

UCH-FC

DOC-B

F 363

**CARACTERIZACION MOLECULAR DE UNA CEPA
REORDENANTE DE ROTAVIRUS DE CERDO**

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

Jorge Osvaldo Fernández Ordenes

Abril, 1996

Director de Tesis: Dr. Eugenio Spencer Ossa.





UCH-FC
DOC-B
F363
C.1

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

JORGE OSVALDO FERNANDEZ ORDENES

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 Exámen de Defensa
de Tesis rendido el Día 26 de Marzo de 1995.

Director de Tesis:

Dr. Eugenio Spencer O.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos

Dr. Victor Cifuentes

Dr. Juan Kuznar





... A MARCELA

... A JAVIER ALONSO

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer y dedicarles esta tesis a mis padres, quienes con su apoyo incondicional en todo momento me incentivaron a lograr esta meta.

A mi esposa, por la comprensión y estímulo que me ha brindado durante toda mi carrera profesional.

Deseo agradecer en forma especial a Eugenio Spencer por su apoyo, paciencia y por su valiosa ayuda como profesor, aspectos que fueron muy importante en mi formación.

Deseo también agradecer al Dr. Goran Magnuson, por permitir desarrollar parte de esta tesis en su laboratorio. A Goran, Jorge y Alexis por su amistad y acogida en el Laboratorio de Virología de la Universidad de Uppsala, Suecia.

A todos mis compañeros de laboratorio de la Unidad de Virología del INTA, y en especial a Ana María, Jacqueline, José, Sofía, Mónica, Marianne, Oscar, Maritza R, Maritza G, por los gratos momentos de amistad, compañerismo y calidez que disfruté durante mi estadía en el laboratorio.

A Maritza, Marianne y Jorge Blackhall, por la amistad que nació y que aún existe.

Finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas que de algún modo han colaborado en la realización de esta tesis.

INDICE DE MATERIAS

	Páginas
1. ABREVIATURAS	xi
2. RESUMEN	1
3. SUMMARY	4
4. INTRODUCCION	7
5. MATERIALES	22
6. METODOS	23
6.1. Cultivo de células.	23
6.1.1. Cultivo de células MA-104.	23
6.1.2. Cultivo de cepas de <i>Escherichia coli</i> .	23
6.2. Purificación de partículas virales para ensayos de transcripción "in vitro".	23
6.3. Purificación de sub-partículas virales para ensayos de síntesis de RNA (-).	24
6.4. Determinación de la síntesis de RNA mensajero y genómico de rotavirus de cerdo en cultivo celular.	24
6.5. Síntesis "in vitro" del RNA mensajero viral.	24
6.6. Síntesis "in vitro" del RNA (-) de rotavirus.	25
6.7. Marcación de proteínas con ³⁵ S-metionina.	25
6.8. Formación de placas de lisis.	26

6.9.	Purificación de clones virales a partir de placas de lisis.	26
6.10.	Amplificación por P.C.R. del segmento 11 de las cepas CN86 y CC86.	27
6.11.	Purificación de plasmidios recombinantes.	27
6.12.	Secuenciamiento del segmento 11 de las cepas CN86 y CC86.	28
6.13.	Transcripción "in vitro" del segmento 11 a partir de los plasmidios pSP-11CN y pSP-11CC.	29
6.14.	Traducción "in vitro" del RNA mensajero obtenido de pSP-11CN y pSP-11CC.	29
7.	RESULTADOS	30
7.1.	Transcripción "in vitro" de las cepas CN86 y CC86 de rotavirus de cerdo.	30
7.2.	Efecto de S-adenosilmetionina sobre la transcripción "in vitro" de rotavirus de cerdo.	32
7.3.	Efecto de análogos en la transcripción "in vitro" de rotavirus de cerdo.	32
7.4.	Cinética de aparición de RNA mensajero y genómico de rotavirus de cerdo.	34
7.5.	Cinética de síntesis de proteínas en células infectadas con rotavirus de cerdo.	39
7.6.	Estudio de la síntesis de RNA (-) "in vitro".	41
7.7.	Amplificación y subclonamiento del segmento 11 de rotavirus de cerdo CN86 y CC86.	43
7.7.1.	Amplificación del segmento 11 a partir de cDNA.	43
7.7.2.	Subclonamiento del segmento 11 de rotavirus CN86 y CC86.	44

7.7.3.	Análisis de plasmidios recombinantes	46
7.8.	Transcripción "in vitro" a partir de pSP-11CN y pSP11CC.	49
7.9.	Traducción "in vitro" de los RNA mensajeros obtenidos a partir de los plasmidios pSP-11CN y pSP11CC.	51
7.10.	Secuenciamiento del segmento 11 de las cepas CN86 y CC86 de rotavirus de cerdo.	53
7.10.1.	Análisis de la secuencia nucleotídica del segmento 11.	53
7.10.2.	Análisis de la secuencia aminoacídica de NSP5 y del polipéptido de 92 aminoácidos.	61
7.11.	Obtención de cepa de SA-11 con el segmento 11 reordenado, mediante infecciones mixtas..	66
7.11.1.	Infección mixta entre las cepas CC86 y SA-11 de rotavirus.	66
7.11.2.	Purificación de clones virales con electroferotipos distintos a CC86 y SA-11.	68
7.12.	Formación de placas de lisis por la cepa SA-11 con el segmento 11 reordenado.	72
7.13.	Ensayo de competencia entre las cepas SA-11 y SA-11 (segmento 11 Reordenado)	74
8.	DISCUSION	78
9.	CONCLUSIONES	94
10.	REFERENCIAS	95

LISTA DE FIGURAS

		Páginas
FIGURA 1	Electroferotipos de las cepas SA-11, CN86 y CC86 de rotavirus.	17
FIGURA 2	Comparación de la formación de placas de lisis de las cepas CN86 y CC86 de rotavirus de cerdo.	19
FIGURA 3	Ensayo de competencia entre las cepas CN86 y CC86.	20
FIGURA 4	Análisis de los productos de transcripción "in vitro" catalizada por las subpartículas de rotavirus CN86 y CC86.	31
FIGURA 5	Efecto de S-adenosilmetionina en la transcripción "in vitro" catalizada por subpartículas de rotavirus CN86 y CC86.	33
FIGURA 6	Efecto de Cord TP y Ara ATP en la transcripción "in vitro" catalizada por las subpartículas de rotavirus CN86 y CC86.	35
FIGURA 7	Análisis de los productos de transcripción de rotavirus en cultivo celular.	37
FIGURA 8	Análisis de los productos de RNA genómico de rotavirus en cultivo celular.	38
FIGURA 9	Cinética de síntesis de proteínas virales por las cepas CN86 y CC86 de rotavirus de cerdo.	40
FIGURA 10	Síntesis de RNA (-) "in vitro" catalizada por subpartículas de rotavirus CN86 y CC86.	42
FIGURA 11	Amplificación en cadena de la polimerasa del segmento 11 de rotavirus de cerdo.	45

FIGURA 12	Esquema de subclonamiento del segmento 11 normal y reordenado.	47
FIGURA 13	Análisis de los plasmidios recombinantes que contienen el segmento 11 de la cepa CN86 y CC86	48
FIGURA 14	Análisis del producto de transcripción "in vitro" de los plasmidios pSP-11CN y pSP-11CC.	50
FIGURA 15	Análisis del producto polipeptídico obtenido por traducción "in vitro".	52
FIGURA 16	Comparación de la secuencia nucleotídica del segmento 11 de la cepa CN86 y CC86.	54
FIGURA 17	Comparación de la secuencia nucleotídica de la región no duplicada de cepas de rotavirus.	57
FIGURA 18	Comparación de la región duplicada de la cepa CC86 con la región no duplicada.	59
FIGURA 19	Comparación de la región duplicada en cepas reordenantes de rotavirus.	60
FIGURA 20	Estructura del segmento 11 de las cepas CN86 y CC86.	62
FIGURA 21	Comparación de la secuencia aminoacídica del polipéptido NSP5 de rotavirus.	63
FIGURA 22	Comparación de la secuencia aminoacídica del polipéptido de 92 aminoácidos.	65
FIGURA 23	Análisis del RNA genómico de las coinfecciones entre las cepas CC86 y SA-11.	67
FIGURA 24	Esquema de purificación de clones de rotavirus.	69
FIGURA 25	Electroferotipos de nuevas cepas de rotavirus obtenida de infecciones mixtas.	70
FIGURA 26	Electroferotipo del reordenante de SA-11.	73

FIGURA 27	Comparación de placas de lisis entre las cepas SA-11 y SA-11 reordenante.	75
FIGURA 28	Ensayo de canibalismo entre las cepas SA-11 y SA-11 reordenante.	76

LISTA DE TABLA

		Páginas
TABLA	1	Identificación de los segmentos de RNA de las nuevas cepas rotavirus.
		52

ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
BrEt	Bromuro de etidio.
BSA	Seroalbúmina de bovino.
Ci	Curie.
cpm	Cuentas por minutos.
DDT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético.
kb	Kilobases.
mRNA	Acido ribonucleico mensajero.
pb	Pares de bases.
rpm	Revoluciones por minutos.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
SAM	S-adenosilmetionina.
SFB	Suero Fetal de Bovino.
p.f.u./cél	Unidades formadoras de placa por célula.

RESUMEN

Rotavirus, miembro de la familia Reoviridae, es un importante agente etiológico de gastroenteritis infantil en la mayoría de las especies animales, incluyendo al hombre.

El genoma de rotavirus está constituido por once segmentos de RNA de doble hebra que se encuentran en el interior del core viral, el que está rodeado por una doble cubierta proteica.

En la actualidad se han aislado reordenantes moleculares de cepas homólogas de rotavirus, que poseen un patrón atípico de su RNA genómico. Se ha observado que la mayoría de estos reordenamientos ocurren en el segmento 11 y se deberían a una duplicación parcial de una región de este segmento. La caracterización preliminar de uno de estos reordenantes, la cepa CC86 de rotavirus de cerdo, reveló diferencias en el comportamiento de esta cepa respecto a la cepa parental. Al realizar infecciones en cultivos celulares, la cepa reordenante presenta un tamaño de placas mayor que la parental y al realizar coinfecciones con ambas cepas, la cepa reordenante desplaza totalmente a la cepa parental. Esto hace posible enfocar un modelo de estudio de estos fenotipos, ya que la diferencia está circunscrita a tan sólo la variación en la migración de un segmento genómico, que puede ser identificado como un verdadero marcador molecular.

El objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto que tiene el reordenamiento del segmento 11 de la cepa CC86 en las distintas etapas de la morfogénesis viral, además

caracterizar genéticamente el reordenamiento y determinar si que el fenotipo asociado a éste puede ser traspasado a una cepa heteróloga de rotavirus.

Se caracterizó "in vitro" e "in vivo" la síntesis del RNA (+) y RNA (-) por la cepa parental CN86 y la cepa reordenante CC86. Además, se estudió la síntesis de los polipéptidos codificados por el segmento 11 en células infectadas por estos virus. También se realizó una infección mixta entre la cepa CC86 y SA-11 para obtener una cepa que contenga los segmentos genómicos de SA-11 y el segmento 11 reordenado de la cepa CC86. Finalmente se caracterizó genéticamente el segmento reordenado.

Los estudios de la síntesis de RNA mensajeros y RNA genómico, indican que en ambos casos el segmento 11 reordenado se sintetiza como una sola unidad, no detectando diferencias en su síntesis al comparar con la síntesis de RNA del segmento 11 normal de la cepa CN86.

No se observaron diferencias en la expresión del polipéptido NSP5 en cultivo celular en ambas cepas, además tampoco se observaron diferencias entre la expresión del polipéptido NSP5 de ambas cepas virales en cultivo celular en los estudios de traducción "in vitro", solo se detectó la expresión del polipéptido NSP5 a partir del segmento 11.

Mediante el ensayo de coinfección desarrollado en esta tesis se obtuvieron alrededor de 23 nuevos clones virales, que presentan segmentos de RNA de las cepas CC86 y SA-11. El genoma de uno de estos clones está constituido por los 10 primeros segmentos de la cepa SA-11 y el segmento 11 reordenado proveniente de la cepa CC86. La caracterización de este reordenante de SA-11 indicó que los fenotipos mayor tamaño

de placa y desplazamiento de la cepa parental presentado por la cepa CC86, fueron traspasados a esta nueva cepa de rotavirus.

La caracterización genética del segmento 11 normal y reordenado permiten concluir que el reordenamiento se debe a una duplicación parcial del segmento 11 de la cepa CC86, similares a las encontradas en otras cepas de rotavirus.

El análisis de la secuencia aminoacídica del polipéptido NSP5 en ambas cepas de rotavirus de cerdo, muestra algunas diferencias que podrían dar cuenta del fenotipo asociado al segmento 11 duplicado. Es probable que estos fenotipos se produzcan por la síntesis de otro polipéptido a partir segmento 11 o bien la duplicación de este segmento aumentó la eficiencia de encapsidación de éste.

SUMMARY

Rotavirus, a member of the Reoviridae family, is an important etiological agent of gastroenteritis in infants, in many animals species including man.

The genome of rotavirus is composed of 11 segments of double-stranded RNA that are found within the viral core, surrounded by an double-shell capsid protein.

Recently, it have been isolated rotavirus strains with rearranged genomes that have an atypical genomic RNA migration patterns with respect to the homologous strain. In most cases, the rearrangements involved sequences of genomic segment 11 and structural analysis of these strains showed that the rearrangement correspond to a partial duplication of the normal segment. The characterization of strain CC86 from porcine rotavirus showed differences when it was compared with the standard counterpart. The strain CC86 forms larger plaques in tissue culture than strain CN86 and overgrows the normal strain after coinfection of MA-104 cells. The characteristics presented by these strains have led to considered them as a model to study these fenotypes, since the unique difference bewteen them is the rearranged 11, genomic segment that can be identified as a molecular marker.

The purpose of this thesis was to study the effect that have the rearrangment of the segment 11 in the rotavirus morphogenesis events, characterize the genetic rearrangement and segregate RNA segment 11 to an heterologous strain.

The mRNA and minus strand synthesis by CC86 and CN86 strains were characterized "in vitro" and "in vivo". Further, the synthesis of the polypeptide NSP5, coded by gen 11, was studied in infected cells. In addition, by mean of coinfection between CC86 and SA-11 strains, the rearranged RNA segment was segregated to the heterologous strain, obtaining a new reassortant that was characterized. Finally, the rearranged segment 11 was sequenced.

The studies of the synthesis of mRNA and minus strand RNA have been shown that in both cases the rearranged RNA segment 11 was synthesized completely and without differences with the normal segment RNA 11.

The synthesis of the polypeptide NSP5 cells infected with either strain is similar. In addition, no differences in any of the other viral or virus induced proteins were detected and the studies of "in vitro" translation showed that genome segment 11 mRNA from both viruses produced a polypeptide with similar characteristics and the molecular size of NSP5.

By mean of the coinfection assay developed during this investigation were obtained 23 new viral clones, that contained RNA genome segments derived from strains CC86 and SA-11. One of these reassortant contained RNA segments 1 to 10 from SA-11 and the segment 11 from the rearranged RNA genome segment the CC86 strain. The characterization of this new strain showed that the phenotypes large plaque formation and overgrowth were segregated with the rearranged RNA segment 11.

The genetic structure of the rearranged segment 11 showed that the rearrangement involved a partial duplication analogous to others rearranged rotavirus involved.

The analysis of polypeptide NSP5 aminoacids sequence from both porcine rotavirus strains show some differences that might explain the fenotype associated to the rearranged segment 11. It is probable that both the synthesis of another polypeptide from segment 11 or that duplication of the segment confer a selective advantage to be encapsidated, being the cause of this fenotype.

INTRODUCCION

Rotavirus es el principal agente etiológico asociado a gastroenteritis aguda en humanos y otras especies animales tales como porcino, bovinos, ovinos y aves (Kapikian y Chanock, 1990; Blacklow y Greenberg, 1991; Estes y Cohen, 1989). En los países subdesarrollados, las infecciones producidas por este virus constituyen una de las causas principales de muerte en lactantes (Cukor y Blacklow, 1988; Kapikian y Chanock, 1990). Este agente infeccioso fue descubierto por Bishop en 1973, cuando analizó por microscopía electrónica biopsias de duodeno de pacientes con gastroenteritis aguda.

Rotavirus ha sido clasificado en la familia Reoviridae, principalmente por sus características morfológicas (Kapikian y Chanock, 1985). La partícula viral tiene estructura icosaédrica, con un diámetro aproximado de 70 nm y una densidad en CsCl de 1,36 gr/cm³. El core viral está rodeado por una doble cubierta proteica, cuyos capsómeros tienen una distribución radial, dando a la partícula la forma de una rueda de la cual deriva su nombre.

La cubierta externa de rotavirus está compuesta por los polipéptidos VP4 y VP7, los cuales debido a sus características antigénicas definen 11 serotipos asociados al polipéptido VP7 y 9 asociados al polipéptido VP4 (Kapikian y col., 1981; Hoshino y col., 1985; Offit y Blavat, 1986). Esta cubierta externa puede ser removida del virus por tratamiento con un agente quelante de calcio como el EDTA, originando la partícula de cubierta simple, estructura que tiene un diámetro de 55 nm y una densidad de 1,38

gr/cm³ en CsCl. La cubierta interna está constituida principalmente por el polipéptido VP6, que representa el 60% del contenido polipeptídico del virión (Novo y Esparza, 1981; Estes y Cohen, 1989; Estes, 1990). Las características antigénicas de VP6 definen los grupos antigénicos, I y II de rotavirus (Kalica y col., 1981; Greenberg y col., 1983 a y b). Cuando el polipéptido VP6 es removido por tratamiento con CaCl₂, se obtiene una partícula de 37 nm, denominada "core", que tiene una densidad en CsCl de 1,44 gr/cm³.

El core viral está constituido por el RNA genómico y los polipéptidos VP1, VP2 y VP3 (Liu y col., 1988; Estes, 1990; Patton, 1993). El polipéptido VP1 tiene asociada la actividad RNA polimerasa del virus, el polipéptido VP3 es la guanililtransferasa y VP2 tiene un rol estructural y la capacidad de unir RNA (Valenzuela y col., 1991; Pizarro y col., 1991a; Boyle y Holmes, 1986; Chen y col., 1990; Mansell y Patton, 1990). En el interior del core se encuentra el genoma viral, constituido por 11 segmentos de RNA doble hebra, cada uno de los cuales codifica para al menos un polipéptido viral

La migración electroforética de los 11 segmentos de RNA genómico de rotavirus define un patrón de bandas característico de este virus. Los segmentos se pueden clasificar en cuatro grupos, dependiendo de su migración electroforética (Kapikian y Chanock, 1985; 1990). En el grupo I se encuentran los cuatro primeros segmentos, cuyos pesos moleculares van de 1,5 a 2,2 x 10⁶ dalton, en el grupo II están los segmentos 5 y 6 con pesos moleculares de entre 0.8 y 1 x 10⁶ dalton; En el grupo III están los segmentos 7,8 y 9 que tienen pesos moleculares muy parecidos, de aproximadamente 0,5 x 10⁶ dalton y en el grupo IV están los segmentos 10 y 11 que

tienen pesos moleculares de $0,2$ y $0,3 \times 10^6$ dalton respectivamente. Aunque este patrón de migración es característico en todas las cepas de rotavirus, la migración de cada uno de los segmentos puede diferir entre distintas cepas, dando origen a los distintos electroferotipos.

En el ciclo replicativo de rotavirus, los polipéptidos de la cubierta externa tienen un rol fundamental en las etapas de adsorción y penetración del virus a la célula (Fukuhura y col., 1988). En un primer momento, el virus se une al receptor celular mediante el polipéptido VP7. Luego, el polipéptido VP4 experimenta un corte proteolítico, catalizado por tripsina, produciéndose dos fragmentos, VP5 y VP8. El fraccionamiento del polipéptido VP4 es fundamental, ya que de esta forma el virus adquiere la capacidad infectiva, que le permite atravesar directamente la membrana plasmática (Espejo y col., 1981). Durante la entrada del virus a la célula se pierde la cubierta externa, liberándose al citoplasma el virus de cubierta simple (Clark y col., 1980; Suzuki y col., 1986). Estas partículas son capaces de transcribir tanto "in vivo" como "in vitro" los 11 segmentos virales. Los transcritos obtenidos en ambas condiciones son idénticos y codifican para los mismos polipéptidos (Cohen y col., 1977; Spencer y Arias, 1981; Stacy-Phipps y Patton, 1987; Sandino y col., 1988).

La síntesis del genoma del virus es asimétrica, la hebra positiva del RNA es utilizada como templado para la síntesis del RNA (-), que permanece asociado al templado generando el RNA de doble hebra (Patton, 1986; Imai y col., 1983). De esto se desprende que el RNA mensajero tiene dos funciones en la célula, ser utilizado para la síntesis de los polipéptidos virales y como templado para la síntesis de la hebra negativa

del RNA genómico del virus. A medida que se sintetizan los polipéptidos virales, éstos se acumulan en el citoplasma de la célula, constituyendo las inclusiones denominadas viroplasmias, donde se realiza todo el proceso de replicación y ensamblaje de la partícula viral (Mc Crae y Faulkner-Valle, 1981; Stacy-Phipps y Patton, 1987; Patton y Gallegos, 1988).

Las subpartículas involucradas en la síntesis del RNA genómico son distintas de las que transcriben los 11 segmentos de RNA simple hebra. El análisis de la composición polipeptídica de los distintos intermediarios de replicación ha demostrado la presencia de polipéptidos estructurales y no-estructurales (Helmberg-Jones y Patton, 1986; Mansell y Patton, 1990; Patton, 1993). El primer intermediario que se produce en las inclusiones viroplásmicas se denomina precore-RI, tiene un diámetro de 55 nm y está formado por los polipéptidos VP1, VP3, NSP1, NSP2, NSP3 y NSP5. Luego se forma el intermediario core-RI, de 60 nm de diámetro, constituido por los polipéptidos VP1, VP2, VP3, NSP2, NSP3 y NSP5. El último intermediario, ss-RI, tiene características similares a la partícula de cubierta simple y está constituido por los polipéptidos VP1, VP2, VP3, VP6, NSP2, NSP3 y NSP5 (Gallegos y col., 1989; Patton y col., 1988).

El estado final de la morfogénesis ocurre en el retículo endoplásmico rugoso (RER), lugar al cual la partícula de cubierta simple migra desde las inclusiones viroplásmicas. El polipéptido NSP4 (NS28) actúa como receptor de la partícula de cubierta simple en el RER, interaccionando con el polipéptido VP6 (Kabcenell y col., 1988; Chen y Ramig, 1993). Luego, se produce la yemación del virus al lumen del retículo, donde adquiere una membrana que rodea la partícula. Posteriormente, el virus

se desprende de la membrana, lo que permite que se ensamble la cubierta externa con los polipéptidos VP7 y VP4. Recientes estudios han demostrado que en el ensamblaje del polipéptido VP4, participaría el polipéptido NSP4 (Chen y Ramig, 1993). En cambio, el polipéptido VP7 no necesita ningún otro polipéptido no estructural para ensamblarse. Finalmente, las partículas virales maduras se acumulan en el lumen del RER, hasta que se produce la lisis celular (Estes, 1990; Patton, 1993).

En el ciclo replicativo del virus, uno de los aspectos importantes que ocurren durante la síntesis del RNA (-) y en el "assortment" de los segmentos de RNA genómico son los ordenamientos genéticos que sufren algunos de los genes (Chen y col., 1989; Garbarg y col., 1984; Graham y col., 1987; Hundly y col., 1985). Es así como, al analizar aislados individuales normalmente se encuentra que están formados por subpoblaciones virales genéticamente distintas. Además, en los virus cuyo RNA es segmentado, un tipo común de ordenamiento genético lo constituye el proceso llamado permutación o "reassortment", que se produce cuando una misma célula es infectada simultáneamente por dos variantes virales. En procesos infectivos de esta naturaleza, se genera progenie viral que posee la dotación genética correspondiente a cada una de las cepas parentales y además nuevas cepas, cuyo genoma está constituido por distintas combinaciones de los segmentos genéticos de ambas cepas parentales (Flores y col., 1989; Gouvea y Brandly., 1995). La capacidad de generar nuevas cepas virales mediante la permutación de los segmentos en coinfecciones realizadas "in vitro", se ha utilizado como una herramienta en el mapeo de mutantes termosensibles (Gombold y col., 1985; Ramig y col., 1985), en la identificación de determinantes de especificidad y virulencia viral (Offit y col., 1986;

Sharpe y col., 1983), en el rescate de virus no-cultivable (Greenberg y col., 1981), y también en la identificación de segmentos genéticos que codifican para un fenotipo único en alguna variante viral (Chen y col., 1989): En la actualidad, varios grupos de investigadores han aportado evidencias que demuestran que el fenómeno de permutación también ocurre "in vivo". Se han encontrado nuevas cepas virales producto de coinfecciones en animales realizadas con virus bluetonge pertenecientes a distintos serotipos (Samal y col., 1987a, 1987b). También se ha demostrado que las permutaciones se producen con una alta frecuencia "in vivo", luego de infecciones orales con rotavirus en ratón (Greenberg y Kalica., 1981).

