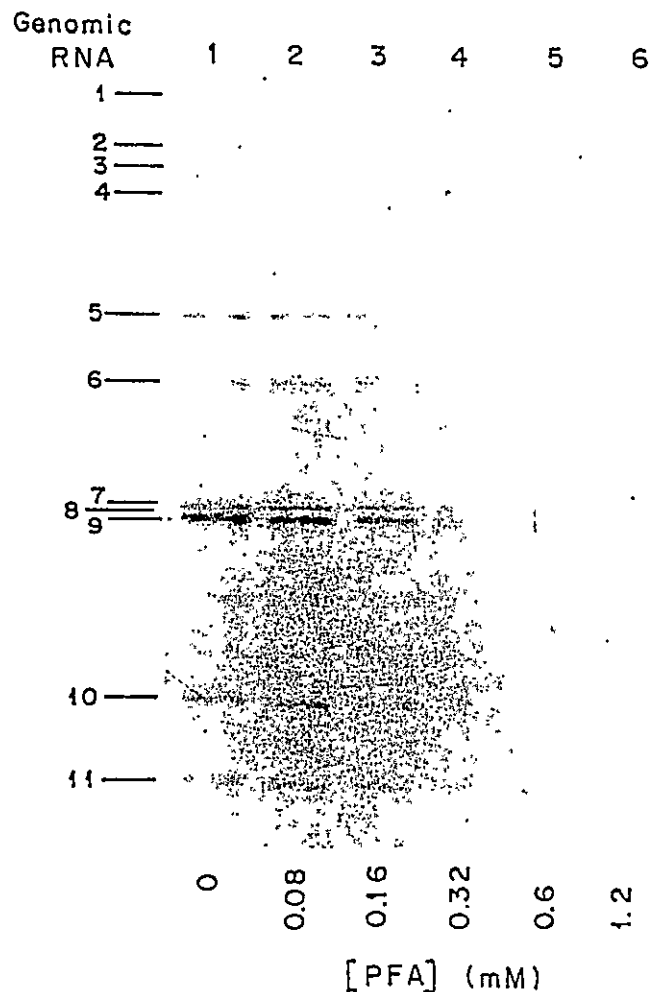


Fig. 4. Effect of foscarnet on in vitro rotavirus minus-strand RNA synthesis. SA-11 subviral particles isolated six hours post-infection were assayed for minus-strand RNA synthesis activity by incubation in a standard reaction mixture that included [ $^{32}$ P]-UTP as described in Section 2. The reaction products are the eleven double-stranded RNA genomic segments, as the minus-strand remains associated to the mRNA template, visualized after autoradiography of a polyacrylamide gel electrophoresis of reaction mixtures incubated without or with the indicated PFA concentrations.

particles to share some polypeptides as VP1, VP2 and VP3. Foscarnet might be affecting the activity of VP1, since this protein is the viral RNA-dependent RNA polymerase (Valenzuela et al., 1992). In Fig. 5 is shown the effect of this pyrophosphate analogue on the transcriptional activity of the wild type strain of rotavirus and of a mutant that carries a temperature-sensitive mutation on the gene 1 that codes for VP1 (tsC). When the inhibition of RNA synthesis was compared for both strains, it may be observed that

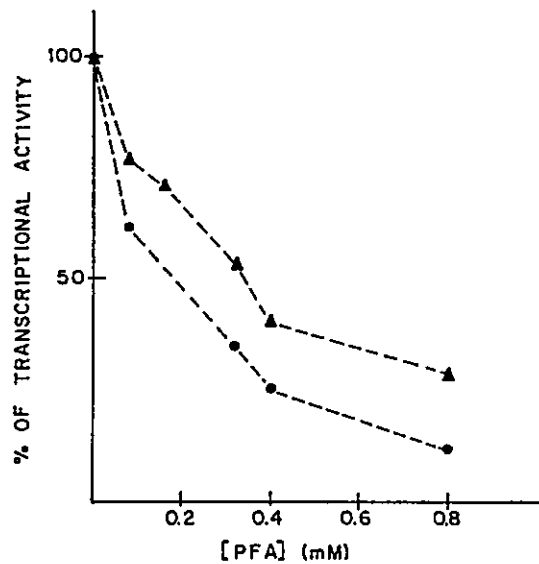


Fig. 5. Effect of foscarnet on in vitro transcriptional activity of rotavirus SA11 and the temperature-sensitive SA11 mutant tsC. The effect of PFA on in vitro mRNA synthesis carried out by SA-11 RNA polymerase, (-----) and VP1 terminosensitive mutant of SA-11, tsC, ( $\Delta$ - $\Delta$ ), was determined as indicated in Section 2. Results are expressed as percentage transcriptional activity remaining at different doses of PFA.

