

Tesis de Posgrado

Análisis molecular del genoma de rotavirus

González, Silvia Adriana

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

González, Silvia Adriana. (1989). Análisis molecular del genoma de rotavirus. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2269_Gonzalez.pdf

Cita tipo Chicago:

González, Silvia Adriana. "Análisis molecular del genoma de rotavirus". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2269_Gonzalez.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

ANALISIS MOLECULAR DEL GENOMA DE ROTAVIRUS

Autor

Silvia Adriana González

Director de Tesis

Dr. Oscar R. Burrone

Lugar de trabajo

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, "Fundación Campomar"

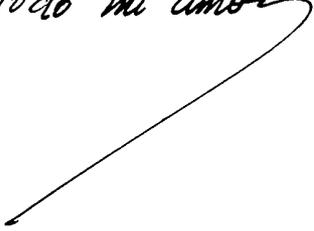
- 2.269 -
Ej: 2

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Año 1989

A José Luis

con todo mi amor



*Mir muß eine Sache Spaß machen,
sonst werde ich krank*

(Heinrich Böll, "Ansichten eines Clowns")

AGRADECIMIENTOS

A mi director, el Dr. Oscar R. Burrone, por haberme permitido iniciarme en la investigación en su laboratorio, por sus consejos y apoyo durante el desarrollo de este trabajo, y por nuestras numerosas y "acaloradas" discusiones.

Al Dr. Alberto C.C. Frasch, con quien dí mis primeros pasos en Biología Molecular, por sus enseñanzas y ayuda.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, Marcela Ferraro, Ariel Wilner, Eduardo Cafferata, Susana Giambiagi, Facundo Batista, a los chicos de "cultivo" y del laboratorio 112, por los momentos compartidos.

A Eduardo Cafferata, por ayudarme en el trabajo de cultivo de células.

A los Dres. José La Torre y Eduardo Scodeller, por su ayuda y apoyo en todo momento.

A Nora Mattion y Rodolfo Bellinzoni, quienes aislaron y purificaron los virus con los cuales desarrollé mi trabajo de Tesis.

A Oscar Competella y María Teresa Rimoldi, por su gran ayuda en la obtención de sueros policlonales.

A Sergio Trombetta, por su constante ayuda y asesoramiento en el estudio de glicoproteínas.

A los Dres. Armando Parodi y Roberto Couso, por sus sugerencias y conceptos con respecto al estudio de glicoproteínas.

A Hilda Gasparoli, gracias a quien se mantiene todo en orden en el laboratorio 102.

A Daniel Gluschankof, por su ayuda con las letras especiales de la procesadora de palabras.

A Millara, por el trabajo de fotografía, y a Marcela Millara, por los gráficos.

Al I.I.B., por haberme permitido desarrollar mi trabajo de Tesis en el Instituto.

ABREVIATURAS

ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN copia
ADNsc:	ADN simple cadena
ARN:	ácido ribonucleico
ARNdc:	ARN doble cadena
ARNm:	ARN mensajero
ARNr:	ARN ribosomal
ARNsc:	ARN simple cadena
ARNasa:	ribonucleasa
dATP:	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
BSA:	seroalbúmina bovina
cpm:	cuentas por minuto
dCTP:	2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
D.O.:	densidad óptica
DTT:	ditiotreitól
EDTA:	ácido etiléndiamino tetraacético
EGTA:	ácido etilénglicol-bis (β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
Endo H:	endo- β -N-acetilglucosaminidasa H
Endo F:	endo- β -N-acetilglucosaminidasa F
Fig.:	figura
β -Gal:	β -Galactosidasa
GalNAc:	N-acetilgalactosamina
GlcNAc:	N-acetilglucosamina
h.p.i.:	horas post-infección
IPTG:	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb:	mil pares de bases
kDa:	mil daltons
LB:	medio Luria-Bertani
MEM Dulbecco:	Modificación de Dulbecco del medio mínimo esencial de Eagle
Met:	metionina
nm:	nanometro
NP-40:	Nonidet P-40
nt:	nucleótido
NTP:	nucleótido trifosfato
dNTP:	desoxinucleótido trifosfato
pb:	par de bases
PBS:	buffer fosfato salino

p.i.:	post-infección
PM:	peso molecular
PMSF:	fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PNGasa F:	péptido:N-glicosidasa F
poli(A):	ácido poliadenílico
R.E.R.:	retículo endoplásmico rugoso
rpm:	revoluciones por minuto
SAM:	S-adenosil metionina
SDS:	dodecil sulfato de sodio
sg:	segmento genómico
Tris:	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
μ Ci:	micro Curie
μ g:	microgramo

GLOSARIO

buffer:	solución de sustancias químicas que mantienen constante el pH
<i>downstream</i> :	hacia el extremo 3'
Klenow:	subunidad mayor de la ADN polimerasa I de <i>E.coli</i>
<i>primer</i> :	ADN iniciador
<i>upstream</i> :	hacia el extremo 5'

N.B.: En este trabajo se utilizan términos en idioma inglés que son de uso corriente en la literatura científica y de difícil traducción.

INDICE

	pág.
I. <u>INTRODUCCION</u>	
1. Generalidades de los rotavirus	1
1.1. Familia <i>Reoviridae</i>	1
2. Características del virus	4
2.1. Morfología	4
2.2. Propiedades fisicoquímicas	4
2.3. Genoma viral	4
2.4. Proteínas virales	7
2.4.1. Proteínas de la cápside externa	7
2.4.2. Proteínas de la cápside interna	8
2.4.3. Proteínas no estructurales	9
2.4.4. Enzimas asociadas al virión	10
2.4.4.1. ARN polimerasa ARN dependiente	10
2.4.4.2. Poliadenilato [poli(A)] polimerasa	12
2.4.4.3. Otras enzimas asociadas al virión	12
2.5. Determinantes antigénicos	12
2.5.1. Determinantes de grupo	12
2.5.2. Determinantes de subgrupo	14
2.5.3. Determinantes de serotipo	14
3. Ciclo de replicación viral	14
3.1. Cinética de crecimiento	14
3.2. Eventos tempranos en la infección viral	15
3.3. Transcripción	16
3.4. Biosíntesis de polipéptidos	16
3.5. Síntesis de ARNdc viral (replicación)	16
3.6. Ensamblado	17
4. Evolución de los rotavirus	19
4.1. Mecanismos de variabilidad genómica	19
4.2. Fidelidad de la ARN polimerasa	19
4.3. Recombinación de la información genética en rotavirus	19
4.4. Heterogeneidad del genoma de rotavirus	20
4.5. Reordenamientos genómicos en rotavirus	20
4.5.1. Reordenamientos genómicos en rotavirus de distintas especies	20
4.5.2. Reordenamientos genómicos en otros miembros de la familia <i>Reoviridae</i>	21

5. Biología de los rotavirus	21
5.1. Enfermedades y patogénesis	21
5.1.1. Diarrea epizootica de ratones infantiles	21
5.1.2. Diarrea del ganado	21
5.1.3. Enteritis de cerdos	22
5.1.4. Enfermedad en otros animales domésticos y en aves	22
5.1.5. Enteritis infantil	22
5.1.5.1. Características clínicas	22
5.1.5.2. Patogénesis y patología	22
5.2. Epidemiología	23
5.2.1. Modo de transmisión	23
5.2.2. Incidencia de las infecciones	23
5.3. Perspectivas de control	24

6. Objetivos	25
--------------	----

II. MATERIALES Y METODOS

1. Virus y células	26
2. Extracción de ARNdc viral	26
3. Electroforesis y <i>Northern blots</i> de ARNdc genómico viral	26
4. Purificación de segmentos genómicos de ARNdc por electroelución	27
5. Marcación radiactiva de segmentos genómicos con ³² P	27
6. Obtención de sondas radiactivas	27
7. Identificación de clones de una genoteca de ADNc de rotavirus bovino	28
8. Construcción de una genoteca de la cepa C60	28
9. Construcción de una genoteca de ADNc de la cepa porcina OSU	28
10. Secuenciación del gen reordenado X ₁	29
11. Ensayos de elongación a partir de un ADN iniciador específico (<i>primer extension</i>)	29
12. Extracción de transcritos virales y <i>Northern blots</i>	30
13. Purificación de partículas virales y síntesis de transcritos virales <i>in vitro</i>	30
14. Subclonado de pX1.1 en el vector pUR288	31
15. Expresión de VP11 en <i>E.coli</i> y purificación de la proteína de fusión	31
16. Producción de anticuerpos anti-VP11	31
17. Marcación de proteínas virales en células infectadas	32
18. Análisis de VP11 por inmunoprecipitación	32
19. Marcación de proteína A con Na ¹²⁵ I	33
20. Análisis de VP11 por inmunoblot (<i>Western Blot</i>)	33

21. Inmunofluorescencia indirecta de células infectadas	33
22. Análisis de VP11 por digestión con endoglicosidasas	33
23. Análisis de VP11 por β -eliminación	34
24. Reactivos y enzimas	34

III. RESULTADOS

1. Obtención de sondas específicas de los distintos segmentos genómicos de rotavirus	36
1.1. Análisis de una genoteca de ADNc de rotavirus bovino	36
2. Estudio de reordenamientos genómicos en rotavirus	40
2.1. Origen de los virus y antecedentes	40
2.2. Identificación de los segmentos involucrados en el reordenamiento por estudios de hibridación molecular	40
2.2.1. Hibridación con sondas de ADNc segmento específicas	40
2.2.2. ¿Son los genes reordenados estructuras mosaico?	44
2.3. Determinación de la estructura de los genes reordenados	44
2.3.1. Análisis de la estructura del gen reordenado X ₁ de la cepa C60	44
2.3.2. Análisis de la secuencia del segmento genómico normal de la cepa OSU	51
2.3.3. Análisis de la estructura del gen reordenado X ₂ de la cepa C117	55
2.4. Análisis de transcritos virales	58
2.4.1. Sondas de hibridación molecular específicas de cada cadena viral	58
2.4.2. Transcritos virales producidos en células infectadas	58
2.4.3. Transcritos virales producidos <i>in vitro</i>	58
3. Estudio del producto del sg 11 (VP11)	61
3.1. Expresión de VP11 en <i>E.coli</i>	63
3.1.1. Construcción de pUR 288:X ₁	63
3.1.2. Expresión de VP11	63
3.1.3. Producción de anticuerpos específicos anti-VP11	63
3.1.4. Localización de VP11 en células infectadas	66
3.1.5. Caracterización de los productos del gen 11	69
3.1.6. ¿Cuál es la modificación de VP11?	74

IV. DISCUSION

1. Reordenamientos genómicos en rotavirus	78
1.1. Estructura de los genes reordenados	78
1.2. Mecanismo involucrado en los reordenamientos	80

2. Estudio del producto del gen 11	82
2.1. Características de VP11 deducidas de su secuencia aminoacídica	82
2.2. Identificación de los productos del sg 11	82
2.3. Modificaciones post-traduccionales de VP11	83
2.3.1. Fosforilación	83
2.3.2. Glicosilación	84
V. <u>CONCLUSIONES</u>	87
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	89

I. INTRODUCCION

1. GENERALIDADES DE LOS ROTAVIRUS

Los rotavirus constituyen un género de la familia *Reoviridae*, que comprende virus que causan gastroenteritis aguda en mamíferos y aves (1-4).

El descubrimiento en 1973 de rotavirus humano por microscopía electrónica de biopsias duodenales y su asociación con gastroenteritis infantil representa un hito en el estudio de las causas de gastroenteritis aguda de origen no bacteriano.

En países en vías de desarrollo las infecciones por rotavirus, que provocan cuadros agudos de diarrea y deshidratación, son los responsables de más de un millón de muertes anuales (5-7). Los rotavirus producen además epidemias de diarrea en terneros, cerdos, pavos y pollos, causando hasta un 30 % de mortalidad en terneros, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas (8).

Dada la importancia de los rotavirus como patógenos humanos y de animales, se han tratado de desarrollar métodos efectivos de prevención y tratamiento de la enfermedad causada por estos virus. La necesidad de controlar las infecciones virales causadas por rotavirus ha estimulado especialmente el estudio de los aspectos moleculares de la estructura genómica y replicación de estos virus.

1.1. Familia *Reoviridae*

La familia *Reoviridae* comprende seis géneros de virus icosaédricos, sin envoltura, con una doble cubierta proteica y un genoma de ARNdc segmentado. Los virus llevan su propia transcriptasa, y se replican y ensamblan en el citoplasma. Los rotavirus son, junto con los ortoreovirus y los orbivirus, los tres géneros de la familia que infectan mamíferos (9, y Tabla I). Los rotavirus y los ortoreovirus se transmiten por vía directa, mientras que los orbivirus se transmiten a través de artrópodos. Las infecciones por reovirus están asociadas a enfermedades que afectan el tracto respiratorio superior y al tracto intestinal (síndrome de calambres abdominales y diarrea). Los orbivirus sólo producen viremia en el huésped vertebrado. Dentro de este género se puede nombrar al agente causante de la enfermedad de la fiebre del Colorado, que es transmitida a humanos por la picadura de la garrapata, *Dermacentor andersoni*. Los síntomas característicos de la enfermedad son fiebre severa, pericarditis, y coagulación intravascular diseminada. Otros patógenos de humanos son el virus Orungo (enfermedad febril en Nigeria y Uganda) y el virus Kemerovo (enfermedad febril en Rusia y Egipto). Otro miembro del género orbivirus es el virus de la lengua azul de ovejas. La enfermedad se caracteriza por escoriación y ulceración de las mucosas nasal y bucal, formación de numerosas hemorragias pequeñas en el tejido muscular y por la degeneración de las fibras del músculo esquelético. La familia *Reoviridae* incluye además virus de insectos, como el virus de polihedrosis citoplasmático, y virus de plantas, como el virus del tumor de las heridas, el cual desarrolla tumores en las raíces del trébol (ver Tabla I).

TABLA I
CLASIFICACION DE LA FAMILIA REOVIRIDAE

Género	Rango de huésped	Número de segmentos	Ejemplos
Ortoreovirus	vertebrados	10	reovirus de mamíferos y de aves
Orbivirus	vertebrados	10 y 12	Virus de la lengua azul Fiebre del Colorado
Rotavirus	mamíferos y aves	11	rotavirus humano, bovino, de cerdos, de simio, de conejo, de pollos
Cipovirus	insectos	10	Virus de polihedrosis citoplasmático
Fitoreovirus	plantas e insectos	12	Virus del tumor de las heridas Virus del arroz enano
Fijivirus	plantas e insectos	10	Virus de la enfermedad de Fiji Virus del maíz rugoso enano

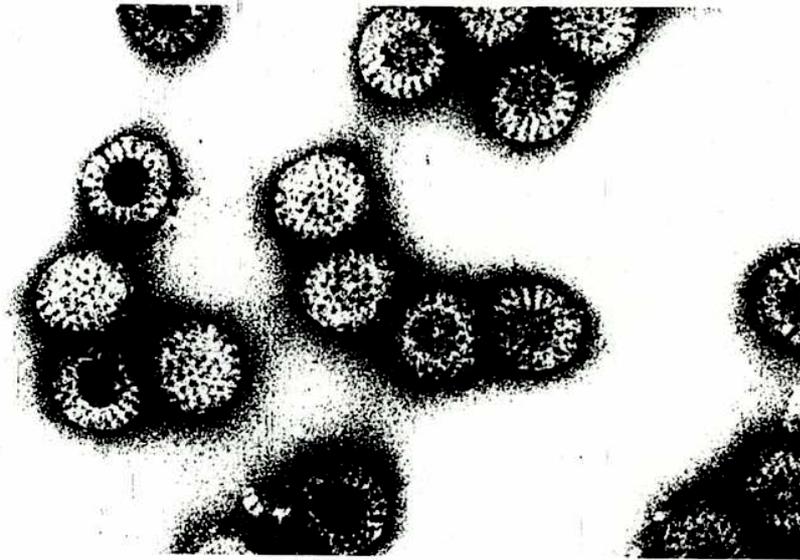


FIGURA 1

Microscopía electrónica de una muestra de materia fecal de un animal infectado con rotavirus.
En la foto se observan partículas de doble y de simple cubierta.

2. CARACTERISTICAS DEL VIRUS

2.1 Morfología

Como los otros miembros de la familia *Reoviridae*, los rotavirus son virus icosaédricos (65-75 nm de diámetro) y tienen una cápside de doble cubierta proteica compuesta de una cubierta externa, una cubierta interna y un *core* icosaédrico.

Por tinción negativa al microscopio electrónico de muestras de animales infectados se detectan dos especies de partículas virales (10) (fig. 1). Las partículas virales completas de **doble cubierta** proteica miden aproximadamente 70 nm de diámetro. Las partículas de doble cubierta también se denominan "lisas", ya que la cubierta proteica externa presenta una apariencia circular bien definida. También se detectan partículas de **simple cubierta** que miden aproximadamente 55 nm y se denominan "rugosas". Al carecer de la cubierta externa lisa los capsómeros de la cápside interna se proyectan hacia la periferia dando una apariencia rugosa. El *core* viral, que presenta un contorno hexagonal, mide aproximadamente 37 nm de diámetro (11).

El nombre rotavirus deriva del latín *rota*, que significa rueda, y fue sugerido porque el contorno circular bien definido de la cápside externa se asemeja al borde de una rueda; el *core* viral constituye el eje central a partir del cual se ubican los capsómeros de la cubierta interna en forma radial a manera de rayos de una rueda (12).

2.2 Propiedades fisicoquímicas

Por centrifugación en gradientes de densidad de cloruro de cesio (CsCl) se pueden separar las partículas virales completas de doble cubierta (de 1.36 g/cm^3 de densidad) de las partículas con cápside interna, de simple cubierta, (de 1.38 g/cm^3 de densidad). Las partículas "vacías", que son visualizadas al microscopio electrónico por tinción negativa, tienen una densidad de $1.29 - 1.30 \text{ g/cm}^3$ en CsCl (13,14,15). La infectividad depende de la presencia de la cápside externa (10,16), y por lo tanto se pierde cuando las partículas intactas son convertidas a partículas de simple cubierta por tratamiento con agentes quelantes de calcio como EDTA o EGTA (17,18). El calcio es pues necesario para mantener la estructura de la partícula viral. La pérdida de la cubierta externa ocurre cuando el virus penetra en el medio intracelular como consecuencia de una reducción en la concentración de calcio.

2.3 Genoma viral

El genoma de rotavirus está formado por 11 segmentos de ARNdc con un rango de tamaño desde 670 a 3300 pb (rango de PM de 0.2 a 2.2×10^6 daltons) (13, 14, 19). Los segmentos de ARN caen dentro de cuatro clases de tamaño en base a su longitud de contorno medida por microscopía electrónica. Esta distribución de los 11 segmentos en cuatro grupos se puede ver por electroforesis del ARN en geles de poliacrilamida (fig. 2). Los segmentos genómicos se numeran de acuerdo a su orden de migración electroforética, siendo aquél con menor movilidad designado 1, y el de mayor movilidad, llamado 11. Si bien existen diferencias en el perfil electroforético en geles de poliacrilamida (**electroferotipo**), se reconoce un perfil de rotavirus como aquél en el cual existen 4 segmentos de gran tamaño, 2 de tamaño medio, un triplete en el cual los segmentos migran muy cercanos y que no

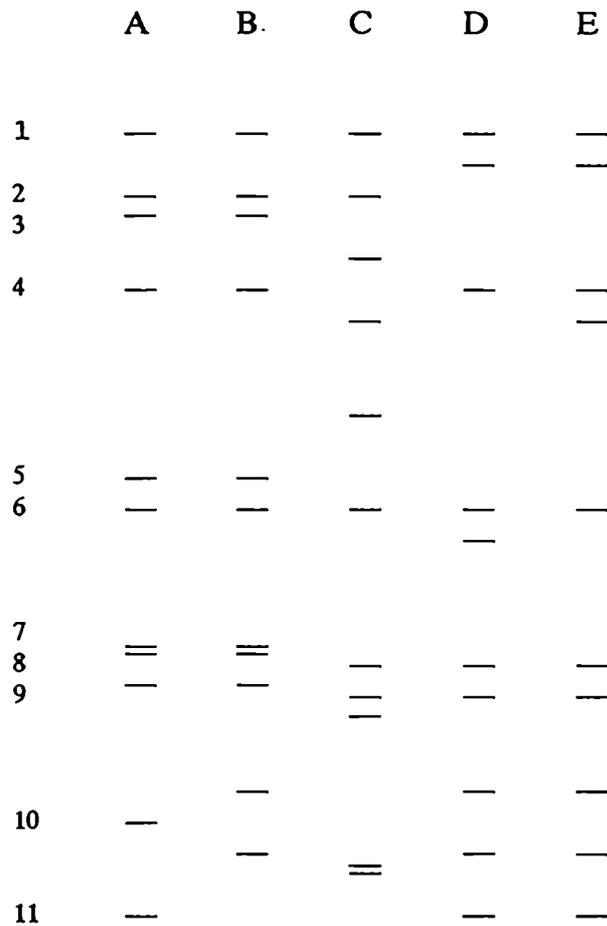


FIGURA 2

Comparación de los electroferotipos del ARNdc genómico de rotavirus de distintos grupos y especies en geles de poliacrilamida. Los números a la izquierda indican los segmentos del genoma de rotavirus grupo A (calles A y B, electroferotipos largo y corto, respectivamente).

Calles: A, rotavirus bovino grupo A; B, rotavirus de la cepa de humano S2 grupo A; C, rotavirus aviar; D y E, rotavirus atfpicos grupo no A.

siempre es bien resuelto, y 2 segmentos de bajo peso molecular (Fig. 2, calles A y B, y refs. 20, 21).

Algunos rotavirus no presentan el perfil de migración de ARN característico que se acaba de describir. En los rotavirus murinos los segmentos 10 y 11 migran juntos; en los rotavirus aviares, el segmento 5 corre cercano al 4 y los segmentos 10 y 11 comigran (fig. 2, calle C). En algunas cepas humanas, el segmento genómico (sg) 11 presenta menor migración electroforética (fig. 2, calle B) por lo que han sido denominadas de electroferotipo "corto", para diferenciarlas del perfil más común (electroferotipo "largo"). En estos casos, las posiciones 10 y 11 en el gel no correlacionan con los genes 10 y 11, respectivamente.

Los electroferotipos descritos están asociados en su mayor parte a virus pertenecientes al serogrupo A (sección I.2.5.1.). Varias cepas de cerdos, pollos, terneros, ovejas y humanos, que no comparten el antígeno común de grupo de los rotavirus grupo A, tienen un electroferotipo distinto al descrito anteriormente; los segmentos 7-8-9 no forman un triplete en el cual los segmentos migran muy juntos, el cual es característico del electroferotipo del grupo A (fig. 2, calles D y E).

Los estudios de hibridación molecular y la determinación de la secuencia nucleotídica de los segmentos genómicos han posibilitado una mejor comparación de los genomas de rotavirus de distintas especies respecto del criterio de análisis del electroferotipo. Así, por ejemplo, mediante la utilización de sondas específicas de hibridación, se ha podido identificar cuál de los segmentos genómicos del triplete 7-8-9 es el que codifica para el antígeno de neutralización viral VP7 en cepas determinadas, independientemente de la migración relativa del triplete en geles de poliacrilamida.

El desarrollo y la aplicación de las técnicas de ADN recombinante al estudio del genoma de rotavirus han permitido conocer la secuencia nucleotídica de casi todos los segmentos genómicos, y así identificar regiones antigénicamente relevantes, regiones conservadas entre virus de distintos orígenes, regiones con alto grado de variabilidad, señales consenso para modificaciones post- o co-traduccionales, y zonas que permiten la interacción de las proteínas virales con ADN (y probablemente con ARNdc).

Las características comunes a todos los genes son:

a- las secuencias conservadas de los extremos 5' (GGCUUUXAA...; X=A o U) y 3' (...XUGUGACC; X=A o U) para la cadena (+) del ARN.

b- el carácter monocistrónico de los mismos, presentando un único marco abierto de lectura principal, a excepción del gen que codifica VP7.

c- la ausencia de poliadenilación de los ARNm virales derivados de los genes.

La capacidad codificante de cada segmento genómico ha sido determinada de diferentes formas: a- por correlación del fenotipo y genotipo en virus resultantes del intercambio de segmentos genómicos (*reassortment*) obtenidos por coinfección con dos virus de diferente genotipo; b- por análisis de la reacción con anticuerpos monoclonales contra los productos de cada gen; c- por aislamiento de los segmentos individuales de ARNdc y posterior traducción *in vitro*; d- por traducción de los ARNm virales producidos *in vitro* por la polimerasa viral, y posterior identificación de los productos. De esta manera se ha asignado a cada segmento genómico el polipéptido correspondiente (Tabla II).

2.4. Proteínas virales

La nomenclatura adoptada en esta tesis para denominar las proteínas virales es la de McCrae & Faulkner-Valle (22), por la cual a todos los polipéptidos virales que se observan en células infectadas se les da el prefijo VP y luego se numeran en orden decreciente de PM. Este sistema de nomenclatura no es enteramente satisfactorio, pero evita el problema de usar nomenclaturas basadas en valores aparentes de PM (23- 26).

Por marcación con precursores radioactivos de polipéptidos virales en células infectadas y en partículas virales, se ha determinado que VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, y VP7 son proteínas **estructurales**, presentes en el virión, mientras que VP5, VP8, VP9, VP10 y VP11 son proteínas **no estructurales**, presentes en células infectadas.

2.4.1. Proteínas de la cápside externa

La cápside externa del virus está formada por las proteínas VP4 y VP7, las cuales representan un 1.5 % y 30 %, respectivamente, de las proteínas totales del virión.