Otros tipos de reordenamientos genéticos que ocurren durante la replicación de genoma viral son intragénicos y se producen ya sea por deleciones y/o duplicaciones de determinadas secuencias (Pedley y col., 1984; Eiden y col., 1985; Hundley y col., 1987; Besselaar y col., 1986; Thouless y col., 1986; Pocock, 1987; Bellinzoni y col., 1987; Tanaka y col., 1988). En algunas ocasiones se ha observado que estos reordenamientos se producen bajo condiciones de infección que utilizan una alta multiplicidad de infección viral. En estas condiciones, aparentemente el RNA genómico se replica rápidamente y en forma azarosa, lo cual conduce a la formación de partículas virales defectivas, que en su mayoría carecen de regiones importantes dentro de su RNA genómico y por lo tanto requieren partículas virales normales ayudadoras (virus helper) para su replicación. Ejemplos de este tipo de reordenamientos intra génicos se han encontrado en virus influenza, donde las partículas virales defectivas poseen fragmentos de RNA que son de tamaño menor, producto de que han ocurrido simples ó múltiples deleciones internas

del fragmento de RNA genómico mayor (Davis y col., 1980; Sivassubramanian y Nayak, 1983; Brown y col., 1983).

En varios géneros de la familia Reoviridae se han detectado partículas defectivas, que presentan reordenamiento intragénicos, es el caso de reovirus donde incluso se han encontrado en aislados obtenidos desde ratones recién nacidos infectados en forma crónica por este virus. En otros géneros de la familia Reoviridae, como orbivirus y rotavirus, se han detectado reordenamientos genéticos en algunos de sus genes (Ramig y col., 1985; Eaton y col., 1985) que se diferencian de aquellos obtenidos con reovirus y virus influenza en que se replican en forma independiente y son estables en el tiempo. En infecciones con cepas de rotavirus del grupo A, este tipo de reordenamientos se detectaron inicialmente en aislados virales obtenidos desde niños inmunodeficientes infectados en forma crónica, pero posteriormente también se han detectado en aislados obtenidos desde hospederos inmunocompetentes humanos y otros mamíferos (Pedley y col., 1984; Eiden y col., 1985; Hundley y col., 1987; Besselaar y col., 1986; Thouless y col., 1986; Pocock, 1987; Bellinzoni y col., 1987; Tanaka y col., 1988).

Los reordenamientos genéticos, que se producen en infecciones con rotavirus u otros virus cuyo genoma es RNA segmentado, parecen tener gran importancia desde un punto de vista evolutivo, debido a que permiten la generación de nuevas cepas virales con mayores ventajas selectivas en la naturaleza (Desselberger, 1989).

En aislados de rotavirus obtenidos de niños inmunodeficientes se han observado reordenamientos en los segmentos 8, 10 y 11 del RNA genómico (Hundley y col., 1987;

Both y col., 1983; Baybutt y McCrae, 1984; Okada y col., 1984; Ward y col., 1985). El análisis de la secuencia nucleotídica de algunos de estos aislados, demostró que en la mayoría de los casos se producen duplicaciones intragénicas parciales, que se han generado por la repetición de una región de la secuencia genómica, a partir del codón de término del primer marco de lectura (ORF).

Es interesante hacer notar que la mayoría de los reordenamientos intragénicos descritos, producidos en infecciones por rotavirus, afectan al segmento 11. Estos se han generado en forma espontánea o bien durante infecciones realizadas con una alta multiplicidad de infección. La caracterización molecular de una cepa reordenante, denominada C60 (Mattion y col., 1988; González y col., 1989), obtenida desde suspensiones de heces fecales de cerdo infectado por rotavirus, ha permitido determinar las características de este reordenamiento en el segmento 11. La determinación de la secuencia nucleotídica del segmento 11 reordenado demostró que el aumento de tamaño se debía a una duplicación de este segmento, que hacía aumentar el tamaño del segmento de 664pb a 1211pb. El segmento reordenado está compuesto de dos unidades homólogas del segmento 11, organizadas en una orientación cabeza-cola; ambas unidades presentan parciales deleciones del segmento 11 normal. La unidad ubicada en el extremo 5' del segmento duplicado, comprende la región codificante completa del polipéptido NSP5, que posee una región deletada de 44 pb en su extremo 3' y 5 pb extras ubicadas luego del codón de término UGA en la posición 613-615. Por otro lado, la unidad ubicada en el extremo 3' del segmento duplicado carece de las primeras 77 bases del extremo 5' del segmento 11. Esta deleción retira la región no-codificante y los primeros

19 codones del polipéptido NSP5. La unidad 3', que comprende los nucleótidos 625 al 1211, carece del codón de iniciación AUG del polipéptido NSP5.

El mecanismo responsable de los reordenamientos que ocurren en el segmento 11 de rotavirus de cerdo, no es conocido. Sin embargo, recientemente se ha propuesto un modelo que podría explicar este fenómeno (Gorziglia y col., 1989; Matsui y col., 1990): La RNA polimerasa, al iniciar la síntesis en el extremo 3' de la hebra, podría elongar hasta alcanzar un sitio de atenuación, donde podría desprenderse desde el templado, con la hebra naciente unida a ella y reiniciar la síntesis en otra posición. Es interesante que al analizar la secuencia nucleotídica en la región donde se produce la duplicación, podría formarse una estructura secundaria del tipo "hairpin loop", que es característica de un sitio de atenuación.

Por lo general, el segmento 11 tiene 664 pb de largo y al igual que otros segmentos de rotavirus homólogos, posee tres marcos de lectura abiertos (ORF), de los cuales se ha podido identificar un polipéptido. El primer ORF comienza en el nucleótido 22 y codifica para el polipéptido NSP5 (NS26) de 197 aminoácidos, con un alto contenido de serina y treonina (25%) (López y col., 1993). Se ha encontrado que este polipéptido no-estructural tiene un peso molecular aparente de 28K, lo que difiere del producto obtenido a partir de traducciones realizadas utilizando un sistema libre de células, que es de 26K (Mattion y col., 1991). El polipéptido NSP5 (NS26), experimenta varias modificaciones postraduccionales: experimenta fosforilación y además, recientes estudios indican que NSP5 también puede experimentar O- glicosilación, modificación que se realizaría en los primeros minutos de su síntesis (González y

Burrone, 1991). Interesantemente, este polipéptido es el segundo ejemplo de una glicoproteína con una O-glicosilación descrito en virus. El segundo marco de lectura abierto comienza en el nucleótido 80 y se encuentra fuera de fase con respecto al primero; codifica para una proteína de 92 aminoácidos, cuya síntesis recientemente ha podido ser detectada en células infectadas por rotavirus. El tercer marco de lectura abierto comienza en el nucleótido 175, está en fase con respecto al primer marco de lectura y codifica para un polipéptido de 146 aminoácidos. Todos estos polipéptidos unirían RNA y formarían parte de un complejo involucrado en la replicación del genoma de rotavirus (Welch y col., 1989; Mattion y col., 1990; 1991).

Cuando se compara la secuencia aminoacídica del polipéptido NSP5 (NS26), entre distintas cepas homólogas de porcino, se observa que es altamente conservado (97-98%) (López y col., 1993); en cambio, cuando se compara la secuencia aminoacídica de NS26 de porcino con el polipéptido codificado por el segmento 11 del RNA genómico de otras cepas de rotavirus, que infectan a humanos o animales, se observa que existe aproximadamente un 90% de homología. Por su parte, el polipéptido de 92 aminoácidos, presenta un 98% de homología en su secuencia aminoacídica entre los distintos tipos de rotavirus (López y col., 1993).

En nuestro laboratorio disponemos de un reordenante molecular, obtenido luego de una infección realizada con la cepa CN86 de rotavirus de cerdo utilizando una alta multiplicidad de infección (Mattion y col., 1990). Este reordenante, denominado CC86, presenta una modificación en la movilidad electroforética del segmento 11, el cual migra entre los segmentos 9 y 10, como se muestra en la figura 1. Estudios preliminares,

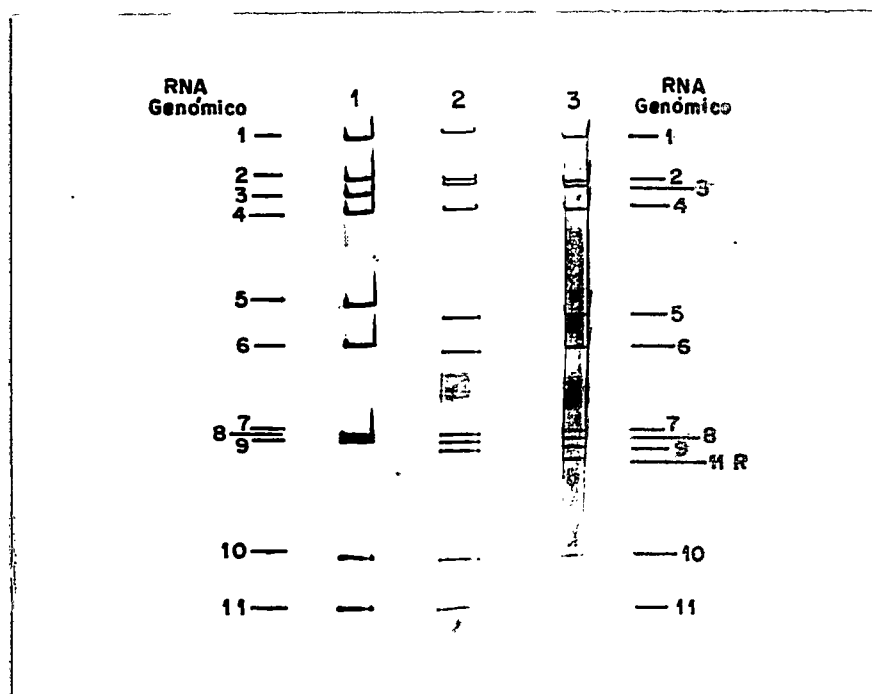


FIGURA 1. ELECTROFEROTIPOS DE LAS CEPAS SA-11 CN86 Y CC86 DE ROTAVIRUS. Las muestras de RNA genómico fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 7%. En el carril 1 se observa el patrón electroforético de la cepa SA-11 de rotavirus de simio. En el carril 2 se observa el patrón electroforético del RNA genómico de la cepa parental CN86 de rotavirus de cerdo y en el carril 3 se muestra el patrón electroforético del RNA genómico de la cepa CC86 reordenante de rotavirus de cerdo.

realizados con la cepa CC86 de rotavirus de cerdo demostraron que el segmento 11 de mayor tamaño híbrida con el segmento 11 de la cepa CN86. Además, análisis realizados mediante la técnica de extensión del partididor demostró que utilizando el segmento 11 de mayor tamaño se producían dos productos de distinto tamaño, que iniciaban en el mismo sitio pero terminaban en lugares distintos. Estos resultados estarían indicando que el reordenamiento del segmento 11 en la cepa CC86 se debería a una duplicación de este segmento, similar al descrito en la cepa C60 (Mattion y col., 1990).

Una característica muy interesante de la cepa CC86 es que al infectar monocapas de células MA-104 forma placas de lisis de mayor tamaño que la cepa parental (figura 2), aún cuando ambas cepas tienen una curva de crecimiento similar en cultivo celular. Además, cuando se realizan coinfecciones con las cepas CN86 y CC86 en células MA-104, la cepa reordenante sobrecrece a la cepa parental, observándose que sólo se produce progenie con características fenotípicas de la cepa reordenante, como se muestra en la figura 3.

Hasta ahora, la mayoría de los estudios realizados han indicado que en rotavirus el polipéptido VP4 sería responsable de la virulencia, de la infectividad, del desarrollo y tamaño que alcanzan las placas de lisis producidas en infecciones de monocapas celulares con este virus (Kalica y col., 1983; Offit y col., 1986). El análisis de algunos reordenantes, obtenidos por coinfección de células con una cepa que produce placas lisis pequeñas y otra que produce placas lisis grande, ha demostrado que el polipéptido VP4 tendría un rol en la formación de las placas de lisis y en el tamaño que éstas pueden

2A



2B



FIGURA 2. COMPARACION DE LA FORMACION DE PLACAS DE LISIS DE LAS CEPAS CN86 Y CC86 DE ROTAVIRUS DE CERDO. Se infectaron monocapas de células MA-104, con la cepa CN86 o CC86. Una vez adsorbido el inóculo se agregó MME suplementado con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tripsina y 0,6% de agar Oxoid. Luego de 3 días, las placas de lisis fueron teñidas con cristal violeta. La figura 2A corresponde a las placas de lisis obtenidas de la cepa CN86 y en la parte 2B se observa las placas de lisis correspondiente a la cepa CC86.

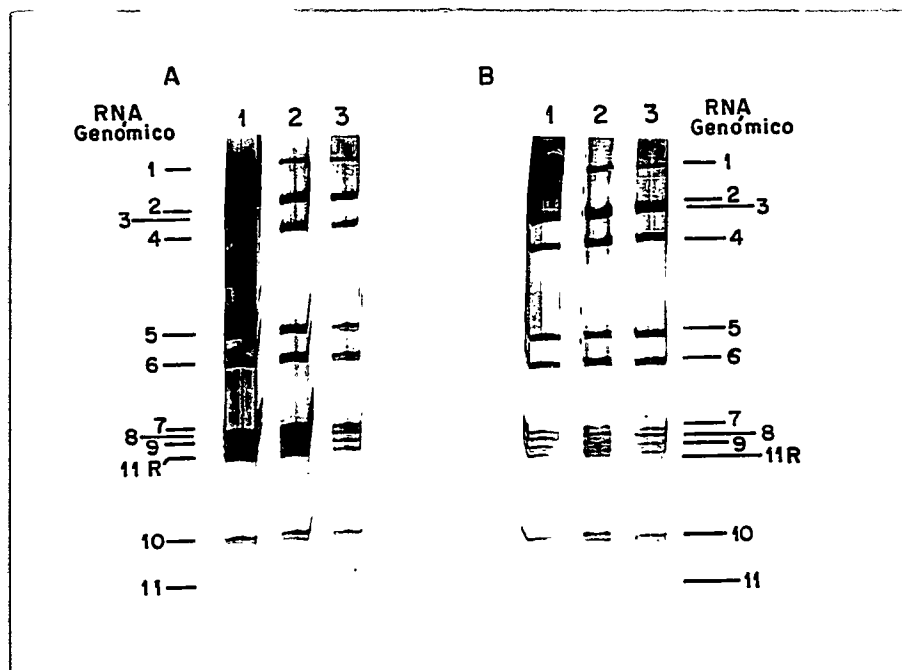


FIGURA 3. ENSAYO DE COMPETENCIA ENTRE LAS CEPAS CN86 Y CC86. Se coinfectaron monocapas de células MA.104, con las cepas CN86 y CC86, el RNA genómico de la progenie viral fue purificado y sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida. La parte A corresponde al RNA genómico obtenido desde 3 pasajes de infección de la coinfección en la que se utilizó 0,1 y 0,01 PFU/célula de la cepa CN86 y CC86 respectivamente. La parte B de la figura corresponde al RNA genómico obtenido desde 3 pasajes de infección de la coinfección en la que se utilizó 0,1 PFU/célula de ambas cepas de rotavirus de cerdo. (Línea 1-3).

alcanzar (Taniguchi y col., 1994). Por otro lado, se demostró que al traspasar el segmento que codifica para el polipéptido VP4 de una cepa virulenta, a una cepa receptora no virulenta la característica de virulencia también era traspasada (Offit y col., 1986). Estos estudios se complementan con otros en los cuales se determinó la secuencia aminoacídica de este polipéptido, en distintas cepas de rotavirus aislados de pacientes sintomáticos y asintomáticos (Gorsiglia y col., 1989).

El objetivo de esta tesis es determinar si el efecto producido por el reordenamiento del segmento 11 en la cepa CC86, respecto a la cepa CN86, se debe a una mayor eficiencia con que se lleva a cabo algunos de los distintos procesos de la morfogénesis viral: síntesis del RNA (+) y RNA (-), síntesis de proteínas y ensamblaje de la progeñe de rotavirus. Caracterizar genéticamente el reordenamiento del segmento 11 y además, se pretende determinar si el fenotipo encontrado en esta cepa de cerdo puede ser traspasado a otra cepa de rotavirus. Se escogió como cepa receptora para este último estudio a la cepa de rotavirus de simio SA-11, cuyo genoma presenta un electroferotipo distinto al de las cepas de rotavirus de cerdo, seleccionando aquellos reordenantes producidos en coinfecciones con CC86 y SA-11 que poseen la dotación genética de SA-11 excepto en que el segmento 11 provenga de la cepa CC86.

MATERIALES

Rotavirus CN86 y CC86 fueron donados por el Dr. José Latorre del Centro de Virología Animal (CEVAN) Buenos Aires. Argentina.

METODOS

1.- CULTIVO DE CELULAS

1.1 CULTIVOS DE CELULAS MA-104.

Células MA-104, derivadas de riñón de *Mono rhesus*, fueron cultivadas en medio mínimo esencial (MME), suplementado con 5% de suero fetal de bovino (SFB), siguiendo procedimientos descritos (Sandino y col 1988, Sandino y col 1994).

1.2.- CULTIVO DE CEPAS DE *Escherichia coli*.

Las cepas de *Escherichia coli* TG1 utilizadas en este estudio fueron cultivadas en medio líquido (LB) a 37°C con agitación, o bien se crecieron a 37°C en placas de cultivo con medio sólido LB. Las colonias resultantes se mantuvieron en la placa a 4°C por varias semanas antes de ser replicadas y repetido el procedimiento.

Para conservar las cepas durante un tiempo más prolongado se utilizó medio líquido luria-glicerol 25%, manteniéndose luego a -70°C. De este modo, las cepas son viables al menos durante 2 años.

2.-PURIFICACION DE PARTICULAS VIRALES PARA ENSAYOS DE TRANSCRIPCION "IN VITRO".

Las monocapas de células MA-104 fueron infectadas con 0.1 PFU/célula de rotavirus de cerdo CN86 ó CC86. El inóculo viral fue activado previamente con 20µg/ml tripsina, incubando por 30 minutos a 37°C. Luego de un período de adsorción de una

hora, el inóculo fue eliminado y las células infectadas se mantuvieron a 37°C con MME y fueron purificadas como se describió anteriormente (Sandino y col., 1988).

3.- PURIFICACION DE SUB-PARTICULAS VIRALES PARA ENSAYOS DE SINTESIS DE RNA (-).

Se infectaron monocapas de células MA-104 como se describió en el punto 2 de Métodos. A las 2, 4, 6 y 9 horas post-infección se eliminó el medio de mantención y las subpartículas virales se purificaron utilizando el procedimiento descrito (Gallegos y Patton, 1989).

4.- DETERMINACION DE LA SINTESIS DE RNA MENSAJERO Y GENOMICO DE ROTAVIRUS DE CERDO EN CULTIVO CELULAR.

Se infectaron monocapas de células MA-104 con 0.1 PFU/célula de rotavirus de cerdo de las cepas CN86 ó CC86, previamente activado con 20 µg/ml de tripsina. Después de la adsorción del inóculo viral, las células infectadas se incubaron con MME carente en ácido ortofosfórico, suplementado con 10 µCi/ml de ^{32}P -HPO₄ y 2 µg/ml de tripsina. A 2, 4, 6, 8 y 12 horas post infección, el RNA genómico y RNA mensajero fue purificado y sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida, como se ha descrito (Sandino y col., 1988).

5.- SINTESIS "IN VITRO" DEL RNA MENSAJERO VIRAL.

La actividad RNA polimerasa de las subpartículas virales de rotavirus de cerdo fue determinada mediante la cuantificación de la incorporación de ^3H -UMP a material ácido insoluble como se describió anteriormente (Sandino y col., 1988).

6.- SINTESIS "IN VITRO" DEL RNA (-) DE ROTAVIRUS.

La síntesis de la hebra negativa del RNA se realizó utilizando subpartículas virales obtenidas a tiempos tempranos post-infección. Las subpartículas se incubaron por una hora a 45°C con una mezcla de reacción que contenía ^{32}P -UTP 0.04 mM con una actividad específica de 3000 cpm/pmol. Finalmente, la mezcla se sometió a una extracción de RNA y a electroforesis en geles de poliacrilamida no denaturante, como se ha descrito (Sandino y col., 1988).

7.- MARCACION DE PROTEINAS VIRALES CON ^{35}S -METIONINA.

Se infectaron monocapas de células MA-104 con las cepas de rotavirus de cerdo CN86 ó CC86, en las condiciones mencionadas en el punto 3 de Métodos. Una vez adsorbido el inóculo viral, éste se reemplazo por medio MME deficiente en metionina, suplementado con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de Actinomicina D, 2 $\mu\text{g/ml}$ de Tripsina y 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S Metionina. A distintos tiempos post-infección, el medio de cultivo fue eliminado y las proteínas virales fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida como se describe (Sandino y col., 1988; Mattion y col., 1988). Cuando se determinó el efecto de tunicamicina en la glicosilación de algunos polipéptidos, este inhibidor fue agregado al medio de incubación después de la adsorción del virus en una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$.

8.- FORMACION DE PLACAS DE LISIS .

Células MA-104 crecidas en discos plásticos se lavaron tres veces con MME. Luego se agregó el inóculo y se permitió la adsorción del virus durante una hora a 37°C. El inóculo fue removido y se agregó MME que contenía 2µg/ml Tripsina; 50 µg/ml DEAE Dextrano; 100 mM Hepes y 0,6% Agar Oxoid. Los discos fueron dejados a temperatura ambiente hasta que el agar gelificó y posteriormente se incubaron entre 4 y 6 días en una estufa a 37°C con CO₂ al 5% (Allen y Desselberger, 1985, Garbarg y Chenon, 1984; Graham y col., 1987; Mattion y col., 1990). Finalizada la incubación, la monocapa celular se fijó con formaldehído al 37% y luego se tiñó con cristal violeta al 1%. Las placas de lisis se evidenciaron por la ausencia de coloración en la monocapa celular.

9.- PURIFICACION DE CLONES VIRALES A PARTIR DE PLACAS DE LISIS.

Una vez formadas las placas de lisis, éstas fueron recolectadas desde el medio con agar. El trozo de agar, obtenido desde cada placa de lisis, fue depositado en un pequeño volumen de MME. Luego se procedió a congelar y descongelar tres veces, lo que permite la difusión de las partículas virales desde el trozo de agar. Posteriormente se tomó una alícuota de cada placa de lisis y se infectaron monocapas de células MA-104. Las partículas virales de cada placa de lisis fueron sometida a dos pasajes de infección en cultivo celular. Luego se purificó el RNA genómico y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida.

10.- AMPLIFICACION POR P.C.R DEL SEGMENTO 11 DE LAS CEPAS CN86 Y CC86.

La amplificación de ambos segmentos, se realizó a partir de los vectores cDNA-CC86 y cDNA-CN86, contruidos por el Dr Jorge Blakchalls. La mezcla de reacción consistió en 10 ng de cDNA, 5 mM MgCl₂; 2,5 mM de dATP; dCTP; dGTP; dTTP; 10 μM de c/u de los siguientes partidores NS-1: 5' TCCCCGCGGTGACAAAACGGGAGTGGGGAGCTCCCTAGTG3'; NS-2: 5'CCCTAGGTTAATACGACTCACTATAGGCTTTTAAAGCGCTACAGT 3'. La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer 480 y consistió en 30 ciclos de 1 minuto de denaturación a 95°C; 1 minuto de hibridación a 60 °C y 1 minuto de extensión a 72 °C; luego, se realizó una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Una vez finalizada la amplificación, los productos fueron visualizados en geles de agarosa.