the mutant showed higher resistance to the inhibition by PFA than SA-11 (Fig. 5). This result might indicate that the foscarnet-blocked pyrophosphate binding site is located on VP1; in this form, PFA may interfere with the exchange of pyrophosphate when the polymerization reaction takes place.

#### 4. Discussion

The results show the inhibitory effect of foscarnet on the replication of rotavirus. This pyrophosphate analogue, also has proved to be an effective inhibitor of transcription and replication of DNA viruses such as different herpes viruses (Crumpacker, 1992; Helgstrand et al., 1978), RNA viruses such as influenza A (Helgstrand et al., 1978; Strid et al., 1989) and retroviruses such as human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) (Sandstrom et al., 1985).

The replication of rotavirus in MA104 cells was inhibited by foscarnet, in a concentration dependent manner, but similar to that observed for other viruses (Strid et al., 1989); in this case also it was necessary to preincubate the cells with the pyrophosphate analogue. These findings are in accord with a poor cell permeability to PFA, due to the negative charge present in their phosphonate and carboxylate moieties (Helgstrand et al., 1978). To enhance the cellular permeation to PFA, DEAE-dextran

was added to the incubation medium; when DEAE-dextran (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was used at 2.5 hours preincubation an effective inhibition of rotavirus replication at different foscarnet concentrations was obtained.

The multiplicity of infection (m.o.i.) was important to obtain a maximal inhibition of rotavirus replication by foscarnet. If the infection of MA104 cells was done with 1 PFU/cell, 1 mM of PFA was required for complete inhibition of rotavirus replication; with a m.o.i. of 10, the amount of double-stranded RNA synthesized at 48 hours post-infection diminished by the addition of 1 to 3 mM foscarnet. In the conditions here described, MA104 cells did not exhibit any signs of cytotoxic effect and previous studies have reported that cellular mRNA synthesis would not be affected by the phosphonofornate concentrations used (Stenberg et al., 1985).

The mechanism of inhibition of rotavirus replication by PFA in infected cell culture, can be explained from the analysis of results of the effect of PFA on the *in vitro* viral RNA synthesis when a free-cell system was used. Since the results showed that PFA inhibited both rotavirus mRNA synthesis catalyzed by purified rotaviral particles and the double-stranded RNA synthesis catalyzed by subviral particles isolated from infected cells, the effect of this pyrophosphate analogue on rotavirus replication may be related to a direct inhibition of the viral transcriptase involved in both plus- and minus-strand RNA synthesis.

Similar to the effect of foscarnet on the replication of influenza A virus (Strid et al., 1989), in the case of rotavirus the concentration needed to inhibit viral replication is higher than the concentration needed to inhibit viral RNA synthesis in a cell free system. In addition to a poor cell permeability, foscarnet may be inactivated or bound in the cell, thus resulting in a decrease of the effective concentration of the compound to interact with viral enzymes.

Foscarnet has proven to inhibit viral polymerases (Sundquist and Oberg, 1979; Cheng et al., 1981; and this study), by competing with pyrophosphate, indicating that the compound blocks the pyrophosphate binding site on viral polymerase enzymes, interfering with the pyrophosphate exchange. This has been confirmed by findings made with foscarnet-resistant mutants of the HSV polymerase. (Datta and Hood, 1981; Derse et al., 1982). A termosensitive mutant (tsC) of rotavirus, which carries the mutation on the gene that codes for the polypeptide VP1, the viral RNA-dependent RNA polymerase, showed a higher resistance to foscarnet than the wildtype strain SA-11. This observation, might also indicate that the pyrophosphate binding site is located on VP1. Previously, the effect of several nucleotide analogues, including some described as antiviral agents, was analyzed on rotavirus RNA synthesis. In all cases where rotavirus infection was inhibited, the effect was associated with mRNA synthesis but not double-stranded RNA synthesis inhibition.