VP4 : es un componente minoritario de la cápside externa que, junto con VP7, determina el serotipo viral (sección I.2.5.3.). Está codificada por el sg 4 (2362-2364 nt), el cual tiene un marco abierto de lectura capaz de codificar un polipéptido de 776 aminoácidos (87 kDa) (27, 28, 29). VP4, además de inducir junto con VP7 anticuerpos de neutralización, tiene actividad de hemaglutinina, y juega un papel principal en la virulencia en el tracto intestinal, ya que su clivaje por las proteasas intestinales es necesario para la infección celular (30-33). De hecho, la replicación de los virus en cultivo de células requiere del tratamiento previo de los mismos con tripsina para convertirlos en partículas infectivas. El clivaje de VP4 con tripsina produce 2 polipéptidos, VP8* y VP5*, de 27 kDa y de 58 kDa de PM, respectivamente (30), donde el asterisco indica que estas proteínas estructurales se originaron por clivaje proteolítico. En un estudio reciente con el virus de simio SA11 se demostró que VP5* es una mezcla de 2 polipéptidos que difieren únicamente en la presencia de 6 aminoácidos extras en la región NH₂-terminal del polipéptido mayor, lo que indica la presencia de dos sitios sensibles a tripsina (34).

VP7 : es una glicoproteína que representa el componente mayoritario de la cápside externa y el antígeno principal de neutralización (sección I.2.5.3.). La secuencia nucleotídica del gen que codifica para VP7, el sg 8 o 9 (1059-1062 nt) dependiendo de la especie (35, 36), muestra que éste es potencialmente bicistrónico, ya que existen dos codones de iniciación en fase con sendos marcos abiertos de lectura de 326 y 297 aminoácidos. El segundo AUG (metionina'30) se halla rodeado de una

secuencia consenso óptima para iniciación eficiente de la traducción (37, 38), pero se desconoce la frecuencia relativa con que cada uno de estos codones de iniciación son utilizados *in vivo*. De hecho, se han detectado dos especies de VP7, VP7 [1] y VP7 [2], que se traducen a partir del primer y segundo AUG, respectivamente (39). Ambas especies están modificadas por oligosacáridos de tipo "alta manosa" sensibles a endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (Endo H) (2). No se detectan oligosacáridos del tipo complejo en VP7 (40), lo que demuestra que esta proteína no es transportada al aparato de Golgi, sino que permanece en el lumen del R.E..

En todos los genes de VP7 estudiados, cada uno de los codones de iniciación precede a un dominio hidrofóbico, H1 y H2 (residuos 6-23 y 32-48, respectivamente). Se ha demostrado que el clivaje del péptido señal de VP7 ocurre entre la alanina 50 y la glutamina 51, *downstream* del segundo (H2) dominio hidrofóbico. Estos resultados contrastan con lo propuesto por otros investigadores (39), quienes sugirieron que el procesamiento ocurría entre los dominios H1 y H2. Por mutagénesis *in vitro* y expresión del gen que codifica para VP7 se investigó el rol de los dominios H1 y H2 en dirigir a VP7 a su localización celular correcta (41, 42, 43). Se demostró que H2 cumple el rol de péptido señal y que, aún después de ser clivado, interactúa con VP7 para retenerla dentro del R.E. (43). La evidencia proviene de experimentos en los cuales se construyeron quimeras en el vector SV40, se transfectaron células COS, y se analizó la secreción o retención en el R.E. de los productos proteicos. Las experiencias realizadas incluyeron la fusión de la secuencia H2 al antígeno S de malaria, detectando este último en el medio; la fusión de la secuencia señal de la hemaglutinina del virus de influenza a las secuencias de VP7 *downstream* del dominio H2, lo cual resultó en la secreción de VP7; y la construcción de la quimera H2-VP7, la cual fue la única que permaneció asociada a la célula. Así quedó demostrado que el péptido señal H2 interactúa, directa o indirectamente, con las secuencias *downstream* de VP7 para dirigirla y retenerla en el R.E. como proteína integral de membrana.

2.4.2. Proteínas de la cápside interna

La cápside viral interna está formada por la proteína mayoritaria VP6 y por las proteínas del *core*, VP1, VP2 y VP3.

VP1: esta proteína, codificada por el sg 1, representa solamente 2% de la proteína total del virión. Recientemente, se ha determinado la secuencia del sg 1 (44), el cual tiene un tamaño de 3302 pb con un marco abierto de lectura de 1088 codones (PM estimado, 125 kDa). La comparación de la secuencia de VP1 en bancos de datos ha permitido encontrar una región en la proteína (Gly-Asp-Gly) que presenta homología significativa con las secuencias consenso establecidas para regiones conservadas en ARN polimerasas ARN dependientes. VP1, junto con VP2, VP6 y otras dos proteínas no estructurales, forma parte de las partículas subvirales con actividad de replicasa (45). Además, mutantes termosensibles que mapean en el sg 1 tienen fenotipos "ARN negativo" (46). Estas observaciones, junto con la homología con las secuencias consenso de ARN polimerasas, apoyan la hipótesis de que VP1 podría funcionar como parte de la transcriptasa presente en partículas virales activadas.

VP2: se halla codificada por el sg 2, el cual tiene un tamaño de 2687 nt y presenta un marco abierto de lectura de 880 aminoácidos (102 kDa de PM) (47). Por análisis de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica, se encontró que existen 4 regiones presentando

estructura de α -hélice que exhiben una disposición periódica de leucinas. Esta disposición periódica (conocida como *Leu zipper*) ha sido descrita en proteínas que interactúan con el ADN celular (48), por lo que se ha propuesto que la presencia de una estructura de este tipo en VP2 moldearía la proteína para interactuar probablemente con el ARNdc (47). Estos datos, junto con el hecho de que VP2 es una proteína relativamente abundante (12 %) de la cápside viral, son consistentes con la hipótesis de que VP2 es un componente del *core* que interactúa con el genoma viral.

VP3: codificada por el sg 3, de aproximadamente 2500 nt, tiene un PM de 88 kDa y se diferencia del producto proteico del gen 4 (VP4), con el cual comigra generalmente en geles de poliacrilamida, en que es una proteína del *core* y es resistente al tratamiento con tripsina (49). Se ha sugerido que VP3 podría funcionar como la ARN polimerasa asociada al virión, teniendo en cuenta su localización y la observación de que mutantes termosensibles del virus SA11 que mapean en el sg 3 (50) presentan bajo nivel de síntesis de ARNsc y ausencia de síntesis de ARNdc a la temperatura no permisiva (51).

VP6: es una proteína de 45 kDa, codificada por el sg 6 que tiene un tamaño de 1356 nt (52, 53, 54). Es un componente importante del virión, no sólo por razones cuantitativas (VP6 da cuenta de un 80 % de la masa proteica de partículas simple cubierta) (55), sino también por su papel antigénico (ver sección I.2.5.) y su posible participación en actividades enzimáticas esenciales para el virus. Esta proteína se requiere para la actividad de ARN polimerasa, y posiblemente para la de otras enzimas involucradas en el procesamiento y modificación del ARN viral. Se ha encontrado que VP6 está presente en los viriones como trímeros (56). Los oligómeros libres de VP6 representarían una etapa temprana en la interacción proteína-proteína en la morfogénesis viral, lo que podría ser sucedido por su asociación con otras proteínas del *core* (VP1, VP2, VP3), o con segmentos genómicos o transcritos de ARN.

2.4.3. Proteínas no estructurales

VP5: es el producto del sg 5 (1581 nt) y tiene un PM de 54 kDa (57). La secuencia nucleotídica del sg 5 indica la presencia de 4 sitios putativos de N-glicosilación; sin embargo, no existe evidencia alguna de que este polipéptido esté glicosilado (57).

VP8: está codificada por el sg 7 de la cepa bovina UK (58) que corresponde al sg 8 de la cepa de simio SA11 (59). El gen presenta un marco abierto de lectura de 951 nt. VP8 tiene la propiedad de unirse a ARN, por lo que se ha sugerido que sería requerida para la síntesis de ARNdc en células infectadas (60).

VP9: este polipéptido, conocido también como NS34, está codificado por el sg 9 de la cepa bovina UK (61) y el sg 7 de la cepa de simio SA11 (62), y tiene un marco abierto de lectura de 930 nt. VP9, junto con VP8, serían requeridas para la etapa de replicación viral.

VP10: esta proteína, también conocida como NS28 y como NCV5 (26), es una glicoproteína de 28 kDa de PM codificada por el sg 10 (751 nt) que deriva de un precursor de 20 kDa (denominado VP12). VP10 contiene oligosacáridos de tipo "alta manosa", un hecho consistente con su localización exclusiva en el R.E.R. (63). La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica de clones

de ADNc del gen 10, revelaron la existencia de 3 secuencias de carácter hidrofóbico (H1, H2, H3) dentro de la región NH₂-terminal de la proteína (64, 65, 66). En el sg 10 existen tres codones potenciales de iniciación en fase, siendo el primero aquél con la secuencia consenso más fuerte para iniciación de la traducción (37), a partir del cual se traduce una proteína de 175 aminoácidos. Los residuos asparagina 8 y asparagina 18 están glicosilados, indicando que ninguno de estos dominios NH₂-terminales es clivado y que están orientados hacia el lumen del R.E.R. (40, 63). La región COOH-terminal de la proteína es sensible a proteasas, lo que demuestra que está localizada hacia el lado citoplasmático de la membrana. Se ha demostrado que el dominio citoplasmático de esta proteína de transmembrana está involucrado en la interacción con el *core* viral, actuando como receptor del mismo durante el proceso de brotación (*budding*) en el R.E. (67).

VP11: esta proteína está codificada por el sg 11 (663-667 nt), el cual tiene un marco abierto de lectura para un polipéptido de 197-198 aminoácidos dependiendo de la cepa (68). De acuerdo a la secuencia aminoacídica, el producto del gen 11 posee un sitio putativo de N-glicosilación. Sin embargo, no existen hasta el momento evidencias sobre las modificaciones post-traduccionales de esta proteína, ni sobre su rol durante el ciclo viral.

Uno de los objetivos de esta Tesis fue caracterizar esta proteína viral.

2.4.4. Enzimas asociadas al virión

2.4.4.1. ARN Polimerasa ARN dependiente

La ARN polimerasa viral ARN dependiente está asociada al *core* viral. Esta enzima, asociada a la síntesis de ARN cadena (+), se activa *in vitro* cuando se disocia la cubierta externa de partículas virales completas por tratamiento con calor o con agentes quelantes de calcio como EDTA. La actividad de polimerasa requiere la presencia de los 4 NTPs, un pH óptimo de 8.5 y una concentración de Mg²⁺ de aproximadamente 8-10 mM (17). La adición de actinomicina D o α -amanitina no inhibe la actividad de la polimerasa (17, 69).

Hasta el momento se desconoce cuál o cuáles son los genes que codifican para la ARN polimerasa viral y si la actividad de ARN transcriptasa [síntesis de cadena (+)] y la actividad de ARN replicasa [síntesis de cadena (-)], ambas observadas durante el ciclo viral, corresponden a la misma proteína.

Mezclas conteniendo VP6 purificada y ARN genómico carecen de actividad de ARN polimerasa *in vitro*. Sin embargo, la actividad de transcriptasa se recupera parcialmente cuando VP6 se reasocia con el *core*, lo que indicaría que más de una proteína de las partículas de simple cubierta (incluyendo la mayoritaria) es requerida para la actividad enzimática, o que la proteína mayoritaria induce un cambio conformacional importante para el funcionamiento de la polimerasa (70).

La determinación de la secuencia del sg 1 ha permitido observar que VP1 presenta homología con las ARN polimerasas ARN dependientes de varios virus a ARN (44), lo que la señala como el principal candidato a la polimerasa de rotavirus.

TABLA II
POLIPEPTIDOS CODIFICADOS POR EL GENOMA DE ROTAVIRUS

Segmento genómico	PM estimado del producto primario	Modificación post-traducciona	PM estimado del producto modificado	Localización
1	125 (VP1)	ninguna		E,I
2	102 (VP2)	clivada	88 (VP3 [*]) 84 (VP4 [*])	E,I
3	88 (VP3)			E,I
4	88 (VP4)	clivada	60 (VP5 [*]) 28 (VP8 [*])	E,E
5	53 (VP5)	ninguna		NE
6	45 (VP6)	ninguna		E,I
7	34 (VP9)	ninguna		NE
8	35 (VP8)	ninguna		NE
9	35.5 (VP7)	N-glicosilación	38	E,E
10	20 (VP10)	N-glicosilación	28	NE
11	26 (VP11)	O-glicosilación ^a	28 ^a	NE

La modificación de VP11 así como el tamaño del producto modificado fueron determinados en esta Tesis.

E,I: proteína viral estructural de la cápside interna

E,E: proteína viral estructural de la cápside externa

NE: proteína viral no estructural

En otros virus de la familia *Reoviridae* se ha podido identificar el gen que codifica para la ARN polimerasa (transcriptasa) encontrándose 50 % (incluyendo cambios conservativos) de homología a nivel aminoacídico con la ARN polimerasa ADN dependiente de vaccinia. Esto sugeriría la conservación de los genes de la ARN polimerasa en virus con genomas muy diferentes (71). En el virus a ARNdc L-A de *Saccharomyces cerevisiae* se ha identificado el gen que codifica para una proteína de 180 kDa, la cual parece funcionar como la ARN polimerasa (72), ya que presenta alta homología con las secuencias consenso de ARN polimerasas ARN dependientes (73, 74).

2.4.4.2. Poliadenilato [poli(A)] polimerasa

Si bien tanto los transcritos como los segmentos genómicos de rotavirus carecen de la secuencia 3' terminal de poli(A) (75), Gorziglia & Esparza (76) detectaron la actividad de poli(A) polimerasa en partículas completas (de doble cubierta) en rotavirus humano aislado de materia fecal, pero no la pudieron detectar en rotavirus bovino adaptado a cultivo. Las condiciones de la reacción fueron las mismas que las establecidas para la actividad de poli(A) polimerasa de reovirus (77), donde se ha sugerido que ésta podría ser una actividad alternativa de la transcriptasa. Sin embargo, estos resultados necesitan un análisis más profundo teniendo en cuenta que esta actividad fue solamente detectada en una muestra de materia fecal, donde los rotavirus coexisten frecuentemente con otros virus.

2.4.4.3. Otras enzimas asociadas al virión

Estudios realizados en virus de la familia *Reoviridae*, tales como los reovirus y los virus de polihedrosis citoplasmáticos, demostraron la presencia de enzimas como la nucleótido fosfohidrolasa, la guanil y las metil transferasas, las cuales son requeridas para la formación de los ARNm específicos con secuencia 5' terminal metilada (*cap*) (78).

Hasta el momento no se han realizado en rotavirus determinaciones de la actividad de estas enzimas, y tampoco existe demostración directa alguna de que haya modificación y metilación de los extremos 5' (*capping*) de los ARNm virales.

2.5. Determinantes antigénicos

Las infecciones por rotavirus generan la producción en el huésped de un espectro de anticuerpos contra componentes virales estructurales y no estructurales. Existen varias especificidades antigénicas asociadas a las partículas virales, que determinan la clasificación serológica de los rotavirus en **grupos, subgrupos y serotipos**.

2.5.1. Determinantes de grupo

El género rotavirus se clasifica en seis serogrupos (A-F) en base a antígenos específicos localizados en la proteína de la cápside interna VP6 (79). El grupo A constituye la mayoría de los rotavirus que han sido estudiados hasta el momento, los cuales pueden ser asignados a por lo menos 9 serotipos diferentes (ver más adelante). Los rotavirus pertenecientes a los grupos B a F han sido

aislados con menor frecuencia, posiblemente porque son menos virulentos, o porque éstos escapan a los ensayos de diagnóstico clásicos, los cuales se basan en la detección del antígeno común del grupo A. Por esta razón, han sido también denominados **rotavirus atípicos, antigénicamente distintos, o rotavirus grupo no A** (80). Además, el electroferotipo de los rotavirus atípicos es característicamente diferente al de los grupo A (ver sección I.2.3).

Los rotavirus grupo B están frecuentemente asociados a enteritis aguda fatal en ovejas neonatas en Inglaterra y Gales, y de hecho son los rotavirus más comunes asociados a diarrea en ovejas (81). Un rotavirus atípico perteneciente al grupo B (el virus ADRV) causó recientemente una epidemia de diarrea severa en humanos adultos en China (82, 83, 84).

Como se muestra en la Tabla III, los rotavirus pertenecientes al grupo B, C, y E han sido aislados de cerdos. Se ha establecido que los virus grupo C de humanos y de cerdos están antigénica y genéticamente relacionados (85).

TABLA III

ESPECIES ANIMALES DE LAS CUALES SE HAN AISLADO ROTAVIRUS ATIPICOS

Serogrupo

A	B	C	D	E	F
Muchas especies	Cerdos Terneros ^a Ovejas ^a Humanos ^b	Cerdos Humanos ^c	Pollos	Cerdos	Pollos

^a Referencia 86

^b Referencias 87, 88

^c Referencia 85

2.5.2. Determinantes de subgrupo

Dentro del serogrupo A, otros determinantes de VP6 especifican uno de los dos subgrupos de rotavirus (I y II). VP2, otro polipéptido de la cápside interna, está probablemente también involucrada en la especificidad de subgrupo (89). Se ha encontrado que VP2 y VP6 son los dos polipéptidos virales inmunodominantes que son detectados en todos los sueros (90). Se desconoce si la alta respuesta de anticuerpos dirigidos contra VP6 y VP2 reflejan una alta inmunogenicidad de estos polipéptidos o el hecho de que VP2 y VP6 comprenden casi 100 % de las proteínas de las partículas de simple cubierta.

2.5.3. Determinantes de serotipo

Un mayor grado de discriminación entre las distintas cepas virales se obtiene por el criterio de serotipos. Estos se definen en ensayos de neutralización *in vitro* por reducción del número de placas virales utilizando sueros hiperinmunes (91).

Las dos proteínas principales de superficie, VP4 y VP7, son los antígenos de neutralización. Estudios recientes han establecido que las especificidades de neutralización de VP7 y de VP4 segregan independientemente en la naturaleza y que, además, VP4 es tan inmunogénica como VP7 (92).

Hasta el momento se han identificado 9 serotipos diferentes, de los cuales 6 pertenecen a humanos (serotipos 1-4, 8 y 9) (93, 94, 95). En animales se han identificado por lo menos 5 serotipos (serotipos 3-7), dos de los cuales (serotipos 3 y 4) han mostrado reacción cruzada con los serotipos de rotavirus humanos en ensayos de neutralización (96). De lo expuesto anteriormente se deduce que los serotipos no correlacionan ni con la especie, ni con la especificidad de subgrupo.

Utilizando análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de VP7 de distintos serotipos de rotavirus de origen animal y humano, se identificaron regiones en la proteína que divergen en secuencia (97). Se propusieron 6 regiones serotipo específicas, las cuales se designaron A, B, C, D, E y F (aminoácidos 39-50, 87-101, 120-130, 143-152, 208-221 y 233-242, respectivamente). Cuando las mismas regiones se compararon entre rotavirus pertenecientes a un mismo serotipo, se encontró un alto grado de homología (91-99 %). Estas observaciones indican que las diferencias en la especificidad de serotipo entre rotavirus son el resultado de divergencia de secuencia en las regiones serotipo específicas propuestas, y que estas regiones están conservadas en los miembros de un mismo serotipo, independientemente del lugar de origen, del año de aislamiento o de la especie. En base a estas observaciones se propuso que es posible predecir el serotipo de un aislamiento viral por comparación de la secuencia de VP7 de ese aislamiento con la de un virus de referencia de cada serotipo (91).

3. CICLO DE REPLICACION VIRAL

3.1. Cinética de crecimiento

Los mecanismos moleculares del ciclo de replicación de los rotavirus no han sido analizados en detalle hasta el momento. Debido a su gran similitud con el genoma de los reovirus de mamíferos, cuyo ciclo de replicación ha sido bien estudiado (98), se ha asumido que los rotavirus se replican utilizando básicamente la misma estrategia que los reovirus (60).

Los rotavirus, al igual que otros miembros de la familia *Reoviridae*, se replican por un mecanismo completamente conservativo por el cual los segmentos de ARNdc se sintetizan asimétricamente (98, y fig. 3). Este mecanismo involucra como primer etapa la **transcripción del ARNdc genómico** por la ARN polimerasa asociada al virión para generar ARNm [cadena(+)]. Estos ARNm cumplen dos funciones: son traducidos para producir las proteínas virales, y además sirven como **templado para la síntesis de cadenas (-) (replicación)**, dando así origen a la progenie de ARNdc.

Pocos trabajos describen la cinética de crecimiento de los rotavirus. Un estudio reciente (60) ha permitido concluir que existe regulación cualitativa y cuantitativa de la transcripción. Se observó control cualitativo solamente cuando se utilizó cicloheximida como inhibidor de la síntesis proteica. En este caso se vio que la transcripción de 4 genes virales (sg 5, 6, 7, y 9) era independiente de la síntesis proteica. La regulación cuantitativa se demuestra por la acumulación de altos niveles de ARNm de algunos genes virales como los sg 2 y 7 a diferencia de los bajos niveles detectados de los ARNm de los sg 4, 6 y 10. Además, se encontró que existe control a nivel de traducción del genoma viral, siendo VP6 y VP10 las dos proteínas que se producen en exceso con respecto al resto de las proteínas virales. Sobre la base del patrón temporal de síntesis de la cadena (-), los segmentos genómicos se pueden dividir en cuatro grupos. En el primero, que comprende a los genes 2 y 9, el ARN cadena (-) puede ser detectado a las 1.5 horas post-infección (h.p.i.). La cadena (-) del único miembro del segundo grupo, el sg 1, comienza a acumularse a las 3.5 h.p.i.. El tercer grupo consiste de los genes 6, 3 y 4, y 11, cuya acumulación se detecta primeramente a las 4.5, 6.5, y 7.5 h.p.i., respectivamente. La acumulación de la cadena (-) de los genes del último grupo (sg 5, 7, 8, y 10) es lenta en comparación con la de los otros grupos y alcanza los niveles finales más bajos.

3.2. Eventos tempranos en la infección viral

Los eventos tempranos en la infección viral incluyen la **adsorción y la penetración viral, y la pérdida de la cubierta viral externa (uncoating)**.

Se asume que el alto grado de especificidad de huésped celular que presentan los rotavirus depende solamente de la especificidad con que se produce el fenómeno de adsorción, y no de los eventos intracelulares subsiguientes (3).

Luego de la unión a la superficie celular, el virus debe pasar a través de la bicapa lipídica celular y desorganizar su cubierta proteica de manera que el genoma viral pueda transcribirse y replicarse.

Existe información detallada sobre el mecanismo de penetración de muchos virus con envoltura (99, 100, 101), sin embargo, el mecanismo por el cual los virus icosaédricos (sin envoltura) penetran en la célula y pierden su cubierta es menos conocido. A diferencia de lo que ocurre con los virus que entran por endocitosis, la entrada de rotavirus a la célula no es sensible a bases débiles ni a inhibidores de la endocitosis (azida de sodio, dinitrofenol) (102), lo que sugeriría, junto con resultados de microscopía electrónica, que los rotavirus entran a la célula por penetración directa de la membrana celular, luego del clivaje trípico de VP4. Por microscopía electrónica se ha demostrado que las partículas virales se adsorben a la membrana citoplasmática de la célula huésped, tanto *in vitro* (103) como *in vivo* (104). En este último caso, las partículas virales se asocian a la punta de las microvellosidades del intestino.

Según estudios realizados (3), tan pronto como la partícula deja la zona extracelular donde la concentración de calcio es relativamente alta, y pasa al citoplasma, donde la concentración de calcio se mantiene inferior a $1 \mu\text{M}$, la cápside externa se disocia y se activa la polimerasa endógena.

3.3. Transcripción

Luego de la pérdida de la cubierta externa, se inicia inmediatamente en el citoplasma la síntesis de ARNm usando como templado la cadena (-) del ARNdc de cada uno de los segmentos genómicos. Si bien los transcriptos no tienen poli(A) en su extremo 3', pueden funcionar como mensajeros dirigiendo la síntesis de los polipéptidos virales tanto *in vivo* como en sistemas de traducción libres de células (105, 106).

Por estudios de traducción *in vitro* de ARNm virales, se ha observado que la traducción de todos los productos primarios se estimula por la presencia de S-adenosil metionina (SAM) (2), lo que sugeriría que los transcriptos virales podrían tener extremos 5' metilados. SAM no estimula la actividad de ARN polimerasa y, salvo una traducción más eficiente, no se detectan diferencias en los transcriptos sintetizados en la presencia o en la ausencia de SAM (105). Se desconoce si la mayor eficiencia de traducción de los transcriptos sintetizados en la presencia de SAM refleja una mayor estabilidad de los transcriptos o una iniciación más eficiente de la traducción.

3.4. Biosíntesis de polipéptidos

Si las células se infectan a una alta multiplicidad de infección como para producir una inhibición rápida de la síntesis proteica celular, las proteínas virales se pueden detectar a las 4 h.p.i. (22). Estudios ultraestructurales sugieren que tanto la transcripción como la biosíntesis de polipéptidos tienen lugar en o alrededor de áreas moderadamente electrodensas, granulares o finamente fibrilares denominadas **viroplasm**s o inclusiones virales. Estas se asemejan a las "factorías" virales observadas en células infectadas con reovirus o con orbivirus (3). La composición proteica de los viroplasm no es conocida, aunque deben de incluir algunas de las proteínas no estructurales.

3.5. Síntesis de ARNdc viral (replicación)

Se ha propuesto que la síntesis de ARNdc a partir de ARNm [cadena(+)] tiene lugar en partículas denominadas **replicasa** (45). Se ha encontrado que estas partículas contienen las proteínas virales estructurales VP1, VP2 y VP6; las mismas proteínas que se encuentran en partículas de simple cubierta. Sin embargo, las partículas de replicasa son únicas ya que contienen además las proteínas VP8 y VP9, y tienen una densidad en gradientes de CsCl que excede a la de las partículas de simple cubierta. La alta densidad de las partículas de replicasa se debe en parte a la presencia de ARNsc asociado a las mismas. Estos ARNsc podrían servir como templados para la síntesis de ARNdc. Estudios de marcación y seguimiento *in vivo* indicaron que tan pronto como los ARNsc se replican, las partículas de replicasa maduran rápidamente a estructuras idénticas en densidad a las partículas de simple cubierta. Teniendo en cuenta el hecho de que VP6 es requerida para la actividad de transcriptasa en partículas de simple cubierta (70), y que mutantes termosensibles que mapean en el sg 6 son negativas para la síntesis de ARNdc a la temperatura no permisiva (46), se puede concluir que la

presencia de VP6 es probablemente requerida para la actividad de replicasa. Sin embargo, se desconoce si existe una cubierta completa de VP6 alrededor de las partículas de replicasa. Se ha propuesto que, durante la replicación del ARN de rotavirus, el ARNm viral que sirve como templado para la síntesis de ARNdc es secuestrado dentro de las partículas de replicasa a medida que es replicado por la polimerasa viral.