11. PURIFICACION DE PLASMIDIOS RECOMBINANTES.

Para la purificación del DNA plasmidial se utilizó el método de la lisis alcalina, descrito por Birnboim y Doly, 1979. Se inocularon 100 ml de medio Luria que contenía ampicilina (100 μg/ml) con 5 ml de cultivo bacteriano y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación fuerte. Se colectaron las bacterias por centrifugación a 10500 x g por 10 minutos en una Minicentrífuga Eppendorf y se resuspendieron en 200 μl de una solución que contiene Tris-HCl 25 mM pH 8.5; EDTA 10 mM; Glucosa 50 mM y lisozima 2 mg/ml, incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se agregó 200 μl de una solución que contenía 0,2 M NaOH; 1% SDS, se

mezcló invirtiendo el tubo varias veces y se mantuvo en hielo durante 10 minutos. A esta mezcla se agregó 150 μ l de solución que contenía Acetato de Potasio 3M pH 5.2, se mezcló por inversión y se mantuvo en hielo por otros 15 minutos. El lisado bacteriano fue centrifugado, recuperando el sobrenadante a 14000 x g por 15 minutos, al cual se le agregó 5 μ l RNAsa A 10 mg/ml y se incubó a 37°C por 15 minutos. Luego, el lisado se incubó a 37°C por 15 minutos con 5 μ l de proteinasa K 10 mg/ml. Posteriormente se agregó un volumen de una mezcla 1:1 de fenol: cloroformo y se agitó vigorosamente en un vórtex. Se centrifugó a 10000 x g por cinco minutos en una Minicentrífuga Eppendorf para separar las fases, y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el DNA con 2 μ l de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y tres volúmenes de etanol absoluto. Finalmente, se centrifugó a 14900 x g por 30 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el DNA en agua destilada estéril.

12.- SECUENCIAMIENTO DEL SEGMENTO 11 DE LAS CEPAS CN86 Y CC86.

Las reacciones de secuenciamiento fueron realizadas por el método de terminación en cadena (Sanger y col., 1977) usando el kit de la Sequenasa Versión 2.0 (United States Biochemical Corporation) y los vectores DNA pGemT-11CC y pGemT-11CN. Una vez finalizada la reacción los productos fueron sometidos a electroforesis de poliacrilamida denaturante.

13.- TRANSCRIPCIÓN "IN VITRO" DEL SEGMENTO 11 A PARTIR DE LOS PLASMIDIOS pSP-11CN y pSP-11CC.

La reacción de transcripción "in vitro", se realizó utilizando el Kit comercial de transcripción de la RNA polimerasa T7 de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción consistió en 5 µg de DNA lineal del plasmidio pSP-11CC y pSP-11CN; 200 mM Tris- HCl pH 7,5; 30 mM MgCl₂; 10 mM Espermidina; 50 mM NaCl; 0,01% DTT; 5mg/ml BSA; 5mg/ml Inhibidor de Ribonucleasa RNAsin, dCTP;dTTP;dCTP 2,5 mM c/u, 0,25 mM dGTP; 0,5 mM mG (5') ppp (5')G y 50 UI de RNA polimerasa T7. Esta mezcla se incubó durante tres horas a 37°C y los productos de transcripción fueron visualizados en geles de poliacrilamida como se describe en (Sandino y col., 1988).

14.- TRADUCCIÓN "IN VITRO" DE LOS TRANSCRITOS DE RNA OBTENIDOS DE pSP-11CN Y pSP-11CC.

La traducción se llevó a cabo utilizando el Kit comercial de traducción "in vitro" de RNA con lisados de reticulitos de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. En este ensayo a 35 µl de lisado de reticulitos libre de nucleasa se agregó 2 µg de RNA templado previamente calentado a 67°C por 10 minutos, 40U de Inhibidor de ribonucleasa RNAsin, mezcla de aminoácidos (deficiente en metionina) 1 mM c/u y Metionina ³⁵S 40µCi/ml. La mezcla de reacción se incubó a 30°C por una hora y posteriormente los polipéptidos fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS como se describe en (Sandino y col., 1988).

RESULTADOS

1.- TRANSCRIPCIÓN "IN VITRO" DE LAS CEPAS CN86 Y CC86 DE ROTAVIRUS DE CERDO.

Con el fin de determinar si el aumento de tamaño del segmento 11 en la cepa CC86 produce una alteración en la síntesis de la hebra positiva, con respecto al segmento 11 normal de la cepa CN86, se comparó la transcripción "in vitro" en ambas cepas de rotavirus de cerdo. Las partículas virales purificadas de cada cepa se incubaron con una mezcla de transcripción "in vitro". La actividad de la RNA polimerasa viral presente en las partículas virales purificadas fue activada por shock térmico y luego la reacción se incubó a 45°C por 30 minutos. Los productos de transcripción se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-urea.

En la figura 4 se muestra el patrón electroforético de los 11 segmentos de mRNA de las cepas CC86 y CN86 sintetizados "in vitro" (carriles 1 y 2 respectivamente). Al analizar los productos de transcripción de la cepa CC86 se observa la síntesis de 11 segmentos de mRNA, de los cuales 10 segmentos tienen idéntica migración que los respectivos mRNA sintetizados por la cepa CN86, mientras que el segmento 11 reordenado presenta una migración electroforética menor al segmento 11 de la cepa CN86. Además no se observa la síntesis de otro producto de transcripción de tamaño similar al segmento 11 de la cepa CN86.

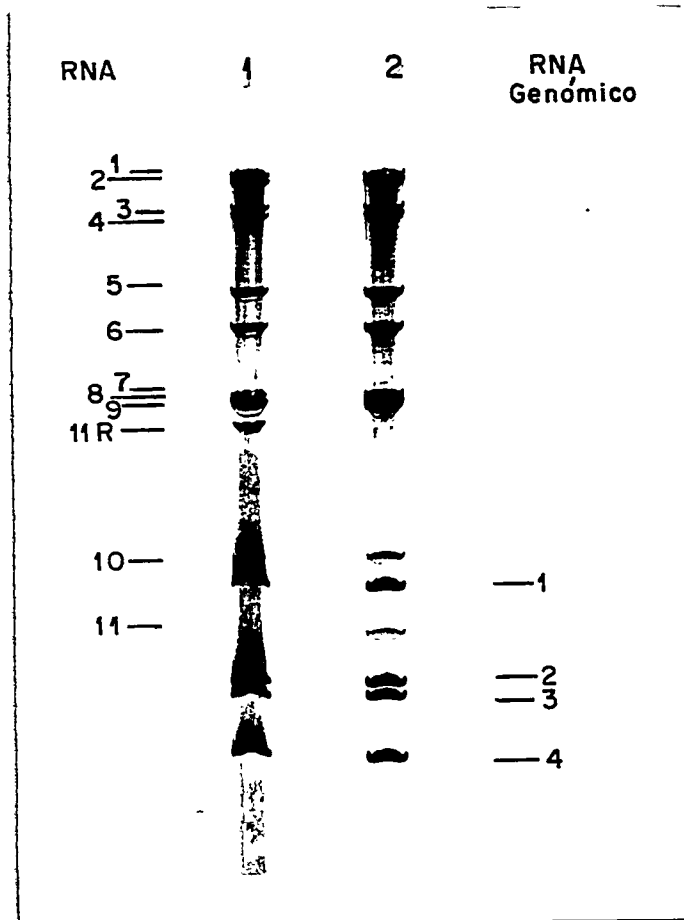


FIGURA 4. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE TRANSCRIPCION "IN VITRO" CATALIZADA POR LAS SUBPARTICULAS DE ROTAVIRUS CN86 Y CC86. Partículas virales purificadas se incubaron con una mezcla de reacción estándar de transcripción, luego los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida-urea al 5% y el gel fue teñido con nitrato de plata. El carril 1 corresponde a los productos de transcripción de la cepa CC86 y el carril 2 corresponde a los productos de transcripción de la cepa reordenante CN86. La ubicación de los distintos segmentos de RNA mensajeros y genómico de rotavirus de cerdo son indicados.

2.- EFECTO DE S-ADENOSILMETIONINA SOBRE LA TRANSCRIPCION "IN VITRO" DE ROTAVIRUS DE CERDO.

Los segmentos de mRNA viral sintetizados "in vivo" durante el proceso de transcripción poseen una estructura cap en el extremo 5', la cual se encuentra metilada. Se ha observado que en la mayoría de las cepas de rotavirus, la adición de S-adenosilmetionina a la mezcla de transcripción "in vitro" favorece la acumulación de los segmentos de mRNA viral sintetizado y que estos segmentos poseen la modificación cap descrita al igual que los productos de transcripción "in vivo". Se estudió el efecto que tenía la presencia y ausencia de SAM en la transcripción "in vitro" de ambas cepas de rotavirus de cerdo, para determinar si existe diferencia en la síntesis del segmento 11 reordenado.

En la figura 5 se muestra una gráfica que relaciona el porcentaje de la actividad transcripcional obtenida utilizando concentraciones crecientes de SAM, respecto a la reacción realizada en ausencia de SAM. Se observa que en ambas cepas de rotavirus de cerdo la adición de SAM tiene un efecto estimulador de la actividad transcripcional de alrededor de un 55%, respecto a los ensayos de transcripción "in vitro" realizados en ausencia de SAM.

3.- EFECTO DE ANALOGOS EN LA TRANSCRIPCION "IN VITRO" DE ROTAVIRUS DE CERDO.

Debido a que los análogos de nucleótidos adenosina 9-β-D-arabinofuranosido-5'-trifosfato (Ara ATP) y Cordicepina 5'-trifosfato 3'-deoxiadenosina 5'-trifosfato (Cord TP)

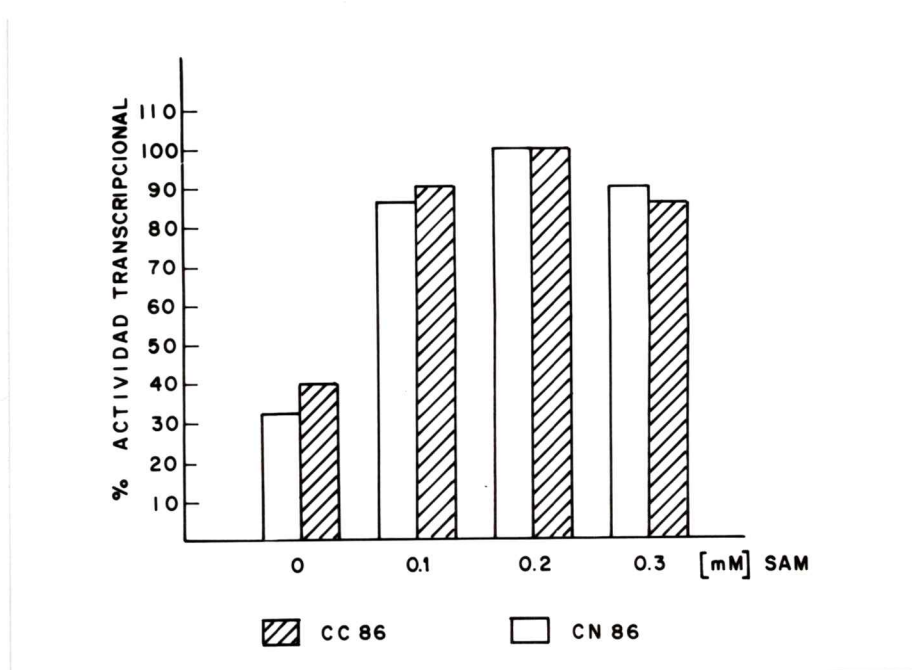


FIGURA 5. EFECTO DE S-ADENOSILMETIONINA EN LA TRANSCRIPCION "IN VITRO" CATALIZADA POR LAS SUBPARTICULAS DE ROTAVIRUS CN86 Y CC86. Partículas virales purificadas se incubaron con mezclas de reacción estándar de transcripción, en presencia ó ausencia de S-adenosilmetionina, durante 30 minutos a 45°C. La gráfica muestra la actividad transcripcional de las cepas CN86 (diagrama claro) y CC86 (diagrama oscuro). Se determinó la radioactividad asociada a material ácido insoluble,

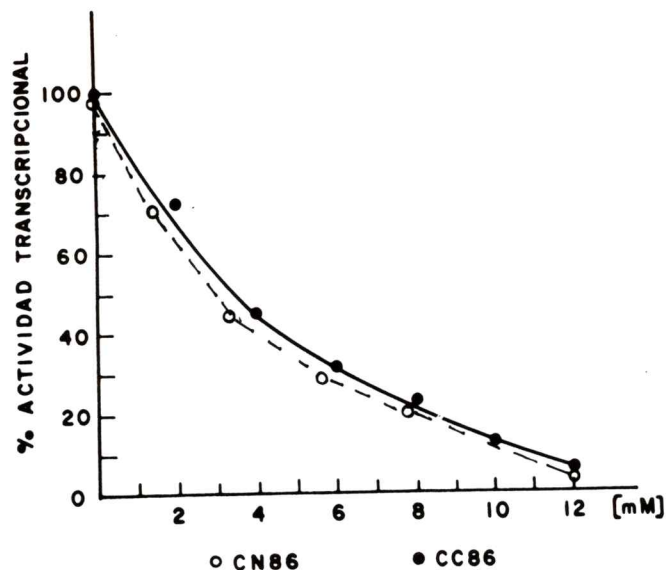
tienen un efecto inhibitorio en la transcripción "in vitro" de rotavirus de simio (SA-11), se estudió el efecto de estos análogos sobre la transcripción "in vitro" de las cepas CN86 y CC86 de rotavirus de cerdo. Con este fin se agregaron concentraciones crecientes de cada análogo a mezclas de transcripción estándar que contenían partículas virales purificadas, 4 mM de NTP y 0,24 mM de $^3\text{H-ATP}$ con una actividad específica de 100cpm/pmol.

En la figura 6A y 6B se muestran las gráficas que relacionan la síntesis de RNA mensajero, expresadas en porcentaje de inhibición, con la concentración de los inhibidores Ara-ATP y CordTP respectivamente. Se observa que Ara ATP inhibe en forma similar la transcripción "in vitro" tanto de la cepa CN86 como de la cepa reordenante CC86 (figura 6A). De igual modo, en presencia de Cord TP la tendencia inhibitoria de la transcripción "in vitro" de ambas cepas de rotavirus de cerdo es similar (figura 6B).

4.- CINETICA DE APARICION DE RNA MENSAJERO Y RNA GENOMICO DE ROTAVIRUS DE CERDO.

Para determinar si el reordenamiento genético del segmento 11 altera la síntesis "in vivo" de mRNA y RNA doble hebra, de la cepa CC86 con respecto a la cepa CN86, se infectaron monocapas de células MA-104 con 0.1 PFU/célula de la cepa CN86 o de la cepa CC86, previamente activadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina. Luego de la adsorción se retiró el inóculo y se adicionó 1 ml de medio de mantención deficiente en fosfato,

A



B

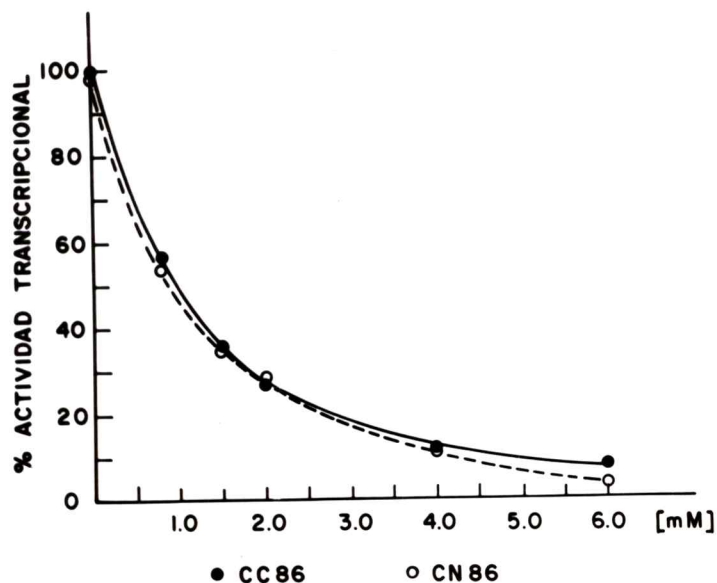


FIGURA 6. EFECTO DE Cord T Y Ara ATP EN LA TRANSCRIPCION "IN VITRO" CATALIZADA POR SUBPARTICULAS DE ROTAVIRUS CN86 Y CC86. Se incubaron partículas virales con una mezcla de transcripción en presencia de distintas concentraciones de Ara ATP y Cord TP y se determinó la radioactividad asociada a material ácido insoluble. La gráfica A y B corresponden al efecto de los análogos Ara ATP y Cord TP respectivamente, en la transcripción "in vitro" de las cepas CN86 (-o-o-o-) y CC86 (o-o-o) de rotavirus de cerdo.

suplementado con 2 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina y 10 μCi de $^{32}\text{P-H}_3\text{PO}_4$. Las células se incubaron a 37°C por 2, 4, 6, 8 y 12 horas y posteriormente fueron cosechadas como se ha descrito (Sandino y col 1988). El RNA viral sintetizado durante la infección fue purificado y analizado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

La figura 7 corresponde a la autorradiografía del gel que muestra la síntesis de RNA mensajero en células infectadas con las cepas CN86 y CC86. Los carriles 1 al 5 y 6 al 10 corresponden al RNA mensajero sintetizados por las cepas CN86 y CC86 respectivamente, obtenido a las 2, 4, 6, 8, y 12 horas post infección. En ambos casos, se observa la aparición de RNA mensajero viral a las 2 horas post infección. El segmento 11 reordenado también se sintetiza en las primeras horas post infección.

La figura 8 corresponde a la autorradiografía del gel que muestra la síntesis de RNA genómico de ambas cepas de rotavirus de cerdo. Los carriles 1 al 5 y 6 al 10 corresponden al RNA doble hebra de las cepas CN86 y CC86 respectivamente, obtenido a las 2, 4, 6, 8 y 12 post infección. En esta figura se observa síntesis de todos los segmentos de RNA genómico a partir de 2 horas post infección, en ambas cepas de rotavirus de cerdo. Estos resultados, juntos con los resultados obtenidos en ensayos de transcripción "in vitro", indican que el segmento 11 reordenado tiene un comportamiento similar al segmento 11 de la cepa CN86 en la síntesis de la hebra positiva y negativa.

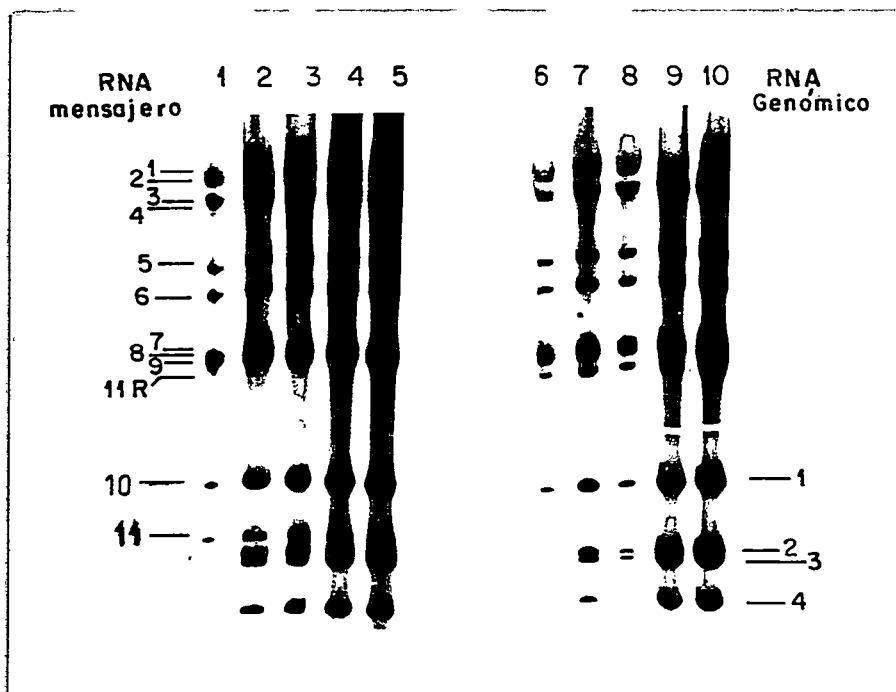


FIGURA 7. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE TRANSCRIPCION DE ROTAVIRUS EN CULTIVO CELULAR. Se infectaron monocapas de células MA-104 con las cepas CN86 o CC86. A distintas horas post infección el medio fue retirado y las células se lavaron con MME sin SFB, luego se les agregó MME sin SFB, deficiente en fosfato, suplementado con $10\mu\text{Ci/ml}$ de $^{32}\text{P-H}_3\text{PO}_4$ y $2\mu\text{g/ml}$ de tripsina, y se incubaron a 37°C por 2, 4, 6, 8 y 12 post- infección. Las células fueron cosechadas y sometidas a extracción de RNA, luego fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida. La autorradiografía de los geles evidencia la síntesis de RNA mensajero de células infectadas con CN86 y CC86. En esta figura los carriles 1 al 5 y 6 al 10, corresponden al RNA mensajero extraído de las células infectadas con CN86 y CC86 respectivamente, después de la adición de $^{32}\text{P-H}_3\text{PO}_4$, por 2, 4, 6, 8 y 12 horas post infección. Los 11 segmento de RNA mensajero son indicados.

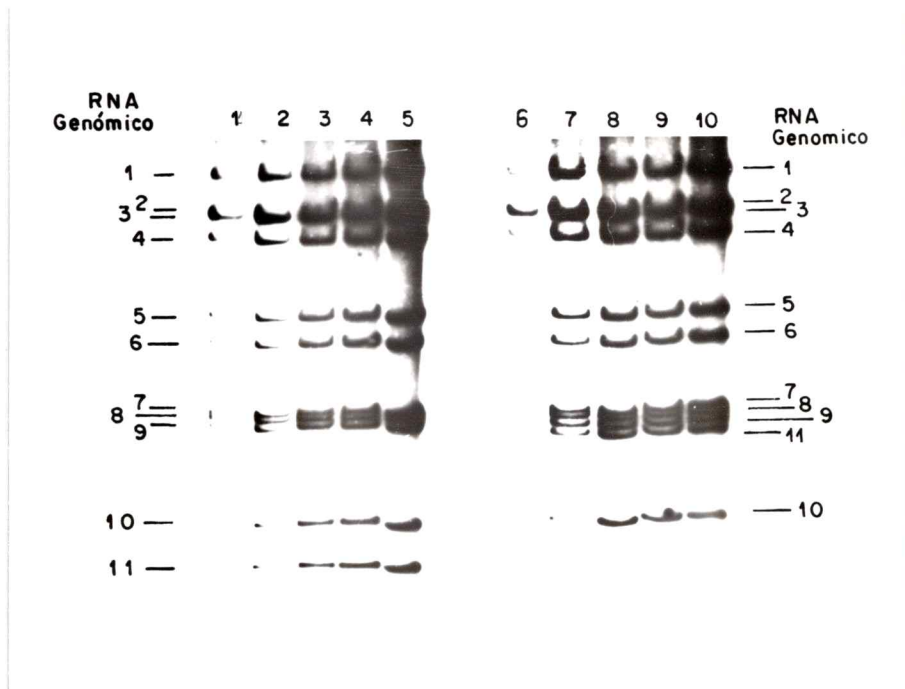


FIGURA 8. ANALISIS DE LA SINTESIS DE RNA GENOMICO DE ROTAVIRUS EN CULTIVO CELULAR. Se infectaron monocapas de células MA-104 con las cepas CN86 o CC86. A distintas horas post infección el medio fue retirado y las células se lavaron con MME sin SFB, luego se les agregó MME sin SFB, deficiente en fosfato, suplementado con $10\mu\text{Ci/ml}$ de $^{32}\text{P-H}_3\text{PO}_4$ y $2\mu\text{g/ml}$ de tripsina, y se incubaron a 37°C por 2, 4, 6, 8 y 12 post- infección. Las células fueron cosechadas y sometidas a extracción de RNA, luego fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida. La autorradiografía de los geles evidencia la síntesis de RNA y RNA mensajero de células infectadas con CN86 y CC86. En esta figura los carriles 1 al 5 y 6 al 10, corresponden al RNA genómico extraído de las células infectadas con CN86 y CC86 respectivamente, después de la adición de $^{32}\text{P-H}_3\text{PO}_4$ por 2, 4, 6, 8 y 12 horas post infección. Los 11 segmento de RNA genómico son indicados.