Thus, rotavirus infection was found susceptible to inhibition by vidarabine (adenine arabinoside) and cordycepin (Pizarro et al., 1991). Vidarabine has been compared to foscarnet for the treatment of acyclovir-resistant herpes simplex infection in patient with AIDS (Safrin et al., 1991), and this study indicated that foscarnet has higher antiviral activity and is less toxic than vidarabine. Our present results indicate that PFA is active against rotavirus and therefore, make PFA a possible candidate for clinical trials, specially in the treatment of rotavirus gastroenteritis in immunocompromised patients.

### Acknowledgements

M. Ríos was supported thanks a fellowship of CONICYT. This work was partially supported by grants from SAREC (Swedish Agency for Research Cooperation), FONDECYT 1067-92 and Depto. Postgrado y Postitulo-U de Chile: Beca PG-099-94. The authors thank Dra. Ana Maria Sandino for suggestions concerning this study and Dra. Matilde Jashés for providing the phosphonoformate. We also thanks Miss Teresa Castillo and Mr. Patricio Ortiz for technical assistance.

### References

- Cheng, Y.-C., Grill, S., Derse, D., Chen, J.-Y., Caradonna, S.J. and Connor, K. (1981) Mode of action of phosphonoformate as an anti-herpes simplex virus agent. *Biochim. Biophys. Acta* 652, 90–98.
- Conner, M.E., Crawford, S.E., Barone, C. and Estes, M.K. (1993) Rotavirus vaccine administered parenterally induces productive immunity. *J. Virol.* 67, 6633–6641.
- Crumpacker, C.S. (1992) Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *Am. J. Med.* 92 (suppl. 2A), 3S–7S.
- Datta, A.K. and Hood, R.E. (1981) Mechanism of inhibition of Epstein–Barr virus replication by phosphonoformic acid. *Virology* 114, 52–59.
- Derse, D., Bastow, W.F. and Cheng, Y.-C. (1982) Characterization of the DNA polymerase included by a group of herpes simplex virus type I variants selected for growth in the presence of phosphonoformic acid. *J. Biol. Chem.* 257, 10251–10260.
- Estes, M.K. (1990) Rotaviruses and their replication. In: B.N. Fields, D.M. Knipe et al. (Eds), *Virology*, 2nd ed, pp. 1329–1352. Raven Press, New York, NY.
- Estes, M.K. and Cohen, J. (1989) Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53, 410–449.
- Gallegos, C.O. and Patton, J.T. (1989) Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for single-shelled particles. *Virology* 172, 616–627.
- Helgstrand, E., Eriksson, B., Johanson, N.G., Lannero, B., Larsson, A., Misiorny, A., Norén, J.O., Sjöberg, B., Stenberg, K., Stening, G., Stridh, S. and Oberg, B. (1978) Trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound. *Science* 201, 819–821.
- Helmberger-Jones, M. and Patton, J.T. (1986) Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. *Virology* 155, 655–665.
- Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. (1990) Rotaviruses. In: B.N. Fields, D.M. Knipe et al. (Eds), *Virology*, 2nd ed, Raven Press, New York, NY, 1353–1404.
- Kapikian, A.Z., Yolken, R.M., Wyatt, R.G., Kalika, A.R., Chanock, R.M. and Kim, H.W. (1978) Viral diarrhea: etiology and control. *Am. J. Clin. Nutr.* 31, 2219–2236.
- Kattoura, M.D., Clapp, L.L. and Patton, J.T. (1992) The rotavirus nonstructural protein, NS35, possesses RNA-binding activity in vitro and in vivo. *Virology* 191, 698–708.
- Mansell, E.A. and Patton, J.T. (1990) Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *J. Virol.* 64, 4988–4996.
- Margalith, M., Manor, D., Usieli, V. and Goldblum, N. (1980) Phosphonoformate inhibits synthesis of Epstein–Barr virus (EBV) capsid antigen and transformation of human cord blood lymphocytes by EBV. *Virology* 102, 226–230.
- Patton, J.T. (1986) Synthesis of simian rotavirus SA-11 double-stranded RNA in a cell-free system. *Virus Res.* 6, 217–233.
- Patton, J.T. (1993) Rotavirus replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 185, 93–113.
- Pérez-Schacl, I., Blanco, M., Vilar, M., García, D., White, L., González, R., Kapikian, A.Z. and Flores, J. (1990) Clinical studies of a quadrivalent rotavirus vaccine in Venezuelan infants. *J. Clin. Microbiol.* 28, 553–558.
- Pizarro, J.M., Pizarro, J.L., Fernández, J., Sandino, A.M. and Spencer, E. (1991) Effect of nucleotide analogues on rotavirus transcription and replication. *Virology* 184, 768–772.