Por otra parte es bien conocido el hecho de que todos los segmentos genómicos presentan secuencias 5' y 3' conservadas (107, 108), lo que es probablemente un requerimiento general de virus que tienen un genoma a ARN segmentado y que llevan su propia ARN polimerasa. Estas secuencias terminales conservadas deben ser importantes como sitios de reconocimiento para la iniciación de la síntesis de ARNm, la replicación del ARN, o como señales de reconocimiento para el ensamblado de los segmentos genómicos.

3.6. Ensamblado

La morfogénesis de rotavirus parece ser única dentro de la familia *Reoviridae*, ya que por el proceso de brotación (*budding*) en el R.E.R. las partículas virales se acumulan en vesículas de membrana. Partículas desprovistas de la cubierta externa se ensamblan primero en los "viroplasmias" en la periferia del núcleo y luego brotan al R.E.R. (2). La envoltura de membrana adquirida durante este proceso se pierde a medida que las partículas se mueven hacia el interior del R.E. y, en lugar de esta membrana, los viriones adquieren las proteínas virales de superficie y el virus maduro se acumula en el espacio luminal hasta que se produce la lisis celular.

La brotación del *core* viral y la subsiguiente envoltura transiente por la membrana del R.E.R. es un paso clave en la serie de eventos y parece involucrar la interacción del *core* con la proteína no estructural VP10 que actúa como receptor del mismo.

Se ha tratado de elucidar los parámetros que afectan la estabilidad del virus, y los que gobiernan el proceso de maduración. Se ha encontrado que los iones Ca^{2+} juegan un papel importante en la morfogénesis de los rotavirus, ya que en ausencia de Ca^{2+} la producción de partículas infectivas está totalmente inhibida, mientras que la síntesis global de proteínas virales no se ve afectada (109). Además, los iones Ca^{2+} son incorporados al virión, lo que es consistente con estudios previos donde los agentes quelantes producían la desintegración de los virus.

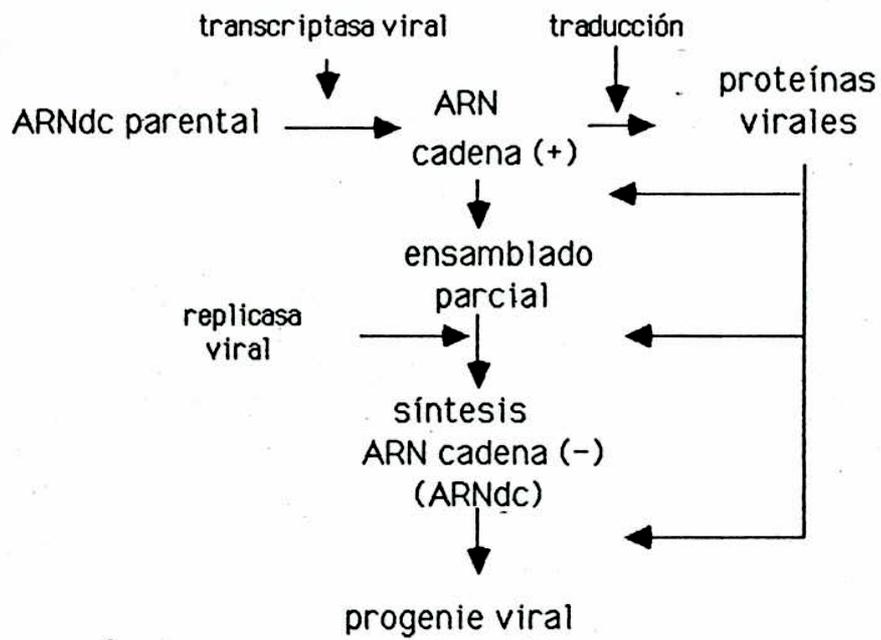


FIGURA 3 Diagrama esquemático del flujo de eventos durante el ciclo de replicación de rotavirus.

4. EVOLUCION DE LOS ROTAVIRUS

4.1. Mecanismos de variabilidad genómica

Aunque no se ha encontrado explicación para la evolución de virus que exhiben un alto grado de variabilidad genómica como los rotavirus, se han propuesto varios mecanismos. (i) Los rotavirus poseen una ARN polimerasa ARN dependiente codificada y asociada al virión, que, como otras ARN polimerasas virales presentan poca fidelidad y podrían por lo tanto proveer numerosas mutantes en un breve período de tiempo (110, 111, 112). De hecho, se han encontrado mutaciones puntuales secuenciales en aislamientos obtenidos con una diferencia de meses (113). (ii) Dado que los rotavirus tienen un genoma segmentado, éstos pueden evolucionar por intercambio de segmentos virales (*reassortment*) entre distintas cepas por coinfección (114). (iii) Los rotavirus pueden mutar mediante reordenamientos genómicos, cuyo mecanismo ha sido investigado en esta Tesis. (iv) Una combinación de los mecanismos descritos anteriormente podría ser operativo.

4.2. Fidelidad de la ARN polimerasa

La rápida velocidad de evolución del genoma de los virus a ARN se debe en parte a la menor fidelidad de la ARN polimerasa en comparación con la ADN polimerasa (110, 111). Mientras que la frecuencia de mutación para genomas de ADN ha sido estimada entre 10^{-7} - 10^{-11} por base por replicación, la frecuencia de error para las ARN polimerasas está estimada en 10^{-4} errores por nt por ciclo de replicación. Se ha propuesto que este alto grado de mutación es el que establece un límite superior para el tamaño de los genomas de los virus a ARN (111). La fidelidad limitada de las ARN polimerasas refleja la falta de mecanismos efectivos de corrección de la síntesis (*proofreading*). Aunque se han encontrado evidencias de excisión 3'→5' para la polimerasa del virus de influenza (115) no se ha demostrado aún la existencia de un mecanismo de corrección de síntesis de la cadena creciente de ARN.

4.3. Recombinación de la información genética en rotavirus

La forma más común de recombinación entre virus a ARN es la segregación independiente de distintos segmentos genómicos virales durante una infección mixta para producir una progenie viral con características de ambos virus parentales (*reassortment*).

La naturaleza segmentada de los rotavirus permite que éstos intercambien segmentos genómicos *in vivo* e *in vitro* (por coinfección de un cultivo de células) (114, 116, 117), ya que solamente se empaqueta una copia de cada gen. La propiedad de *reassortment* ha sido aprovechada para crecer en cultivo de células rotavirus no adaptables a cultivo por coinfección con virus que crecen eficientemente (114). Asimismo los virus *reassortants* han sido útiles para determinar la asignación codificante de segmentos genómicos (114, 116) y son candidatos potenciales para producción de vacunas (ver sección I.5.3.).

4.4. Heterogeneidad del genoma de rotavirus

Debido a la alta frecuencia de mutación, cualquier población de virus a ARN, aun una población derivada de un único clon viral, consiste de individuos que difieren en su composición nucleotídica; esta distribución de variantes genómicas puede variar en el tiempo y las variantes que aparecen están en equilibrio dinámico transiente compitiendo con todas las variantes de la población (concepto de *cuasiespecie*) (112).

En el caso de los rotavirus, se ha observado heterogeneidad del genoma en virus aislados de terneros (118) y de monos (119), y se vio que esto se debe a la presencia de diferentes subpoblaciones de virus en el mismo aislamiento. También se ha visto que dentro de una comunidad en un período determinado del año pueden circular virus con distintos electroferotipos (120). Inclusive 10 % o más de las muestras clínicas presentan más de 11 segmentos (121, 122). Esto se explica por coinfección del huésped con dos o más cepas de rotavirus. Si se forman *reassortants* estables durante la coinfección, se podrían originar nuevas cepas de rotavirus. Ciertas cepas de rotavirus humanos y de animales parecen haberse originado de esta forma (123).

4.5. Reordenamientos genómicos en rotavirus

4.5.1. Reordenamientos genómicos en rotavirus de distintas especies

Los reordenamientos genómicos en rotavirus se caracterizan por la desaparición de segmentos genómicos propios de un perfil electroforético normal, y por la aparición de segmentos de mayor tamaño. Los reordenamientos genómicos en rotavirus han sido descritos en humanos inmunocompetentes, ya sea acompañado de diarrea (124), o sin síntomas clínicos (125), en niños inmunodeficientes crónicamente infectados (126), en conejos (127), en terneros (128), y más recientemente en porcinos (129). En estos casos los segmentos involucrados en los reordenamientos son el sg 8, 10, u 11. También se han obtenido virus presentando reordenamiento genómico del sg 5 por pasajes seriados *in vitro* a alta multiplicidad de infección (130).

Además, estos virus con material genético adicional son indistinguibles en forma y tamaño de un virus normal (129).

En los casos estudiados hasta el momento se encontró que en virus con reordenamientos genómicos el perfil electroforético de proteínas virales no se presenta aparentemente alterado con respecto al de los virus normales, lo que sugeriría que los marcos de lectura en los genes reordenados son los mismos que en los genes normales correspondientes, y que su expresión no se ha alterado. En un caso de reordenamiento genómico del sg 5 no se encontró evidencia del producto codificado por este gen (130). Sin embargo, hasta el momento no se ha utilizado un anticuerpo específico dirigido a la proteína del gen involucrado en el rearrreglo que permitiera demostrar inequívocamente la presencia o ausencia de la proteína en los virus con reordenamiento genómico.

4.5.2. Reordenamientos genómicos en otros miembros de *Reoviridae*

Se han obtenido preparaciones de virus pertenecientes a otros géneros de la familia *Reoviridae* que presentan un perfil de ARNdc genómico atípico. En el caso de los reovirus se han generado mutantes de delección de los segmentos L₁, L₃ y M₁ por pasaje seriado en cultivo de células (131, 132, 133). En el virus del tumor de las heridas se han aislado ARNdc derivados por delecciones internas del genoma viral (134). En una variante australiana de orbivirus se encontró un segmento genómico que era resultado de la delección del segmento 9 normal, el cual daba como producto una proteína de 32 kDa en lugar de la proteína normal de 38 kDa detectada en la cepa salvaje (135). Se sugirió que la proteína de 32 kDa podría reemplazar funcionalmente a la normal. Se han aislado también variantes de orbivirus conteniendo concatémeros del segmento genómico normal, los cuales son funcionales y capaces de reemplazar a los segmentos normales. Estudios de mapeo con RNasa T₁ sugirieron que estos ARN son dímeros en orientación cabeza-cola. La generación de estos dímeros no parece resultar en nuevos productos, sino en información genética silenciosa presumiblemente 3' distal de la región codificante normal del segmento correspondiente.

5. BIOLOGIA DE LOS ROTAVIRUS

5.1. Enfermedades y patogénesis

Los rotavirus son los principales agentes causantes de diarrea aguda no bacteriana en niños lactantes y en animales jóvenes de muchas especies (1, 2, 3), aunque síntomas similares son también producidos por los coronavirus y ciertas bacterias, siendo la enfermedad más severa causada por infecciones múltiples. En terneros y cerdos particularmente, la enteritis por infección con rotavirus causa grandes pérdidas económicas, ya sea por muerte como por retraso en la ganancia de peso de los animales que se recuperan de la infección.

5.1.1. Diarrea epizootica de ratones infantiles

La infección murina por rotavirus puede constituir el principal problema en criaderos de ratones, ya que es altamente contagiosa y difícil de erradicar. El período de incubación es de aproximadamente de 2 días en ratones de 3-16 días de edad, provocando diarrea y deshidratación. La susceptibilidad a enfermedades sintomáticas depende marcadamente de la edad, y ratones adultos pueden tener infecciones asintomáticas (136).

5.1.2. Diarrea del ganado

En infecciones experimentales con altas dosis de virus, la enteritis bovina causada por rotavirus puede aparecer en un período de tiempo de 13 horas. En orden de aparición, los síntomas que se presentan son depresión, anorexia, y diarrea con heces blancas o amarillas en un tiempo de 6-12 horas. Los terneros pueden morir como consecuencia de deshidratación o infección bacteriana secundaria, o pueden recuperarse en 3-4 días. Las infecciones naturales parecen ser más frecuentes en la segunda semana de vida (137).

5.1.3. Enteritis de cerdos

La enfermedad ocurre en cerdos de 1-8 semanas de edad, poco tiempo después del destete, especialmente si es temprano o abrupto (138). Los síntomas incluyen anorexia, diarrea y vómitos, luego de un período de incubación de 1 a 2 días, pudiendo causar deshidratación severa o una seria depresión en la ganancia de peso.

5.1.4. Enfermedad en otros animales domésticos y en aves

Los rotavirus están asociados a diarrea en potrillos. En pollos y pavos, existen por lo menos 3 serotipos de rotavirus que están asociados a síntomas de diarrea, apetito pobre o anormal, deshidratación y mortalidad elevada (3). Los rotavirus atípicos de pollos parecen no causar enfermedad severa.

5.1.5. Enteritis infantil

5.1.5.1. Características clínicas

Las características clínicas de la enteritis humana producida por rotavirus han sido descritas en detalle por varios investigadores (139, 140). Luego de un período de incubación de 1-2 días, se observa diarrea y vómitos, y puede haber fiebre (38-39 °C). La diarrea dura aproximadamente 4-5 días, y es común la deshidratación moderada. La enfermedad severa es más frecuente en bebés de 6-18 meses de edad. Puede sobrevenir la muerte por deshidratación rápida y severa, por lo que esta enfermedad es la principal causa de mortalidad infantil en muchas partes del mundo.

Por otra parte, las infecciones asintomáticas en neonatos parecen ser frecuentes (141). En niños inmunodeficientes se han observado diarreas que duran un largo período de tiempo con excreción de rotavirus por más de 6 semanas y detección de antígenos virales en suero (142).

5.1.5.2. Patogénesis y patología

El patrón general de infección por rotavirus comprende la penetración viral y la infección de las células epiteliales que tapizan las mitades apicales de las vellosidades del intestino delgado (2). Los rotavirus se multiplican en el citoplasma de estas células, lo que resulta en un daño tanto de las funciones de absorción como de las digestivas. Las células dañadas son liberadas al lumen del intestino delgado y la lisis de las mismas libera el virus por lo cual se detectan grandes cantidades de partículas virales en las heces de los individuos infectados. Las células de absorción diferenciadas de las vellosidades son reemplazadas por las células epiteliales inmaduras de las criptas que, si bien no son susceptibles al virus, no pueden compensar inmediatamente el defecto de absorción (143). La infección progresa desde la porción superior del intestino delgado a la inferior. Las células epiteliales inmaduras que reemplazan a aquellas destruidas por el virus presentan bajos niveles de disacaridasas, incluyendo la lactasa, y el transporte de sodio acoplado a glucosa también se ve dañado (144). Las vellosidades retornan a su estado normal en un período de 3-4 semanas.

Se han demostrado dos etapas en el período de recuperación (3). La primera es no inmune en la naturaleza y es probablemente debida a la pérdida de las células susceptibles a los rotavirus, y posiblemente, a la producción de interferón. En la segunda fase se observa la eliminación final del virus, seguida por la producción de anticuerpos locales.

5.2. Epidemiología

5.2.1. Modo de transmisión

Dado que los rotavirus se replican en las células epiteliales del intestino, las heces son la fuente de infección, ya que contienen grandes cantidades de partículas virales. Por otra parte, los rotavirus son muy estables, dado que su estructura, y por lo tanto su naturaleza infectiva, se preserva en las heces de los animales jóvenes debido a su alto contenido de calcio (145). Existen así más de un modo posible de transmisión, y es difícil determinar cuál es el más importante.

Se ha postulado que la transmisión aérea por el polvo o por pequeñas gotas explicaría la diseminación eficiente de los rotavirus murinos de una jaula a otra (146). Asimismo se ha sugerido que la transmisión de rotavirus humanos en hospitales podría ser por vía aérea.

Los rotavirus también pueden ser transmitidos por agua, ya que se sabe que los rotavirus infectivos pueden sobrevivir en el agua por períodos prolongados, y que son altamente resistentes a la clorinación (147). En el caso de los animales domésticos, la forma de transmisión parece ser por contacto directo con individuos infectados o con el ambiente contaminado; este último caso sería la idea favorecida para las infecciones en hospitales.

5.2.2. Incidencia de las infecciones

En general, las infecciones por rotavirus sintomáticas ocurren en neonatos o animales muy jóvenes, pero pueden ocurrir repetidas infecciones a diferentes edades sin tener síntomas. A diferencia de lo que ocurre en otros animales, y por razones desconocidas, las infecciones neonatales humanas son suaves o asintomáticas, mientras que las infecciones más serias ocurren en el grupo de 6 meses a 2 años de edad (148). Posiblemente, un nivel muy alto de anticuerpos circulantes adquiridos a través de la placenta es responsable de la relativa resistencia a la enfermedad durante la reinfección neonatal, pero esto no ha sido aún demostrado.

Se han informado infecciones por rotavirus sintomáticas y asintomáticas en adultos, ya sea en personal de hospitales, adultos en contacto con pacientes pediátricos, o en viajeros adultos (149).

En países con clima templado, existe un pico de infección en invierno. Sin embargo, en zonas tropicales, las infecciones ocurren frecuentemente a lo largo del año.

El nivel de inmunidad, especialmente la inmunidad pasiva en animales jóvenes, afecta la incidencia de la infección. Esto ha sido observado en ratones, donde las progenies sucesivas de una misma madre muestran síntomas más suaves, y en humanos, donde hay una reducida incidencia de infecciones en bebés que son alimentados con leche materna (150).

5.3. Perspectivas de control

Se ha mostrado gran interés en la posibilidad de desarrollar vacunas que estimulen la inmunidad entérica local, ya que la experiencia alcanzada hasta el momento sugiere que las mejoras en la higiene de granjas, casas, u hospitales no pueden controlar completamente las infecciones por rotavirus.

Las estrategias seguidas incluyen la utilización de cepas virales atenuadas, de virus *reassortants*, y la producción de proteínas virales en sistemas de expresión bacterianos o eucarióticos; sin embargo, no se conocen los mecanismos inmunológicos y no inmunológicos que son críticos para inducir protección contra la infección por rotavirus (79).

El objetivo de una vacuna contra rotavirus debe ser el prevenir la gastroenteritis aguda durante los dos primeros años de vida, período durante el cual la enfermedad es más severa. Algunas observaciones sugieren que la efectividad de una vacuna contra rotavirus depende, en gran medida, de su capacidad de estimular en humanos anticuerpos IgA en intestino y de otras formas de inmunidad local. Por tal razón, los estudios de inmunoprofilaxis experimental están dirigidos principalmente al desarrollo de vacunas con virus atenuados.

Teniendo en cuenta que los rotavirus de origen animal y humano muestran reactividad serológica cruzada a nivel del antígeno de grupo de la cápside interna (sección 2.5.1.), se han utilizado como vacunas cepas animales atenuadas para humanos.

La cepa bovina NCDV fue atenuada por 147 pasajes en cultivo de tejido y la nueva cepa fue denominada RIT 4237 (151). Esta cepa, altamente atenuada, indujo protección cruzada contra infecciones con rotavirus humanos en un modelo animal de cerdos (80). Cuando se administró a niños entre 6 y 12 meses de edad produjo infección intestinal asintomática con baja proporción de excreción viral y con producción de anticuerpos en más de 80 % de los sujetos seronegativos inicialmente. Por desafío con rotavirus humano tal vacunación confirió 80 % -90 % de protección contra diarrea severa, independientemente del serotipo del rotavirus humano.

La cepa de mono rhesus RRV-1, menos atenuada que la RIT 4237, es más infectiva para el hombre y la multiplicación viral en el intestino resulta en la excreción del virus acompañada de algunos síntomas clínicos, principalmente fiebre a los 3-4 días post-vacunación (152). El grado de protección contra rotavirus humano parece ser similar al inducido por la vacunación con la cepa bovina NCDV.

En un estudio de campo realizado en Argentina se ensayó la efectividad de una vacuna producida con virus bovino atenuado en adyuvante oleoso (153). La vacunación de vacas preñadas permitió proteger a la cría contra diarrea por rotavirus, seguramente por inmunidad adquirida a través del calostro.

Por otra parte, el hecho de poder obtener *reassortants* donde todos los genes sean de origen animal salvo los genes que codifican para los antígenos de neutralización (VP4 y VP7), haría posible la utilización de los mismos como vacunas para humanos. Este tipo de virus recombinante donde todos los genes, excepto uno, son de origen animal, parecen ser atenuados para humanos (154). Alternativamente, la inmunización con un rotavirus *reassortant* conteniendo las proteínas virales VP4 y VP7 de dos virus parentales antigénicamente distintos, podría proteger contra virus de 2 o más serotipos.

En cuanto al uso de proteínas virales recombinantes producidas en sistemas de expresión no ha mostrado hasta el momento ser útil como vacuna, ya que no inducen protección contra un desafío viral (79).

Finalmente, la inmunización pasiva ha demostrado ser efectiva en prevenir la enfermedad en animales (4). Además, la administración oral de calostro de vacas inmunizadas con rotavirus humano previno la enfermedad durante una epidemia de gastroenteritis por rotavirus en niños (155).

6. OBJETIVOS

Como se ha mencionado antes, se han aislado rotavirus que presentan reordenamientos genómicos de humanos (124, 125, 126), de terneros (128), y de conejos (127). También se han descrito reordenamientos genómicos en aislamientos naturales de orbivirus (135). En la mayoría de los casos descritos el segmento involucrado en los reordenamientos genómicos es el sg 11. Sin embargo, se desconocía hasta el momento la estructura de los genes reordenados y las consecuencias del reordenamiento en la expresión de los mismos.

En 1985 y 1986, Bellinzoni y col.(129) aislaron de distintos criaderos de cerdos de la provincia de Buenos Aires las cepas C60 y C117 que presentan un electroferotipo alterado: el segmento que migra como el gen 11 normal desaparece, y aparece un segmento de mayor tamaño. Teniendo en cuenta estos antecedentes, y el hecho de que los reordenamientos genómicos son frecuentes en rotavirus y en otros virus a ARNdc, y constituyen además uno de los mecanismos de evolución del genoma viral, el propósito del presente trabajo de Tesis fue estudiar los mecanismos involucrados en los reordenamientos genómicos en rotavirus y analizar sus consecuencias a nivel de variabilidad genómica y de expresión proteica viral.

Para ello se propusieron los siguientes objetivos:

- 1) Identificar los genes implicados en el reordenamiento genómico de las dos cepas porcinas mencionadas anteriormente.
- 2) Estudiar la estructura de los genes reordenados con el objeto de encontrar los mecanismos que pudieron darles origen.
- 3) Estudiar si los reordenamientos genómicos tienen alguna consecuencia a nivel de la expresión del genoma viral.
- 4) Caracterizar el producto proteico del sg 11 normal y de los genes reordenados, estudiando su expresión, localización y modificaciones post-traduccionales.

II. MATERIALES Y METODOS

1. Virus y células

Se utilizaron las siguientes cepas virales cedidas por el Centro de Virología Animal (CEVAN):

cepa bovina UK, aislamientos naturales de origen bovino T67 y T82, cepa de simio SA11, cepa humana Met, y cepas porcinas OSU, C60, C134, C117, CN86 y Cc86. Estas últimas cepas (C60, C134, C117, CN86 y Cc86) provienen de aislamientos naturales obtenidos de distintos criaderos de cerdos de la provincia de Buenos Aires, los cuales fueron adaptados a cultivo y clonados por el método de dilución límite (156).

Los virus fueron propagados en células de riñón de embrión de mono MA104 según procedimientos publicados (157). Las células se crecieron en medio MEM Dulbecco suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 2 mM en L-glutamina y antibióticos (100 unidades de penicilina y 100 µg de estreptomycin por ml). Los virus se activaron con tripsina (20 µg/ml) durante 30 minutos a 37 °C y se dejaron adsorber sobre la monocapa de células durante 1 hora a 37 °C. Se lavó luego la monocapa con PBS y se agregó medio MEM Dulbecco sin suero conteniendo 2 µg de tripsina por ml. Se incubaron las células a 37 °C hasta observar efecto citopático completo.

2. Extracción de ARNdc viral

El ARNdc viral se purificó de células infectadas MA104 que mostraban efecto citopático total (24-48 horas, dependiendo del virus). Las células se lisaron mediante tres ciclos de congelamiento-descongelamiento con el objeto de liberar el virus intracelular. La suspensión resultante se llevó a 0.05% (v/v) en NP-40 y se centrifugó a 2,000xg durante 15 minutos para sedimentar los núcleos. Al sobrenadante se agregaron EDTA y SDS en una concentración final de 10 mM y 1%, respectivamente, y se trató posteriormente con proteinasa K (50 µg/ml) durante 1 hora a 50 °C. Luego se extrajo 2 veces con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50:49:1 v/v) a 60 °C. La fase acuosa resultante de las extracciones se precipitó con 3 volúmenes de etanol 95%. Luego de recuperar el ARN por centrifugación, se resuspendió en H₂O y se llevó a 2M LiCl para precipitar el ARNsc. El sobrenadante resultante de la centrifugación a 12,000xg durante 30 minutos se precipitó con 3 volúmenes de etanol 95% con el objeto de sedimentar el ARNdc.