5.- CINETICA DE SINTESIS DE PROTEINAS EN CELULAS INFECTADAS CON ROTAVIRUS DE CERDO

Con el fin de determinar si el reordenamiento genético del segmento 11 genera una alteración en la síntesis del polipéptido NSP5 ó induce la síntesis de otro polipéptido desde otros marcos de lectura, se estudió la síntesis de los polipéptidos virales en la cepas CN86 y CC86. Se infectaron monocapas de células MA-104 con 0.1 PFU/célula de la cepa CN86 ó de la cepa CC86. Luego de la adsorción, se retiró el inóculo y se reemplazó por MME deficiente en metionina suplementado con 15 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -metionina, 2 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Actinomicina D, como se describe en Métodos. Luego las células se cosecharon a distintas horas post infección y las proteínas virales sintetizados se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. La autorradiografía del gel se muestra en la figura 9, donde los carriles 2, 5, 8 y 11 corresponden a proteínas sintetizadas en células sin infectar; los carriles 3, 6, 9 y 12 corresponden a proteínas sintetizados en células infectadas con la cepa CN86 y los carriles 4, 7, 10 y 13 corresponden a proteínas sintetizadas en células infectadas con la cepa CC86. Todas las células fueron cosechadas a las 3, 6, 9 y 12 horas post-infección respectivamente. El carril 1 corresponde a los polipéptidos virales marcados con ^{35}S -Metionina obtenidos desde virus purificado. En esta figura se observa que en las condiciones del experimento descrito es posible detectar proteínas virales a partir de las 3 horas post-infección en células infectadas con la cepa CC86, en forma similar a lo observado con la cepa CN86. Con ambas cepas de rotavirus de cerdo en etapas más

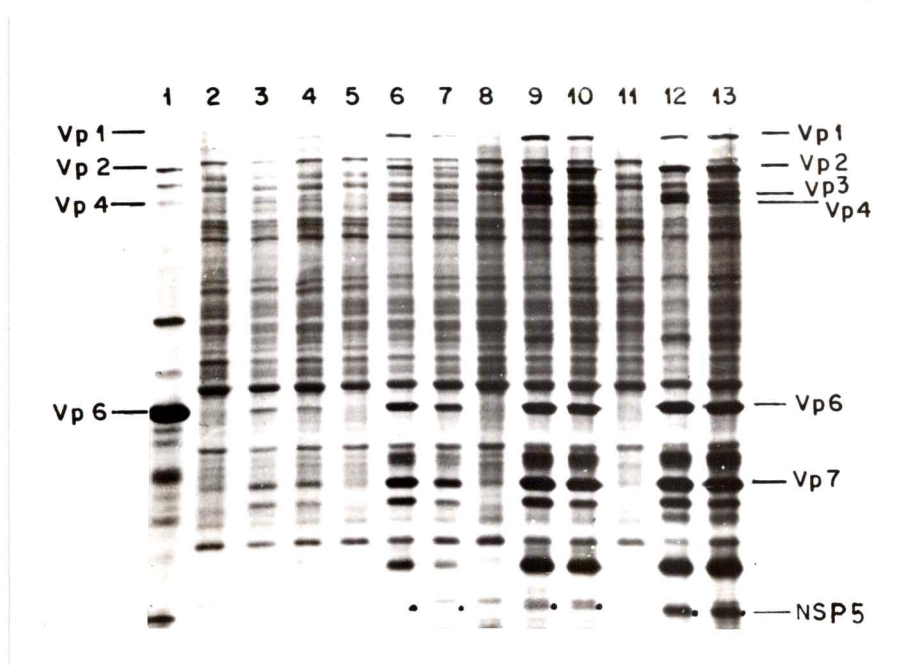


FIGURA 9. CINÉTICA DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS PRODUCIDAS POR LAS CEPAS CN86 Y CC86 DE ROTAVIRUS DE CERDO. Se infectaron monocapas de células MA-104, en tubos de cultivo, con las cepas CN86 o CC86, en presencia de $10\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -metionina. A distintas horas post-infección las células fueron cosechadas y las proteínas marcadas fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. La figura muestra la autoradiografía del gel de poliacrilamida-SDS, donde los carriles 2, 5, 8 y 11 corresponden a muestras provenientes de células sin infectar; los carriles 3, 6, 9 y 12 corresponden a muestras provenientes de células infectadas con CN86; los carriles 4, 7, 10 y 13 corresponden a muestras proveniente de células infectadas con CC86, todas las células fueron cosechadas a 2, 4, 6 y 9 horas post-infección. Los polipéptidos virales están son indicados.

tardías de la infección se observa un aumento general en la síntesis de proteínas virales. Tanto al utilizar la cepa CN86 como CC86 se observó la síntesis del polipéptido NSP5 (NS26), que es codificado normalmente por el segmento 11. En las células infectadas por la cepa viral que posee el segmento 11 reordenado, no se detecta la síntesis de ningún otro producto polipeptídico distinto a los sintetizados por la cepa viral normal, así como no se observa síntesis diferencial en el polipéptido NSP5 por la cepa CC86 con respecto a la cepa CN86, en las condiciones estudiadas. Tampoco se observó diferencias en la inhibición de la glicosilación del polipéptido NSP5 en ambas cepas (datos no mostrados).

6.- ESTUDIO DE LA SÍNTESIS DE RNA (-) "IN VITRO".

Para determinar si el segmento 11 que presenta el reordenamiento genético confiere a la cepa CC86 alguna característica que le permita replicarse en una forma más eficiente se comparó la replicación "in vitro", es decir la síntesis de los 11 segmentos de RNA genómico de doble hebra, en ambas cepas de rotavirus de cerdo. Para realizar el ensayo se utilizaron sub-partículas virales purificadas a diferentes tiempos post-infección. Luego de 1 hora de incubación a 45°C, en presencia de NTP 4 mM y 32 P-UTP 40 uM el producto de la reacción se trató con RNAsa A. El RNA de doble hebra sintetizado en la reacción se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior autoradiografía. Los resultados se muestran en la figura 10, donde los carriles 1-4 y 5-8 corresponden al RNA de doble hebra sintetizado "in vitro" por las cepas CN86 y CC86 respectivamente.

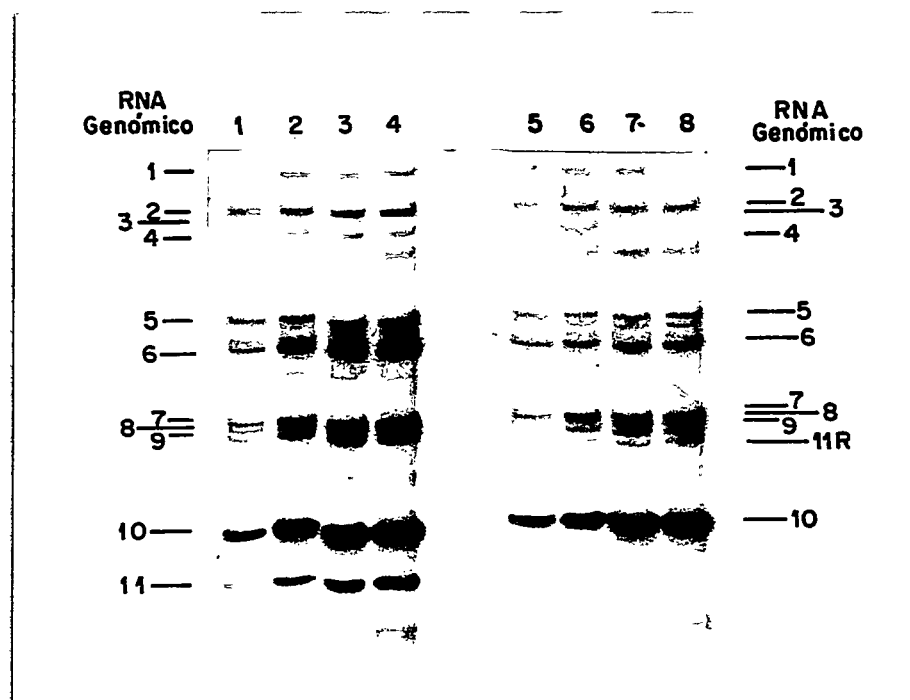


FIGURA 10. SINTESIS DE RNA (-) "IN VITRO" CATALIZADA POR SUBPARTICULAS DE ROTAVIRUS CN86 Y CC86. Se infectaron monocapas de células MA-104, con CN86 o CC86, a distintos tiempos post-infección se purificaron las subpartículas y se determinó la síntesis de la hebra negativa del RNA genómico viral. Se incubaron con una mezcla de reacción, que contiene ^{32}P -UTP, a 45°C durante una hora. Luego las muestras fueron tratadas con RNAasa A y sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida. La figura muestra los productos de replicación viral de ambas cepas de rotavirus de cerdo en la autoradiografía de un gel de poliacrilamida. Los carriles 1 al 4 corresponden a los productos de replicación de subpartículas de la cepa CN86; los carriles 5 al 8 corresponden a los productos de replicación de subpartículas de la cepa CC86. Las subpartículas fueron cosechadas a la 2, 4, 6 y 9 horas post-infección. Los productos de la replicación viral son indicados.

Los resultados muestran que en ambas cepas de rotavirus de cerdo, ya a las 2 horas post infección y durante todo el curso de la infección hay subpartículas virales que pueden sintetizar los RNA de doble hebra "in vitro". Al utilizar sub-partículas de la cepa CC86 no se observa la síntesis del segmento 11 normal "in vitro". Al igual que "in vivo", el segmento de la cepa CC86 aparece migrando entre el segmento 9 y 10, lo cual evidencia que el segmento reordenado se replica como una sola unidad, de igual tamaño que el segmento 11 normal.

7.-AMPLIFICACION Y SUBCLONAMIENTO DEL SEGMENTO 11 DE ROTAVIRUS DE CERDO CN86 Y CC86.

El segmento 11 de las cepas CN86 y CC86 fue amplificado y subclonado en el vector pSP64 bajo el comando del promotor de la RNA polimerasa T7.

7.1.- AMPLIFICACION DEL SEGMENTO 11 A PARTIR DE cDNA

La amplificación del segmento 11 de ambas cepas de rotavirus de cerdo se realizó por la reacción en cadena de la polimerasa (P.C.R), a partir del cDNA de cada uno de los segmentos obtenidos previamente por el Dr Jorge Blackhall. Para ello, se utilizaron los partidores NS-1 y NS-2, correspondientes a una región que se encuentra ubicada entre los nucleótidos 1-20 y 640-664 del segmento 11 normal respectivamente. En el extremo 5', el partidor NS-1 contiene la secuencia del promotor de la RNA polimerasa T7 y el sitio de restricción EcoRI, mientras que en el extremo 5', el partidor NS-2 contiene el sitio de restricción SacII. La amplificación se realizó incubando el cDNA

correspondiente junto con una mezcla de amplificación que contiene los partidores NS-1 y NS-2. Luego, los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y visualizados por exposición del gel a luz ultravioleta.

Los resultados de la amplificación se muestran en la figura 11, donde los carriles 1 y 2 corresponden a marcadores de peso molecular (DNA de fago lambda digerido con la enzima de restricción BanII y del plasmidio pGem digerido con la enzima de restricción NciI, respectivamente). En el carril 3 se observa el producto de PCR obtenido a partir del cDNA de la cepa CN86, el cual presenta el tamaño esperado de 680 pb. Utilizando los partidores antes mencionados, el producto de PCR obtenido a partir del cDNA de la cepa CC86 migra en una posición cercana a los marcadores de 1105 pb y 1129 pb de lambda y pGem respectivamente. No se observa síntesis de un fragmento similar al obtenido utilizando el cDNA del segmento 11 normal.

7.2.- SUBCLONAMIENTO DEL SEGMENTO 11 DE ROTAVIRUS CN86 Y CC86.

Los productos de PCR fueron purificados y ligados al plasmidio pGem T. Luego, las mezclas de ligamiento se utilizaron para transformar células TG1 competentes, seleccionando posteriormente las colonias que poseen plasmidios recombinantes en base al color blanco que presentan al ser plaqueados en medio que contiene IPTG y X-gal, como se describe (Maniatis y col., 1982). Mediante este procedimiento se aislaron alrededor de 10 clones de cada uno de los segmento, los cuales fueron crecidos en placas de agar luria y sus plasmidios fueron purificados.

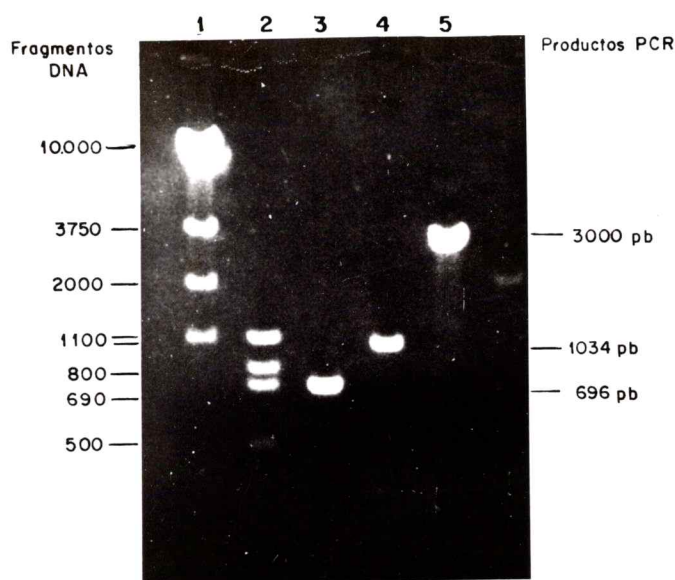


FIGURA 11. AMPLIFICACION EN CADENA DE LA POLIMERASA DEL SEGMENTO 11 DE ROTAVIRUS DE CERDO. El cDNA correspondiente al segmento 11 de la cepa CN86 y CC86 se incubó con los partidores NS-1 y NS-2 en una mezcla de amplificación por 30 ciclos. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio. Los carriles 1 y 2 corresponden a fragmentos de DNA estándar de lambda digerido con Ban II y pGem digerido con Nci I respectivamente; el carril 3 corresponde al producto de amplificación obtenido desde el cDNA que contiene el segmento 11 de la cepa CN86; el carril 4 corresponde al producto de amplificación obtenido desde el cDNA que contiene el segmento 11 de la cepa CC86 y el carril 5 corresponde al producto de amplificación de un DNA control. El tamaño de los fragmentos de DNA en pares de bases son indicados.

como se describe en el punto 13 de Métodos. En la figura 12, se muestra la estructura de los clones seleccionados. En C se muestra al plasmidio recombinante pGemT-11CN de 3699 pb, que contiene el segmento 11 de la cepa CN86; En D se muestra al plasmidio recombinante pGemT-11CC de 4018 pb, que contiene el segmento 11 de la cepa CC86. Ambos plasmidios recombinantes fueron digeridos posteriormente con las enzimas EcoRI y SacII, obteniéndose los fragmentos de 696 y 1016 pares de bases, correspondientes al segmento 11 de CN86 y CC86 respectivamente. Los fragmentos de ambos segmentos fueron clonados en el plasmidio pSP64, siguiendo el procedimiento descrito (Maniatis y col., 1982). La mezcla de ligamiento se utilizó para transformar células TG1. Posteriormente se aislaron 10 colonias recombinantes cuyos plasmidios fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa. En la figura 12 parte F y G, se muestra una representación gráfica de la estructura de los plasmidios recombinantes pSP-11CC y pSP-11CN, que contienen el segmento 11 de la cepa CN86 y de la cepa CC86 respectivamente.

7.3.- ANALISIS DE PLASMIDIOS RECOMBINANTES

Una vez clonados los productos de PCR en el plasmidio pGem T, ambos vectores fueron digeridos con las enzimas BamHI y Sac II. Los fragmentos que contienen el segmento 11 de CN86 y aquellos que contienen el segmento 11 de CC86 se subclonaron en el vector pSP64 obteniéndose los plasmidios recombinantes pSP-11CN y pSP-11CC. En la figura 13 se muestra el perfil plasmidial de los clones seleccionados. El carril 1 y 4 corresponde al plasmidio pSP64, utilizado en el subclonamiento

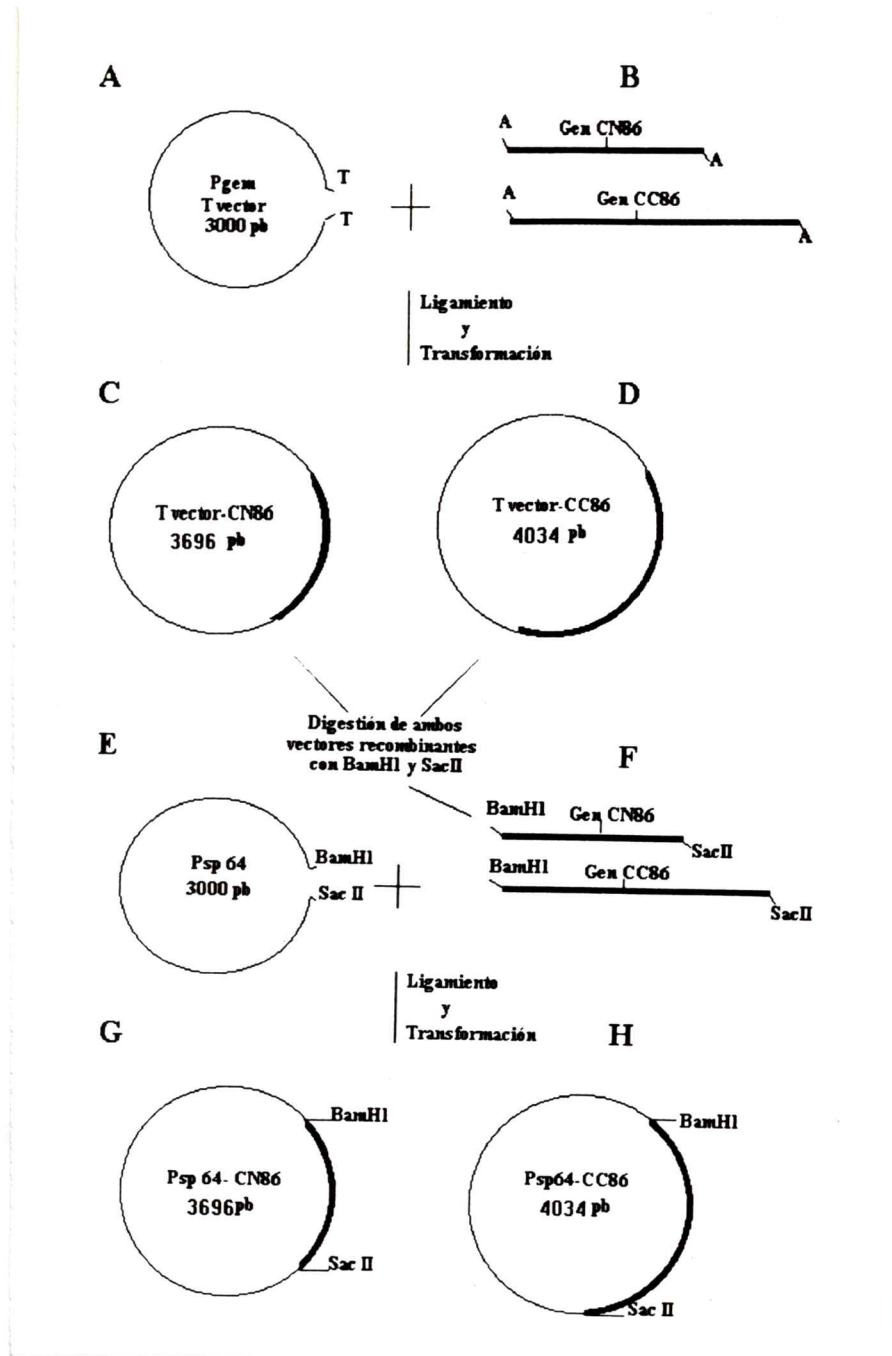


FIGURA 12. ESQUEMA DE SUBCLONAMIENTO DEL SEGMENTO 11 NORMAL Y REORDENADO.

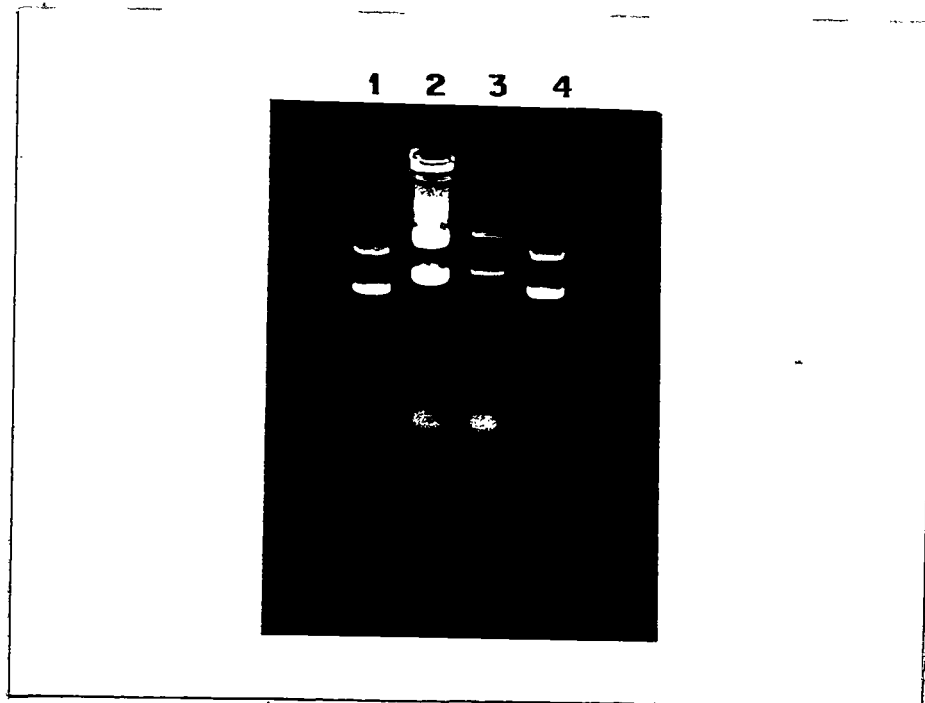


FIGURA 13. ANALISIS DE LOS PLASMIDIOS RECOMBINANTES QUE CONTIENEN EL SEGMENTO 11 DE CN86 Y CC86. Los productos de amplificación fueron ligados al plasmidio pGem T y transformados en células TG1 competentes. Los plasmidios recombinantes fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. El carril 1 y 4 corresponde al DNA del plasmidio pGem T; el carril 2 corresponde al DNA del plasmidio recombinante que contiene el segmento 11 de la cepa CN86; y el carril 3 corresponde al DNA del plasmidio recombinante que contiene el segmento 11 reordenante de la cepa CC86.

de ambos segmentos; el carril 2 corresponde al plasmidio recombinante pSP-11CN, que contiene el segmento 11 de la cepa CN86; el carril 3 corresponde al plasmidio recombinante pSP-11CC de 40, que contiene el segmento 11 de la cepa CC86.

8.- TRANSCRIPCION "IN VITRO" A PARTIR DE pSP-11CN Y pSP-11CC.

Para determinar si el segmento 11 de la cepa CN86 y CC86, clonados en el vector pSP64, produce un transcrito del mismo tamaño que los obtenidos por transcripción "in vitro" utilizando partículas virales purificadas de la cepa CN86 y CC86, se realizó transcripción "in vitro" de estos segmentos bajo el comando de la RNA polimerasa T7. Para ello, los plasmidios recombinantes pSP-11CN y pSP-11CC fueron digeridos con SacII, lo que permite su linearización. Luego se utilizó 1 ng de vector lineal como templado para realizar transcripción "in vitro" con RNA polimerasa T7, usando procedimientos descritos en Métodos. Posteriormente, los transcritos sintetizados fueron analizados en geles de poliacrilamida-urea y teñidos con nitrato de plata. Los resultados se muestran en la figura 14 A y 14 B. El carril 1 de la figura 14 A, corresponde al producto de transcripción "in vitro" utilizando partículas virales purificadas de la cepa CC86 de rotavirus de cerdo; el carril 2, corresponde al transcrito obtenido por transcripción "in vitro" utilizando el plasmidio recombinante pSP-11CC. En el carril 1 de la figura 14 B se observan los productos de transcripción "in vitro" utilizando partículas virales purificadas de la cepa CN86; el carril 2 corresponde al transcrito obtenido por

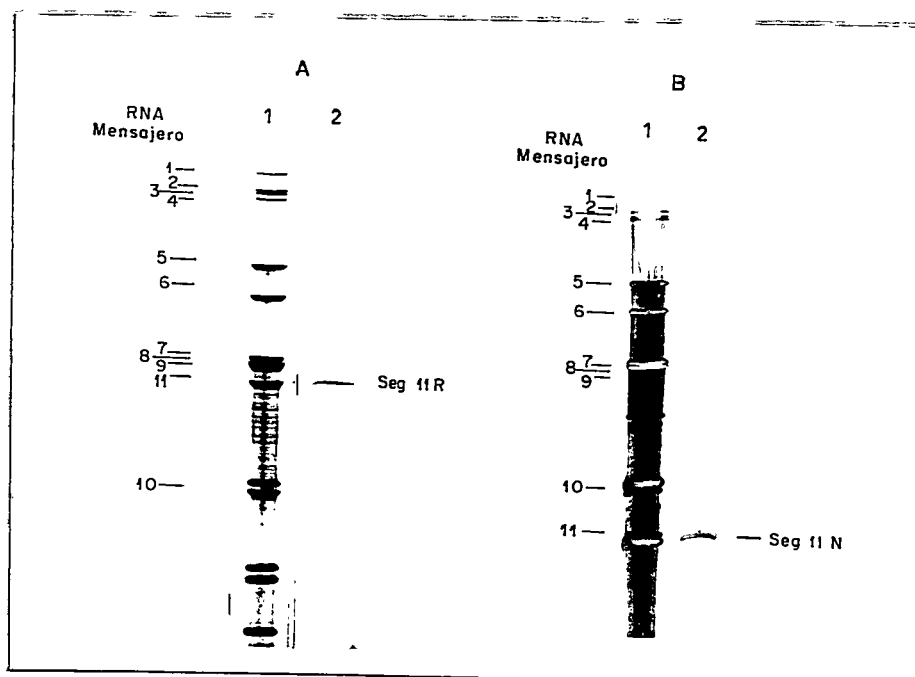


FIGURA 14. ANALISIS DEL PRODUCTO DE TRANSCRIPCIÓN “IN VITRO” DE LOS PLASMIDIOS pSP-11CN Y pSP-11CC. Los plasmidios recombinantes pSP-11CN y pSP-11CC, linearizados por la digestión con SacII, fueron incubados con una mezcla de transcripción por 2 horas a 37°C. Los productos de transcripción fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida-urea y posteriormente teñidos con plata. La figura 14 A, muestra el RNA mensajero de la cepa CC86. El carril 1 corresponde a los 11 transcritos obtenidos a partir de partículas virales purificadas de la cepa CC86; en el carril 2 corresponde al transcrito obtenido a partir del plasmidio recombinante pSP-11CC que contiene el segmento 11 normal. La figura 14 B, muestra el RNA mensajero de la cepa CN86. El carril 1 corresponde a los 11 transcritos obtenidos a partir de partículas virales purificadas de la cepa CN86; en el carril 2 corresponde al transcrito obtenido a partir del plasmidio recombinante pSP-11CN que contiene el segmento 11 reordenado. Los transcritos son indicados.

transcripción "in vitro" del plasmidio recombinante pSP-11CN. Como se puede observar, tanto para la cepa CC86 como CN86, el tamaño de los transcritos obtenidos por transcripción "in vitro" de los segmentos clonados es idéntico al tamaño de los transcritos del segmento 11 producidos por transcripción "in vitro" utilizando partículas virales purificadas. (figura 14 A y 14 B respectivamente).