- Safrin, S., Crumpacker, C., Chatis, P., Davis, R., Hafner, R., Rush, J., Kessler, H.A., Landry, B. and Mills, J. (1991) A controlled trial comparing foscarnet with vidarabine for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex in the acquired immunodeficiency syndrome. *New Engl. J. Med.* 325, 551–555.
- Sandino, A.M., Jashés, M., Faúndez, G. and Spencer, E. (1986) Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcriptions. *J. Virol.* 60, 797–802.
- Sandino, A.M., Pizarro, J., Fernández, J., Fellay, M.C. and Spencer, E. (1988) Involvement of structural and nonstructural polypeptides on rotavirus RNA synthesis. *Arch. Biol. Med. Exp.* 21, 381–392.
- Sandstrom, E.G., Kaplan, J.C., Byington, R.E. and Hirsch, M.S. (1985) Inhibition of human T-cell lymphotropic virus type III in vitro by phosphonoformate. *Lancet* I, 1480–1482.
- Santosham, M., Daum, R.S., Dillman, L. et al. (1982) Oral rehydration therapy of infantile diarrhea: a controlled study of well-nourished children hospitalized in the United States and Panama. *N. Engl. J. Med.* 306, 1070–1076.
- Shigeta, S., Mora, S., Baba, M., Ito, M., Honzumi, K., Nakamura, K., Oshitani, H., Numasaki, Y., Matsuda, A., Obara, T., Shuto, S. and De Clercq, E. (1992) Antiviral activities of ribavirin, 5-ethynyl-1- $\beta$ -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide, and 6-(R)-6-C-methylnepanocin A against several ortho- and paramyxoviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 435–439.
- Smee, D.F., Sidwell, R.W., Clark, S.M., Barnett, B.B. and Spendlove, R.S. (1982) Inhibition of rotaviruses by selected antiviral substances: mechanisms of viral inhibition and in vivo activity. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 21, 66–73.
- Spencer, E. and Arias, M.L. (1981) In vitro transcription catalysed by heat-treated human rotavirus. *J. Virol.* 40, 1–10.
- Spencer, E.G., Avendaño, L.F. and García, B.I. (1983) Analysis of human rotavirus mixed electropherotypes. *Infect. Immun.* 39, 569–574.
- Stenberg, K., Skog, S. and Tribukait, B. (1985) Concentration-dependent effects of foscarnet on the cell cycle. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28, 802–806.
- Strid, S., Ekstrom, C. and Datema, R. (1989) Comparison of foscarnet and foscarnet esters as anti-influenza virus agents. *Chemotherapy*, 35, 69–76.
- Sundquist, B.O. and Oberg, B. (1979) Phosphonoformate inhibits reverse transcriptase. *J. Gen. Virol.* 45, 273–281.
- Valenzuela, S., Pizarro, J., Sandino, A.M., Vásquez, M., Fernández, J., Hernández, O., Patton, J.T. and Spencer, E. (1993) Photoaffinity labelling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J. Virol.* 65, 3964–3967.
- Vásquez, M., Sandino, A.M., Pizarro, J.M., Fernández, J., Valenzuela, S. and Spencer, E. (1993) Function of rotavirus SA11 VP3 polypeptide on viral morphogenesis. *J. Gen. Virol.* 74, 937–941.