El ARNdc utilizado como templado en la síntesis de ADNc fue además purificado por cromatografía en columna de celulosa Whatman CF-11 equilibrada en buffer STE (100mM NaCl, 1mM Tris-HCl [pH 7.4], 1mM EDTA) conteniendo 30% etanol. El ARNdc viral se eluyó libre de contaminaciones de ARNsc y de ADN con un gradiente discontinuo de 30 %, 15 % y 0 % de etanol en buffer STE (158).

3. Electroforesis y Northern blots de ARNdc genómico viral

El ARNdc genómico viral (5-10 µg) se resolvió mediante electroforesis en geles de SDS-10 % poliacrilamida empleando el sistema de buffer discontinuo de Laemmli (159). Los segmentos genómicos de ARNdc se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. El ARNdc se desnaturalizó

tratando el gel con 0.1 M NaOH (temperatura ambiente, 10 minutos) y se electrotransfirió a membranas de nylon (Gene Screen) en buffer 25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6.5) a 100 mA durante 2-4 horas. Las hibridaciones se llevaron a cabo en 5x SET (1x: 0.15 M NaCl, 0.03 M Tris-HCl [pH 8.0], 2 mM EDTA) y 0.25 % de leche en polvo descremada a 65 °C. Los lavados se realizaron en 1x SET, 0.1 % SDS a la misma temperatura.

4. Purificación de segmentos genómicos de ARNdc por electroelución

El genoma viral se resolvió por electroforesis en un gel de poliacrilamida según se describió anteriormente. Después de teñir con bromuro de etidio, las bandas de ARN se visualizaron por transiluminación con luz ultravioleta y se cortaron los fragmentos de gel correspondientes a los segmentos de interés. Los fragmentos de gel se colocaron en bolsitas de diálisis conteniendo buffer Tris-acetato (0.04M tris-acetato [pH 7.4], 1mM EDTA) y se electroeluyó el ARNdc a 100 volts durante 1 hora. Luego de invertir la polaridad de la corriente por aproximadamente 30 segundos (para liberar el ARN de la cara interna de la membrana de diálisis) se tomó la solución y se precipitó el ARN con 3 volúmenes de etanol 95%. El ARN se recuperó por centrifugación (12,000 xg, 30 minutos), se resuspendió en 200 μl de buffer 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA (T.E.) y se reprecipitó con etanol. Finalmente, el segmento genómico de ARNdc aislado se resuspendió en un volumen de 15-20 μl de H_2O y se estimó la recuperación por electroforesis de un 10% de la muestra en un gel de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio.

5. Marcación radiactiva de segmentos genómicos con ^{32}P

Los segmentos de ARNdc electroeluidos de un gel de poliacrilamida se marcaron con [γ - ^{32}P] ATP según el método de Arrand (160). Brevemente, 100 ng del segmento de ARNdc purificado se hidrolizó parcialmente en 0.1M NaOH (0 °C, 10 minutos) y luego de neutralizar con 1 volumen de 0.1M HCl y 1M Tris-HCl (pH 8.0), se precipitó con 3 volúmenes de etanol 95%. El ARN se recuperó por centrifugación, y los extremos 5' se marcaron con 50 μCi de [γ - ^{32}P] ATP (3000 Ci/mmol) y T4 polinucleótido quinasa (161). El ARN marcado se separó del nucleótido libre por cromatografía en columna de Sephadex G-50 equilibrada en buffer T.E. (pH 7.4).

6. Obtención de sondas radiactivas

Los plásmidos y fragmentos de ADN utilizados como sondas se marcaron radiactivamente con [α - ^{32}P] dCTP (3000 Ci/mmol) según el método de Rigby & col. (162) obteniéndose actividades específicas mayores de 10^7 cpm/ μg de ADN. El ADN marcado se separó del nucleótido libre pasando la mezcla de reacción a través de una columna de Sephadex G-50 equilibrada en T.E..

7. Identificación de clones de una genoteca de ADNc de rotavirus bovino

Se realizó el análisis (*screening*) de una genoteca de ADNc del aislamiento bovino T82 (163), para identificar clones correspondientes a cada segmento genómico.

Se tomaron clones al azar, se analizó primero el tamaño de los insertos de ADNc por doble digestión con las enzimas *PstI/EcoRI* o con *EcoRI/HindIII* y electroforesis en geles de agarosa (161). Luego se marcaron clones individuales o mezclas de grupos de 5 clones con ^{32}P como se indica en la sección anterior, los cuales se utilizaron como sondas en ensayos de hibridación de filtros de nylon con ARN genómico total electrotransferido como se describe en la sección II.3. de Materiales y Métodos. Las condiciones de hibridación se detallan en la misma sección.

8. Construcción de una genoteca de la cepa C60

6 μg de ARNdc genómico se desnaturalizaron por calentamiento a 90 $^{\circ}\text{C}$, 5 minutos. El ARN desnaturalizado se poliadeniló con la enzima poli(A) polimerasa de *E. coli* (3 unidades) en 100 μl de solución conteniendo 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl_2 , 250 mM NaCl, 2.5 mM MnCl_2 y 100 μM ATP. Luego de proceder la reacción (37 $^{\circ}\text{C}$, 10 minutos), se extrajo con mezcla fenol-cloroformo-isoamílico (50:49:1 v/v) y se precipitó con etanol 95%.

La síntesis de ADNc se realizó según el método de Gubler y Hoffman (164). Luego de calentar el ARN poliadenilado a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos, se realizó la síntesis de la primera cadena en 110 μl de reacción conteniendo: 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ARN poliadenilado, 1x buffer de transcriptasa reversa (5x buffer: 500 mM Tris-HCl [pH 8.2 a 37 $^{\circ}\text{C}$], 50 mM MgCl_2 y 700 mM KCl), 500 μM en cada uno de los nucleótidos trifosfato, 10 mM DTT, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de oligodT₁₂₋₁₈ y 50 unidades de transcriptasa reversa. La reacción procedió a 42 $^{\circ}\text{C}$ por 90 minutos, luego de lo cual se precipitó la mezcla de ADNc-ARN con etanol 95% en presencia de 2.5 M NH_4OAc . Para la síntesis de la segunda cadena se tomó el equivalente a 2 μg de ARNdc genómico original en 50 μl de 100 mM Hepes.K (pH 7.0), 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 2 mM DTT y 500 μM en cada uno de los dNTPs y se incubó con 4 unidades de ARNasa H y 20 unidades de ADN Polimerasa I 60 minutos a 16 $^{\circ}\text{C}$, luego 60 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se calentó a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. Se agregaron 2 unidades de T4 ADN polimerasa por μg de ARN original y se incubó 10 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$ deteniendo la reacción con EDTA (20 mM concentración final). Luego de extraer con mezcla fenol- cloroformo- isoamílico, se precipitó el ADNc con el agregado de NH_4OAc y etanol 95 %. De esta forma se obtuvo ADNc con extremos romos el cual fue clonado en el sitio *SmaI* del vector pUC 13.

9. Construcción de una genoteca de ADNc de la cepa porcina OSU

Para la construcción de la genoteca de la cepa OSU se partió de 1 μg de ARNdc genómico y se procedió esencialmente como se describió para la cepa C60, salvo que la síntesis de la segunda cadena se realizó según la modificación de Gubler (165). A la mezcla de reacción de la primera cadena (20 μl), realizada bajo las condiciones descritas en la sección anterior, se agregaron 50 μl de 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl_2 , 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200 mM KCl, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA, 4.6 unidades de ARNasa H y 115 unidades de ADN polimerasa I en un volumen final de 100 μl . La mezcla de ADNc se ligó al vector pUC 19 digerido por *SmaI* y desfosforilado.

La identificación de clones positivos en las genotecas de ADNc de la cepas C60 y OSU, se hizo utilizando como sonda de hibridación el clon de ADNc p79, que corresponde al sg 11 bovino (ver Resultados, sección III.1.1.).

10. Secuenciación del gen reordenado X1

Los insertos de 2 clones de ADNc (pX1.1 y pX1.2) correspondientes al segmento genómico X₁ fueron subclonados en los sitios *EcoRI*/*Bam*HI del fago M13 en ambas orientaciones y usados para secuenciar ambas cadenas virales por el método de secuenciación de Sanger (166). La secuencia completa del gen se determinó usando una serie de clones provenientes de digestiones unidireccionales progresivas del clon pX1.1 (clon completo) a partir de su extremo 5' con la enzima exonucleasa III, seguido por tratamiento con nucleasa S1 y religado (167).

2 μ g de ADN (forma replicativa) del clon pX1.1 en M13 se trataron con 160 unidades de exo III en un volumen de 35 μ l conteniendo 66 mM Tris-HCl (pH 8.0), 77 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ y 10 mM DTT, a 32 °C. Se tomaron alícuotas de 5 μ l a los 30, 60, 120, 150, 180, 240 y 270 segundos y se modificó la composición salina de manera tal que resultara 0.2 M NaCl, 50 mM NaOAc [pH4.5], 4.5 mM ZnSO₄ para el tratamiento con 17 unidades de S1. Se dejó a temperatura ambiente 30 minutos y se detuvo la reacción con 1/10 vol de 3 M Tris-base, 0.5 M EDTA. Para generar extremos romos en el plásmido se trataron 4 μ l de cada mezcla con 2 unidades de Klenow en presencia de 20 μ M en cada dNTP (5 minutos, 37 °C) y se religaron con T4 ADN ligasa. Con el ADN obtenido se transformaron bacterias competentes *E. coli* JM101 (168) y se preparó ADNsc (169) a partir de placas de fagos correspondientes a los distintos tiempos de tratamiento con exo III para usarlos como templado para secuenciar.

11. Ensayos de elongación a partir de un ADN iniciador específico (*primer extension*)

Para los ensayos de elongación se utilizó como ADN iniciador (*primer*) un oligonucleótido (5'-GGGTAGTGTTCCTACT-3') complementario a la secuencia 445-461 del ARNm viral del sg 11. 2 pmoles de ADN *primer* (2-3 x10⁶ cpm/pmol), marcado en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP y T4 polinucleótido quinasa (161), se hibridaron con 5 μ g de ARN citoplasmático total extraído de células infectadas a las 5 h.p.i. calentando durante 1 minuto a 90 °C, en presencia de 0.25 mM EDTA y dejando enfriar a temperatura ambiente. La mezcla se llevó a 100 mM Tris-HCl (pH 8.2), 10 mM MgCl₂, 140 mM KCl, 10 mM DTT y 250 μ M en cada uno de los 4 dNTPs. La síntesis se inició por agregado de 30 unidades de transcriptasa reversa y procedió por 90 minutos a 42 °C. Los productos de elongación se analizaron por electroforesis en geles 5% de poliacrilamida-7 M urea junto con marcadores de PM y fueron visualizados por autorradiografía.

12. Extracción de transcriptos virales y Northern blots

Se infectaron monocapas de células MA104 en confluencia (multiplicidad de 5 a 10) con los virus OSU, C60 y C117. A las 6 h.p.i. se extrajo el ARN citoplasmático total por el método de urea-LiCl (170). Los transcriptos se fraccionaron bajo condiciones desnaturizantes en presencia de glioxal en geles de 1.6 % agarosa y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa usando el método de Thomas (171).

Para producir **sondas específicas** de cada una de las cadenas virales (cadena codificante (+) y cadena (-) del segmento genómico 11), se utilizó un subclon de pX1.1 en el vector M13 mp18 (ver figura 9 en Resultados).

Para detectar las **cadenas (+)** de los genes X_1 y X_2 se utilizó un oligonucleótido *primer* de M13 (5'-CACAATTCCACACAAC-3') que hibrida del lado 5' de los sitios de clonado del *polylinker* del vector. Para ello se hibridaron 2.5 ng del *primer* a 0.5-1 μ g de ADNsc del clon de M13 por calentamiento a 65 °C durante 1 minuto, y dejando enfriar a temperatura ambiente. La reacción se realizó en 15 μ l de una solución conteniendo 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 μ Ci de [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol), 50 μ M de los otros 3 dNTPs, y 2 unidades de Klenow. Luego de incubar a 37 °C durante 20 minutos, se agregó a la mezcla 1 μ l de 100 μ M dATP, y se dejó proceder por 20 minutos más a 37 °C, deteniendo la reacción con 2 μ l de 0.5 M EDTA. Así se sintetizó una copia complementaria del ADN del vector M13 dejando el inserto como simple cadena. En este caso la sonda se utilizó sin desnaturizar previamente.

Para detectar específicamente las **cadenas (-)** de los genes reordenados, se hibridó el *primer* universal (17-mer) de secuencia de M13 al mismo subclon de M13 y se elongó en presencia de 10 μ Ci de [α -³²P]dATP y de los otros dNTPs, como se describió para la síntesis de la sonda de cadena (+). Luego de digerir con *EcoRI* (corta del otro extremo del *polylinker*) la copia marcada radioactivamente se eluyó de un gel desnaturizante de 5 % poliacrilamida-7 M urea (161) y se usó directamente como sonda de hibridación molecular.

Todas las hibridaciones se llevaron a cabo a 65 °C en 3xSSC (1xSSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M citrato trisódico [pH 7.6]), 5xDenhardt (1x Denhardt: 0.02 % BSA, 0.02 % Ficoll [PM 400,000], 0.02 % polivinilpirrolidona [PM 400,000]), 0.1 % SDS y 50 μ g/ml de ADN de esperma de salmón sonificado. Los filtros se lavaron 3 veces en 0.1x SSC, 0.1 % SDS a la misma temperatura de hibridación.

13. Purificación de partículas virales y síntesis de transcriptos virales *in vitro*

Se purificaron partículas virales de doble cubierta de los virus C60 y C117 a partir de células MA104 infectadas a las 24-48 h.p.i. por bandeo (40,000 rpm durante 18 horas) en un gradiente de 1.37 g/ml de CsCl en solución buffer conteniendo 10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$ y 10 mM $CaCl_2$. Las partículas de doble cubierta, correspondientes a una densidad de 1.36 g/ml, se preincubaron durante 30 minutos a 40 °C en presencia de 6 mM EDTA para activar la polimerasa endógena. Los *cores* virales enzimáticamente activos se recuperaron por centrifugación (30,000 xg, 4 °C, 20 minutos) y se resuspendieron directamente en la mezcla de síntesis conteniendo 2.5 mM de cada NTP, 0.5 mM SAM, 100 mM Tris-HCl (pH8.0), 1.5 mM EDTA, 8 mM fosfoenolpiruvato, 50 μ g/ml de

piruvato quinasa, y 0.1 % de bentonita. La reacción de síntesis se inició por agregado de $MgCl_2$ a una concentración final de 13 mM y se dejó por 6 horas a 42 °C. La mezcla se centrifugó a 30,000 xg, 4 °C, 20 minutos y se tomó el sobrenadante que contiene los ARNm virales. El sobrenadante se extrajo con 1 volumen de fenol y 2 veces con éter. Se llevó luego la solución a 2 M LiCl y se dejó a 4 °C durante la noche para precipitar los ARNm sintetizados, los cuales se recuperaron por centrifugación.

14. Subclonado de pX1.1 en el vector pUR 288

El inserto completo del clon pX1.1 fue subclonado en el sitio *Bam*HI del vector de expresión pUR 288 (promotor *lac* inducible) de manera tal que la secuencia viral resultara fusionada al extremo 3' del gen *lacZ* (172). El plásmido resultante fue denominado pUR288:X1.

El clon pX1.1 se cortó en el extremo 3' digiriendo con *Eco*RI y, luego de generar extremos romos reparando con Klenow, se ligó con T4 ADN ligasa a *linkers Bam*HI fosforilados (161). Luego se digirió con exceso de *Bam*HI, que permite liberar el inserto de ADNc del gen X₁, y este fragmento con extremos *Bam*HI se separó del plásmido y del exceso de *linkers* purificando la banda de 1200 pb de un gel de 0.8 % agarosa por congelamiento-descongelamiento según el método de Tautz & Renz (173).

El inserto *Bam*HI fue ligado a pUR 288 digerido por *Bam*HI y desfosforilado. Luego de transformar bacterias *E. coli* JM101 (*lacI*^q) con las mezclas de ligación, se analizó en colonias ampicilina resistentes la presencia de plásmidos con insertos en la orientación transcripcional correcta por digestión con la enzima *Sac*I (sección III.3.1.1.), de lo cual se aisló el plásmido pUR288:X₁.

15. Expresión de VP11 en *E. coli* y purificación de la proteína de fusión

Se inocularon 40 ml de medio LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina con 0.2 ml de un cultivo de 16 horas de bacterias *E. coli* JM101 llevando el plásmido pUR288:X₁. Cuando las células alcanzaron una D.O.₆₀₀ de 0.5-0.65 se agregó IPTG en una concentración final de 2 mM y se prosiguió la incubación por 90 minutos. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 5,000 rpm por 15 minutos y se resuspendieron en 2 ml de buffer Laemmli. Una fracción del lisado de bacterias (5 µl) se analizó por electroforesis en un gel desnaturizante 0.1 % SDS-7.5 % poliacrilamida y tinción con colorante Coomassie Blue.

La proteína de fusión se purificó a partir de un gel preparativo por electroelución en buffer 25 mM Tris (pH 8.3), 192 mM glicina y 0.1 % SDS durante 16 horas a 100 voltios. La cantidad de proteína recuperada, cuantificada por el método de Bradford (174), fue de alrededor de 4 mg de proteína de fusión por 40 ml de cultivo inicial de bacterias. La proteína de fusión así purificada fue utilizada como antígeno para ser inoculada en cobayos.

16. Producción de anticuerpos anti VP11

Se preparó antisuero específico para el producto del gen 11 en 2 cobayos seronegativos para rotavirus. Cada cobayo se inoculó 3 veces con 200 µg de proteína recombinante purificada (30 µg en secuencias de VP11). La primera inmunización fue intramuscular con adyuvante completo de Freund y las inmunizaciones subsiguientes fueron intradérmicas con adyuvante incompleto a los 15 y 30 días de la primera inmunización. Los cobayos se sangraron a blanco 7 días después de la última inyección.

Se produjeron también anticuerpos anti- β -Gal utilizando como antígeno β -Gal purificada de bacterias inducidas conteniendo el plásmido pUR 288; el esquema de inmunización fue similar al descrito para el caso de la proteína de fusión.

El título de los sueros fue analizado a los 15 días de la primera inoculación y luego del sangrado a blanco por reacción con filtros de nitrocelulosa conteniendo extractos de bacterias inducidas y no inducidas (3 μ l de 2 ml del extracto proteico en buffer Laemmli) y extractos de células infectadas (correspondientes a aproximadamente 10^5 células). La reacción antígeno-anticuerpo se reveló posteriormente por reacción con [125 I]- proteína A como se detalla en la sección II.20. de Materiales y Métodos.

17. Marcación de proteínas virales en células infectadas

Se infectaron monocapas confluentes de MA104 ($2-3 \times 10^6$ células/ caja de 60 mm) con los diferentes virus porcinos a alta multiplicidad de infección (20-30 PFU/célula) en medio MEM Dulbecco conteniendo 5-7 μ g de Actinomicina D por ml. A las 5 h.p.i. las células se ayunaron en MEM Dulbecco libre de metionina durante 30 minutos, previo a la marcación con 50 μ Ci de [35 S]-Met (>800 Ci/mmol) por ml durante 1 hora. Para la marcación con azúcar, luego de 1 hora de adsorción viral, se agregó medio MEM Dulbecco libre de glucosa, y a las 4 h.p.i. se agregaron al medio 100 μ Ci de D-[6- 3 H(N)]-Glucosamina.HCl (31.1 Ci/mmol) por ml durante 2 horas.

En el caso de experimentos de pulso y seguimiento (*pulse-chase*), las células se marcaron por 10 minutos en medio MEM sin metionina conteniendo 50 μ Ci de [35 S]- Met y 5-7 μ g de Actinomicina D por ml. Posteriormente, se hizo el seguimiento (*chase*) por el período de tiempo indicado con un exceso de 400 veces de metionina fría y 5-7 μ g de Actinomicina-D por ml.

Luego del tiempo indicado, las células se lisaron a 4 $^{\circ}$ C en 500 μ l de buffer TNN (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 250 mM NaCl, 0.5 % NP-40, 1 mM PMSF) y se tomó el sobrenadante resultante de una centrifugación a 12,000 xg durante 5 minutos.

18. Análisis de VP11 por inmunoprecipitación

Las proteínas virales marcadas con [35 S]-Met con [3 H]-Glucosamina provenientes de células MA104 infectadas (100 μ l) se inmunoprecipitaron con 1 μ l de suero de cobayo anti-VP11 en medio conteniendo 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 1 % NP-40, 1 % BSA y 1 mM PMSF (1x buffer de inmunoprecipitación). Luego de incubar a 4 $^{\circ}$ C durante 2 horas, se agregaron 50 μ l de proteína A Sepharosa (10 % p/v en 1x buffer de inmunoprecipitación) y se dejó a 4 $^{\circ}$ C con agitación continua por 30 minutos. Se centrifugó a 12,000 xg, 1 minuto y el pellet de proteína A Sepharosa se lavó 4 veces con 100 μ l de solución de lavado conteniendo 100 mM Tris-HCl (pH 8.6), 500 mM LiCl, 1-1.5 % NP-40 y 0.1 % BSA. Las muestras se resuspendieron en 60 μ l de 1x buffer Laemmli, se centrifugaron (5 minutos, 12,000 xg) y los sobrenadantes se sembraron en geles reductores de 0.1 % SDS-12 % poliacrilamida. Luego de hacer fluorografía de los geles (175), éstos se expusieron a -70 $^{\circ}$ C con película KODAK X-Omat AR-5 por 16-18 horas.

19. Marcación de proteína A con Na¹²⁵I

Se marcaron 50 μ g de proteína A con 1 mCi de Na¹²⁵I (17.4 Ci/mg; 50 μ M) en presencia de 1,3,4,6-tetracloro-3 α ,6 α -difenílglicolurilo (Iodogen) como agente oxidante (176), alcanzando actividades específicas mayores a 10⁷ cpm/ μ g de proteína. La proteína marcada se purificó del [¹²⁵I] libre por cromatografía en columna de Sephadex G-50 equilibrada en buffer PBS.

20. Análisis de VP11 por inmunoblot (Western Blot)

Los extractos de células infectadas con virus normal y con reordenamiento genómico (20 μ l correspondientes a 10⁵ células) se separaron en geles de SDS-10 % poliacrilamida y se electrotransferieron a filtros de nitrocelulosa en buffer 25 mM Tris, 192 mM glicina y 20 % metanol durante 16 horas a 70 mA (177). Los filtros se bloquearon por 30 minutos a temperatura ambiente con 3 % de leche descremada en polvo y 2 % glicina en TBS (50 mM Tris-HCl [pH 7.6], 150 mM NaCl), y luego se incubaron con antisuero anti-VP11 (dilución 1:500 en solución de bloqueo en TBS) durante 1 hora. La reacción antígeno-anticuerpo se detectó por incubación con [¹²⁵I]-proteína A (500,000 cpm/ml, durante 1 hora) y posteriores lavados en buffer TBS (3 veces, 10 minutos cada vez). Las proteínas reaccionantes con los anticuerpos anti-VP11 se visualizaron por autorradiografía. Los marcadores de PM fueron también electrotransferidos al filtro de nitrocelulosa y se visualizaron por tinción con tinta china (178).

21. Inmunofluorescencia indirecta de células infectadas

Se crecieron células MA 104 a confluencia en portaobjetos y se infectaron con diferentes cepas virales. Los portaobjetos se cosecharon a distintos tiempos p.i. entre 2 y 5 h.p.i.. Los portaobjetos se lavaron 2 veces en PBS. Todas las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Luego de fijar las células con una solución de 2 % paraformaldehído en PBS, éstas se permeabilizaron con 0.05 % de NP-40 (diluido en PBS) durante 5-10 minutos. Se agregó a las células fijadas 50 mM NH₄Cl en PBS por 5 minutos, y posteriormente se bloqueó durante 15 minutos con una solución 1 % BSA en PBS, conteniendo 40-50 μ g de suero de conejo por ml. Se incubó primero con el antisuero de cobayo anti-VP11 (dilución 1:200), durante 1 hora, y posteriormente, se lavó 3 veces en solución 1 % BSA (en PBS), incubando luego con el anticuerpo de conejo anti-cobayo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (dilución 1:200). Las células MA104 no infectadas fueron tratadas de la misma manera que las infectadas, así como los controles usando suero de cobayo pre-inmune (dilución 1:200). Las células teñidas con fluoresceína se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia Zeiss.

22. Análisis de VP11 por digestión con endoglicosidasas

Para la digestión de VP11 con endoglicosidasas, los lisados de células infectadas se inmunoprecipitaron esencialmente como ya se describió en la sección II.18., salvo que los inmunocomplejos se eluyeron de la proteína A Sepharosa en 100-150 μ l de buffer 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.05 % SDS y 1 mM PMSF. El sobrenadante se ajustó al pH óptimo para cada enzima; 50 mM

Trietanolamina (pH 5.5) para Endo H (179), y 100 mM buffer fosfato (pH 6.3) para Endo F/ PNGasa F (180); y se incubó con 0.2 U/ml de Endo H, y 5 U/ml de Endo F/ PNGasa F, respectivamente, durante 16-24 horas a 37 °C.

Como controles de digestión se utilizaron 5-10 μ l de extracto proteico total de células infectadas marcadas con [35 S]-Met incubados en los buffers correspondientes en ausencia o en presencia de enzima.

23. Análisis de VP11 por β -eliminación

Para la β -eliminación el inmunoprecipitado se eluyó de la proteína A Sepharosa en 100-150 μ l de una solución conteniendo 7M urea, 1 % SDS y 1 mM PMSF. La tercera parte se llevó a 0.1 M NaOH y se incubó a 23 °C durante 18 horas (181). Al igual que en el caso de digestión con endoglicosidasas, se utilizó como control extracto proteico total marcado con [35 S]-Met (5-10 μ l) incubado bajo las mismas condiciones.