9.- TRADUCCION "IN VITRO" DE LOS RNA MENSAJEROS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS PLASMIDIOS pSP-11CN Y pSP-11CC.

Los transcritos generados por la transcripción "in vitro" de los plasmidios pSP-11CN y pSP-11CC fueron utilizados en ensayos de traducción "in vitro", con el fin de analizar las características de los polipéptidos sintetizados. Los transcritos se incubaron con una suspensión de reticulocitos en presencia de 20 μ Ci de 35 S-metionina en las condiciones descritas en Métodos. Posteriormente, los productos de traducción "in vitro" fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. La autoradiografía del gel correspondiente es mostrada en la figura 15. En el carril 2 se observa el polipéptido obtenido por traducción "in vitro" utilizando mRNA derivado del plasmidio pSP-11SA, el cual contiene el segmento 11 de la cepa SA-11 de rotavirus de simio. El carril 3 corresponde al producto de la traducción "in vitro" del transcrito obtenido desde el plasmidio pSP-11CC, el cual contiene el segmento 11 de la cepa CC86 y en el carril 4 se observa el producto de la traducción "in vitro" del transcrito obtenido desde pSP-11CN, que contiene el segmento 11 de la cepa CN86.

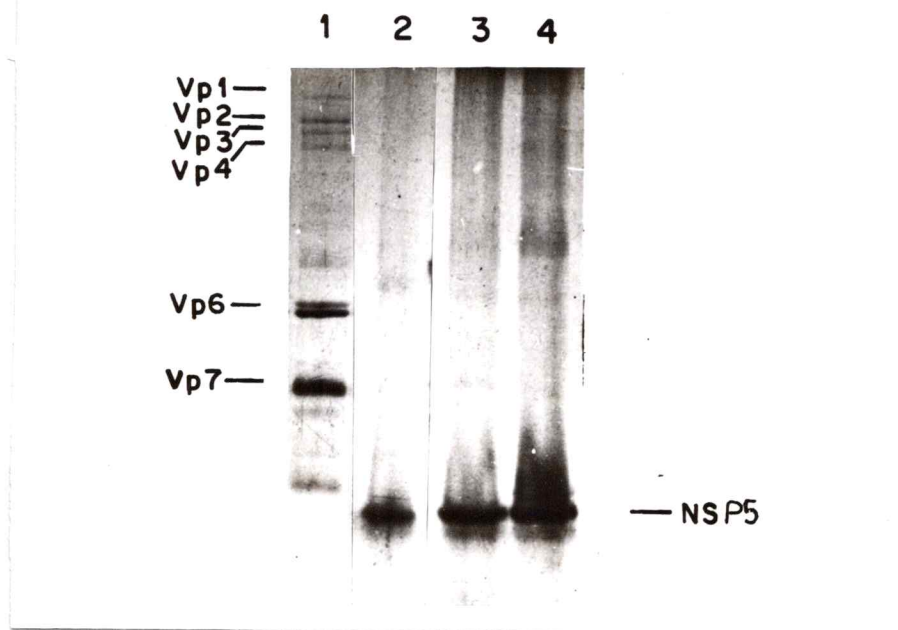


FIGURA 15. ANALISIS DEL PRODUCTO POLIPEPTIDICO OBTENIDO POR TRADUCCION "IN VITRO". Los transcritos obtenidos desde los plasmidios recombinantes pSP-11CN y pSP-11CC se incubaron con una mezcla de reticulositos en presencia de 10 μ Ci de 35 S- metionina durante 30 minutos a 45°C y las proteínas marcadas fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida -SDS. La figura muestra la autoradiografía de un gel de poliacrilamida-SDS, donde el carril 1 corresponde a los polipéptidos virales de la cepa SA-11; el carril 2 corresponde al polipéptido sintetizado a partir de los transcritos obtenido desde pSP-11SA; el carril 3 corresponde al polipéptido sintetizado a partir de los transcritos obtenidos desde pSP-11CN; el carril 4 corresponde al polipéptido sintetizado a partir de los transcritos obtenidos desde pSP-11CC, Los polipéptidos sintetizados son indicados.

El carril 1, corresponde a los polipéptidos virales marcados con ^{35}S -metionina obtenidos desde partículas virales purificados marcadas "in vivo". Se puede observar que el tamaño del polipéptido sintetizado a partir del mRNA obtenido por transcripción "in vitro" de los plasmidios pSP11-SA, pSP-11CN o pSP-11CC es igual en los dos casos, alcanzando un peso molecular aproximado de 26KD.

10.- SECUENCIAMIENTO DEL SEGMENTO 11 DE LA CEPAS CN86 Y CC86 DE ROTAVIRUS DE CERDO.

A partir de los plasmidios recombinantes pGemT-11CN y pGemT-11CC se determinó la secuencia nucleotídica del segmento 11 de la cepa CN86 y CC86, realizando el ensayo en las condiciones descritas en Métodos. El DNA de ambos plasmidios fue previamente denaturado con NaOH 2M/EDTA 0,2 M y se permitió que hibridara al DNA del partidor deseado. Posteriormente, el híbrido fue incubado con la mezcla de secuenciamiento que contenía ^{35}S -ATP y DNA polimerasa. Finalmente, los productos de secuenciamiento fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida-urea, el gel fue secado y autoradiografiado.

10.1.- ANALISIS DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL SEGMENTO 11

En la figura 16 se observa una comparación de las secuencias nucleotídicas del segmento 11 de la cepa CN86 y CC86 de rotavirus. El segmento 11 de la cepa CN86 está constituido por 664 pares de bases; en los extremos 5' y 3' de este segmento se ubica una región no codificante conservada, de 21 y 44 pares de bases

```

CN86- GGCTTTAAAGCGCTACAGTGATGCTCTCAGCATGACGTAACGAGTCT -50
      |||
CC86- GGCTTTAAAGCGCTACAGTGATGCTCTCAGCATGACGTAACGAGTCT -50
      |||
CN86- TCCCTCAATTTCTCTAGTATCTTAAAGATGATCATCTTACAACT -100
      |||
CC86- TCCCTCAATTTCTCTAGTATCTTAAAGATGATCATCTTACAACT -100
      |||
CN86- CAACTCTTTCTGGAAAATCTATTGGTAGGAGTGAACAGTACATTTACCA -150
      |||
CC86- CAACTCTTTCTGGAAAATCTATTGGTAGGAGTGAACAGTACATTTACCA -150
      |||
CN86- GATGCAGAGCATTCAATAAATACATGCTGCGAAGTCTCCAGAGGATAT -200
      |||
CC86- GATGCAGAGCATTCAATAAATACATGCTGCGAAGTCTCCAGAGGATAT -200
      |||
CN86- TGGACCATCTGATTCGCTTCAAACGATCCACTCACCAGCTTTTCGATTA -250
      |||
CC86- TGGACCATCTGATTCGCTTCAAACGATCCACTCACCAGCTTTTCGATTA -250
      |||
CN86- GATCGAATGCAGTTAAGACAAATGCAGATGCTGGCGTGTCTATGGATTCA -300
      |||
CC86- GATCGAATGCAGTTAAGACAAATGCAGATGCTGGCGTGTCTATGGATTCA -300
      |||
CN86- TCAACGCAATCACGACCTTCAAGCAAGCTTGGTAGGATCAAGTGGATTT -350
      |||
CC86- TCAACGCAATCACGACCTTCAAGCAAGCTTGGTAGGATCAAGTGGATTT -350
      |||
CN86- CTCCTTAACTAAAGGTGTTAAATGTAGTGTAACTTCTGATTCATGTATAT -400
      |||
CC86- CTCCTTAACTAAAGGTGTTAAATGTAGTGTAACTTCTGATTCATGTATAT -400
      |||
CN86- CAATCTCAACTGATTATAAAGAGGAGAAATCCAAAAGGATAAAAATAGG -450
      |||
CC86- CAATCTCAACTGATTATAAAGAGGAGAAATCCAAAAGGATAAAAATAGG -450
      |||
CN86- AAACACTACCCAAGAAATGAAGATGATTCTGATTCGGAAGATTACGTTTT -500
      |||
CC86- AAACACTACCCAAGAAATGAAGCAGATTCTGATTCGGAAGATTACGTTTT -500
      |||
CN86- AGATGATTGACAGAGTATGACGGCAAATGAAGAATGTAATATATAAGA -550
      |||
CC86- AGATGATTGACAGAGTATGACGGCAAATGAAGAATGTAATATATAAAA -550
      |||
CN86- AGAAGTATTTCCGCACTTAGAATGAGGATGAAGCAAGTCGCAACGCAATTG -600
      |||
CC86- AGAAGTATTTCCGCACTTAGAATGAGGATGAAGCAAGTCGCAATGCAATTG -600
      |||
CN86- ATCGAAGATTGTAACTCA613----- -621
      |||
CC86- ATCGAAGATTGTAACTCAITTTTCCTCTGGATTCATCAACGCAATCA -650
      |||
CN86- ----- -621
      |||
CC86- CGACCTTCAAGCAAGTGGGTGGGATCAAGTGGATTTCTCCTTAACATA -700
      |||
CN86- ----- -621
      |||
CN86- 709AGGTATTAATGTAGTGTAACTTAATTCATGTATCAATCTCAACTA -750
      |||
CC86- ----- -621
      |||
CN86- ATCATAAAAAGGAGAAATCCAAAAGAATAAAAAGTAGGAAACACTACCCA -800
      |||
CC86- ----- -621
      |||
CN86- AGAATTGAAGCAAATCTGATTCGGAAGATTACGTTTATGTGATTCAAA -850
      |||
CC86- ----- -621
      |||
CN86- CACTGATGACGATAAATGCAAGAAATGTAATATAAAAAGAGTATTTCG -900
      |||
CC86- ----- -621
      |||
CN86- CACTTAGAATGAGGATGAAGCAAGTCGCAATGCAATGATCGAAGATTG -950
      |||
CN86- -----ACCTGAGAGCACACTAGGGAGCTCCCACTCCCGTTATG -663
      |||
CC86- TAAATCAACTGAGAGCACACTAGGGAGCTCCCACTCCCGTTATG -1000
      |||
CN86- CC -665
      |
CC86- CC -1002

```

FIGURA 16. COMPARACION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL SEGMENTO 11 DE LA CEPA CN86 Y CC86. La secuencia nucleotídica del segmento 11 normal fue alineada con la secuencia nucleotídica del segmento 11 reordenado. La regiones 5' y 3' no codificantes y los 7 nucleótidos que unen la región 3' (620 nt) del segmento no duplicado con la región duplicada son indicados con una línea continua. Las regiones "hairpin loop" son indicados con línea punteada. Los probables marcos de lectura abiertos (ATG) están indicados con letra oscura. La región duplicada esta indicada con el símbolo (-).

respectivamente, los cinco primeros nucleótidos del extremo 5' (ggcttt) y los últimos cinco nucleótidos del extremo 3' (atgcc) son conservados en todos los segmentos de RNA de rotavirus, y parecen tener gran importancia en la síntesis de la hebra negativa. El segmento 11 de la cepa CC86 está constituido por 1002 pares de bases y también posee en el extremo 5' y 3' regiones conservadas que son idénticas a las del segmento 11 normal. Sin embargo, luego del nucleótido 620 de este segmento hay una secuencia extra de 330 pares de bases que se extiende desde el nucleótido 629 al 958 del segmento reordenado, esta región es homóloga a la secuencia nucleotídica que se encuentra entre el nucleótido 290 al 620 en el segmento 11 normal. Esta región duplicada carece de los primeros 289 nucleótidos y está separada de la región no duplicada por 8 nucleótidos (tttttcg). Esto demuestra claramente que el reordenamiento del segmento 11 se debe a una duplicación parcial de este segmento, manteniéndose en el extremo 3' del segmento la región conservada de 44 pares de bases encontradas en todos los segmentos 11 de rotavirus analizados. Así, el segmento normal comparte 620 nucleótidos con la región 5' del segmento duplicado, existiendo 97.7% de similitud con 14 cambios de nucleótidos en las posiciones 226 (G/A), 259 (G/T), 344 (A/G), 368 (G/A), 378 (G/A), 416 (T/C), 445 (A/G), 473 (T/C), 525 (C/T), 531 (T/C), 549 (G/A) 593 (C/T), 612 (G/A), 616 (T/C).

En la región comprendida entre el nucleótido 22 y 613 en ambos segmentos 11 se encuentran tres marcos de lectura y los polipéptidos que estos codifican han sido detectados en células infectadas o mediante ensayos de traducción "in vitro". Desde el nucleótido 22 (ORF1) al 613 se estaría sintetizando el polipéptido NSP5 de 197

aminoácidos y desde el nucleótido 175 (ORF3) al 613 se sintetiza uno de 146 aminoácidos. También existen otros tres marcos de lectura en las posiciones 152, ORF4; (68aa), 292 ORF5; (107aa) y 370 ORF6, que pueden ser utilizados. Estos últimos polipéptidos no han sido localizados en células infectadas y tampoco en ensayos de traducción "in vitro".

Al analizar de la estructura secundaria del segmento 11 normal se observan dos estructuras "hairpin loop", una de las cuales se ubica entre los nucleótidos 639 y 653, con un repetido invertido de 5 pares de bases. Esta estructura podría ser importante en el mecanismo de reordenamiento de este segmento, ya que la RNA polimerasa podría reconocer esta estructura y detener la síntesis del RNA mensajero, para luego reiniciar en otro lugar. También se observa una estructura "hairpin loop" entre los nucleótidos 355 y 370, con un repetido invertido de 5 pares de bases, que podría ser reconocido por la RNA polimerasa para reiniciar la síntesis del RNA mensajero en la posición 290.

Cuando se compara la secuencia nucleotídica de la región no duplicada en las cepas rotavirus de cerdo CC86, C60, bovino VRM1 y las cepas de rotavirus de cerdo CN86 y bovino UK, como se muestra en la Figura 17, se observa que en las tres cepas rotavirus CC86, C60 y VRM1 el inicio de la duplicación en el extremo 3' ocurre entre el nucleótido 620 y 623. Todas las cepas de rotavirus tienen conservadas la región no codificante del extremo 5' y el extremo 3' del segmento 11. La similitud de la secuencia nucleotídica del segmento 11 entre los nucleótidos 1 al 620 en la cepa de cerdo CN86 y las cepas CC86 y C60 es de 97%. Cuando se compara la secuencia nucleotídica de las

CN86	GGCTTTAAAGCGCTACAGTGATGTCTCTCAGCATCGACGTAACGAGTCT	50
CC86	50
C60	50
UKA.....A.....T.....G.....	50
VMR1T.....TT.....C.T.A.....T.....G.....	50
CN86	TCCTCAATTTCTTCTAGTATCTTTAAGAATGAATCATCTTCTACAAGT	100
CC86	100
C60G.....	100
UKT.....T.....T.A.....A.....A.....G.....	100
VMR1T.....TT.....C.T.A.....G.....A.....G.....	100
CN86	CAACTCTTCTGGAAAATCTATTGGTAGGAGTGAACAGTACATTCACCA	150
CC86	150
C60	150
UKA.....TG.....	150
VMR1T.....A.....TG.....	150
CN86	GATGCAGAAGCATTCATAAATACATGCTGTCGAAGTCTCCAGAGGATAT	200
CC86	200
C60	200
UKG.C.....G.....A.....A.....	200
VMR1G.....G.....T.....A.....A.....	200
CN86	TGGACCATCTGATCTCGCTTCAAAGGATCCACTCACCAGCTTTTCGATTA	250
CC86A.....	250
C60	250
UK	250
VMR1	250
CN86	GATCGAATGCAGTTAAGACAAATGCAGATGCTGGCGTGTCTATGGATTCA	300
CC86T.....	300
C60	300
UKC.....	300
VMR1	300
CN86	TCAACGCAATCAGCACTTCAAGCAAGCTGGGTACGATCAAGTGGATTT	350
CC86G.....	350
C60T.....G.....	350
UKG.A.....A.....T.....G.....	350
VMR1T.A.....A.....T.....G.....	350
CN86	CTCCTTAACATAAGGTGTTAATGTTAGTGTAACTTGATTGATGTATAT	400
CC86A.....A.....	400
C60A.....A.....A.....	400
UKT.A.....AA.....A.....G.A.....G.....C.....A.....	400
VMR1T.A.....AA.....C.....A.....A.....C.....G.....C.....	400
CN86	CAATCTCAACTGATTATAAGAAGGAGAAAATCCAAAAGGA---TAAAAAT	447
CC86C.....G.....G.....	447
C60C.....CA.GA.....G.....	447
UKG.G.....AA.....CA.GA.....T.....CCA.....G.....	450
VMR1G.G.....AA.....CA.GA.....GGT.....TCG.....G.....	450
CN86	AGGAAACACTACCCAAAGATGAAGTAGATTCTGATCCGAAGATTACGT	497
CC86C.....	497
C60C.....	497
UKT.....C.....A.....C.....A.....T.....	500
VMR1T.A.....C.....A.....G.....T.....G.....	500
CN86	TTTAGATGATTGAGACAGTGAACGGCAAAATCTAAGAAATGTAATATA	547
CC86T.....C.....	547
C60T.....C.....	547
UKC.T.....C.....T.....A.....C.....	550
VMR1C.....C.....T.....C.....G.....	550
CN86	AGAAGAAGTATTTCGCACCTTGAAGTAGGATGAAGCAAGTCGCAACGCAA	597
CC86A.....T.....	597
C60A.....T.....	597
UKA.G.....G.....A.....T.....C.T.....	600
VMR1A.G.....A.....A.....A.....A.....T.T.....	600
CN86	TTGATCGAAGATTTCGAA--TGTCA	620
CC86A.....C.....	620
C60G.....C.....	620
UKGG.C.G--	623
VMR1A.....GG.C.G--	623
CN86	ACCTGAGAGCAGCACT	3'nt 664
CC86G.....	3'nt 1002
C60G.....	3'nt 1211
UKG.....	3'nt 667
VMR1G.....	3'nt 967

FIGURA 17. COMPARACION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE LA REGION NO DUPLICADA DE CEPAS DE ROTAVIRUS. La región no codificante del extremo 5' y 3' y la región codificante del segmento 11 fueron comparados en las cepas de rotavirus de cerdo CN86, C60 y CC86 y las cepas de rotavirus de bovino UK y VMR1.

cepas de bovino UK y VRM1 se observa una similitud de un 94 %. También se observa que el efecto de la duplicación produjo segmentos de distinto tamaño en las cepas CC86, C60 y VRM1, con 1002 pb, 1211 pb y 967 pb respectivamente.

En la figura 18 se compara la secuencia nucleotídica de la región duplicada de la cepa CC86, con la región nucleotídica de la cepa CN86 y la región no duplicada de la cepa CC86. Los resultados de este alineamiento muestran que la región duplicada tiene 330 pb y comparte la región comprendida entre los nucleótidos 290 y 620 de la secuencia nucleotídica del segmento 11 de ambas cepas de rotavirus de cerdo. La región duplicada carece de los primeros 289 nucleótidos del extremo 5' del segmento 11. La similitud de esta región duplicada con la misma región comprendida entre el nucleótido 290 y 620 del segmento de la cepa CN86 es de 95%, con 18 cambios de nucleótidos y la similitud con la región no duplicada de la cepa CC86 es de un 97 %, con 14 cambios de nucleótidos.

La región duplicada presente en las cepas CC86, C60 y VRM1 tienen distinto tamaño, como se muestra en la figura 19. Es así como la región duplicada del segmento 11 de la cepa C60 de rotavirus de cerdo tiene 544 pb de largo, solamente carece de los primeros 77 nucleótidos del extremo 5' del segmento 11. La región duplicada de la cepa VRM1 de rotavirus de bovino tiene 292 pb y carece de los primeros 325 nucleótidos del extremo 5' del segmento. En cambio, la región duplicada de la cepa CC86 tiene 330 pb de largo y carece de los primeros 289 nucleótidos. La duplicación del segmento 11 de la cepa VRM1 es similar a la de la cepa CC86.

CN86	GGCTTTAAAGCGCTACAGTGATGTCTCTCAGCATTGACGTAACGAGTCT	50
CC86	50
DUPLICADO	-----	
CN86	TCCCTCAATTTCTTCTAGTATCTTTAAGAATGAATCATCTTCTACAAGT	100
CC86	100
DUPLICADO	-----	
CN86	CAACTTTTCTGGAAAATCTATTGGTAGGAGTGAACAGTACATTTCACCA	150
CC86	150
DUPLICADO	-----	
CN86	GATGCAGAAGCATTCAATAAATACATGCTGTCGAAGTCCAGAGGATAT	200
CC86	200
DUPLICADO	-----	
CN86	TGGACCATCTGATTCGCTTCAAACGATCCACTCACCAGCTTTTCGATTA	250
CC86A.....	250
DUPLICADO	-----	
CN86	GATCGAATGCAGTTAAGACAAATGCAGATGCTGGCGTGTCTATGGATTCA	300
CC86T.....	300
DUPLICADO	-----C.....	10
CN86	TCAACGCAATCAGCACCTTCAAGCAACGTTGGTACGATCAAGTGGATTT	350
CC86G.....	350
DUPLICADOG.....	60
CN86	CTCCTTAACTAAAGGTGTTAATGTTAGTGCTAATCTTGATTCATGTATAT	400
CC86A.....A.....	400
DUPLICADOA.....A.....	110
CN86	CAATCTCAACTGATTATAAGAAGGAGAAATCCAAAAGGATAAAAATAGG	450
CC86C.....G.....	450
DUPLICADOA.C.....A.....A.....G.....	160
CN86	AAACTACCCAAGAATTGAAGTAGATCTGATTCGGAAGATTACGTTTT	500
CC86C.....	500
DUPLICADOC.A.....	210
CN86	AGATGATCAGACAGTGATGACGGCAATGTAAGAATTGTAATATAGA	550
CC86T.....C.....A.....	550
DUPLICADOA.....AT.....C.....A.....	260
CN86	AGAAGTATTCGCACCTTAGAATGAGGATGAAGCAAGTCGCAACGCAATTG	600
CC86T.....	600
DUPLICADOT.....	310
CN86	ATCGAAGATTGTAATGCA	620
CC86A...C....	620
DUPLICADO	330

FIGURA 18. COMPARACION DE LA REGION DUPLICADA DE LA CEPA CC86 CON LA REGION NO DUPLICADA. La región duplicada de la cepa CC86 fue alineada con la misma región de la cepa CN86 y CC86 de rotavirus de cerdo.

C60	GAATGAATCGTCTTCAATAACGTACAGCTTTTCTGGAAAAATCTATGG	48
C60	TAGGAATGAACAGTACATTCACCAGATGCAAAGCACTCAATAAATACA	98
C60	TACTCTCGAAGTCTCCAGAGGATATGGACCATCTGATTCTACTTTAAAT	148
C60	GATCCATTCCACAGCTTTTCGATTAGATCGAATGCAATTAAGACAAATGC	198
C60	AGATGCTGACGTATTAATGGATTCAATTAACGTAATCACGACCTCAAGCA	248
CC86	C.....C....C.....	34
C60	ACGTGGGTGCGAGCAAGTGGATTCTTCTTAACATAAAGGTATTAATGTT	298
CC86T.....C.....	84
VMR1T.T.....C...T.A.....A...C...A..A	48
C60	AGTGCTAATCTTGATTCATGTATATCAATCTCTACTGATCATAAAAAGGA	348
CC86A.....A.....	134
VMR1	.AT.T....TG.G....CA.....G.G..A..AA..ACA.G.....	98
C60	GAATCCAAAAAGAC---AAAAGTAGGAAACACTATCCAAGAATTGAAG	395
CC86GA.T....C.....	181
VMR1T...GT..TCAT.....CG...CTT.....	148
C60	CAGACTCTGATCCGAAGATTACGTCTAGATGATCAGACAGTGATGAC	445
CC86	..A.....T.....A.....	231
VMR1	...A...T...G..TA.G....A..T..CA.....T	198
C60	GGTAAATGCAAGAAATGTAATATAAAAAGAAGTATTTCGTACTTAGAAT	495
CC86	.A.....C.....	281
VMR1T..A..T...G..G....G.....A.....	248
C60	GAGGATGAAGCAAGTCCCAATGCAATGATCGTAGATTGTAAATGTC-A	544
CC86A.....	330
VMR1	...A...G.A.....T..T.....A.....C..G.....	292

FIGURA 19. COMPARACION DE LA REGION DUPLICADA EN CEPAS REORDENANTES DE ROTAVIRUS. Alineamiento las regiones duplicadas de las cepas de rotavirus de cerdo C60, CC86 y bovino VRM1.

Los resultados demuestran que el segmento 11 de la cepa CC86 presenta una duplicación parcial del tipo cabeza-cola; cabeza-cola, que se esquematiza en la Figura 20.

10.2.- ANALISIS DE LA SECUENCIA AMINOACIDICA DE NSP5 Y DEL POLIPEPTIDO DE 92 AMINOACIDOS.

Se comparó la secuencia de aminoácidos del polipéptido no estructural NSP5, codificado a partir del primer ORF (22 nt) del segmento 11, en las cepas SA-11 de rotavirus de simio y en las cepas C60, CN86 y CC86 de rotavirus de cerdo. Como se observa en la figura 21 en todas las cepas de rotavirus de cerdo se sintetiza un polipéptido de 197 aminoácidos, con un alto contenido de los aminoácidos treonina y serina, como se ha descrito anteriormente. En cambio, en la cepa SA-11 el polipéptido tiene 196 aminoácidos. Las tres cepas de cerdo carecen del aminoácido ubicado en la posición 145. La secuencia aminoacídica de este polipéptido en las cepas de rotavirus de cerdo tienen una similitud de un 97%, y un 90% de similitud cuando éstas se comparan con la secuencia descrita para SA-11. El polipéptido NSP5 de CN86 con respecto a CC86 presenta 8 aminoácidos distintos en las posiciones 105 (Y/C), 106 (V/I), 119 (S/N), 132 (Y/H), 142 (N/S), 152 (V/A), 157 (E/D), 191 (T/M) respectivamente. También se comparó la secuencia aminoacídica de un polipéptido de 92 aminoácidos que se estaría sintetizando a partir del un segundo ORF cuyo inicio está ubicado en el nucleótido 80, en las mismas cepas de rotavirus. Este polipéptido ha sido descrito en cepas de SA-11, pero en las cepas CN86 y CC86 no fue posible

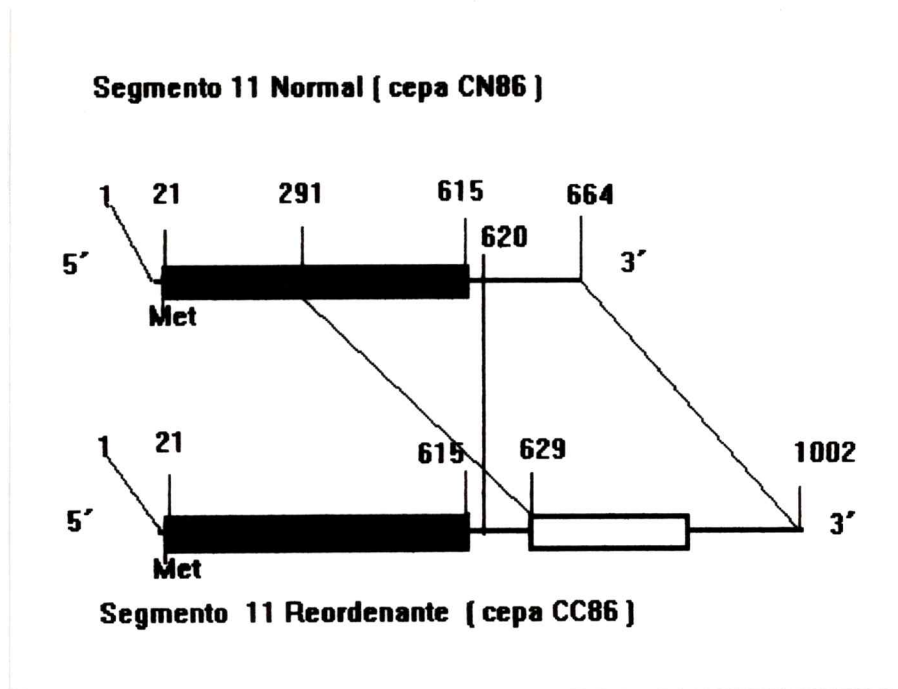


FIGURA 20. ESTRUCTURA DEL SEGMENTO 11 DE LAS CEPAS CN86 Y CC86. Diagrama de la estructura del segmento 11 normal y reordenado de las cepas CN86 y CC86 respectivamente. El rectángulo oscuro corresponde al marco de lectura ORF y el rectángulo claro corresponde a una parte del ORF del segmento normal. Las líneas sólidas corresponden a las regiones 5' y 3' nocodificante.

```

*                                     **
SA-11 MSLSIDVTSILPSIPSTIYKNESSTTSTLSGKSIGRSEQYISPDAEAFNKYMLSKSPEDI 60
C60 -----S-S-F-----
CN86 -----S-S-F-----
CC86 -----S-S-F-----

***
SA-11 GPSDSASNDPLTSFIRSNAVKTNADAGVSMDSQAQSRPSSNVGCDQVDFSLNKGLKVKKA 120
C60 -----T-----T--IN-S-
CN86 -----T-----Y-----T--VN-S-
CC86 -----T-----T-----T--IN-N-

SA-11 NLDSSISISTDTKKEKSKQNHKSRKHYPRIEASDSDDDYVLDSDSDDGKCKKCKYKKKY 180
C60 ---C---H---KDKSRK.---D---E-----
CN86 ---C---Y---KDKMRK.---VD---E-----
CC86 ---C---H---KDKSRK.---AD-----

SA-11 FALRMRMKQVAMQLIEDL 198
C60 -----
CN86 -----T-----
CC86 -----

```

FIGURA 21. COMPARACION DE LA SECUENCIA AMINOACIDICA DEL POLIPEPTIDO NSP5 DE ROTAVIRUS. Comparación de la secuencia aminoacídica obtenida a partir de la secuencia nucleotídica del segmento 11 de la cepa CN86, CC86, C60 de rotavirus de cerdo y SA-11 de rotavirus de simio.

identificarlo. Ahora si comparamos la secuencia de aminoácidos de estas cepas, se observa que existe una gran similitud de alrededor de 97%, en todas las cepas de rotavirus analizadas como se muestra en la figura 22. Este polipéptido presenta un solo cambio de aminoácido en la posición 86 (T/A).

	*	*	
C60	MNRLLRQLFLENLLVGVNSTFHQMOKHSINTCCRSLQRILDHLILLQTI		50
CN86	..H.....		50
CC86	..H.....		50
C60	HSPAFRLDRMMQLRQMQLACLWIHQRNHDLQVTLGAIKWISP		93
CN86-.....A...T.....		92
CC86I-.....A...A.....		92

FIGURA 22. COMPARACION DE LA SECUENCIA AMINOACIDICA DEL POLIPEPTIDO DE 92 AMINOACIDOS. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del polipéptido de 92 aminoácidos en las cepas CN86, C60 y CC86 de rotavirus de cerdo.

11.- OBTENCION DE REORDENANTES DE SA-11 CON EL SEGMENTO 11 REORDENADO MEDIANTE INFECCIONES MIXTAS

11.1.- INFECCION MIXTA ENTRE LAS CEPAS CC86 Y SA-11 DE ROTAVIRUS.

Una de las estrategias para comprobar que el segmento 11 reordenante es el que le confiere a la cepa CC86 la capacidad de formar placas de lisis de mayor tamaño y de desplazar a la cepa CN86, en coinfecciones realizadas en células MA-104, consistió en traspasar este segmento a una cepa heteróloga de rotavirus, proceso denominado permutación. Para ello se coinfectaron células MA-104 con las cepas CC86 y SA-11, utilizando 10^7 partículas virales de cada una de las cepas de rotavirus. Luego de la infección mixta, cuando se observó el desprendimiento de toda la monocapa celular, se purificó el RNA genómico viral y se analizó en geles de poliacrilamida. En la figura 23, se observa el patrón electroforético de RNA genómico de ambas cepas. El carril 1 corresponde al patrón electroforético del RNA genómico de la cepa CC86; en el carril 2 se observan los segmentos de RNA genómico sintetizados en la infección mixta realizada con las cepas de rotavirus CC86 y SA-11, utilizando (10^7) partículas virales; en el carril 3 se observa el patrón electroforético del RNA genómico de la cepa SA-11. Como se puede observar, al realizar las infecciones mixtas en las condiciones señaladas anteriormente se obtiene la síntesis de 22 segmentos de RNA que corresponden a la sumatoria del aporte genético de las cepas CC86 y SA-11.

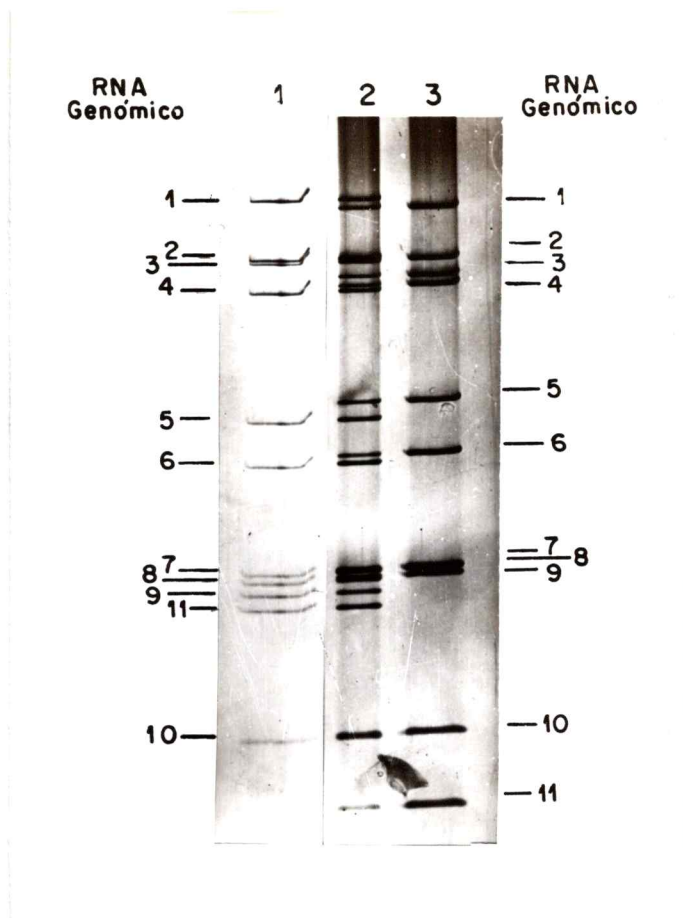


FIGURA 23. ANALISIS DEL RNA GENOMICO DE LAS COINFECCIONES ENTRE LAS CEPAS CC86 Y SA-11. Se infectaron monocapas de MA-104 con CC86 y SA-11 simultáneamente. Una vez lisadas las células se extrajo el RNA genómico y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida. En la figura se muestra el patrón electroforético de rotavirus, donde el carril 1 corresponde al RNA genómico de CC86 de rotavirus de cerdo; el carril 2 corresponde al RNA genómico obtenido de la coinfección entre CC86 y SA-11 utilizando 10^7 partículas virales; y el carril 3 corresponde al RNA de la cepa SA-11 de rotavirus de simio. Los segmentos de RNA genómicos están indicados en la figura.

11.2.- PURIFICACION DE CLONES VIRALES CON ELECTROFEROTIPOS DISTINTOS A CC86 Y SA-11.

La estrategia para la purificación de los clones de rotavirus que contengan permutaciones en algunos de sus segmentos de RNA genómico, se muestra en el esquema de la figura 24. En una primera etapa se infectaron células MA-104 utilizando como inóculos el producto de las coinfecciones realizadas con las cepas CC86 y SA-11. Luego de la adsorción de las partículas virales se agregó medio de mantención, suplementado con agar y tripsina. Después de 3-4 días de incubación, las placas de lisis fueron purificadas y los clones se propagaron nuevamente 2-3 veces en células MA-104. Posteriormente se purificó el RNA genómico de estos clones y se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Una vez identificados los clones con permutaciones, éstos fueron propagados nuevamente hasta obtenerlos totalmente puros. En este estudio se purificaron alrededor de 650 clones, de los cuales un 10% corresponden a clones con permutaciones. En la figura 25 se muestran algunos de los clones obtenidos. Al analizar el patrón electroforético del RNA genómico de los nuevos clones se puede observar que entre ambas cepas heterólogas de rotavirus existe una gran variabilidad en los segmentos permutados. Es importante destacar que en la mayoría de los clones obtenidos se observa la presencia del segmento 11 duplicado. En la tabla 1 se muestra el origen de cada segmento de RNA genómico, en donde C corresponde a los segmentos de RNA genómico de la cepa CC86 y S corresponde a los segmentos de RNA genómico de la cepa SA-11. Esto demuestra en forma más evidente la capacidad de

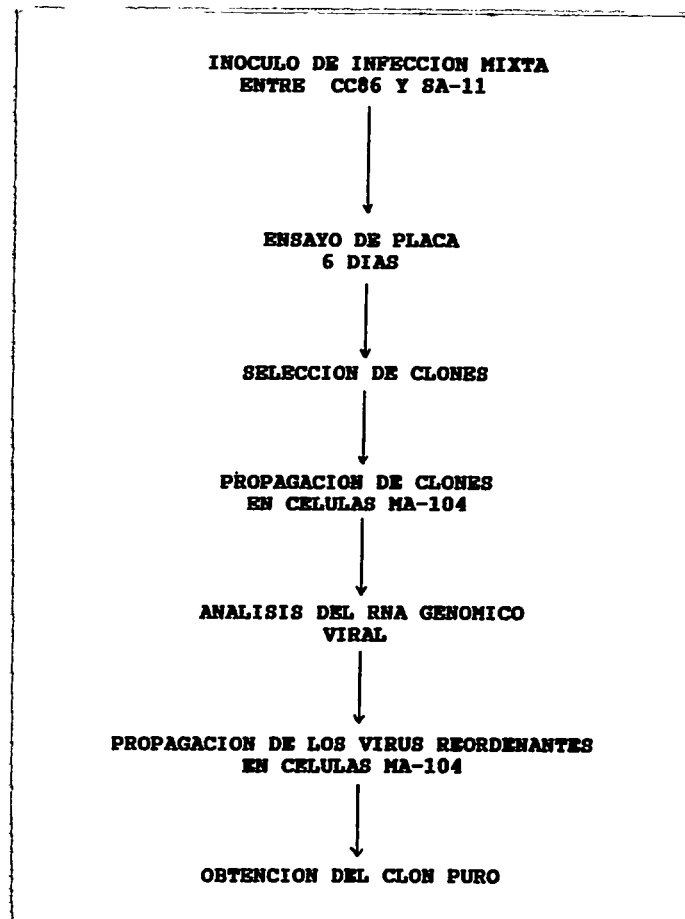


FIGURA 24. ESQUEMA DE PURIFICACION DE CLONES DE ROTAVIRUS.

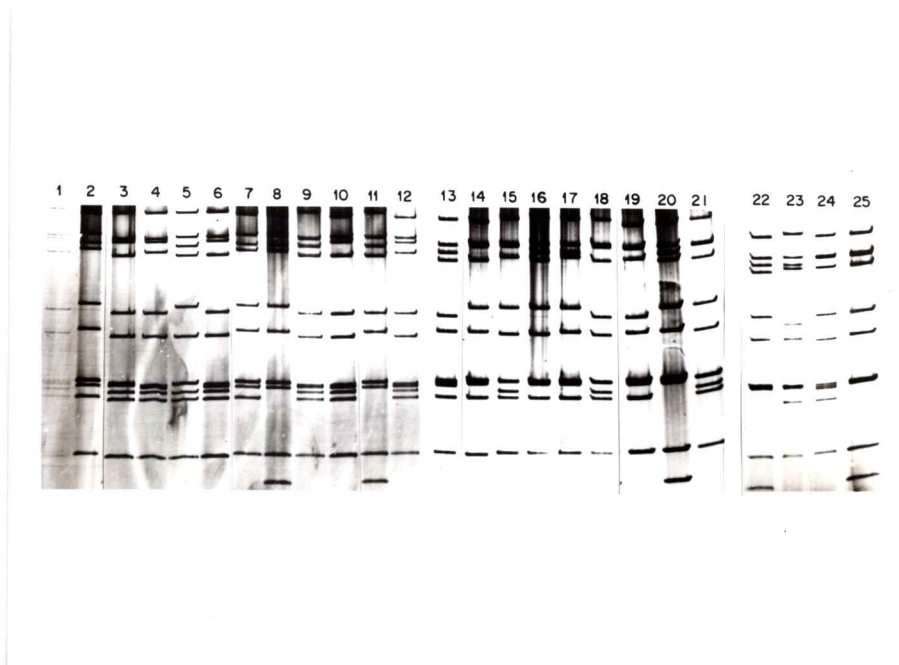


FIGURA 25. ELECTROFEROTIPOS DE NUEVAS CEPAS DE ROTAVIRUS OBTENIDAS POR INFECCIONES MIXTAS. El RNA genómico de los clones de rotavirus reordenantes obtenidos desde placas de lisis, fue sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida. En la figura se muestra el patrón electroforético de rotavirus, donde los carriles 1 y 7 corresponde al patrón electroforético del RNA genómico de CC86 y SA-11 respectivamente. Los carriles 2-6 y 8-23 corresponde al patrón electroforético del RNA genómico de 21 cepas nuevas de rotavirus.

Clones	SEGMENTOS DE RNA										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C
3	C	C	C	C	C	C	S	C	C	C	C
4	C	C	C	S	C	C	C	C	C	C	C
5	C	S	S	C	S	C	S	S	C	C	C
6	C	S	C	C	C	C	C	C	C	C	C
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C
8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	C	S	S	C	C	C	C	C	C	S	C
10	S	S	C	C	C	C	C	C	C	S	C
11	C	S	S	C	C	C	C	C	C	C	C
12	S	S	C	S	C	C	C	C	C	S	C
13	C	S	S	C	C	S	C	C	S	S	C
14	S	S	C	C	S	S	C	C	S	C	C
15	C	S	C	S	S	C	S	S	C	S	C
16	C	S	S	C	S	C	S	C	S	S	C
17	C	S	S	S	C	S	S	C	S	S	C
18	C	S	C	C	S	S	S	S	C	S	C
19	S	S	C	S	S	C	S	C	S	S	C
20	S	S	S	C	C	C	S	C	S	S	S
21	C	S	C	C	C	S	S	S	C	S	C
22	S	S	S	C	C	C	C	C	S	S	S
23	C	S	S	S	S	C	S	C	S	S	C
24	S	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C
25	S	S	C	S	C	S	C	C	S	S	S

TABLA 1. IDENTIFICACION DE LOS SEGMENTOS DE RNA GENOMICO DE LAS NUEVAS CEPAS DE ROTAVIRUS. Los segmentos de RNA genómico de la cepa de rotavirus SA-11 están indicados con la letra S y los segmentos de RNA genómico de rotavirus de cerdo están indicados con la letra C.

permutar de los segmentos de rotavirus, incluso en cepas heterólogas de rotavirus, lo que indica que cada segmento codifica para el mismo polipéptido en ambas cepas. Finalmente, en la figura 26 se observa el patrón electroforético del reordenante de SA-11, obtenido por la permutación del segmento duplicado de la cepa CC86 por infección mixta. El carril 1 corresponde al patrón electroforético del RNA genómico de la cepa donadora CC86; el carril 2 corresponde al patrón electroforético del RNA genómico de la cepa reordenante de SA-11; el carril 3 corresponde al patrón electroforético del RNA genómico de la cepa receptora SA-11. Como se puede observar, la cepa reordenante tiene el mismo patrón electroforético del RNA genómico de la cepa SA-11, excepto que el segmento 11 de SA-11 ha sido reemplazado por el segmento 11 duplicado de la cepa CC86, (figura 26, carril 3).

12.- FORMACION DE PLACAS DE LISIS POR LA CEPA SA-11 CON EL REORDENADO.

Para caracterizar la nueva cepa SA-11 reordenante que contiene el segmento 11 duplicado, en primer lugar se determinó si esta nueva cepa viral forma placas de lisis de mayor tamaño que su homóloga, la cepa SA-11. Con este fin, se infectaron células MA-104 con las cepas SA-11 o SA-11 reordenante. Luego de una hora de adsorción se retiró el inóculo y la monocapa se cubrió con medio de mantención, suplementado con agar y tripsina. Posteriormente, las placas de cultivo se incubaron

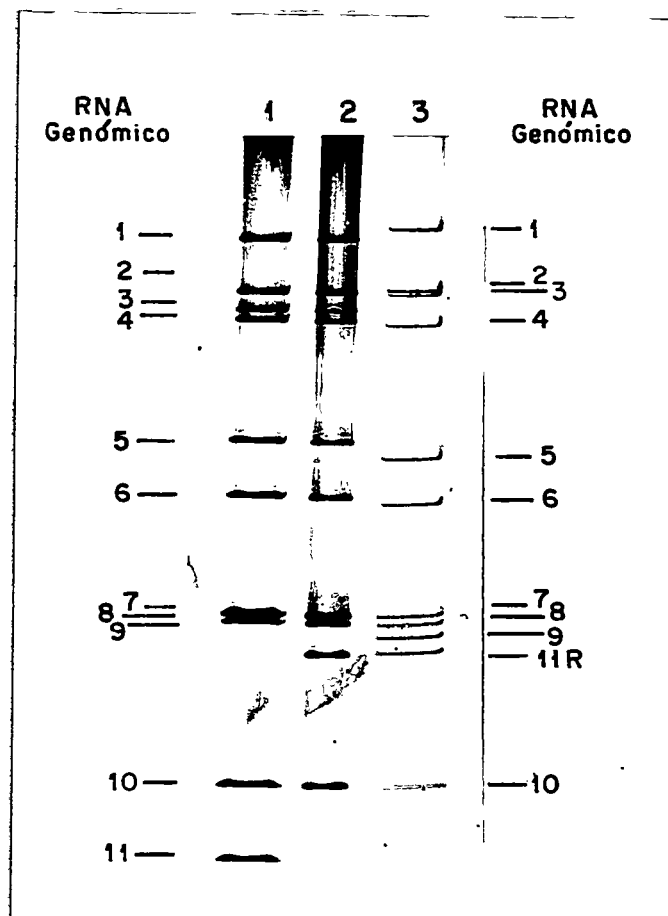


FIGURA 26. ELECTROFEROTIPO DEL REORDENANTE DE SA-11. El RNA genómico de la cepa CC86, de SA-11 y de la cepa reordenante fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida. En la figura se muestra el patrón electroforético del RNA, donde los carriles 1 y 3 corresponden al patrón del RNA genómico de la cepa CC86 y SA-11 respectivamente. En el carril 2 se muestra el patrón del RNA genómico de la cepa reordenante SA-11 obtenida.

durante 3-4 días a 37°C. Como se muestra en la figura 27A y 27B, la cepa reordenante de SA-11 que contiene el segmento 11 de la cepa CC86 presenta placas de lisis de mayor tamaño que la cepa SA-11.

13.- ENSAYO DE COMPETENCIA ENTRE LAS CEPAS SA-11 Y SA-11 REORDENANTE.