24. Reactivos y enzimas

Los siguientes reactivos y enzimas se obtuvieron de los proveedores indicados entre paréntesis:

Acrilamida, bisacrilamida, trizma base, glicina, SAM, BSA fracción V, EDTA, SDS, Actinomicina D, ADN de esperma de salmón, standards de peso molecular de proteínas, PMSF, piruvato quinasa, fosfoenolpiruvato, inmunoglobulina de conejo anti IgG de cobayo conjugada con isotiocianato de fluoresceína, endo H, DTT, proteinasa K (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.); ácido bórico, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, acetato de sodio, acetato de potasio, sulfato de amonio, cloruro de magnesio, cloruro de manganeso, cloruro de potasio, sulfato de zinc, cloruro de litio, citrato trisódico, éter sulfúrico, ácido acético glacial (Mallinckrodt Chemical Works, N.Y., U.S.A.); paraformaldehído, polietilenglicol 6000 (Fluka AG, Switzerland); etanol absoluto, cloroformo, alcohol isoamílico, acetato de amonio, ácido clorhídrico, fosfato monosódico y fosfato disódico (Merck); Sephadex G-50, agarosa, proteína A Sepharosa (Pharmacia, Uppsala); poli(A) polimerasa, fosfatasa alcalina bacteriana, nucleasa S1 (Bethesda Research Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD, U.S.A.); endonucleasas de restricción, *primers* de secuencia, T4 ADN ligasa, T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs, Inc., U.S.A.); exonucleasa III y endo F (Boehringer Mannheim); ADN polimerasa I, ARNasa H, RAV-2 transcriptasa reversa, enzima Klenow (Amersham International plc, Amersham Laboratories, Buckinghamshire, England), medio MEM Dulbecco, tripsina, suero fetal bovino, PBS, extracto de levadura, bacto agar, bacto triptona, adyuvante incompleto de Freund (Gibco Laboratories, Madison, Wisconsin, U.S.A.); adyuvante completo de Freund H37 Ra (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.); [α - 32 P] dATP, [α - 32 P] dCTP, [γ - 32 P] ATP, [α - 35 S] dATP, [35 S] metionina, D-[6- 3 H(N)] glucosamina (New England Nuclear, Boston, U.S.A.).

Las cepas bacterianas utilizadas fueron:

JM 101 *supE*, *thi*, $\Delta(lac-proAB)$, [F⁻, *traD36*, *proAB*, *lacI*^q ZM15]

MC 1061 F⁻, *araD139*, $\Delta(ara,leu)$ 7696, $\Delta lacY74$, *galU*⁻, *galK*⁻, *hsr*⁻, *hsm*⁺, *strA*

HB 101 F⁻, *hsd* S20 (*r_B*⁻, *m_B*⁻), *supE44*, *ara14*, λ ⁻, *galK2*, *lacY1*, *proA2*, *rspL20*, *xyl-5*, *mtl-1*, *recA13*. Restricción: (*r_B*⁻, *m_B*⁻), *mcrA*(+), *mcrB*(-).

III. RESULTADOS

1. OBTENCION DE SONDAS ESPECIFICAS DE LOS DISTINTOS SEGMENTOS GENOMICOS DE ROTAVIRUS

1.1. Análisis de una genoteca de ADNc de rotavirus bovino

A partir de una genoteca de ADNc construida con ARNdc genómico del virus T82, un aislamiento local de rotavirus bovino (163), se aislaron e identificaron clones correspondientes a los distintos segmentos genómicos. El ADNc fue clonado en el sitio *Sma*I del plásmido pSP62, que posee una *polylinker* con los mismos sitios de restricción que el del vector M13 mp11.

La estrategia general seguida fue analizar primero el tamaño de los insertos de los clones de ADNc por digestión con las enzimas *Eco*RI/*Pst*I o con *Eco*RI/*Hind*III, las cuales cortan en ambos extremos del *polylinker* del plásmido pSP62.

Los clones de ADNc se utilizaron luego como sondas de hibridación molecular con ARNdc genómico para identificar el gen viral al cual correspondían. Para ello el genoma viral se separó por electroforesis en geles de SDS-10 % poliacrilamida y se electrotransfirió a membranas de nylon. Los filtros se hibridaron con distintos clones individuales o grupos de 5 clones marcados con ³²P.

En las figuras 4 A y 4 B se muestran ejemplos del ensayo empleado para asignar cada uno de los clones aislados de la genoteca de ADNc de rotavirus bovino. El clon p27, por ejemplo, que se determinó que corresponde al sg 8 del virus bovino (ver Tabla IV y fig. 4 A), hibridó con el sg 9 de la cepa de simio SA11, el cual codifica para el antígeno principal de neutralización, VP7 (fig. 6). En base a estos resultados, se concluyó que el sg 8 del virus bovino T82 codifica para VP7. El mismo razonamiento se siguió con los demás clones y grupos de clones.

La Tabla IV muestra que se aislaron de esta manera clones de ADNc representativos de cada segmento genómico. Puede verse que en algunos casos el tamaño del inserto de ADNc es mayor que el del segmento genómico del que deriva. Esto es debido a que, bajo las condiciones de reacción de la primera etapa de síntesis de ADNc utilizado, la poli(A) polimerasa incorpora entre 50 a 200 nt por extremo (161). Así se podría decir que los clones 3, 27, 67 y 79 tienen insertos de ADNc completos. Esto fue confirmado para algunos de los clones por secuenciación parcial y/o mapeo con endonucleasas de restricción.

Por otra parte, aquellos clones completos o con insertos de mayor tamaño fueron posteriormente utilizados como sondas específicas de cada segmento genómico en el estudio de reordenamientos genómicos, lo cual se describe en detalle en la siguiente sección.

TABLA IV

ANÁLISIS DE LA GENOTECA DE ADNc DE LA CEPA BOVINA T82

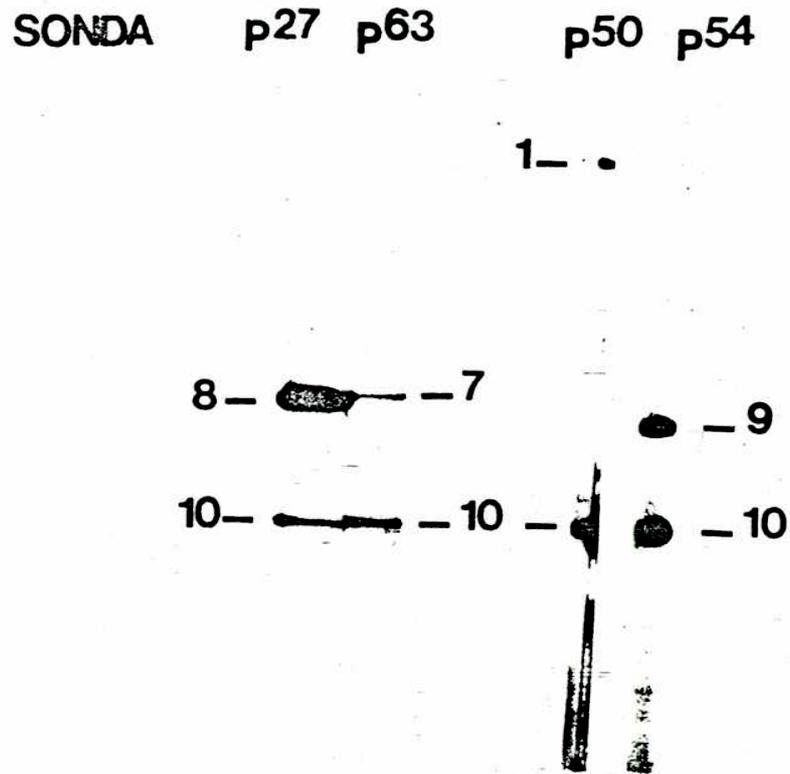
Segmento genómico	Tamaño del sg (pb) ^a	Clones y/o grupos de ADNc ^b	Tamaño del inserto ^c
1	3302	50 D,F,G	
2	2687	D,E,I	
3	2500	21 53 68	1080 - -
4	2362- 2364	9 22 G	1100 1130 -
5	1581	3 41	1900 -
6	1356	17 41	900 -
7	1104	63	200
8	1062	27 F,G	1190 -
9	1059	54	480
10	751	67 77	820 -
11	663-667	79	800

^a Los tamaños de cada uno de los segmentos genómicos que figuran en la Tabla IV se obtuvieron a partir de las secuencias publicadas (29,36,44,47,52,57,58,61,66,68). En el caso del segmento 3, el tamaño se estimó por comparación de la movilidad electroforética relativa de los segmentos de ARNdc de la cepa SA11 con respecto a la de los segmentos de ARNdc de reovirus bajo condiciones no desnaturalizantes, considerando un PM promedio de 660 daltons para un par de bases (59).

^b Los clones se indican con números y los grupos de 5 clones con letras mayúsculas.

^c El tamaño de los insertos de los clones de ADNc se estimó por electroforesis en geles de 1 % agarosa de las digestiones de los clones con las enzimas EcoRI/PstI o con EcoRI/HindIII.

A

**FIGURA 4**

Asignación de los clones de ADNc de la genoteca de rotavirus bovino T82. Se separó el ARNdc genómico de rotavirus bovino T82 por electroforesis en geles de poliacrilamida 10 %-SDS y se electrotransfirió a membranas de nylon. Los filtros se hibridaron con clones (A) o grupos de 5 clones (B) de ADNc de la genoteca de la cepa T82, marcados con ^{32}P . Solamente se muestran algunos ejemplos del estudio realizado.

B

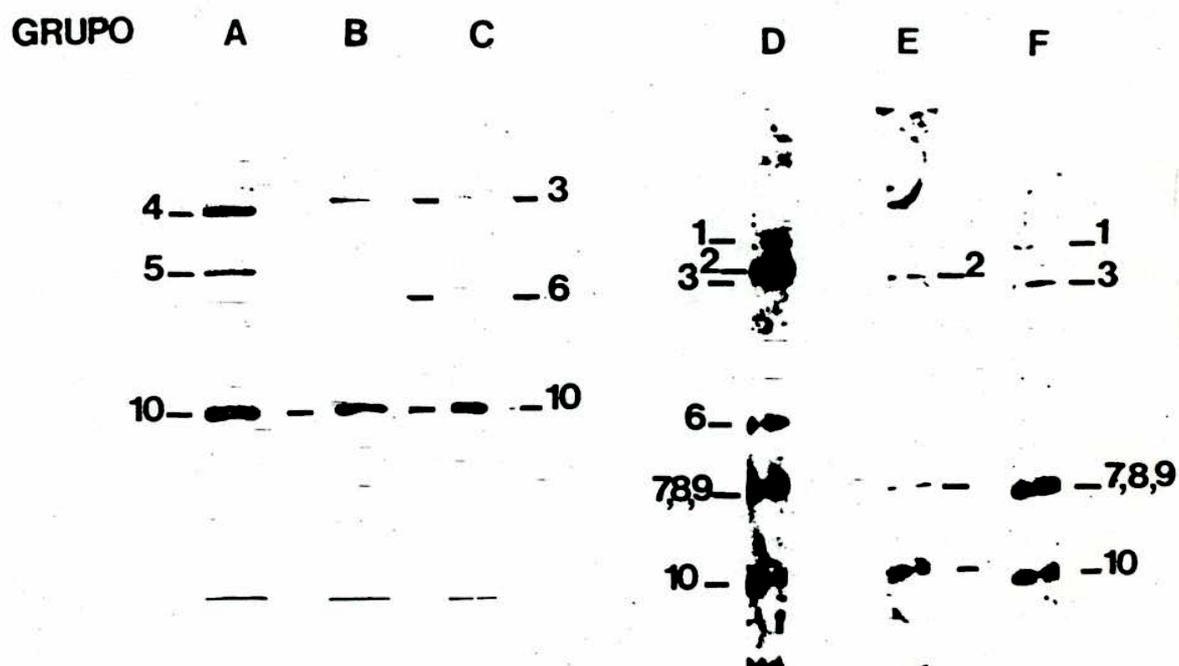


FIGURA 4 B

2. ESTUDIO DE REORDENAMIENTOS GENOMICOS EN ROTAVIRUS

2.1. Origen de los virus y antecedentes

En 1985 y 1986 hubo dos epidemias importantes de diarrea en dos criaderos de cerdos de la provincia de Buenos Aires, apartados aproximadamente 100 km uno del otro. En ambos casos, 20 % de la cría se vio afectada causando 80-100 % de morbilidad. Todas las muestras analizadas fueron positivas para rotavirus por análisis en geles de poliacrilamida, los cuales fueron clasificados dentro del serogrupo A por ensayo de ELISA (129). Además, el análisis al microscopio electrónico de las partículas virales de estos virus mostró una morfología normal.

Estos virus fueron adaptados a cultivo en células MA104 y clonados por el método de dilución límite; de lo cual surgieron cepas con electroferotipo normal y con electroferotipo rearrreglado (156). Las cepas pertenecientes a este último grupo, denominadas C60, C134, C117, y Cc86, se caracterizan por presentar un electroferotipo alterado: desaparece el segmento que migra como el gen 11 normal (alrededor de 670 pb) y aparece un segmento de mayor tamaño (fig. 5). En las cepas C60 y C134 este segmento (denominado X_1) tiene aproximadamente 1200 pb y en las cepas C117 y Cc86 el segmento (denominado X_2) tiene aproximadamente 1000 pb.

Además, estos virus retuvieron su virulencia aún después de ser adaptados a cultivo en células MA104 y de ser clonados, y fueron persistentes en el campo, aislando en años posteriores virus con el mismo electroferotipo que el de las cepas reordenadas aisladas inicialmente de esos criaderos.

2.2. Identificación de los segmentos genómicos involucrados en el reordenamiento por estudios de hibridación molecular

2.2.1. Hibridación con sondas de ADNc segmento específicas

Como primer paso para determinar el origen de los segmentos X_1 y X_2 se realizaron ensayos en los cuales las muestras de ARNdc viral de las diferentes cepas se hibridaron con los clones de ADNc correspondientes a cada uno de los segmentos genómicos utilizados como sondas (sección III.1.). No se obtuvo señal alguna para los genes X_1 y X_2 cuando se utilizaron como sondas clones específicos de los segmentos 1 a 10 con muestras de ARN de las cepas C60 y C117 (fig. 6). X_1 y X_2 hibridaron solamente con el clon p79, que es un clon completo de ADNc correspondiente al sg 11 de rotavirus bovino (fig. 7, parte B). El clon de ADNc p67, específico del sg 10, se incluyó como referencia en estos experimentos, hibridando únicamente con el segmento 10 de todas las muestras analizadas.

Estos experimentos demostraron que los segmentos X_1 y X_2 contenían secuencias homólogas al sg 11, y que no tenían secuencias correspondientes a otros segmentos genómicos virales, al menos bajo las condiciones de hibridación realizadas con sondas de ADNc de origen bovino.

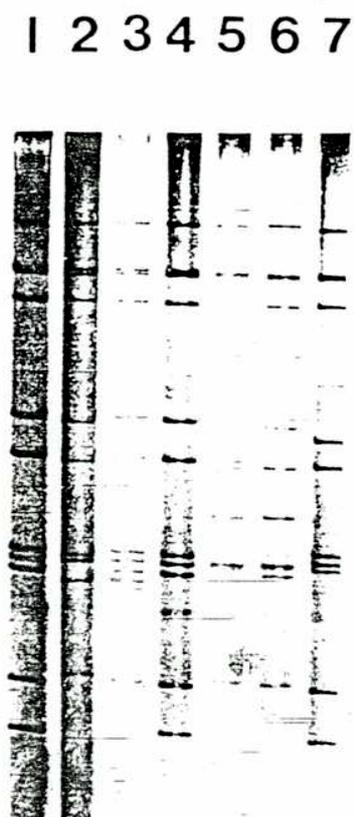


FIGURA 5

Electroferotipo de los virus con reordenamiento genómico aislados de distintos criaderos de cerdos de la provincia de Buenos Aires.

El ARNdc viral de cada aislamiento se separó por electroforesis en un gel de 10 % poliacrilamida-SDS, y se visualizó por tinción con nitrato de plata según el método de Herring & col. (182).

En el caso de las cepas C117 (calle 2) y Cc86 (calle 3) el sg reordenado tiene aproximadamente 1000 pb, mientras que en las cepas C60 (calle 5) y C134 (calle 6) el gen tiene 1200 pb. En las calles 1, 4, y 7 se muestra el genoma de la cepa de simio SA-11 (perfil electroforético normal)

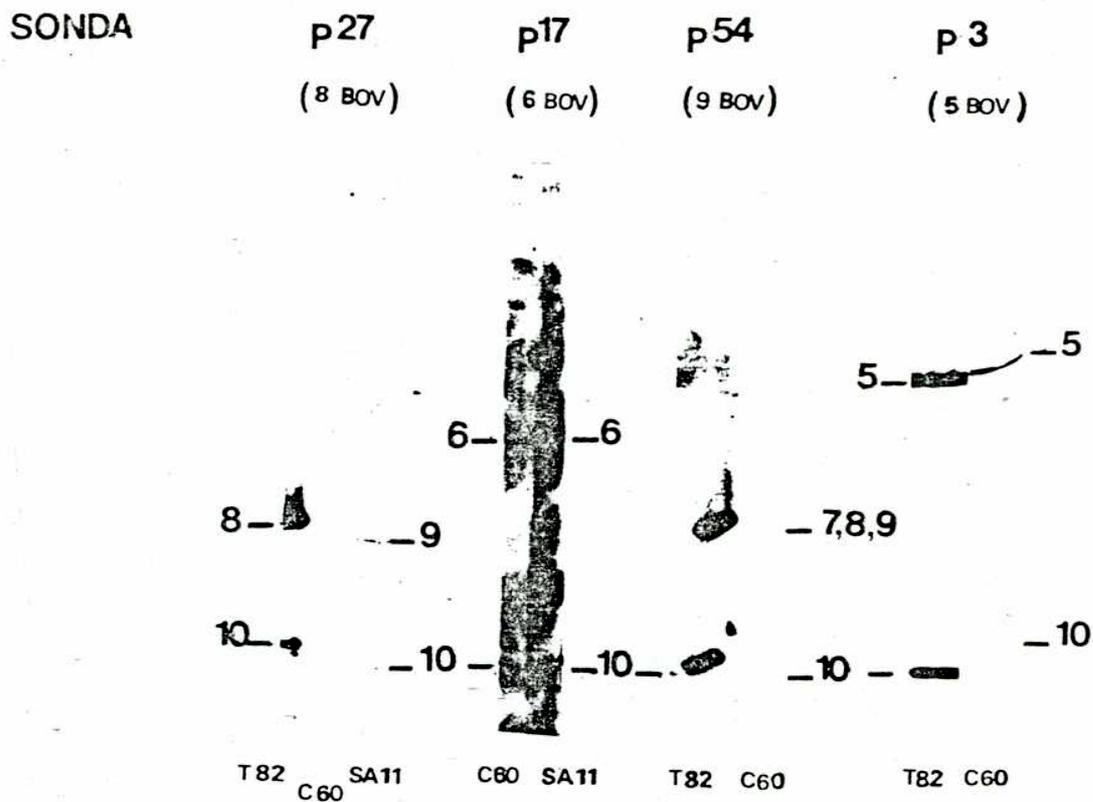


FIGURA 6 Análisis de hibridación del ARN genómico de la cepa porcina C60 (con reordenamiento genómico). El ARNdc genómico de las cepas C60, T82 (bovina), y SA11 (de simio) fue resuelto por electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferido a membranas de nylon. En la figura se muestran algunos ejemplos del estudio realizado utilizando como sondas los clones de ADNc correspondientes a cada uno de los segmentos genómicos de la cepa bovina T82.

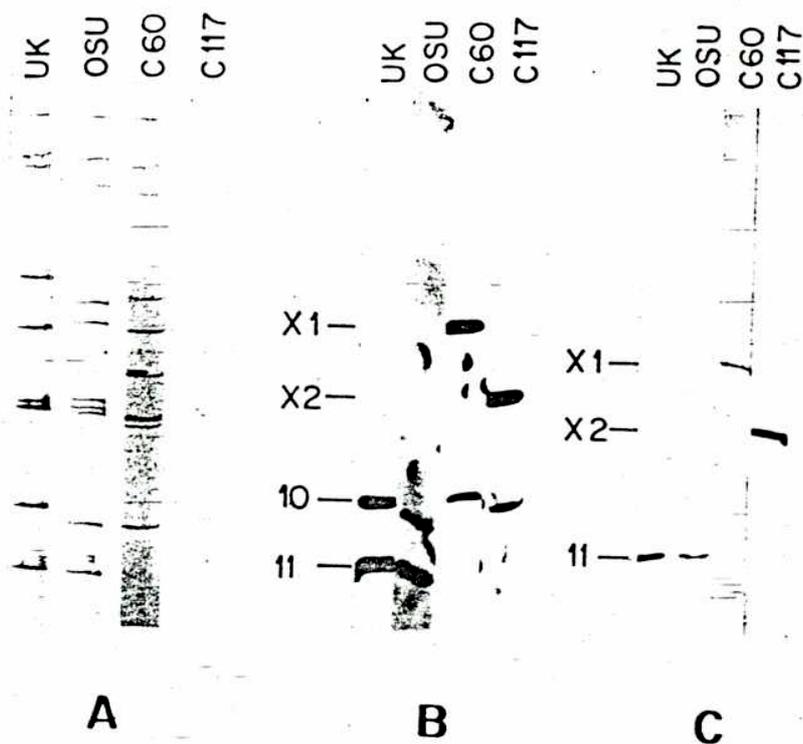


FIGURA 7

Análisis de hibridación de ARNdc viral de las cepas porcinas C60 y C117. El ARNdc viral de las cepas C60 y C117 fue resuelto por electroforesis en geles de poliacrilamida y visualizado por tinción con nitrato de plata (A). Geles corridos bajo las mismas condiciones se electrotransfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con clones de ADNc específicos para los segmentos 10 (clon p67) y 11 (clon p79) marcados con ^{32}P (B), o con el segmento X_1 marcado con ^{32}P (C). Las cepas porcina OSU y bovina UK se incluyeron para comparación. El clon de ADNc p67 correspondiente al sg 10 se incluyó como referencia interna.

2.2.2. ¿Son los genes reordenados estructuras mosaico?

Para investigar la posibilidad de que X_1 y X_2 tuvieran secuencias de otros segmentos virales porcinos que no pudieran ser detectadas por las sondas de origen bovino utilizadas, se electroeluyó X_1 de un gel de poliacrilamida y, luego de hidrólisis parcial alcalina y marcación con ^{32}P , se utilizó como sonda.

La fig.7 (parte C) muestra que X_1 sólo hibridó consigo mismo, con el segmento X_2 y con el sg 11 de los genomas de las cepas OSU (porcino) y UK (bovino) utilizadas como control.

Este experimento demostró que ninguno de los segmentos reordenados contenía secuencias correspondientes a otro segmento distinto del 11. Sin embargo, no podía descartarse que los segmentos reordenados tuvieran secuencias cortas de otros segmentos de ARN que no pudieran ser detectadas por hibridación con sondas completas, o que X_1 y X_2 contuvieran secuencias de otro origen no homólogas al resto del genoma de rotavirus.

2.3. Determinación de la estructura de los genes reordenados

2.3.1. Análisis de la estructura del gen reordenado X_1 de la cepa C60

Dado que los estudios de hibridación molecular demostraron que los genes reordenados contenían secuencias homólogas al sg 11, y con el objeto de conocer la secuencia y estructura del gen X_1 , se construyó una genoteca de ADNc de la cepa C60.

Se partió de ARN genómico poliadenilado en su extremo 3' con la enzima poli(A) polimerasa de *E. coli*, y luego se sintetizaron la primera y la segunda cadena del ADNc según el método de Gubler & Hoffman. El tamaño promedio de los productos sintetizados durante la primera y segunda etapa de la reacción de síntesis de ADNc se analizó mediante ensayos paralelos en presencia de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP. Los productos se corrieron en geles alcalinos de 1.5 % agarosa (161) junto con marcadores de PM adecuados y se visualizaron mediante autorradiografía. Como se puede ver en la fig. 8, el tamaño promedio de los ADNc fue satisfactorio (entre 600 y 2000 pb) teniendo en cuenta que el tamaño aproximado del gen X_1 es de 1200 pb, por lo cual se procedió a su clonado.

Los ADNc se ligaron al sitio *Sma*I del vector pUC 13, y con las mezclas de ligación se transformaron bacterias *E. coli* JM 101 competentes, las cuales se plaquearon en medio LB con ampicilina.

El análisis de la genoteca de ADNc de la cepa C60 se realizó por hibridación de colonias *in situ* con la sonda específica del sg 11, el clon p79.

Se identificaron 2 clones (pX1.1 y pX1.2) conteniendo insertos correspondientes al gen reordenado X_1 . Cada inserto de ADNc fue subclonado en M13 en ambas direcciones y secuenciado por el método de los dideoxinucleótidos de Sanger.

La secuencia nucleotídica completa del gen X_1 se determinó usando pX1.1 (1200 pb, clon completo), pX1.2 (600 pb, 100 % homólogo a pX1.1) y subclones de pX1.1 obtenidos por deleciones unidireccionales progresivas a partir del extremo 5' con exonucleasa III.

Por una secuencia preliminar se determinó que el extremo 5' del gen mapeaba en el clon pX1.1 junto al sitio *Bam*HI del *polylinker* del plásmido (fig. 9). El clon de M13 (forma replicativa) se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Pst*I que cortan entre el sitio de inserción del fragmento de ADN y el

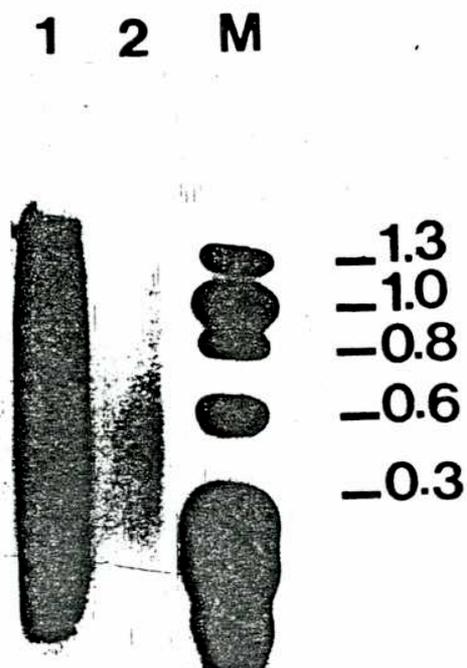


FIGURA 8

Análisis de los productos de síntesis de ADNc.
Los productos de la primera (calle 1) y segunda (calle 2) cadena de ADNc sintetizados en presencia de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ fueron analizados en un gel alcalino de 1.5 % agarosa y visualizados por autorradiografía. Como marcador de PM se incluyó ADN del fago Phi X 174 digerido por *Hae*III marcado con ^{32}P (M).