Para determinar si la cepa SA-11 reordenante adquirió el fenotipo presente en la cepa CC86, denominado "canibalismo" se realizaron dos ensayos de coinfección. En el primero se infectaron células MA-104 con 0,1 PFU/célula de cada una de las cepas de rotavirus y en el segundo ensayo se infectaron células MA-104 con 0,01 PFU/célula de la cepa reordenante y 0,1 PFU/célula de la cepa SA-11. Después de la adsorción se eliminó el inóculo y se agregó medio de mantención suplementado con tripsina, incubando a 37°C hasta el desprendimiento total de la monocapa celular. Posteriormente se purificó el RNA viral desde el medio de incubación que contiene las células lisadas y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida. En la figura 28 A, los carriles 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a los cinco pasajes de infección del inóculo viral proveniente de la coinfección inicial con el mismo número de partículas virales. Se observa que la cepa SA-11 reordenante desplazó a la cepa SA-11 normal a partir del primer pasaje de infección. En la figura 28 B, los carriles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a los distintos pasajes del inóculo viral preparado con una m.o.i 100 veces mayor de la cepa SA-11 reordenante respecto a la cepa SA-11 normal. Se observa que como resultado de esta coinfección hay una predominancia de la cepa SA-11 reordenante en

A



B



FIGURA 27. COMPARACION DE PLACAS DE LISIS DE LA CEPAS SA-11 Y SA-11 REORDENANTE. Se infectaron monocapas de células MA-104 con distintas diluciones de las cepa CN86 y CC86. Una vez adsorbido el inóculo se agregó MME suplementado con 2 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina y 0.6% de agar Oxoid. Luego de 3-6 días, las placas de lisis fueron teñidos con cristal violeta. La parte A corresponde a las placas de lisis obtenidas de la cepa SA-11 y la parte B corresponde a las placas de lisis obtenidas de la cepa SA-11 reordenante.

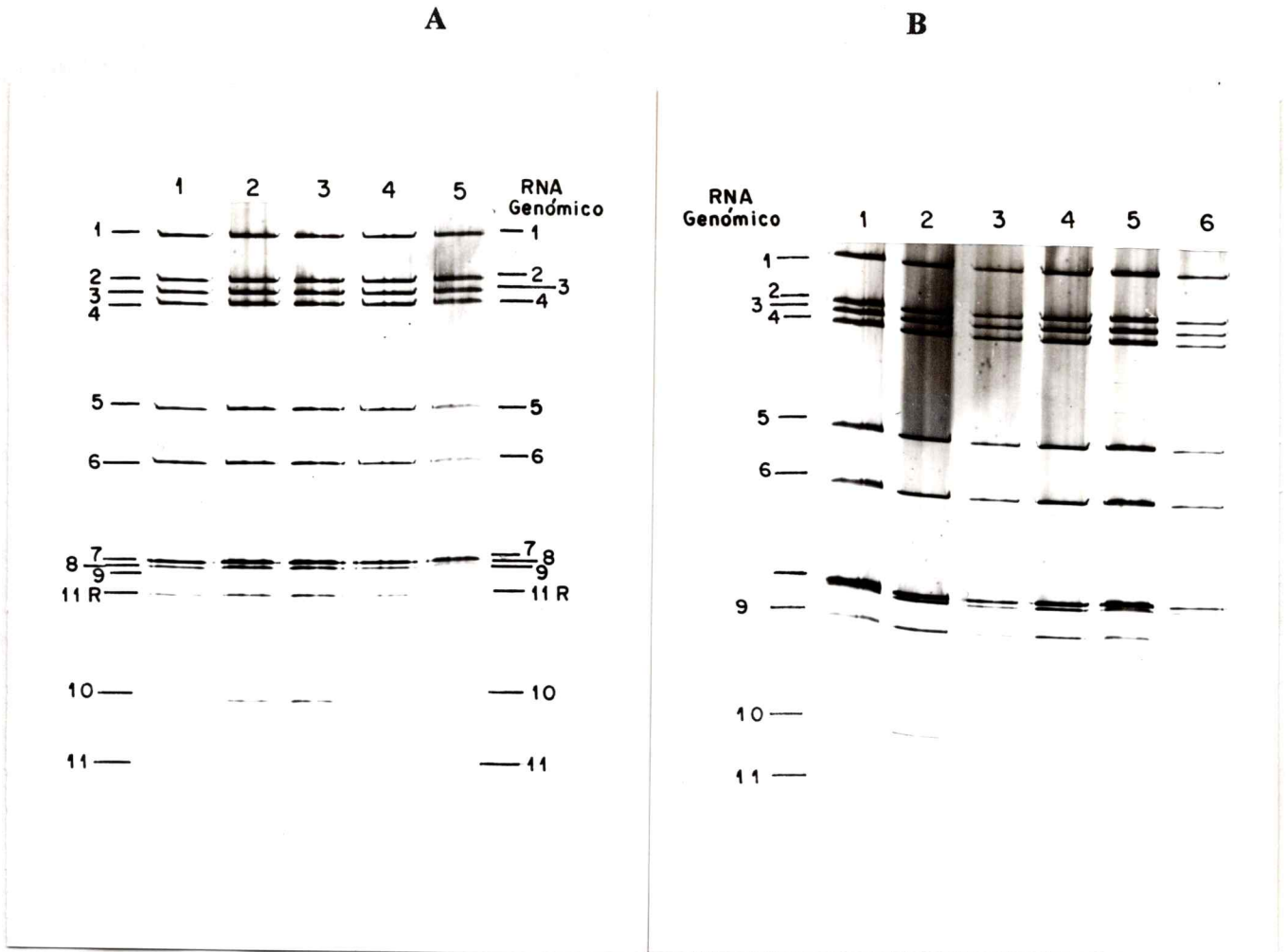


FIGURA 28. ENSAYO DE COMPETENCIA ENTRE LAS CEPAS SA-11 Y SA-11 REORDENANTE. Se coinfectaron monocapas de células MA.104, con las cepas SA-11 y SA-11 reordenante, el RNA genómico de la progenie viral fue purificado y sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida. La parte A de la figura corresponde al RNA genómico obtenido luego de 5 pasajes de infección de la coinfección en la que se utilizó 0,1 PFU/cel de ambas cepas de rotavirus. (Línea 1-5). La parte B corresponde al RNA genómico obtenido luego de 6 pasajes de infección de la coinfección en la que se utilizó 0,1 y 0,01 PFU/célula de la cepa SA-11 y SA-11 reordenante respectivamente.

estos pasajes, con una mínima presencia del segmento 11 de la cepa SA-11 normal en los primeros pasajes.

DISCUSION

Las características del patrón electroforético de los 11 segmentos de RNA doble hebra de rotavirus han sido utilizadas como herramienta para la identificación y caracterización de diferentes cepas de este virus. Es así como el análisis de los distintos electroferotipos ha permitido agrupar los 11 segmentos del RNA genómico en cuatro diferentes clases, conteniendo 4, 2, 3 y 2 segmentos respectivamente (Kapikian y col 1990). Este tipo de patrón electroforético del RNA de rotavirus se ha observado en diferentes cepas virales, aisladas de distintas especies de mamíferos y todas ellas pertenecen al grupo A de rotavirus (Bellinzoni y col 1987). Sin embargo, en estos últimos años se ha informado la aparición de cepas de rotavirus del grupo A que presentan un patrón de migración electroforética atípico (Bellinzoni y col 1987). El análisis estructural del RNA genómico de algunas de estas cepas indica que en determinados segmentos existen reordenamientos genéticos, varios de los cuales presentan una duplicación de una porción del segmento 11. Estas duplicaciones se han encontrado en cepas virales aisladas desde distintas especies animales y afectan a diferentes segmentos genómicos, aunque se asocian con mayor frecuencia al segmento 11 (Pedley y col 1984, Eiden y col 1985, Hundley y col 1987, Besselaar y col. 1986, Thouless y col 1986, Pocock 1987, Bellinzoni y col 1987, Tanaka y col 1988). En algunas cepas de rotavirus aisladas desde humanos, que presentan también un patrón de migración electroforética atípico, se observó que las regiones adicionales en el extremo

3' no son significativamente homólogas entre ellas o con alguna otra parte del segmento 11 (Matsui y col 1990). Estas diferencias estructurales indican que no existe un mecanismo de reordenamiento único. En general se postula que estos reordenamientos en el genoma de rotavirus constituyen uno de los mecanismos de evolución genética, que explicaría en gran parte la variabilidad encontrada en los 11 segmentos de RNA genómico (Desselberger 1989).

Estudios anteriores informaron la aparición de una nueva cepa de rotavirus de cerdo cepa CC86, originada a partir de la cepa CN86 por un reordenamiento en el segmento genómico 11 (Mattion y col 1990). Esta cepa reordenante presenta nuevas propiedades biológicas, que incluyen la habilidad de formar placas de lisis de mayor tamaño en monocapas de células MA-104 que la cepa parental CN86 y además, la capacidad de sobrecrecer (efecto canibalismo) a la cepa parental cuando ambas coinfectan las células. Estos fenotipos presentados por la cepa CC86 se observan aún cuando la cepa reordenante y la parental presentan una curva de crecimiento similar en cultivo celular (Mattion y col 1990).

El objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto que tiene el reordenamiento del segmento 11 en la cepa CC86 en las distintas etapas de la morfogénesis viral, caracterizar genéticamente el reordenamiento y demostrar si el fenotipo asociado al reordenamiento del segmento 11 puede ser traspasado a una cepa heteróloga de rotavirus. Basados en las características fenotípicas: producción de placas de lisis de mayor tamaño y el canibalismo que ejerce la cepa CC86 sobre la cepa parental, se planteó la hipótesis de que estas características podrían estar asociadas al segmento 11

reordenado y que podrían ser incorporadas a otra cepa de rotavirus cuando el segmento 11 reordenado es traspasado a la cepa heteróloga.

Uno de los aspectos importantes en la asociación de los fenotipos observados en la cepa CC86 con el reordenamiento del segmento 11 fue determinar que efectivamente la transferencia de este segmento a una cepa de rotavirus heteróloga conducía a un cambio en el fenotipo de la cepa receptora. La cepa de rotavirus SA-11, que presenta un distinto patrón electroforético de los segmentos de RNA genómico que el de la cepa CC86, fue escogida como cepa receptora del segmento 11 reordenado, seleccionando posteriormente la cepa reordenante cuya dotación genética estuviese constituida por los segmentos 1 al 10 provenientes de SA-11 y el segmento 11 proveniente de la cepa CC86. Se obtuvo este reordenante, y otros con un mayor número de permutaciones de otros segmentos, mediante infecciones mixtas entre ambas cepas heterólogas de rotavirus. Prácticamente todos los segmentos de RNA de rotavirus ya sea de cerdo o de simio, son intercambiables y aproximadamente un 10 % de los clones obtenidos tenían segmentos de ambas cepas utilizadas en la coinfección, lo que indica que rotavirus al igual que otros virus de la familia Reoviridae tiene una alta capacidad de permutar los segmentos genómicos cuando se produce una infección mixta. Este fenómeno tiene una gran importancia, ya que una de las causas de la gran variabilidad asociada al patrón electroforético de rotavirus sería el resultado de permutaciones que ocurren cuando una célula es infectada al mismo tiempo por más de una cepa viral, lo cual permite obtener un alto número de cepas nuevas de rotavirus, las cuales podrían

tener mayores ventajas selectivas en medio ambiente que sus progenitoras (Gouvea y col., 1995).

Por otro lado, la capacidad que tienen los segmentos de rotavirus de permutar indica que la partícula viral tiene la capacidad de encapsidar una mayor cantidad de ácido nucleico, lo que en un futuro cercano puede ser utilizado como una estrategia para estudiar las funciones de algunos polipéptidos no estructurales que participan en la replicación del virus, obteniendo partículas virales infectivas con el segmento genómico que se quiere estudiar modificado. Una estrategia podría consistir, por ejemplo, en adicionar una región no codificante al extremo 3' de un segmento genómico que codifica para un polipéptido no estructural, siguiendo las mismas características de las duplicaciones descritas en rotavirus. Posteriormente, por transcripción "in vitro" del segmento viral modificado, se obtiene el RNA (+) correspondiente y mediante electroporación se introduce a células MA-104 infectadas con la cepa receptora de rotavirus. El rescate de la progenie viral que contiene el segmento mutado se podría realizar analizando en los distintos clones la migración electroforética de los genes de rotavirus, que en el caso del segmento modificado presentaría una migración distinta a la del segmento normal. Gran parte de esta estrategia fue realizada en esta tesis, con el propósito de obtener un reordenante de SA-11 cuyo segmento 11 proviniera de la cepa CC86 (datos no mostrados).

La caracterización de la cepa reordenante de SA-11, que contiene 10 segmentos pertenecientes a SA-11 y el segmento 11 reordenado de la cepa CC86, se determinó analizando la migración de los segmentos por electroforesis en geles de

acrilamida. Esta nueva cepa viral no contiene ningún otro segmento de la cepa CC86 de rotavirus de cerdo además del segmento 11. Esta característica fue confirmada por estudios realizados por Javier Díaz (Tesis en redacción) cuyos resultados demostraron que los polipéptidos VP7, VP4 y VP6 corresponden a SA-11. Lo más significativo es que este nuevo reordenante de SA-11 también presenta los fenotipos encontrados en la cepa CC86, es decir forma placas de lisis de mayor tamaño que la cepa de SA-11 normal y es capaz de desplazar a la cepa SA-11 normal desde el primer pasaje de infección, cuando se realizan infecciones mixtas.

Estos resultados tienen una gran importancia, ya que los fenotipos encontrados, en primer lugar en la cepa CC86 y posteriormente en la cepa SA-11 permutada con el segmento 11 de CC86, demuestran que el segmento 11 reordenado puede ser reconocido como un verdadero marcador genético. Los estudios orientados a determinar por que este marcador genético le introduce nuevas características a las cepas en las cuales se encuentra no permitieron, bajo las condiciones estudiadas, determinar diferencias en las distintas etapas de la morfogénesis viral entre la cepa CN86 y CC86. Es probable que el fenotipo de sobrecrecimiento observado en la cepa CC86 y ahora en la cepa SA-11 reordenante, al ser éstas coinfectadas en células MA-104 junto a sus respectivas cepas parentales, se produzcan por factores celulares que afecten el crecimiento selectivo de ciertas variantes virales (Graham y col 1987, Hundly y col 1985). Es así como una cepa reordenante de rotavirus bovino, que presenta un reordenamiento en el segmento genómico 5, crece solamente a alta multiplicidad de infección (Hundly y col., 1985). Esta cepa reordenante tiene características distintas a las observadas en CC86 y SA-11

reordenante ya que en infecciones realizadas utilizando baja multiplicidad de infección no logra sobrecrecer a la cepa de bovino parental.

Las características fenotípicas encontradas en la cepa CC86 y en la cepa reordenante SA-11 estarían indicando que estas cepas tienen la capacidad de realizar el ciclo infectivo con una mayor velocidad que sus parentales. Esto permite por un lado el desplazamiento o sobrecrecimiento de las cepas reordenantes sobre las cepas parentales y por otro, que el tamaño de placa de lisis sea mayor en las cepas reordenantes. Este fenómeno indica que la duplicación del segmento 11 le está confiriendo características de mayor virulencia "in vitro" a las cepas que presentan este segmento reordenado. Este tipo de virulencia está relacionada con una mayor eficiencia en el ciclo replicativo del virus, posiblemente en la síntesis de RNA (-), proceso en el cual el polipéptido NSP5 codificado por el segmento 11 (Patton y col., 1992) estaría participando ó bien, el mayor tamaño del segmento 11 reordenado aumenta la eficiencia con que éste es encapsidado en la partícula viral. Sin embargo, en el caso de rotavirus no se han descrito regiones que estén involucradas en la encapsidación del RNA genómico, pero es evidente que las proteínas no estructurales estarían cumpliendo un rol fundamental en el ordenamiento y/o encapsidación de los segmentos de rotavirus (Patton y col., 1992; Mattion y col., 1990).

Hasta ahora, la mayoría de los estudios realizados han indicado que en rotavirus el polipéptido Vp4 sería responsable del tamaño de placas de lisis. Incluso, el análisis de reordenantes obtenidos por coinfecciones de células con una cepa de rotavirus que produce placas de lisis pequeñas y otra que produce placas de lisis grande ha demostrado que el polipéptido Vp4 tendría un rol en la formación de las placas de lisis y en el tamaño

que éstas pueden alcanzar (Taniguchi y col 1994, Offit y col 1986, Gorziglia y col 1988, Chen y col 1989). El tamaño de placas de lisis está directamente relacionado con la capacidad infectiva del virus, que a su vez está determinada por las características del polipéptido VP4, como se demostró al traspasar junto con el segmento 4 (que codifica para el polipéptido VP4) las características de virulencia de una cepa de rotavirus a una cepa receptora no virulenta. Sin embargo, hoy en día se cuestiona que la capacidad de formar placas de lisis de mayor tamaño esté exclusivamente determinada por las características de VP4, ya que estudios recientes indican que en algunas cepas de rotavirus, también el segmento genómico 9 se relaciona con la formación de placas de lisis de mayor tamaño (Chen y col 1989). En este caso, no serían interacciones covalentes entre las proteínas de la cubierta externa codificadas por los segmentos 4 y 9, las responsables de que este proceso ocurra. En este contexto, las características fenotípicas presentadas por las cepas CC86 y SA-11 reordenante parecen indicar que, además del polipéptido VP4, el reordenamiento del segmento 11 tendría un rol determinante de la mayor virulencia "in vitro" en las cepas reordenantes de rotavirus.

Todo parece indicar que alguno de los polipéptidos sintetizados por el segmento 11 podría estar asociado a las características fenotípicas presentadas por las cepas reordenantes estudiadas. Sin embargo, al analizar la síntesis polipeptídica de la cepa CC86 sólo se detectó la síntesis del polipéptido NSP5, no observando ningún cambio entre los niveles de NSP5 sintetizados por las cepas reordenantes y sus parentales. Además, la caracterización genética demostró que no hay formación de un nuevo marco de lectura como el descrito para una cepa de rotavirus bovino, en la cual se sintetizó un

polipéptido de mayor tamaño (Hundly y col., 1985). El análisis de la secuencia aminiacídica del polipéptido NSP5 en ambas cepas de rotavirus demostró que existen algunos cambios de aminoácidos, que en su mayoría son conservativos, sin embargo es posible que algunos éstos puedan influir en la actividad del polipéptido sintetizado por la cepa reordenante, ya que es sabido que solo un cambio de aminoácido afecta la estructura y la funcionalidad de algunas proteínas. Estudios recientes demostraron que el polipéptido NSP5 de la cepa de rotavirus SA-11, presenta cuatro residuos de serina fosforilados, cuya ubicación aún no se ha determinado (datos no publicados). Entre ambas cepas de rotavirus de cerdo se observan diferencias en la ubicación de serinas, las que podrían afectar la funcionalidad de este polipéptido, si estos residuos estuvieran relacionados con las modificaciones posttraduccionales experimentadas por proteínas análogas sintetizadas por otras cepas de rotavirus. Basados en estos resultados, sería interesante estudiar la fosforilación de estos residuos en el polipéptido NSP5 de ambas cepas de rotavirus de cerdo, y determinar si existen cambios que guarden relación con los fenotipos asociados al segmento 11 reordenado. Por otro lado, recientemente se ha descrito que a partir del segmento 11 se estaría sintetizando más de un polipéptido, algo que no se ha descrito para otros segmentos genómicos de rotavirus. Analizando la secuencia nucleotídica del segmento 11 se encuentran al menos tres marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican para polipéptidos que han podido ser identificados (Estes y col., 1990; Kapikian y col., 1985; Patton, 1993). El primer ORF codifica para el polipéptido mayor NSP5, un segundo ORF (OP-ORF) codifica para un polipéptido de 12 kd y aproximadamente 92 aminoácidos que ha sido detectado por inmunoprecipitación en

extractos provenientes de células infectadas por rotavirus. También se ha descrito un tercer ORF (IP-ORF), el cual se inicia en el aminoácido 52 de NSP5 y produciría un polipéptido de 16 kd (Mattion y col., 1991; Both y col., 1983). En esta tesis no se pudo determinar la presencia de ninguno de estos dos últimos polipéptidos en células infectadas y tampoco mediante traducciones "in vitro" del segmento 11. Esto no descarta la posibilidad, que en el caso de sintetizarse, el nivel de síntesis de estos polipéptidos esté regulada de diferente forma en las cepas reordenadas respecto a las cepas parentales.

A pesar de que los resultados obtenidos no logran determinar el origen de los fenotipos presentados por las cepas reordenantes, estos podrían deberse a que se esté sintetizando en forma diferencial algún polipéptido involucrado en la replicación viral, a que las partículas virales sean más estables o liberadas más eficientemente desde la célula, ó bien a que el reordenamiento del segmento 11 le confiera a éste ventajas selectivas en la encapsidación (Mattion y col., 1990; Eaton y col., 1987).

Se ha postulado que los reordenamientos del genoma de rotavirus constituyen un mecanismo de evolución genética (Allen y Desselberger, 1985; Hundley y col., 1987), aparentemente el más común utilizado por rotavirus. Esta idea se basa en el análisis estructural del RNA genómico de tres cepas de rotavirus de cerdo, CC86 (Mattion y col., 1990), C117 y C60 (González y col., 1989), una cepa de conejo denominada Alabama, otra de bovino VMR1 y algunos virus humanos RV-5, B37, DS-1 y 69M ; todas estas cepas presentan patrones de movilidad electroforética del tipo "super corto". El análisis de la secuencia nucleotídica del segmento 11 de las cepas de cerdo C117 y C60 demostró que existe una duplicación parcial de este segmento. Similares resultados

se han observado en rotavirus de conejo (Gorziglia y col., 1989) y rotavirus de bovino VRM1 (Matsui y col., 1990). Sin embargo, el segmento 11 reordenado de distintas cepas de rotavirus humano contiene una región no codificable en el extremo 3', que no es idéntica en todas las cepas y más importante aún no guarda ninguna relación con la secuencia nucleotídica del segmento 11 (Nuttall y col., 1989). Las diferencias estructurales de los segmentos duplicados descritos indican que no existe un mecanismo único responsable de los reordenamientos, lo que estaría permitiendo que se obtengan características funcionales distintas dependiendo de la estructura y tamaño de la región duplicada.

En general, se ha descrito que los virus que contienen como genoma RNA segmentado están frecuentemente envueltos en reordenamientos en cultivo celular. (Allen y Desselberger, 1985). En algunos casos, como en variantes genéticas de orbivirus que presentan concatmeros en uno de los segmentos, se ha postulado que la duplicación de señales de encapsidación podría hacer más eficiente el enpaquetamiento del genoma reordenado en el virus (Eaton y Gould, 1987). Los resultados obtenidos anteriormente por (Mattion y col., 1990) con la cepa CC86 y los obtenidos en esta tesis con la cepa reordenante de SA-11 que tiene el segmento 11 de CC86, indican que los fenotipos asociados a la cepa CC86 están directamente relacionados con el aumento de tamaño del segmento 11.

A partir del análisis de la secuencia nucleotídica del segmento 11 de la cepa reordenante CC86 realizada en esta tesis, se demostró que la secuencia adicional está inserta en la porción 3' terminal, entre el codón de término de la región no duplicada y

las últimas 44 bases hacia el extremo 3', que son conservadas en el segmento 11 normal. La secuencia adicional en el extremo 3' de la región no codificante de la cepa CC86, claramente corresponde a una duplicación parcial de la región ubicada entre el nucleótido 291 y el nucleótido 620 de la región codificante de este segmento. Esta duplicación podría originarse mediante un proceso similar al que dio lugar a la cepa de rotavirus de bovino VRM1, cuya duplicación comienza entre los nucleótidos 328 a 618, ya que no hay deleciones ni presencia de marco de lectura abierto (Matsui y col., 1990). El evento de duplicación del segmento 11 de la cepa CC86 parece ser una versión más limitada que las observadas en otras cepas de rotavirus de cerdo con el segmento 11 reordenado (González y col., 1989, Gorziglia y col., 1989). Sin embargo, es probable que mecanismos muy relacionados estén envueltos en la formación del segmento 11 reordenado en cada uno de los virus descrito.