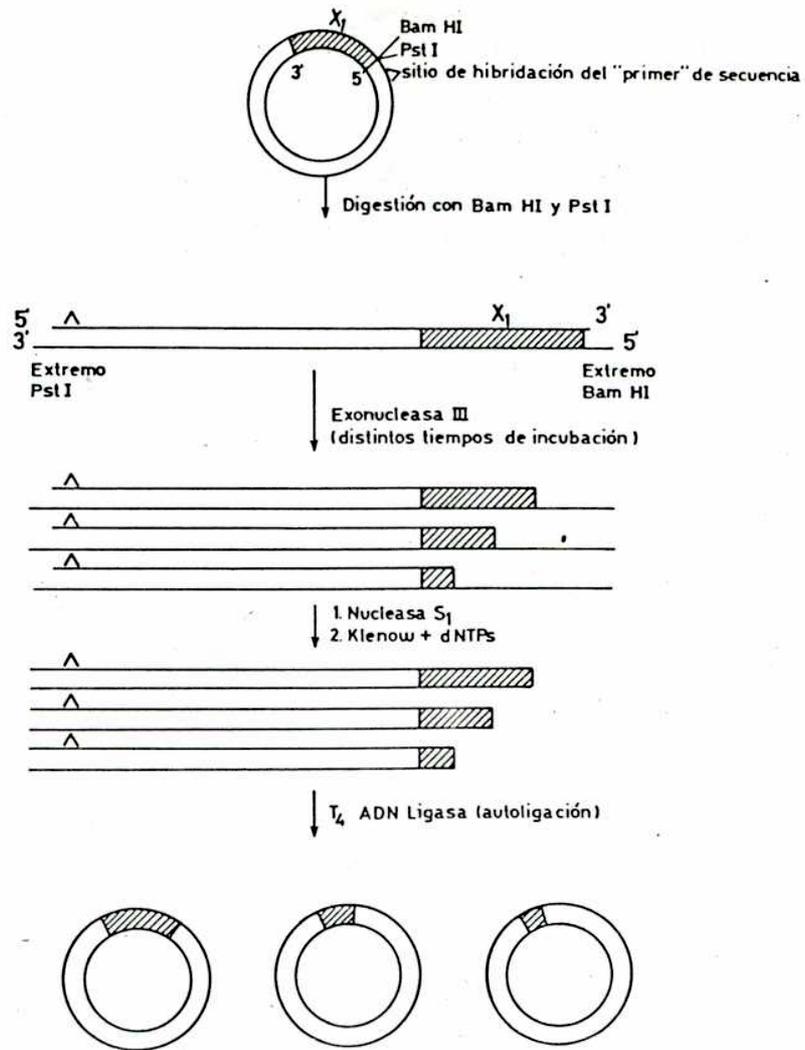


FIGURA 9 Esquema de obtención de subclones de pX1.1 por deleciones unidireccionales con exonucleasa III. El extremo *Bam*HI del clon corresponde al extremo 5' del gen X_1 .

sitio de hibridación del iniciador (*primer*) "universal" (utilizado para secuenciar). La enzima *Pst*I deja 4 nt protruyentes del extremo 3', por lo que este extremo no es sustrato para la exo III (3'→5' exonucleasa específica de doble cadena). Por digestiones progresivas del ADNc a partir del extremo 5' del gen (sitio *Bam*HI del plásmido) con exonucleasa III se redujo el tamaño de una de las cadenas del inserto de ADN. Las fracciones correspondientes a los distintos tiempos de tratamiento se trataron con nucleasa S1 y Klenow para generar extremos romos, y se ligaron para circularizar el vector. Se tomaron clones correspondientes a los distintos tiempos de digestión con exo III para cubrir la secuencia completa del gen.

De la secuencia se determinó que el sg X_1 consiste de 1211 nt con un marco abierto de lectura principal que se extiende desde el primer AUG (bases 22-24) hasta el codón de terminación UGA (bases 613-615), codificando potencialmente un polipéptido de 197 aminoácidos (fig. 10). Como se ha observado para el gen 11 de la cepa de simio SA11 (183), el sg X_1 tiene una segunda metionina en fase en el residuo 52, lo que daría un producto de 146 aminoácidos, y además existe otro marco abierto de lectura fuera de fase (+1), que comienza en la base 80, de 279 bases (92 aminoácidos).

La comparación de la secuencia nucleotídica del gen X_1 con la del sg 11 (68, 183, y esta Tesis) permitió demostrar que el sg X_1 es una estructura dimérica formada por unidades homólogas del sg 11 en orientación cabeza-cola (fig. 11). Ambas unidades son versiones delecionadas del sg 11 normal. La unidad 5', que comprende la región codificante completa de VP11, tiene una delección de 44 bases (ver más abajo) *downstream* del codón UGA de terminación (posición 613-615). Por su lado, la unidad 3' carece de las primeras 77 bases del extremo 5' del sg 11; esta delección abarca la región 5' no traducida y los primeros 19 codones de VP11. Por lo tanto, la unidad 3' (posición 625-1211) es en consecuencia no codificante, dado que carece del codón de iniciación y que existen codones de terminación en todas las fases. Además, si hubiera una lectura a través del codón (*readthrough*) de terminación UGA (nt 613-615), la reiniciación de la región codificante en la unidad 3' (corresponde a la posición 78 de la unidad 5') estaría -1 fuera de fase respecto del marco de lectura de la unidad 5' y seguida de un codón de terminación (posición 628-630). Inclusive, si operara en este caso el mecanismo de terminación-reiniciación (184), y el ribosoma permaneciera, luego de la terminación, asociado al ARNm de X_1 el tiempo suficiente como para reiniciar en un AUG cercano (posiciones 615-617, y 627-629), encontraría inmediatamente codones de terminación (posiciones 624-626, y 642-644, respectivamente).

Las dos unidades están separadas por 4 bases (UCUU, posición 621-624) de origen desconocido, que podrían provenir de la posición 71-74 con una delección de 3 bases (UAA, posición 75-77).

Además, X_1 retiene las secuencias terminales 5' (5'-GGCUUUUAA...) y 3'(...UUGUAACC-3') características de la cadena (+) de todos los segmentos genómicos de rotavirus (107, 108), las cuales serían reconocidas por la polimerasa del virus durante la replicación del genoma viral. Estas secuencias no están presentes en regiones internas del gen, como consecuencia de las delecciones parciales de las unidades 5' y 3'.


```

1      MSLSIDVTSL PSISSSIFKN ESSTTSTLS GKSIGRSEQY ISPDAEAFNK
51     YMLSKSPEDI GPSDSASNDP LTSFSIRSNA VKTNADAGVS MDSSTQSRPS
101    SNVGCDQVDF SLTKGINVNA NLDSCISIST DHKKEKSKKD KSRKHYPRIE
151    ADSSEDYVL DDSDSDDGKC KNCKYKKKYF ALRMRMKQVA MQLIEDL

```

FIGURA 10 B

FIGURA 10 A

Secuencia nucleotídica del clon de ADNc del sg X_1 de la cepa porcina C60. La secuencia corresponde a la cadena (+) (sentido del ARNm) del ARNdc genómico. Los codones de iniciación y de terminación del marco abierto de lectura principal, así como los codones de la unidad 3' (considerando el mismo marco de lectura que la unidad 5') están subrayados. La punta de flecha (▼) indica el final de la unidad 5'. Las flechas indican el comienzo de la unidad 3' (nt 625-630) y su región homóloga en la unidad 5' (nt 78-83). En negritas se indican las secuencias 5' y 3' conservadas en todos los segmentos genómicos de rotavirus.

FIGURA 10 B

Producto de traducción que se deduce a partir del marco abierto de lectura principal del sg X_1 (nt 22-615). El único sitio potencial de N-glicosilación (residuo 20) está subrayado. Los números indican la posición del residuo.

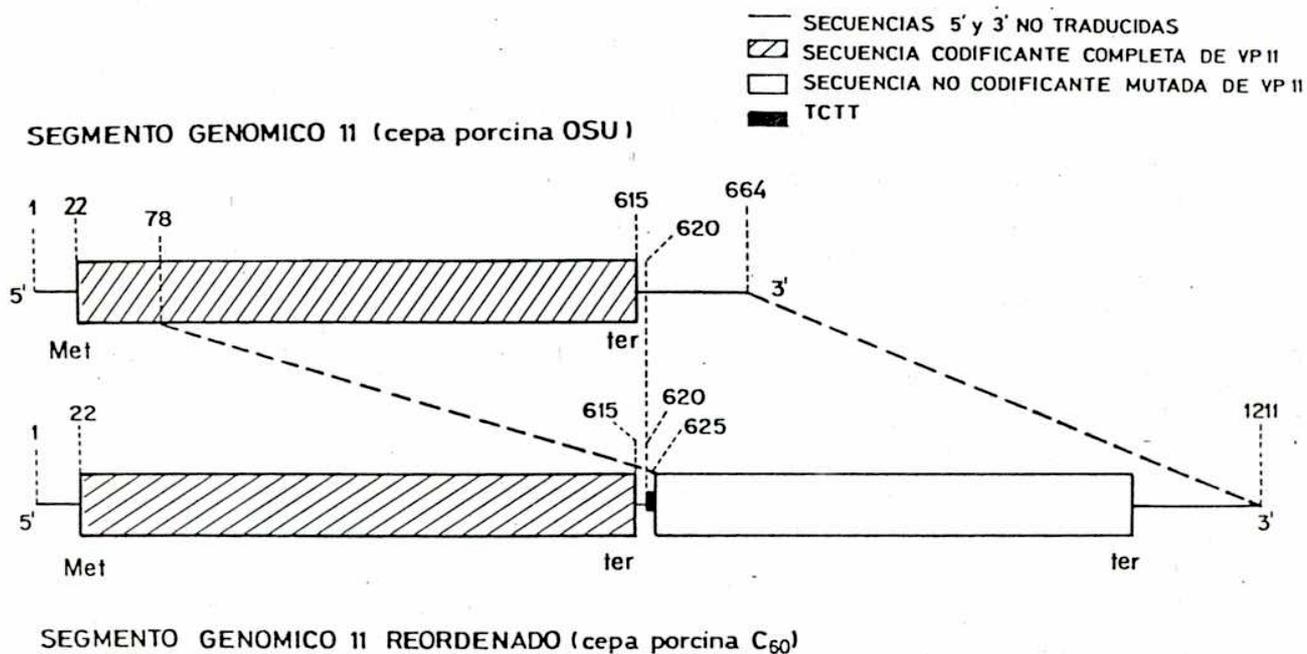


FIGURA 11 Diagrama esquemático de la estructura del sg X_1 comparada con la del segmento 11 de la cepa normal porcina OSU. La unidad duplicada del segmento reordenado (bases 625-1211) corresponde a la región comprendida entre las bases 78 y 664 del segmento 11 normal (indicado con líneas punteadas).

Cuando se comparó las secuencias nucleotídicas que tienen en común las dos unidades de X_1 , se encontró un 94 % de homología con 33 mutaciones puntuales, siendo 85 % de ellas transiciones (prevalencia de cambios C→T) (fig. 12 y Tabla V). La Tabla V muestra las mutaciones que ocurren en la región duplicada (unidad 3') y sus potenciales consecuencias traduccionales si la unidad 3' tuviera el mismo marco de lectura que la unidad 5'.

A nivel nucleotídico, la unidad 5' (codificante) de X_1 (nt 1-615) presenta un alto porcentaje de homología con el sg 11 de las cepas OSU (96 %), Wa (91 %), UK (89 %) y SA11 (89 %) (fig. 14). Existe una diferencia significativa entre el gen 11 de Wa y el de las otras cepas: una delección de una única base en posición 389 en Wa deja la secuencia fuera de fase con respecto a UK, SA11 y OSU por 25 bases, y la fase se recupera luego por una inserción en la posición 418 (68). En este sentido la unidad 5' de X_1 mantiene la fase del gen normal porcino (OSU) (sección III.2.3.2.), de UK y de SA11 (fig. 14), lo que resulta en 89 % de homología con el producto del sg 11 de Wa, 90 % con el de UK, 93 % con el de SA11 y 97 % con el de OSU. Sin embargo, el grado de homología aminoacídico con Wa aumenta a 95 % si no se tiene en cuenta la región entre los residuos 123-132 (la región donde diverge el marco de lectura). El gen X_1 (en ambas unidades), al igual que el gen 11 porcino de OSU y humano de Wa, comparten la delección del codón de histidina (CAU) entre los nt 442-444 con respecto al gen de UK y de SA11, lo que resulta en un producto proteico con un aminoácido menos que en los otros casos. Esta característica delección de un codón (CAU) podría indicar un origen común de los virus porcinos y humano, así como servir de marcador de virus de origen humano o porcino.

Al igual que en el caso de VP11 de otras especies, la secuencia aminoacídica muestra que el producto proteico del sg X_1 es muy rico en serinas (19.8 %) y treoninas (4.6 %). Esto sugiere que VP11 podría estar modificada por fosforilación, O-glicosilación y/o acilación. Por otra parte, el producto proteico de X_1 tiene un único sitio potencial de glicosilación en el aminoácido 20, presente en todos los genes conocidos hasta el momento, a diferencia de las cepas Wa (humano) y OSU (porcino normal) que poseen otro sitio putativo en el residuo 117 (sección III.2.3.2., y fig. 13).

2.3.2. Análisis de la secuencia del segmento genómico I1 normal de la cepa porcina OSU

Dado que los resultados de hibridación arriba descritos mostraron que los genes reordenados contienen secuencias del gen I1, y teniendo en cuenta que no se contaba con el sg 11 original a partir del cual se originaron X_1 y X_2 (se debe mencionar que las cepas C60 y C117 provienen de aislamientos de campo independientes, desconociéndose la cepa original de la cual derivan), se decidió secuenciar el sg 11 de la cepa porcina OSU con el fin de analizar y comparar la estructura y la secuencia de los genes reordenados con la de un gen normal de origen porcino.

Se construyó una genoteca de ADNc a partir de ARN genómico total de la cepa OSU en el vector pUC 19. Se aislaron clones parciales y completos correspondientes al sg 11. Se secuenciaron ambas cadenas de estos clones por el método de Sanger y col. usando ADNc como templado (185) y los dos *primers* de secuenciación (universal 17-mer y reverso). Utilizando clones con secuencias que se superponen (hacen *overlapping*), se cubrió la secuencia completa del sg 11.

El análisis de la secuencia mostró que el gen tiene 664 pb y un marco abierto de lectura principal de 197 aminoácidos (fig. 13). Como se ha observado para el gen X_1 , el sg 11 de OSU también presenta otros marcos de lectura menores.

```

78   GAATGAATCGTCTTCTACAACGTCAACTCTTTCTGGAAAATCTATTGGTA
625           A T           G T

128  GGAGTGAACAGTACATTTACCAGATGCAGAAGCATTCAATAAATACATG
675   A           A           C           A

178  CTGTCGAAGTCTCCAGAGGATATTGGACCATCTGATTCTGCTTCAAACGA
725                               A T T

228  TCCACTCACCAGCTTTTCGATTAGATCGAATGCAGTTAAGACAAATGCAG
775   T

278  ATGCTGGCGTGTCTATGGATTCATCAACGCAATCACGACCTTCAAGTAAC
825   A A T           T T           C

328  GTTGGGTGCGATCAAGTGGATTTCTCCTTAACTAAAGGTATTAATGTAA
875           G                               G

378  TGCTAATCTTGATTCATGTATATCAATCTCAACTGATCATAAGAAGGAGA
925                               T           A

428  AATCCAAGAAGGATAAAAGTAGGAAACACTACCCAAGAATTGAAGCAGAT
975   A A C           T           C

478  TCTGATTCCGAAGATTACGTTTTAGATGATTCAGATAGTGATGACGGTAA
1025                               C           C

528  ATGCAAGAATTGTAAATATAAAAAGAAGTATTTTCGCACTTAGAATGAGGA
1075   A                               T

578  TGAAGCAAGTCGCAATGCAATTGATCGAAGATTTGTGATGTCA
1125                               T           A

```

FIGURA 12 Alineamiento de las secuencias homólogas de las unidades 5' y 3'. Los cambios de bases en la unidad 3' se muestran debajo de la secuencia de la unidad 5'.

TABLA V

CAMBIOS DE BASES EN LA REGIONES HOMOLOGAS DE LAS UNIDADES 5' Y 3' DEL
GEN REORDENADO X₁ (nt 78-620 y nt 625-1167)

Posición base		Cambio base		Cambio aa *	
5'	3'	5'	3'	5'	3'
93	640	T	A	S	S
95	642	C	T	T	I
103	650	A	G	T	A
106	653	C	T	L	F
131	678	G	A	S	N
157	704	G	A	E	K
163	710	T	C	F	L
177	724	G	A	M	I
217	764	G	A	A	T
221	768	C	T	S	L
225	772	C	T	N	N
232	779	C	T	L	F
284	831	G	A	G	D
288	835	G	A	V	V
290	837	C	T	S	F
302	849	C	T	S	L
307	854	C	T	Q	TER
324	871	T	C	S	S
339	886	T	G	D	E
377	924	A	G	N	S
408	955	A	T	S	S
420	967	G	A	K	K
435	982	G	A	K	K
438	985	G	A	K	K
441	988	T	C	D	D
459	1006	C	T	Y	Y
477	1024	T	C	D	D
499	1046	T	C	L	L
513	1060	T	C	D	D
537	1084	T	A	N	K
563	1110	C	T	A	V
605	1152	A	T	E	V
614	1161	G	A	TER	TER

* Los cambios de aminoácidos (aa) fueron determinados considerando para la unidad 3' el mismo marco de lectura que el de la unidad 5'.

```

1   GGCTTTTAAAGCGCTACAGTGATGTCTCTCAGCATTGACGTACGAGTCTTCCCTCAATTTCTTCTAGTATC
      M S L S I D V T S L P S I S S S I
73  TTTAAATGATCGTCTTCTACACGTCACCTCTTCTGGAAATCTATTGGTAGGAGTGACAGTACATT
      F K N E S S S T T S T L S G K S I G R S E Q Y I
145 TCACCAGATGCAGAGCATTCAATAATACATGTTGTGCGAGTCTCCAGAGGATATTGGACCATCTGATTCT
      S P D A E A F N K Y M L S K S P E D I G P S D S
217 GCTTCAGATCCACTAACCAGCTTTTCGATTAGATCGAATGCAGTTAAGACCAATGCAGACGCTGGCGTG
      A S N D P L T S F S I R S N A U K T N A D A G U
289 TCTATGGATTCATCGACGCATCACGACCTTCAAGTAACGTTGGGTCCGATCAAGTGGATTTCTCCCTGACT
      S M D S S T Q S A P S S N U G C D Q U D F S L T
361 AAAGGTATTAATGTTAGTGCTAATCTTGATTCAATGTGTATCAATCTCAACTGATAATAAAAGGAGAAATCC
      K G I N U S A N L D S C V S I S T D N K K E K S
433 AAGAAAGATAAAGTAGGAACACTACCCAAGATTGAAGCAGATTCTGACTCTGAGATTATGTTTTAGAT
      K K D K S R K H Y P R I E A D S D S E D Y U L D
505 GATTCAGATAGTGATGACGGTAATGTAAGAATTGTAATATAGAAAAGGTGCTTCGACTAAGAGTGAGG
      D S D S D D G K C K N C K Y K K R C F A L R U R
577 ATGAGCAAGTCGCATGCAATTGATCGAAGATTTGTAATGTCAACCTGAGAGCACACTAGGGAGCTCCCCA
      M K Q V A M Q L I E D L *
649 CTCCCGTTTTGTGACC

```

FIGURA 13 Secuencia nucleotídica de la cadena (+) del sg 11 de la cepa porcina OSU. La traducción aminoacídica del marco abierto de lectura principal se indica bajo la secuencia. Los sitios putativos de N-glicosilación están subrayados.

La comparación de la región codificante del sg 11 de OSU con la región correspondiente de otras cepas, tales como Wa, UK y SA11 mostró un 89 %, 88 % y 91 % de homología a nivel aminoacídico, respectivamente (fig. 14).

La región codificante del sg 11 de OSU presenta algunas características en común con la del gen X_1 y la de Wa, tales como la delección del codón de histidina (CAU) entre los nt 442-444 con respecto al gen de UK y de SA11, como ya se ha mencionado para el gen X_1 .

Por otra parte, la región codificante tanto del sg 11 de OSU como de Wa tienen un sitio putativo de N-glicosilación adicional en el residuo 117, además del sitio potencial en el residuo 20 presente en el producto del sg 11 de todas las cepas estudiadas.

2.3.3. Análisis de la estructura del gen reordenado X_2 de la cepa C117

La técnica de elongación a partir de un iniciador (*primer extension*) se utiliza para determinar el extremo 5' de un transcripto. Para ello se utiliza un iniciador (puede ser un oligonucleótido sintético o un fragmento de restricción) derivado del gen a estudiar, el cual se marca radioactivamente y se hibrida con el transcripto. Posteriormente, se extiende el primer con transcriptasa reversa en presencia de nucleótidos y la elongación continúa hasta que se alcanza el extremo 5' del transcripto. Los productos de elongación se resuelven luego en un gel desnaturizante y se visualizan por autorradiografía.

Para determinar si el gen X_2 de la cepa C117 se originó como consecuencia de un mecanismo de duplicación similar al que originó X_1 , se realizaron ensayos de elongación con un oligonucleótido complementario a la cadena (+) de X_1 entre los nt 445-461. Esta secuencia (5'-AGUAGGAAACACUACCC-3') está conservada en la unidad 3' de X_1 (posición 992-1008), salvo por un cambio C→T en el nt 1006, y en las secuencias conocidas del sg 11 (sección III.2.3.2.).

Para las reacciones se hibridó este oligonucleótido a ARN citoplasmático total extraído de células infectadas a 6 h.p.i. con los virus porcinos OSU (normal), y C60 y C117 (con reordenamiento genómico) y se elongó con transcriptasa reversa. Los productos de ADNc fueron analizados en un gel de poliacrilamida desnaturizante y visualizados por autorradiografía.

Como se esperaba, en base a la secuencia nucleotídica, X_1 produjo dos productos de elongación, uno de 461 nt (banda a) y otro de 1008 nt (banda c). Como se muestra en la fig. 15 (calle 2), X_2 también dio dos ADNc de un tamaño aproximado de 461 nt (banda a) y de 840 nt (banda b). Si el gen X_2 fuera, como X_1 , un dímero del sg 11 en orientación cabeza-cola, se deberían obtener dos productos de elongación, cada uno de ellos iniciándose en la secuencia repetida presente en ambas unidades (fig. 15, parte B). El producto de menor PM (banda a), común a los ARNm X_1 y X_2 así como al ARNm del sg 11 normal de OSU, se origina por hibridación en la unidad 5'. Los productos de mayor PM, que iniciaron *downstream* en la unidad 3', son característicos de los genes reordenados (banda c en X_1 y banda b en X_2).

SA11	MSLSIDVTSLPSIPSTIYKNESSTTSTLSGKSIGRSEQYISPDAAEFNK	50
UK	.Y.....S.S.....A.....V.....SS.	
OSU	
C60	
WaS.S.F.....N..V.S.I.....	
	YMLSKSPEDIGPSDSASNDPLTSFSIRSNVKTNADAGVSMDSQAQRPS	100
V.....	
	
	
N.....E.....T.....	
	SNVGCQVDFSLNKGLKVKANLDSSISISTDTKKEKSKQNHKSRKHYPRI	150
F...I..N.....V..NSR.....ND.....	
d.....	
d.....	
M....T..IN.S.S.VHVYQFQLTN.....Kd.....	
	EAESDSDDYVLDDSDSDDGKCKNCKYKKKYFALRMRMKQVAMQLIEDL	
R.....	
	
	
	..D..YE.....	

FIGURA 14. Secuencia aminoacídica deducida a partir del marco abierto de lectura principal de la secuencia nucleotídica del sg 11 normal y reordenado de rotavirus de diferentes especies. En el caso de las cepas SA11 (de simio) y UK (bovina), el polipéptido deducido tiene 198 aminoácidos; en el caso de las cepas Wa (de humano), y porcinas C60 y OSU (estas dos últimas secuencias fueron determinadas en esta Tesis), el polipéptido tiene 197 aminoácidos. El símbolo (**d**) indica la delección de un aminoácido (histidina, H) en el alineamiento de la secuencia.

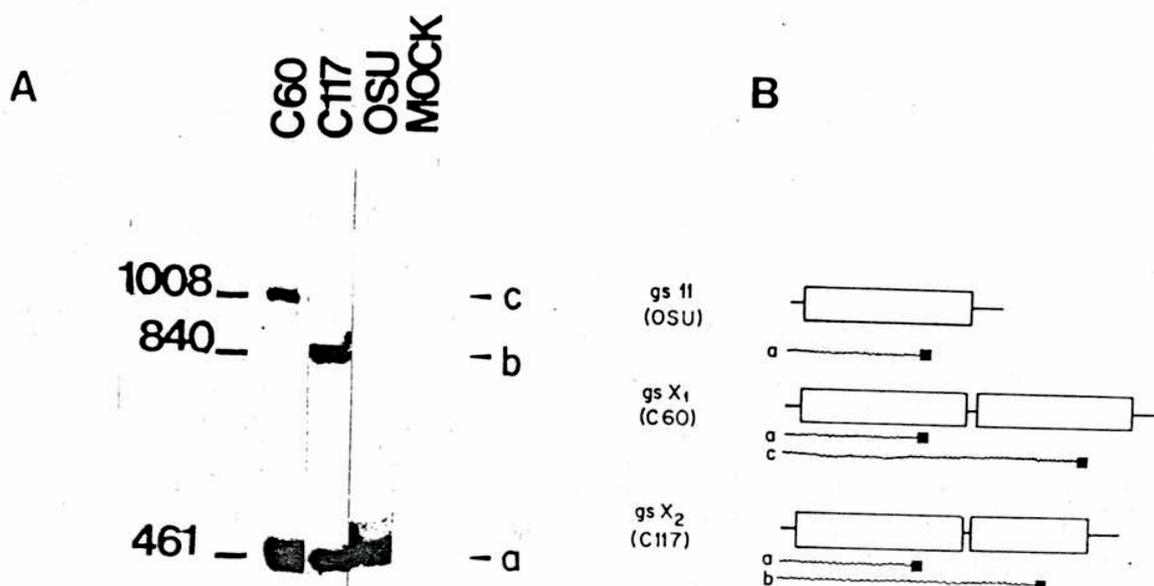


FIGURA 15 Análisis de la estructura del gen reordenado X₂.

(A) Autorradiografía de los productos (a,b,c) de clonación a partir de un ADN iniciador (*primer extension*) utilizando 5 μ g de ARN citoplasmático total extraído de células MA104 infectadas con los virus C60, C117 y OSU (calles 1 a 3), o no infectadas (calle 4), analizados en un gel desnaturante de 5 % poliacrilamida-7 M urea. Los números indican el tamaño en nucleótidos. (B) Diagrama de los productos de elongación (a,b,c) obtenidos con los diferentes ARNm virales. Los detalles sobre la asignación de las bandas se explican en el texto.

Estos resultados demuestran que X_2 también está formado por dos unidades del sg 11 en orientación cabeza-cola. Dado que la diferencia en tamaño que existe entre los productos de elongación b y c (aproximadamente 168 nt) es la misma que la que hay entre los segmentos genómicos X_1 y X_2 , y habiendo demostrado que la región codificante de VP11 se mantiene en X_2 como lo está en X_1 (sección III.3.1.5.), se puede inferir que la unidad 3' del gen X_2 tiene una delección mayor que la del gen X_1 .

2.4. Análisis de transcritos virales

Con el fin de analizar los transcritos virales de los segmentos reordenados, se hicieron *Northern blots* con ARNm de células infectadas y producidos *in vitro* por la ARN polimerasa viral.

2.4.1. Sondas de hibridación molecular específicas de cada cadena viral

La estrategia seguida para detectar selectivamente cada cadena viral fue producir sondas de ADNsc a partir del mismo subclon de pX1.1 en M13 (forma de simple cadena), utilizando dos oligonucleótidos *primers* de M13 diferentes.

Para detectar la *cadena (+)* del gen X_1 , se utilizó un *primer* de M13 que hibrida del lado 5' de los sitios de clonado del *polylinker* del vector, de forma tal de sintetizar una copia radiactiva complementaria al ADN del vector M13, dejando así el inserto como ADNsc (fig. 16, parte A).

Para detectar la *cadena (-)*, se hibridó el *primer* universal de secuencia de M13 al mismo subclon, con el fin de sintetizar una *cadena* radiactiva complementaria al inserto (fig. 16, parte B). Esta fue purificada a partir de un gel desnaturante de poliacrilamida luego de digerir con la enzima *EcoRI* (que corta del otro extremo del *polylinker*).

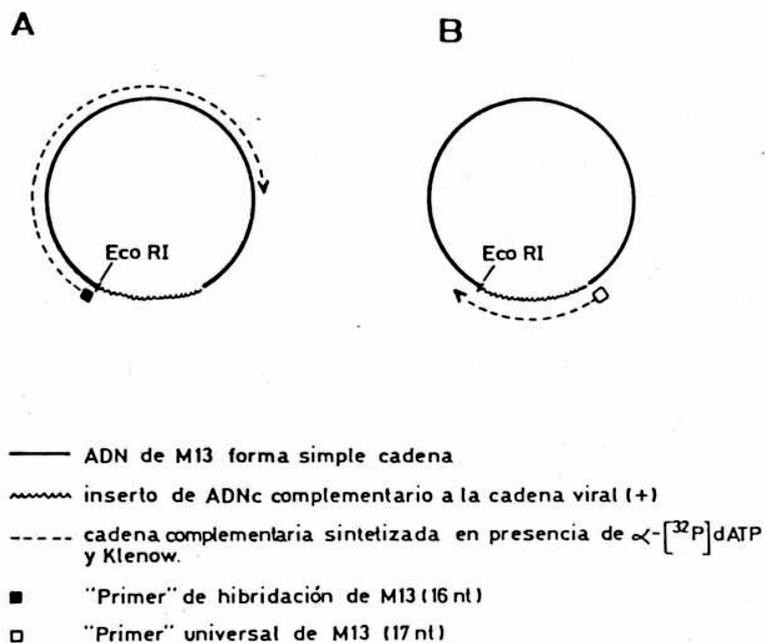
Ambas sondas fueron utilizadas directamente en los ensayos de *Northern* que se describen a continuación.

2.4.2. Transcritos virales producidos en células infectadas

Se purificó ARNm viral de células infectadas a 6 h.p.i. con virus C60 y C117. El ARNm viral de células infectadas con OSU fue incluido como control. Estos ARN se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se hibridaron con la sonda de ADNsc complementaria a la *cadena (+)* de X_1 . La fig. 17 (parte A) muestra que el tamaño de los transcritos, de 1.2 kb y 1.0 kb, coincide con el tamaño de los genes correspondientes X_1 y X_2 .

2.4.3. Transcritos virales producidos *in vitro*

Los rotavirus poseen una ARN polimerasa ARN dependiente asociada a los viriones. Esta enzima puede ser activada fácilmente y es extremadamente estable, lo que permite sintetizar *in vitro* grandes cantidades de ARNm.

**FIGURA 16**

Síntesis de sondas de hibridación de ADNsc específicas de cada cadena viral. Se sintetizaron sondas de ADNsc a partir del mismo subclon de pX1.1 en el vector M13 mp18 (forma de simple cadena) utilizando dos oligonucleótidos *primers* de M13 diferentes, y elongando en presencia de los 4 dNTPs y Klenow.

A. Síntesis de la sonda complementaria a la cadena viral (+). **B.** Síntesis de la sonda complementaria a la cadena viral (-).

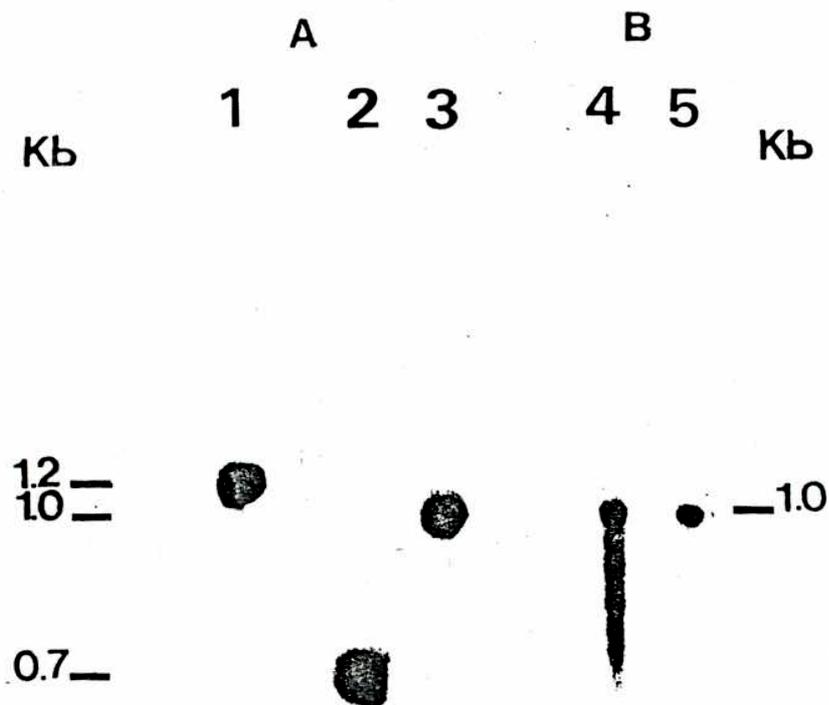


FIGURA 17 *Northern blots* de ARNm virales sintetizados en células infectadas y en partículas virales purificadas. (A) ARN citoplasmático total ($10 \mu\text{g}$) de células infectadas con virus C60 (calle 1), OSU (calle 2), y C117 (calle 3), fue separado en condiciones desnaturalizantes en un gel de 1.6 % agarosa, transferido a un filtro de nitrocelulosa, e hibridado con una sonda de ADNsc complementaria a la cadena (+) del sg X_1 . (B) Transcritos sintetizados *in vitro* (calle 4) y ARNde genómico (calle 5) de partículas virales purificadas de la cepa C117 fueron analizadas bajo las mismas condiciones que las muestras de la parte (A). Los tamaños se indican en kb.

Para analizar los ARNm producidos *in vitro* se purificaron partículas de doble cubierta del virus C117 por bandeo en un gradiente de CsCl, las cuales se trataron con 6 mM EDTA a 40 °C para activar la polimerasa viral endógena. Luego de incubar durante 6 horas a 42 °C en presencia de los 4 NTPs , se sedimentaron los *cores* virales por centrifugación a 30,000 xg durante 20 minutos. El sobrenadante resultante se llevó a una concentración final de 2.5 M LiCl (16 horas a 4 °C).

Por hibridación con la sonda complementaria a la cadena (+) de X₁ se analizó en el pellet resultante de la precipitación en LiCl la presencia de ARNm, y en el sobrenadante, la posible contaminación con ARNdc genómico. La fig. 18 muestra que la sonda hibridó solamente con la fracción que precipita en LiCl, y no con el sobrenadante, confirmando que el único producto que se obtiene por activación *in vitro* de la polimerasa viral es ARN mensajero. También se obtuvo señal con una muestra de ARN genómico de la cepa C60 utilizada como control positivo.

Cuando los transcritos del gen X₂ producidos *in vitro* se analizaron por Northern blot utilizando la sonda complementaria a la cadena (+) se detectó un transcripto que corresponde en tamaño al ARNm de X₂ producido en células infectadas (fig. 17, calle 4).

Al hibridar los filtros con las muestras de ARN de células infectadas y de ARN sintetizado *in vitro* con la sonda de ADNsc complementaria a la cadena viral (-) no se obtuvo señal de hibridación, lo que permitió descartar la posibilidad de que las bandas observadas fueran debidas a contaminación de las muestras de ARN con ARNdc genómico (datos no mostrados).

Estos experimentos permitieron demostrar que los transcritos de los genes reordenados, ya sea producidos en células infectadas como sintetizados *in vitro* por la polimerasa viral, tienen el mismo tamaño que los segmentos genómicos correspondientes.

3. ESTUDIO DEL PRODUCTO DEL SG 11 (VP11)

La secuencia nucleotídica del sg 11 muestra un marco abierto de lectura principal de 197-198 aminoácidos, dependiendo de la especie. Existen además otros dos marcos abiertos de lectura menores, uno en fase con respecto al principal, de 146 aminoácidos y otro desfasado en (+1) que comienza en la base 80 y tiene 92 aminoácidos. El producto que se traduce a partir del marco abierto de lectura principal, y que es el se utiliza *in vivo* como se demuestra en esta Tesis (ver más adelante) es muy rico en serinas y treoninas, lo que sugiere que VP11 podría estar fosforilada, O-glicosilada y/o acilada, pero hasta el momento se desconocía la naturaleza de la modificación.

Con el objeto de estudiar VP11, se expresó el ADNc del gen 11 reordenado en *Escherichia coli*. Se produjeron anticuerpos específicos que permitieron detectar esta proteína viral minoritaria, dado que sueros de animales infectados o hiperinmunizados con partículas virales completas no contienen anticuerpos detectables anti-VP11.

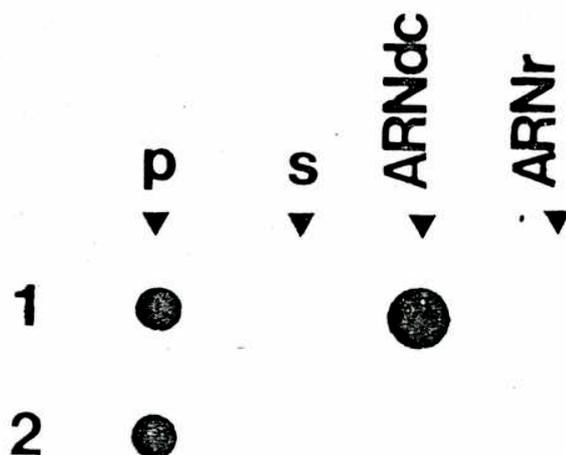


FIGURA 18 Síntesis de ARNm *in vitro* en partículas virales.

Partículas virales de doble cubierta de la cepa C117 se trataron con EDTA para activar la polimerasa viral endógena y se incubaron en presencia de los 4 NTPs durante 6 horas a 42 °C. La mezcla de reacción se llevó a una concentración final de 2.5 M LiCl y se analizó luego la presencia de ARNm en el pellet (P) y en el sobrenadante (S) de la precipitación en LiCl. Como sonda de hibridación se utilizó el ADNsc complementario a la cadena (+) del sg X₁ (fig. 16 A). Se incluyeron ARNr de levadura (ARNr) y ARNdc genómico de la cepa C60 como controles. 1 y 2 indican dos reacciones de síntesis realizadas en forma independiente.

3.1. Expresión de VP11 en *E. coli*

3.1.1. Construcción de pUR 288:X₁

Para obtener la proteína viral VP11 en cantidades suficientes como para ser usada como antígeno, se expresó en *E. coli* el clon pX1.1, ya que la secuencia determinada del gen reordenado X₁ indica que la región codificante de este gen es la misma que la del sg 11 normal (sección III.2.3.1.).

Para ello se subclonó el inserto del clon pX1.1 en el sitio *Bam*HI del vector de expresión pUR. Se utilizó el plásmido pUR 288, que es el miembro de la serie pUR que ofrece la fase correcta para la expresión de VP11 como proteína de fusión con β -Galactosidasa. En la fig. 19 (parte A) se muestra la estrategia de clonado.

Se analizaron los plásmidos por digestión con *Sac*I para encontrar aquéllos con inserto en la orientación transcripcional correcta. El inserto de ADNc del clon pX1.1 tiene un único sitio *Sac*I en el extremo 3' del gen (corresponde a la posición 1186-1192), y el plásmido pUR 288 presenta un único sitio *Sac*I en posición 1130 (fig. 19 A). Por lo tanto, los clones con la orientación correcta dieron dos bandas por digestión con *Sac*I, una de 2.3 kb (correspondiente a 1.1 kb del inserto, más 1.2 kb de secuencias del vector) y otra de 4.1 kb (correspondiente a la región restante del vector más aproximadamente 100 pb del inserto X1.1). De esta manera se aisló el clon pUR 288:X₁.

Además, se secuenció el clon pUR 288:X₁ utilizando un *primer* de 15 nt (5'-GACTCCTGGAGCCCG-3') complementario a la cadena codificante del gen *LacZ*, que permite secuenciar la región de unión entre el gen *LacZ* y el inicio del gen X₁. Esto permitió confirmar que el inserto estaba en el marco de lectura correcto como para obtener una proteína de fusión entre la β -Galactosidasa y VP11 (fig. 19, parte B).

3.1.2. Expresión de VP11

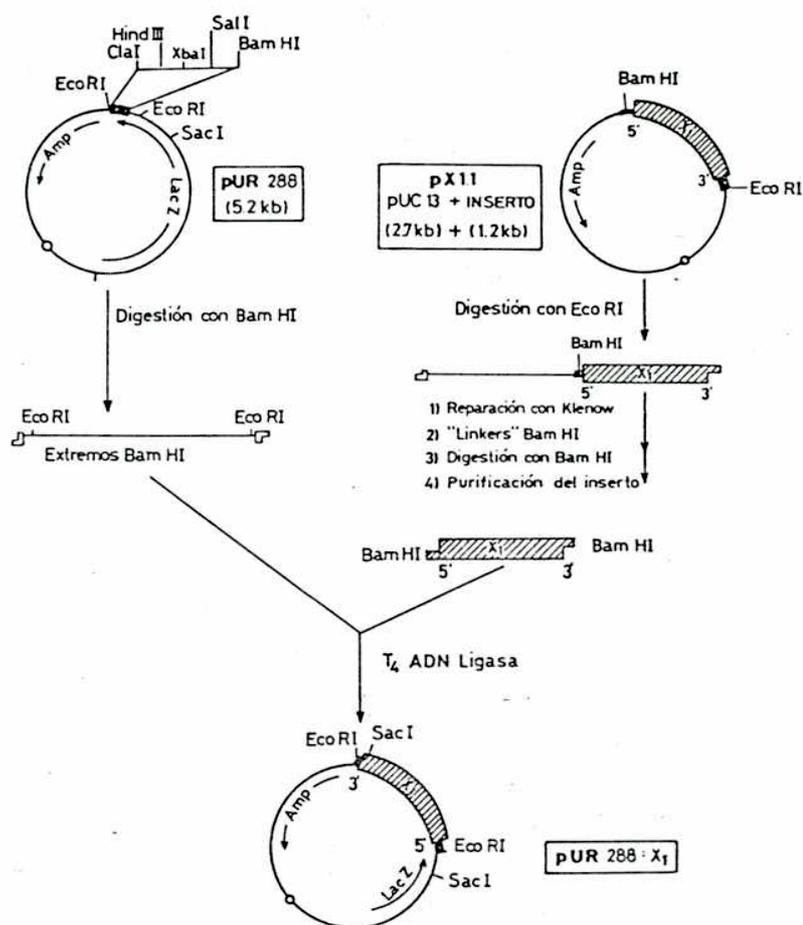
Se crecieron cultivos de *E. coli* conteniendo el clon pUR 288:X₁ hasta alcanzar la fase exponencial tardía. Se indujo el promotor *LacZ* con IPTG, y luego se analizaron los lisados de bacterias por electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con colorante Coomassie Blue (fig. 20). El vector pUR 288 (control sin inserto) produjo β -Galactosidasa como proteína predominante luego de la inducción con IPTG (fig. 20, calle 3). En cambio, el clon pUR 288:X₁ produjo además de la β -Gal un polipéptido de aproximadamente 140 kDa correspondiente a la proteína de fusión (fig. 20, calles 1 y 2).

El hecho de que en bacterias transformadas con el recombinante no se produzca 100 % de proteína de fusión, sino que también se detecte β -Galactosidasa, podría deberse a poca estabilidad de la proteína de fusión β -Galactosidasa:VP11. Se han observado resultados similares al expresar otros genes en los vectores de la serie pUR (172, 186).

3.1.3. Producción de anticuerpos específicos anti-VP11

La proteína de fusión purificada por electroelución fue utilizada como antígeno para obtener anticuerpos específicos contra VP11 por inmunización de cobayos seronegativos.

A



B

5'-.....GG Gga tcc ccg atg tct ctc.....-3'

FIGURA 19

Construcción del clon pUR288:X₁.
 A- Diagrama esquemático del subclonado del ADNc del gen X₁ en el plásmido pUR 288. B- Secuencia y marco de lectura correspondiente de la región de unión entre el gen *LacZ* del vector pUR 288 y el inicio del ADNc del gen X₁ determinados por secuenciación. En mayúsculas se indican las secuencias del *polylinker* del vector pUR 288; en minúsculas, las secuencias del *polylinker* del plásmido pUC 13 (región *upstream* del extremo 5' del ADNc del gen X₁); y en negritas, se indican las secuencias específicas del ADNc del gen X₁.

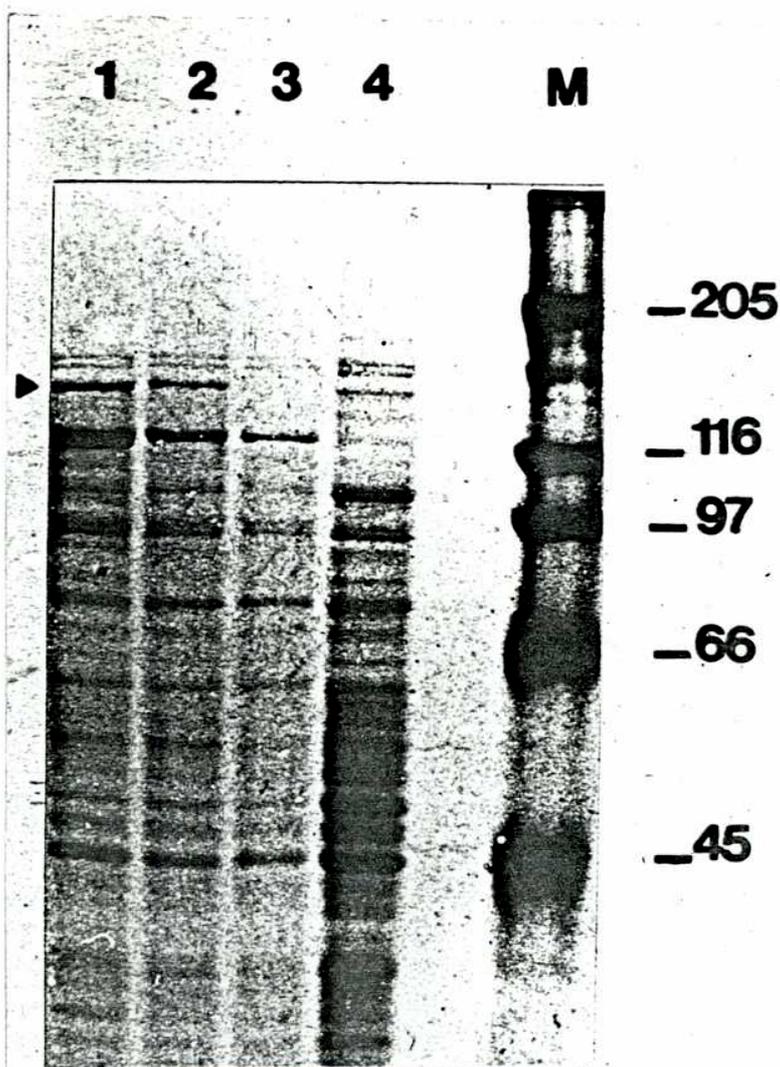


FIGURA 20

Expresión de la proteína viral VP11 en *E. coli*.
 Los extractos de bacterias conteniendo el plásmido pUR288 o pUR288:X1 se resolvieron por electroforesis en un gel de SDS-7.5 % poliacrilamida y se visualizaron por tinción con colorante Coomassie Blue.
1 y 2: lisados de bacterias conteniendo pUR288:X1 inducidas con IPTG (expresión de β -Gal:VP11); **3:** bacterias conteniendo pUR288 inducidas con IPTG (expresión de β -Gal); **4:** bacterias conteniendo pUR288 sin inducir; **M:** marcador de PM. Los números indican PM en kDa.

Se analizó primeramente la positividad de los sueros por reacción de los mismos con extractos proteicos de bacterias no inducidas e inducidas con IPTG, y con lisados de células infectadas en ensayos de "inmunodot". Utilizando una dilución del suero de 1:500 se obtuvo señal positiva con extractos de bacterias inducidas transformadas con pUR 288 (expresión de β -Gal) y con pUR 288:X1 (expresión de β -Gal:X1), así como con lisados de células MA104 infectadas con virus OSU, C117 y C60 (fig. 21, parte A). Cuando las mismas muestras se analizaron con antisuero anti- β -Galactosidasa, fueron positivas las muestras de lisados de bacterias inducidas, pero no las de lisados de células infectadas (fig. 21, parte B).

3.1.4. Localización de VP11 en células infectadas

El suero anti-VP11 fue utilizado para localizar por inmunofluorescencia la proteína viral en células infectadas.

Se cosecharon células MA104 infectadas a las 4-5 h.p.i., las cuales se permeabilizaron por tratamiento con un detergente no iónico (NP-40), y se incubaron primero con el anticuerpo policlonal anti-VP11, y luego, con el segundo anticuerpo de conejo anti-cobayo conjugado con isotiocianato de fluoresceína.

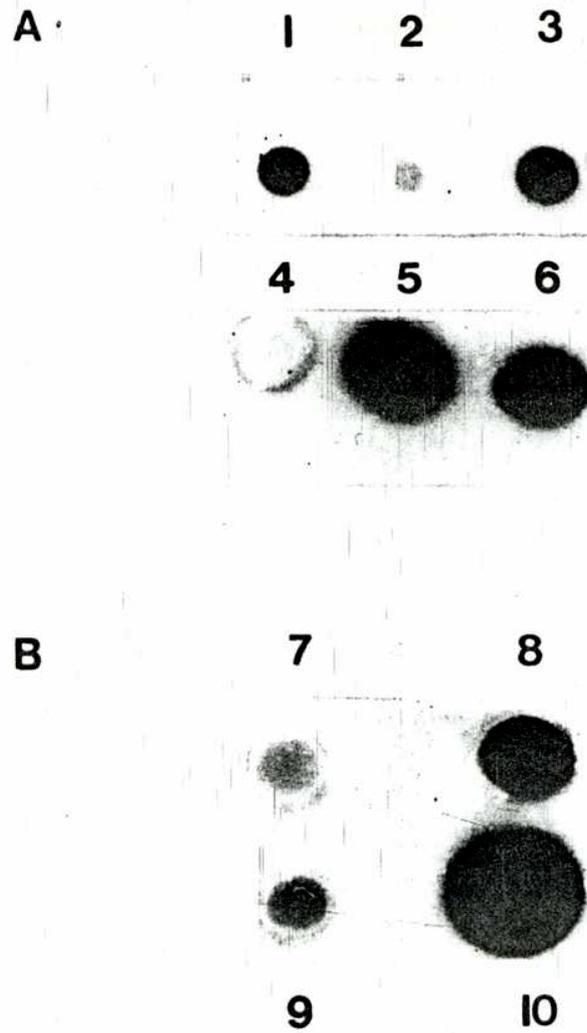
Se observó una tinción específica solamente en el citoplasma de las células infectadas, ya sea con virus normal como con virus con reordenamiento genómico (cepas C60 y C117) (fig. 22, A y B).