En relación al mecanismo que produce reordenamientos en el RNA, se ha sugerido que una vez que la RNA polimerasa RNA dependiente de rotavirus inicia la transcripción podría detenerse al encontrar un sitio de atenuación y luego reiniciar la síntesis en otro lugar del templado (Gorziglia y col 1989, Matsui y col 1990). En los casos en los cuales se han encontrado secuencias duplicadas que presentan deleciones o bien secuencias que no se asocian a ninguna región del genoma de rotavirus, se postula que eventos de recombinación genética intra o inter molecular podrían dar cuenta de estos hallazgos. En todos los casos en que se ha secuenciado el segmento de RNA reordenado, la reiniciación ocurre cerca del codón de terminación, ya sea en el nucleótido siguiente o en los nucleótidos 2, 4 y 6 después del codón de término. Esto puede ser

debido a una predilección del evento de reordenamiento en este sitio ó a la selección de este sitio para un evento de recombinación intramolecular. La primera posibilidad puede haber ocurrido en este evento de reordenamiento descrito en esta tesis y en otros, pero lo descrito por (Hundly 1985) en el reordenamiento del genoma de bovino, que resulta en un segmento 5 de RNA de mayor tamaño, generado por una reiniciación en dentro de el ORF, podría indicar un evento de recombinación. Sin embargo el análisis de la estructura secundaria del segmento 11 normal, a partir del cual se produjo la duplicación en las cepas de rotavirus demostró la presencia de una estructura "hairpin loop" en regiones cercanas al nucleótido 620, donde se postula que existiría un sitio de atenuación donde la RNA polimerasa se desprendería del templado. Lo mas interesante es que en la mayoría de las duplicaciones también existiría una estructura "hairpin loop" cercana al sitio en donde la RNA polimerasa reinicia la síntesis del RNA mensajero (Gorziglia y col., 1989).

Basados en esto, el mecanismo que podría explicar el origen de la secuencia nocodificante ubicada en el extremo 3' del segmento 11 de la cepa CC86 es el siguiente: la RNA polimerasa RNA dependiente al transcribir el mRNA correspondiente al segmento 11 podría detenerse después de alcanzar el codón de término entre el nucleótido 616 y 620 por el reconocimiento de una estructura secundaria. Luego, la polimerasa podría desprenderse del templado con la hebra transcrita unida y reiniciar la síntesis en el nucleótido 291, donde estaría reconociendo una estructura secundaria para comenzar a transcribir la porción que resta incluyendo los 44 nucleótidos en el extremo 3'. La molécula de mRNA generada tendría ahora un tamaño superior al RNA

mensajero normal del segmento 11, y todas las señales para la traducción y la síntesis de RNA de doble hebra, por lo cual la progenie viral mantendría la nueva dotación genética, luego de sucesivos ciclos de infección. Puesto que la tasa de transcripción del RNA es similar en todos los genes de la familia Reoviridae, los genes pequeños son transcritos mas frecuentemente que los de tamaño mayor. Consecuentemente, si efectivamente la duplicación de segmento 11 de rotavirus es el resultado de un error de la RNA polimerasa, como ha sido postulado, no resulta extraño que este tipo de reordenamientos se encuentre asociado en forma preferencial a los genes pequeños, como el segmento 11 (Matsui y col 1990).

La secuencia nucleotídica ubicada entre el nucleótido 620 al 958 del segmento 11 de la cepa CC86 difiere de la región codificante ubicada entre el nucleótido 290 al 620, en aproximadamente un 3.5 %. Algunos autores postulan que estas regiones duplicadas podrían ser importantes en mantener un bajo nivel de mutaciones en la región codificante del segmento, de tal modo de mantener la función del polipéptido NSP5 (Matsui y col 1990). Por otro lado, el hecho que exista una marcada conservación de las ultimas 44 bases en el extremo 3' del segmento duplicado está de acuerdo con anteriores estudios que demostrarían un importante rol de esta región en la síntesis del RNA genómico viral (Patton y col 1990).

Las duplicación del segmento 11 en las cepas C60, Alabama, VRM1 y CC86 indica que el mecanismo de duplicación de este segmento es similar. Sin embargo el análisis de las regiones extras no codificantes del extremo 3' de las cepas de rotavirus humano DS-1 y 69M no son debidas a simples y directas duplicaciones (Matsui y col.,

1990). Estas secuencias adicionales son idénticas a aquellas encontradas en las cepas RV-5 y B37 de rotavirus humano. Al comparar las secuencias no codificables de la región 3' de las cepas de rotavirus humano DS-1 y 69M, se encontró que estas secuencias contienen un alto número de nucleótidos adenina y timina, teniendo regiones en las cuales tienen una cierta similitud. Varias hipótesis que podrían explicar este tipo de reordenamientos, que es diferente a los producidos en otras cepas de rotavirus animales, se han descritos. Una posibilidad es que la RNA polimerasa repetidamente se esté asociando a regiones con un alto contenido de residuos adenina y timina en el segmento génico y por tartamudeo los transcriba. Una segunda posibilidad ha sido descrita para virus RNA de hebra simple, en los cuales una vez que la RNA polimerasa comienza la síntesis del RNA mensajero, ésta salta desde el gen que está transcribiendo a un sitio de inicio de la transcripción de otro gen que está estrechamente próximo sin liberar la hebra hija transcrita. Si esto es así, las secuencias adicionales podrían ser derivadas desde otros segmentos de rotavirus que están transcripcionalmente activo en la partícula de cubierta simple. Una tercera, pero menos probable posibilidad es que las secuencias de DS-1 y 69M insertadas entre el codón de termino del primer ORF y las 49 bases conservadas del extremo 3' son el resultado de una generación de mutaciones puntuales, de deleciones y inserciones selectivas, las cuales afectan en una medida similar a ambas secuencias.

La duplicación genética, el tartamudeo y los saltos de la RNA polimerasa estarían representando vías alternativas por las cuales rotavirus mantiene o aumenta la diversidad genética (Matsui y col., 1990). Las secuencias adicionales generadas, al parecer no

interfieren con la función viral y pueden conferir algunas ventajas selectivas para rotavirus en algunas circunstancias, como en el caso de la cepa CC86 de rotavirus de cerdo.

Los procesos enzimáticos involucrados en éste y otros tipos de reordenamientos que ocurren durante la síntesis de RNA (-) y RNA (+) es desconocido. Sin embargo, cuando se realizan ensayos "in vitro" de la síntesis de RNA (+), con una alta concentración de partículas virales, no se observa la producción de reordenamientos (Gorziglia y col 1989). Los reordenamientos del genoma de rotavirus se producen por lo general después de un pasaje de infección de rotavirus a una alta multiplicidad de infección. Para comprender como se producen los distintos reordenamientos genéticos es fundamental el estudio y análisis de las características genéticas de los reordenantes, generados durante el ciclo infectivo de rotavirus "in vitro".

El estudio de la cepa reordenante demuestra que las partículas virales de rotavirus pueden encapsidar una mayor cantidad de ácido nucleico sin que esto se traduzca en un deterioro de la expresión viral. Sería interesante intentar aprovechar esta característica de rotavirus y utilizarlo como vector de expresión de genes virales en células eucariontes, en estudios destinados a la obtención de vacunas.

En resumen, los resultados obtenidos durante este estudio permitieron asociar las características fenotípicas encontradas en la cepa CC86 al segmento 11 duplicado. La principal evidencia que avala esta hipótesis es que el traspaso de este segmento a una cepa heteróloga de rotavirus de simio generó una cepa reordenante que presentó las mismas características que la cepa CC86. Esto reviste gran importancia debido a que mediante esta metodología es posible asociar determinados fenotipos a un segmento

genómico particular, que puede ser visto como un verdadero marcador molecular. Sin embargo, al comparar las distintas etapas de la morfogénesis viral de las cepas CN86 y CC86 no se encontraron diferencias que pudieran explicar estos fenotipos. Por otro lado, al analizar la secuencia aminoacídica del polipéptido NSP5 codificado por segmento 11 de la cepa CN86 y CC86 muestran diferencias entre ambas cepas que podrían cambiar la funcionalidad de este polipéptido. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad que se esté sintetizando algún otro polipéptido en forma diferencial ó que la duplicación favorezca la encapsidación de este segmento, produciendo los fenotipos descritos. La caracterización genética del segmento reordenado demostró que estaba formado por una duplicación parcial del tipo cabeza cola, la cual no codifica para ningún polipéptido descrito. Este tipo de reordenamiento mantiene las características encontradas en otras cepas de rotavirus reordenantes.

CONCLUSION

El segmento 11 reordenado de la cepa CC86 tiene igual comportamiento que el resto de los segmentos de RNA de la partícula viral, cuando se transcribe el mRNA y cuando se sintetiza el RNA (-).

Mediante el ensayo de traducción "in vitro" se demostró que el segmento 11 reordenado sintetiza sólo el polipéptido NSP5 y no otro polipéptido de menor o mayor tamaño. En células infectadas, la síntesis del polipéptido NSP5 es similar en ambas cepas de rotavirus de cerdo.

La purificación de clones a partir de infecciones mixtas parece ser un buen método para seleccionar fenotipos asociados a algún segmento genómico de rotavirus, ya que permitió obtener el reordenante de SA-11 que contiene el segmento 11 de la cepa CC86.

Los fenotipos presentados por la cepa CC86 fueron adquiridos por la cepa SA-11 al incorporar en su genoma el segmento 11 de la cepa CC86, lo que evidencia que estos fenotipos se asocian a la duplicación del segmento 11.

El reordenamiento del segmento 11 de la cepa CC86 se debe a una duplicación parcial de la región codificante del segmento 11 de la cepa normal ubicada entre los nucleótidos 290 y 620. El segmento 11 reordenado mantiene las región 5' y 3' conservadas.

El análisis de la secuencia aminoacídica del polipéptido NSP5 en ambas cepas de rotavirus demostró que existen cambios de aminoácidos que podrían dar cuenta de los fenotipos asociados al segmento 11 reordenado.

Es probable que los fenotipos asociados al segmento 11 sean el resultado de un cambio funcional del polipéptido NSP5, de la expresión diferencial de otro polipéptido sintetizado por el segmento 11 reordenado ó que la duplicación produzca alguna ventaja selectiva en la encapsidación de este segmento a la partícula viral.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, A.M. and Desselberger, U. 1985. Reassortment of human rotavirus carrying rearranged genomes with bovine rotavirus. *J General Virology* 66: 2703-2714.
- Baybutt, H.N. and McCrae, M.A. 1984. The molecular biology of rotavirus VII. Detailed structural analysis of gene 10 of bovine rotavirus. *Virus Research* 1: 533-541.
- Bellinzoni, R.C., Mattion, N., Burrone, O., La Torre, J.L. and Scodeller, E.A. 1987. Isolation of group A swine rotavirus displaying atypical electropherotypes. *J. Clin. Microbiol.* 25: 952-954.
- Besselaar, T.G., Roseblatt, A. and Kidd, A.H. 1986. atypical rotavirus from South African neonates. *Archives of Virology.* 87: 327-330.
- Bican, P.C., Charpilienne, A. and Scherrer, R. 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J. Virol.* 43: 1113-1117.
- Blacklow, N.R. and Greenberg, H.B. 1991. Viral gastroenteritis. *N Engl. J. Med.* 325: 252-264.
- Both, G.H., Siegman, L.J, Bellamy, A.R. and Atkinson, P.H. 1983. Coding assignment and nucleotide sequence of simian rotavirus SA-11 gene segment 10: location of glycosylation sites suggest that the signal peptide is not cleaved. *J. Virology.* 48: 335-339.
- Boyle, J.F., and Holmes, K.V. 1986. RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J. Virology* 58: 561-568.
- Brown, E.G., Nibert, M.L. and Fields, B.N. 1983. The L2 gene of reovirus serotypes 3 controls the capacity to interfere, accumulate deletions and establish persistent infection. In *Double-Stranded RNA Viruses* 275-287.
- Chen, D., Burns, J.W., Estes, M.K. and Ramig, R.F. 1989. Phenotype of rotavirus reassortants depend upon the recipient genetic background. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 3743-3747.
- Chen, D., Gombold, J.L., and Ramig, R.F. 1990. Intracellular RNA synthesis directed by temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA-11. *Virology* 178: 143-151.
- Chen, D. and Ramig, R., 1993. Rescue of infectivity in vitro transcapsidation of rotavirus single-shelled particle. *Virology.* 192: 422-429.

- Clark, S.M., Spendlove, R.S. and Barnett, B.B. 1980. Role of two particle types in bovine rotavirus morphogenesis. *J. Virol.* 34: 272-276.
- Cohen, J. 1977. Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus. *J. General Virology.* 36: 395-402.
- Cohen, J.L., Charpilienne, A. and Scherrer, R. 1979. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60: 177-186.
- Cukor, G. and Blacklow, N.R. 1988. Human viral gastroenteritis. *Microbiol. Rev.* 48: 157-179.
- Davis, A.R., Hiti, A.L. and Nayak D.P. 1980. Influenza defective interfering viral RNA is formed by internal deletion of genomic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 215-219.
- Desselberger, U. 1989. Molecular epidemiology of rotavirus. In *Viruses and The Gut*, pp 55-65. Edited by M.J.C. Farthing. London: Swan Press.
- Eaton, B.T. and Gould, A.R. 1987. Isolation and characterization of the orbivirus genotypic variants. *Virus Research* 6: 363-382.
- Eiden, J., Losonski, G.A., Johnson, J. and Yolken, R. 1985. Rotavirus RNA variation during chronic infection of immunocompromised children. *Pediatric and Infectious Diseases.* 4: 632-637.
- Espejo, R., López, J.S. and Arias, C. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37: 156-160.
- Estes, M. K. 1990. Rotavirus and their replication. In *virology*, 2nd edn, pp. 1329-1352. Edited by B.N. Fields & D.M. Knipe. New York: Raven Press.
- Estes, M.K., and Cohen, J. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.* 53: 410-419.
- Fukuhara, N., Yoshie, O., Kitaoka, S. and Konno T. 1988. Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J. Virol.* 62: 2209-2218.
- Gallegos, C.O., and Paton, J.P. 1989. Characterization of rotavirus replication intermediates a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology.* 172: 616-627.
- Garbard, C.A., Bricout, F. and Nicolas, J.C. 1984. Study of genetic reassortment between two human rotavirus. *Virology.* 139: 358-365.

- Gombold, J.L., Estes, M.K. and Ramig, R.F. 1985. Assignment of simian rotavirus SA-11 temperature-sensitive mutant groups B and E to genome segment. *Virology* 143: 309-320.
- González, S.A. and Burrone, O. 1991. Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine. *Virology*. 182: 8-16.
- González, S.A., Mation N.M., Bellinzoni, R. and Burrone, O.R. 1989. Structure of rearranged genome segment 11 in two different rotavirus strains generated by similar mechanism. *J. General. Virology*. 70: 1329-1336.
- Gorziglia, M., Nishikawa, K. and Fukuhara, N. 1989. Evidence of duplication and deletion in super short segment 11 of rabbit rotavirus Alabama strain. *Virology*. 170: 587-590.
- Gorziglia, M.C., Green K., Nishikawa K., Taniguchi K., Jones R., Kapikian A.Z. and Chanock, R. Sequence of the fourth gene of human rotavirus recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J. Virology*. 62: 2978-2984.
- Gouvea, V. and Brantly M. 1995. Is rotavirus a population of reassortants? *Trend in Microbiology*. 3: 159-162.
- Graham, A., Kudesia, G., Allen, A.M. and Desselberger, U. 1987. Reassortment of human rotavirus possessing genome rearrangements with bovine rotavirus evidence for host cell selection. *J. General. Virology*. 68: 115-122.
- Greenberg, H.A., Valdesuso, V., Flores, J., Kalica, A., Hoshino Y. and Singh, N. 1983a. Serology analysis of the subgroup protein of rotavirus using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 39: 91-99.
- Greenberg, H.B., Flores, J., Kalica, A., Wyatt, R.G. and Jones, R. 1983 b. Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the Wa and DS-1 strain of human rotavirus. *J. Gen. Virology*. 64: 313-330.
- Helmberger, J.M. and Patton, J.T. 1986. Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA-11. *Virology*. 155: 655-665.
- Hoshino, Y., Sereno, M.M., Midthum, K., Flores, J., Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. 1985. Independent segregation of two antigenic specificities Vp3 and Vp7 involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 8701-8704.
- Hundley, F., Biryahwaho, B., Gow, M. and Desselberger, U. 1985. Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology*. 143: 88-103.

- Hundley, F., McIntyre, M., Clark, B., Beards, G., Wood, D., Chrystie, I. and Desselberger, U. 1987. Heterogeneity of genome rearrangements in rotavirus isolated from a chronically infected immunodeficient child. *J. Virology*. 61: 3365-3372.
- Imai, M., Akatani, K., Ikegami, N. and Furuichi, Y. 1983. Capped and conserved terminal structure in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J. Virology*. 47: 125-136.
- Kabcenell, A.K., Poruchynsky, M.S. and Bellamy, A.R., Greenberg, H.B., Atkinson, P.H. 1988. Two forms of Vp7 are involved in assembly of SA-11 rotavirus in endoplasmic reticulum. *J. Virology*. 62: 2929-2941.
- Kalica, A., Greenberg, H., Wyatt, T., Flores, J., Sereno, M., Kapikian, A., Chanock, R. 1981. Gene of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotavirus that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology*. 112: 385-390.
- Kalica, A., Flores, J. and Greenberg, H.B. 1983. Identification of the rotavirus gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology*. 125: 194-205.
- Kapikian, A.Z., Cline, W.I., Greenberg, H.B., Wyatt, R.G., Kalica, A.R., Banks, C.E., James, H.D., Flores, J. and Chanock, R.M. 1981. Antigenic characterization of human and animal rotavirus by immune adherence hemagglutination assay (IAHA): evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infect. Immun.* 33: 415-425.
- Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. 1985. Rotavirus, Fields B.N. (ed). *Virology*. Raven Press, New York. 863-906.
- Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. 1990. Rotavirus. In *virology*, 2nd edn., pp.1353-1404. Edited by B.N. Fields & D.M. Knipe. New York: Raven Press.
- Liu, D.K., Offit, P.A. and Estes, M.K. 1988. Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology*. 163: 26-32.
- López, S. and Arias, C.F. 1993. Protein NS26 is highly conserved among porcine rotavirus strains. *Nucleic. Arch. Research*. 21: 1042.
- Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J., *Molecular cloning* Cold Spring harbor laboratory. 1982. Cold Spring Harbor, New York.
- Mansell, E.A. and Patton, J.T. 1990. Rotavirus RNA replication: Vp2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *J. Virology* 64: 4988-4996.

- Mattion, N.M., Gonzáles, S.A., Burrone, O., Bellinzoni, R., La, T.J. and Scodeller, E.A. 1988. Rearrangement of genomic segment 11 in two swine rotavirus strains. *J. Gen. Virology*. 69: 695-698.
- Mattion, N.M., Mitchell, D.B., Both, G.W. and Estes, M.K. 1991. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology*. 181: 295-304.
- Mattion, N.M., Bellinzoni, R.C., Blackhall, J.O., Estes, M.K., Gonzáles, S.A., La, T.J. and Scodeller, E.A. 1990. Genome rearrangement in porcine rotavirus: biochemical and biological comparisons between a supershort strain and its standard counterpart. *J. Gen. Virology*. 71: 335-362.
- Matsui, S.M., Mackow, E.R., Marsuno, S., Paul, P.S. and Greenberg, H.B. 1990. Sequence analysis of gene 11 equivalents from short and super short strains of rotavirus. *J. Virology*. 64: 120-124.
- Mc Crae, M. and Faulkner-Valle, G.P. 1981. Molecular biology of rotaviruses: characterization of basic growth parameters and pattern of macromolecular synthesis. *J. Virology*. 39: 490-496.
- Meyer, J.C., Bergman, C.C. and Bellamy, A.R. 1989. Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. *Virology*. 171: 98-107.
- Nakagomi, O., Nakagomi, T., Hoshino, Y., Flores, J. and Kapikian, A.Z. 1987. Genetic analysis of a human rotavirus that belongs to subgroup I but has an RNA pattern typical of subgroup II human rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1150-1164.
- Novo, E.E., 1981. Composition and topography of structural polypeptides of bovine rotavirus. *J. Gen. Virology*. 56: 325-335.
- Offit, P.A. and Blavat, G. 1986. Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. *J. Virology*. 57: 376-378.
- Offit, P.A., Blavat, G., Greenberg, H.B. and Clark, H.F. 1986. Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. *J. Virology*. 57: 46-49.
- Okada, Y., Richardson, M.A., Ikegami, N., Nomato, A. and Furuichi, Y. 1984. Nucleotide sequence of human rotavirus genome segment 10, an RNA encoding a glycosylated virus protein. *J. Virology*. 51: 856-859.
- 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. and Gallegos, C.O. 1988. Structure and protein composition of the rotavirus replicase particle. *J. Gen. Virology*. 166: 358-365.
- Patton, J.T. and Gallegos, C.O. 1990. Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *J. Gen. Virology*. 71: 1087-1094.
- Patton, J.T. 1993. Rotavirus replication. *Current Topics in microbiol. and immunol.* 185: 93-113.
- Pedley, S., Hundley, F., Chrystie, I., McCrae, M.A. and Desselberger, U. 1984. The genome of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. *J. General Virology*. 65: 1141-1150.
- Pizarro, J.L., Sandino, A.M., Pizarro, J.M., Fernández, J. and Spencer, E. 1991a. Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide Vp3. *J. Gen. Virology*. 72: 325-332.
- Pizarro, J.M., Pizarro J.L., Fernández J., Sandino A.M. and Spencer E. 1991b. Effect of nucleotide analogues on rotavirus transcription and replication. *Virology*. 184: 1-5.
- Pocock, D.H. 1987. Isolation and characterization of two group A rotaviruses with unusual genome profiles. *J. General. Virology*. 68: 653-660.
- Ramig, R.F., Samal, S.K., and McConnell, S. 1985. Genome RNAs of virulent and attenuated strains of bluetongue virus serotypes 10, 11, 13, and 17. In *Bluetongue and Related Orbiviruses*, pp. 389-396. Edited by T.I. Bargar and M.M. Yochim. New York: Alan R. Liss.
- Samal, S.K., El-Husein A., Beaty B., Holbrook F., and Ramig R.F. 1987a. An analysis of mixed bluetongue virus infection of the vector (*Culicoides variipennis*) with serotypes 10 and 17. *J. Gen. Virology*. 68: 2319-2329.
- Samal, S.K., Livingston, C.W., McConnell, Jr. S., and Ramig R.F. 1987b. Analysis of mixed infection of sheep with bluetongue virus serotypes 10 and 17; evidence for genetic reassortment in the vertebrate host. *J. Virology*. 61: 1086-1091.
- 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.
- Sandino, A.M., Fernández, J., Pizarro, J., Vásquez, M. and Spencer, E. 1994. Structure of rotavirus particle: interaction of the inner capsid protein VP6 with the core polypeptide VP3. *Biol. Res*. 27: 39-48.

- Sivasubramanian, N. and Nayak, D.P. 1983. Defective interfering influenza RNAs of polymerase 3 gene contain single as well as multiple internal deletions. *Virology*. 124: 232-237.
- Spencer, E. and Arias, M.L. 1981. In vitro transcription catalyzed by heat-treated human rotavirus. *J. Virology*. 61: 1-6.
- Stacy-Phipps, S.P. and Patton, J.T. 1987. Synthesis of plus and minus-strands RNA in rotavirus-infected cells. *J. Virology*. 61: 3479-3484.
- Suzuki, H., Kitaoka, S., Sato, T., Konno, T., Iwasaki, Y., Numazaki, Y. and Ishida, N. 1986. Further investigation on the mode of entry of human rotavirus into cells. *Arch. Virology*. 91: 135-144.
- Tanaka, T.N., Conner, M.E., Graham, D.Y. and Estes, M.K. 1988. Molecular characterization of three rabbit rotavirus strains. *Archives Virology*. 98: 253-265.
- Taniguchi, K., Nishikawa, K., Kobayashi, N., Urasawa, T., Wu, H., Gorziglia, M., and Urasawa, S. 1994. Difference in Plaque Size and VP4 Sequence found in SA-11 Virus clones having Simian Authentic Vp4. *Virology*. 198: 325-330.
- Thouless, M.E., Digiacomo, R.F. and Neuman, D.S. 1986. Isolation of two lapine rotaviruses. Characterization of their subgroup and serotypes and RNA electrophoretotypes. *Archives Virology*. 89: 161-170.
- Valenzuela, S., Pizarro, J., Sandino, A.M., Vásquez, M., Fernández, J., Hernández, O., Patton, J. and Spencer, E. 1991. Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J. Virology*. 65: 3964-3967.
- Ward, C.W., Azad, A. and Dyal-Smith, M.L. 1985. Structural homologies between RNA gene segment 10 and 11 from UK bovine, simian SA11 and human WA rotaviruses. *Virology* 144: 328-336.
- Ward, R.L., Nakagomi, O., Knowlton, D.R., McNeal, M.M., Nakagomi, T., Clemens, J.D., Sack, D.A. and Schiff, G.M. 1990. Evidence for natural reassortants of human rotavirus belonging to different genogroups. *J. Virology*. 64: 3219-3225.
- Welch, S.K., Crawford, S.E. and Estes, M.K. 1989. Rotavirus SA-11 genome segment 11 protein is a nonstructural phosphoprotein. *J. Virology*. 63: 3974-3982.