No se observó tinción cuando las células infectadas sin permeabilizar se hicieron reaccionar con el primer y segundo anticuerpo. Esto indicó que VP11 no está localizada en la superficie celular.

La imagen de tinción "puntillosa" que se obtuvo por inmunofluorescencia es característica de la acumulación de VP11 en los viroplasmos, que son zonas de síntesis y ensamblado del ARN viral.

Esta misma tinción "puntillosa" se obtiene por inmunofluorescencia de células MA104 infectadas al ser incubadas con un anticuerpo anti-VP6 (componente de la cápside interna del virión) y con anticuerpos dirigidos contra proteínas no estructurales tales como VP8, las cuales han sido localizadas en los viroplasmos por microscopía electrónica (187). Sin embargo, la imagen de tinción por inmunofluorescencia que se obtiene con un anticuerpo anti-VP7 (proteína viral de la cápside externa, localizada en el R.E.) es completamente diferente. Se observa una tinción anular, que incluye la envoltura nuclear y se extiende a través del citoplasma hacia la periferia celular, la cual es característica del R.E. (187).

Se realizaron asimismo experimentos de inmunofluorescencia indirecta en los cuales se cosecharon células MA104 infectadas a distintos tiempos p.i. Se observó que VP11 se produce en forma abundante a las 4 h.p.i., mientras que a tiempos cortos (2 h.p.i.) apenas se detectan focos fluorescentes en el citoplasma (fig. 22, C y D).

**FIGURA 21**

Análisis por "inmunodot" del suero anti-VP11 producido en cobayos.

Las proteínas de células MA104 infectadas con rotavirus y de bacterias conteniendo la proteína de fusión β -Gal:VP11 o β -Gal se fijaron a un filtro de nitrocelulosa y se hicieron reaccionar con el suero anti-VP11 (A), o con el suero anti- β -Gal (B).

1 y 8: lisado de bacterias conteniendo el plásmido pUR288 inducidas con IPTG; 2 y 9: bacterias conteniendo el plásmido pUR288:X1 sin inducir, o 3 y 10: inducidas con IPTG; 4: lisado de células MA104 no infectadas, o infectadas con 5: la cepa C117, o 6 y 7: la cepa OSU.

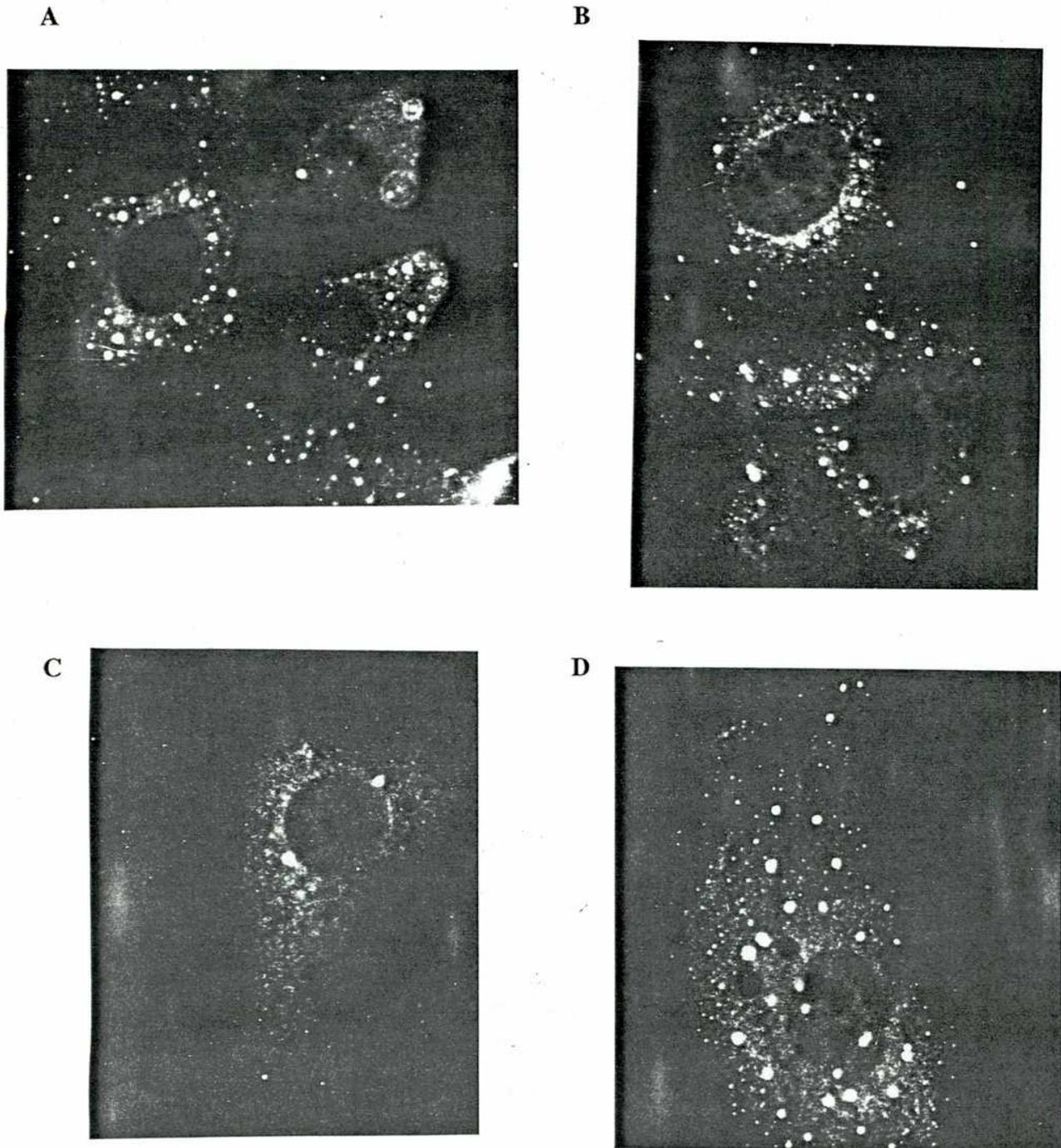


FIGURA 22 Localización de VP11 en células MA104 infectadas por inmunofluorescencia indirecta. A y B - Células MA104 infectadas con las cepas porcinas OSU o C60 fueron permeabilizadas con NP-40 e incubadas primero con el suero anti-VP11, y luego con inmunoglobulina anticobayo conjugada con isotiocianato de fluoresceína. VP11 se visualiza en focos discretos (viroplasmos) a través del citoplasma. (Aumento:400x). C y D -Inmunofluorescencia indirecta a diferentes tiempos p.i. de células MA104 infectadas con los mismos virus. A las 2 h.p.i. (C) apenas se tiñe el citoplasma, mientras que a las 4 h.p.i. (D) VP11 se sintetiza en forma abundante. (Aumento:1000x).

3.1.5. Caracterización de los productos del gen 11

Como primer paso en la caracterización del producto del sg 11, se realizaron inmunoprecipitaciones con el suero anti-VP11 de extractos proteicos de células MA104 infectadas a las 4 h.p.i. con virus OSU (normal), y C60 y C117 (con reordenamiento genómico) marcadas con [³⁵S]-Met. Como se observa en las figuras 23 A y 23 B, en virus normal y con reordenamiento genómico se detectaron 2 productos de PM aparente de 26 y 28 kDa. Estos productos son específicos del sg 11, ya que con suero de cobayo pre-inmune no se inmunoprecipitó de células infectadas ninguna de estas proteínas (fig. 23 A, calle 4). Además, los extractos proteicos de células MA104 no infectadas se inmunoprecipitaron con el mismo antisuero anti-VP11, pero tampoco se detectó ningún producto, lo que apoya la especificidad de los productos detectados en células infectadas (fig. 23 A, calle 3). En algunas calles, se pueden observar bandas adicionales de mayor PM que las bandas de 26 y de 28 kDa. Estas corresponden a la unión inespecífica de las proteínas virales mayoritarias (VP1, VP2, VP6 y VP7) a la proteína A Sepharosa, como se puede ver al incubar directamente el extracto de proteínas virales con proteína A Sepharosa, o al inmunoprecipitar con suero de cobayo pre-inmune.

Los mismos resultados se obtuvieron por *Western blot* con lisados de células MA 104 infectadas con virus OSU (fig. 24). Cuando se hizo un *Western blot* con partículas virales de doble y de simple cubierta purificadas por bandeado en un gradiente de CsCl, no se obtuvo señal por reacción con el anticuerpo anti-VP11 (datos no mostrados), lo cual permitió confirmar, en base al criterio de reacción con un anticuerpo específico, que VP11 es una proteína no estructural presente solamente en células infectadas.

Dado que por incorporación de [³⁵S]- Met se obtuvieron dos polipéptidos, y con el objeto de determinar cuál es el producto final que se sintetiza en células infectadas, se realizaron experimentos de pulso y seguimiento (*pulse-chase*). Se marcaron con [³⁵S]- Met células MA104 infectadas con virus OSU y C60 durante 10 minutos, y se incubaron durante 50 minutos en ausencia de precursor radioactivo. Cada lisado celular se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-VP11 y se analizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y posterior autorradiografía.

Como muestra la fig. 23 C, este experimento demostró que el producto de 26 kDa es procesado a un polipéptido de mayor PM (28 kDa).

Estos resultados permitieron concluir que en células infectadas con virus normal y con reordenamiento genómico del sg 11 se detectan los mismos productos proteicos del gen 11. Esto indica que, al menos en los casos de reordenamiento del sg 11 estudiados, la región codificante del gen 11 normal se mantiene, ya que no se detectó modificación alguna con respecto a los productos detectados en células infectadas con virus normales.

Además, por experimentos de pulso y seguimiento, se demostró que VP11 sufre una modificación post-traducciona, siendo el producto final un polipéptido de PM aparente de 28 kDa.

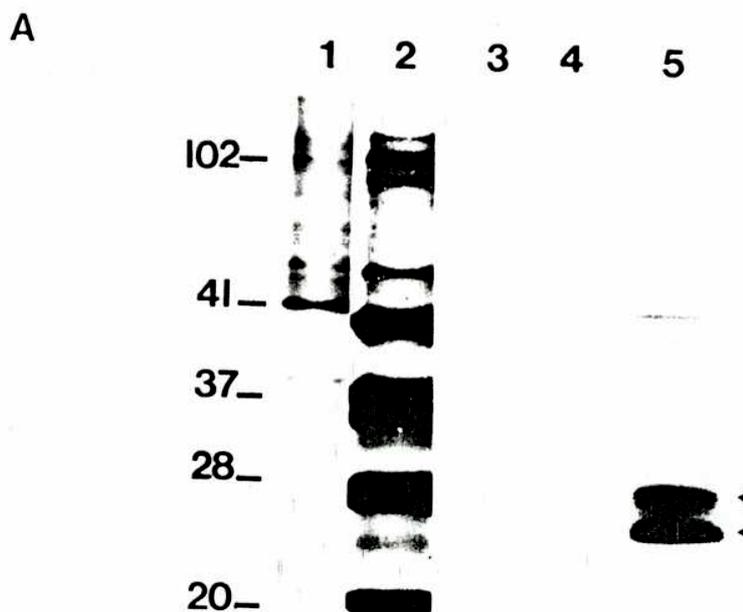


FIGURA 23 A Detección de los productos del sg 11 en células MA104 por inmunoprecipitación. Los polipéptidos virales en células MA104 infectadas con virus OSU se marcaron durante 60 minutos con [^{35}S]-Met a las 4 h.p.i. y se inmunoprecipitaron con el suero de cobayo anti-VP11. Proteínas de células MA104 no infectadas marcadas con ^{35}S (1), e inmunoprecipitadas con el suero anti-VP11 (3); proteínas totales de células MA104 infectadas con la cepa OSU (2), e inmunoprecipitadas con el suero de cobayo pre-inmune (4), o con suero de cobayo anti-VP11 (5).

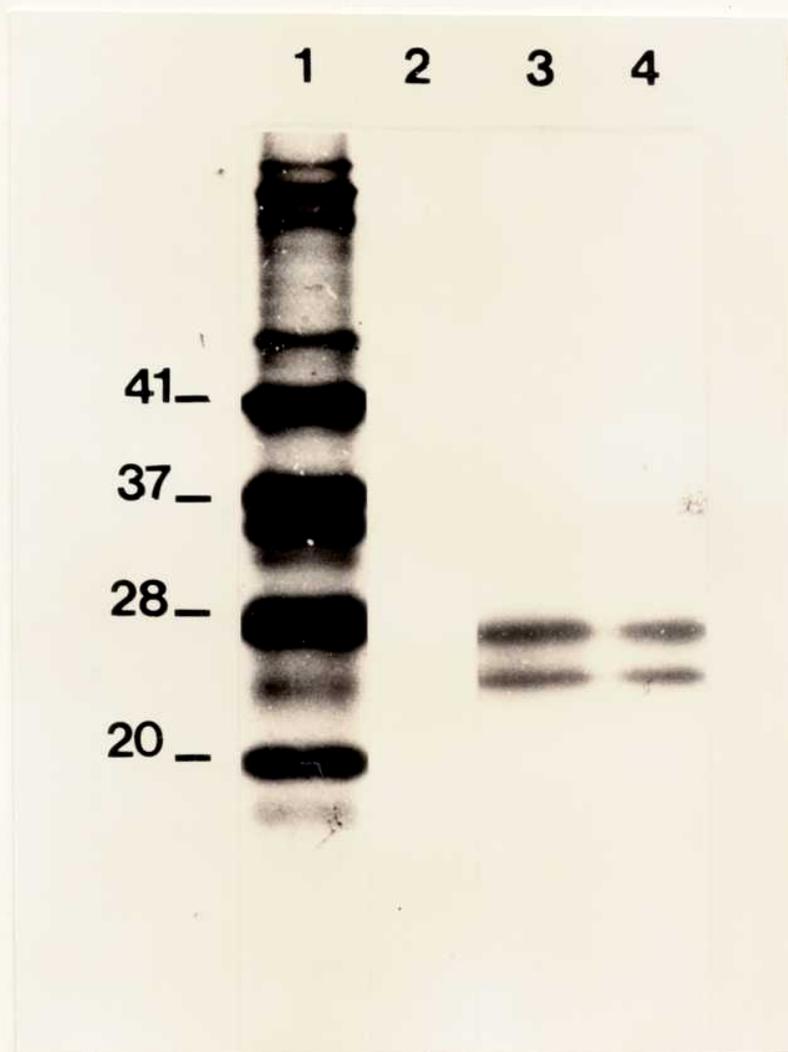


FIGURA 23 B Detección de VP11 en células MA104 infectadas con virus con reordenamiento genómico.

Los polipéptidos virales en células MA104 infectadas con virus C60 se marcaron a las 4 h.p.i. con [^{35}S]-met durante 60 minutos (1) y se inmunoprecipitaron con suero de cobayo pre-inmune (2), o inmune anti-VP11 (3), y luego se analizaron por electroforesis en un gel de SDS-12 % poliacrilamida. En la calle 4 se corrieron los productos de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-VP11 de células MA104 infectadas con virus normal (OSU) como referencia. Los números indican PM en kDa.

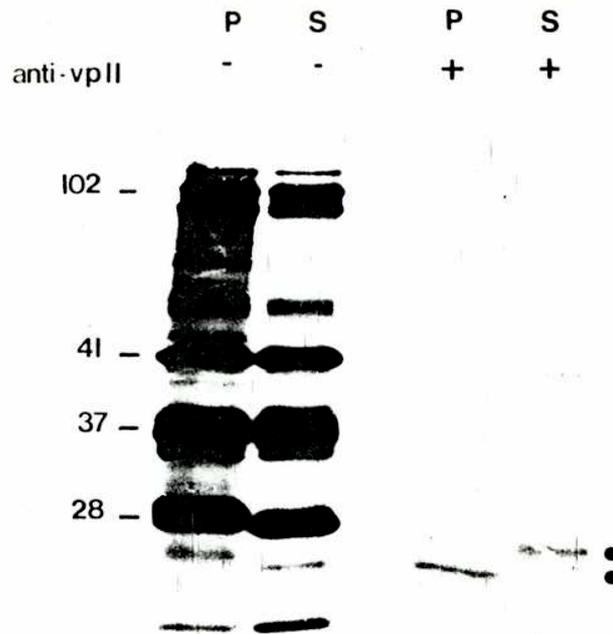


FIGURA 23 C Detección del producto final del sg 11 por ensayo de pulso y seguimiento. Las proteínas virales en células MA104 se marcaron con [^{35}S]-met por 10 minutos (P) y luego se incubaron con met fría durante 50 minutos (S). Se comparan las proteínas totales marcadas en el pulso y en el seguimiento con aquéllas inmunoprecipitadas con el suero anti-VP11. Los números indican PM en kDa.

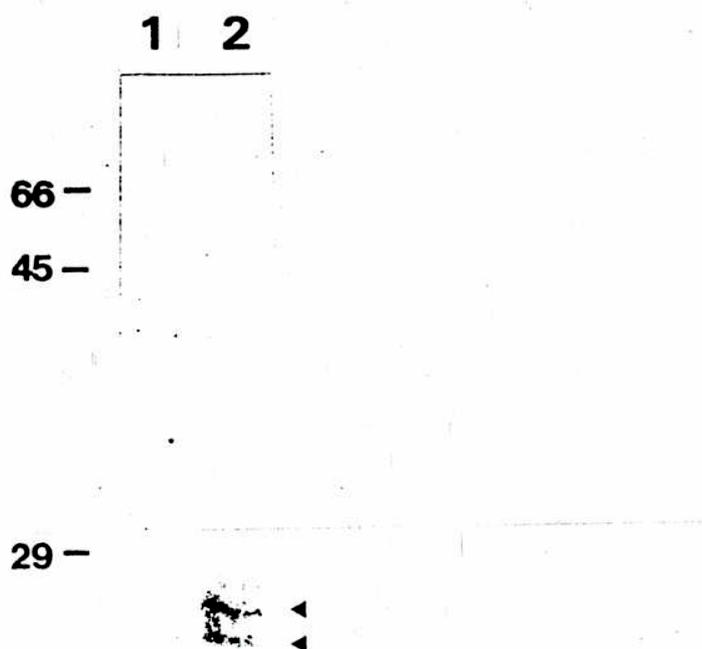


FIGURA 24 Identificación de los productos del sg 11 por *Western blot*
Proteínas totales extraídas de células MA104 no infectadas (1) o infectadas (24-48 h.p.i.) con la cepa OSU (2), correspondientes a 10^5 células, se separaron por electroforesis en un gel de SDS-10 % poliacrilamida y se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa. El filtro se incubó primeramente con el antisuero anti-VP11, y luego la reacción antígeno-anticuerpo se reveló por incubación con ^{125}I -proteína A. Las dos bandas de 26 y de 28 kDa detectadas están indicadas. Los números indican PM en kDa.

3.1.6. ¿Cuál es la modificación de VP11?

Dado que los experimentos de incorporación de [³⁵S]-Met indicaron que VP11 presenta una modificación post-traducciona, y que, en base a la secuencia aminoacídica, VP11 posee 1 o 2 sitios putativos de N-glicosilación (dependiendo de la especie), se realizaron primeramente digestiones con endoglicosidasas para ver si la N-glicosilación era la responsable del incremento de PM.

Las enzimas utilizadas fueron endo H, que libera oligosacáridos de glicoproteínas de tipo "alta manosa", características del R.E., y endo F, que libera oligosacáridos de glicoproteínas de tipo complejo, modificación que tiene lugar en el aparato de Golgi.

Para ello se aprovechó la posibilidad de aislar los dos polipéptidos de 26 y de 28 kDa por inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-VP11.

Los inmunocomplejos se eluyeron de la proteína A Sepharosa en buffers compatibles con las enzimas a utilizar. Se realizaron como control digestiones paralelas con el lisado de proteínas virales totales marcadas con ³⁵S, teniendo en cuenta que las 2 N-glicoproteínas virales conocidas hasta el momento, VP7 y VP10, son del tipo de "alta manosa" (están localizadas en el R.E.), por lo que son sensibles a Endo H y Endo F/ PNGasa F (bajo las condiciones de ensayo, endo F puede clivar N-glicoproteínas de tipo "alta manosa" y complejo).

Los polipéptidos de 26 y de 28 kDa fueron resistentes tanto al tratamiento con Endo H como con Endo F/ PNGasa F (fig. 25, calles 2 y 3). La actividad de estas enzimas en las condiciones de ensayo realizadas quedó demostrada por la sensibilidad de VP7 y de VP10 a Endo H y Endo F/ PNGasa F, manifiesta por la disminución en el PM de las mismas (fig. 25, calles 4 y 6, en comparación con calles 5 y 7).

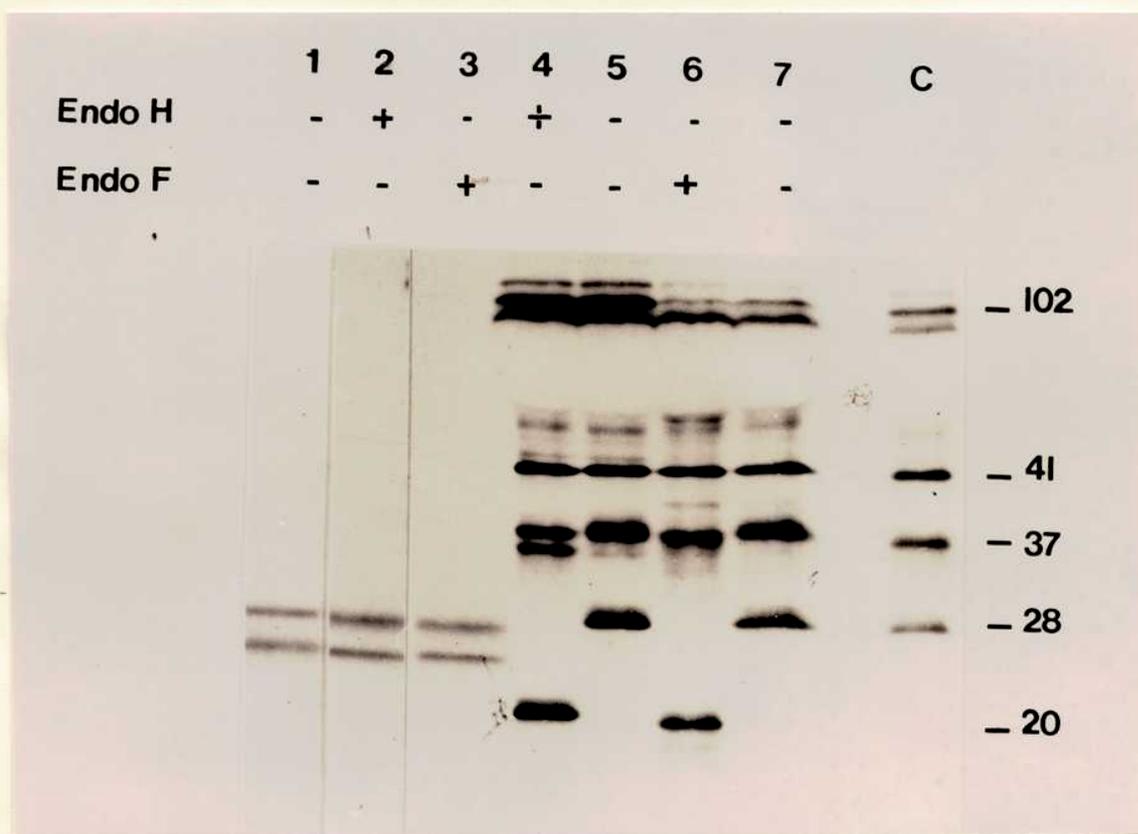
Con el objeto de analizar si la modificación de VP11 correspondía a una O-glicosilación, se sometieron los polipéptidos inmunoprecipitados a β -eliminación en condiciones alcalinas suaves, lo que permite liberar los oligosacáridos de O-glicoproteínas por ruptura de la unión proteína-azúcar.

Se observó que las bandas de 26 y de 28 kDa eran sensibles a la ruptura con álcali (fig. 26, calles 2 y 3) quedando un producto de 25 kDa. El extracto proteico total no sufrió modificación por incubación en las mismas condiciones (fig. 26, calles 4 y 5), lo que permite descartar la posible degradación inespecífica de los polipéptidos. Esto sugirió fuertemente la posible presencia de O-oligosacáridos en VP11.

Con el fin de confirmar este resultado, se marcaron con [³H]-Glucosamina células MA 104 infectadas con virus OSU y C60 a las 4 h.p.i.. Esto permite la detección de O-glicoproteínas por la incorporación específica de este azúcar. El hecho de que los productos proteicos de 26 kDa y de 28 kDa, inmunoprecipitados con el antisuero anti-VP11, aparezcan marcados con [³H]-Glucosamina indica que VP11 es una O-glicoproteína (fig. 27). Este resultado, junto con los datos de β -eliminación, permiten concluir que VP11 es una O-glicoproteína de 28 kDa. Sin embargo, en base a los estudios realizados, no se puede descartar que VP11 presente además otra modificación, como ser acilación.

Hasta el presente se conocían solamente dos N-glicoproteínas virales, VP7 y VP10, que son del tipo "alta manosa". Los experimentos realizados en esta Tesis permitieron determinar por primera vez la existencia de una O-glicoproteína en rotavirus.

Resta pues analizar cuál es el tipo de O-glicosilación que presenta VP11 (ver Discusión), y determinar cuál es su función.

**FIGURA 25**

Tratamiento de VP11 con endoglicosidasas

Proteínas totales de células MA104 infectadas con virus OSU se marcaron con [³⁵S]-met y se trataron, directamente o después de inmunoprecipitar con el suero anti-VP11, con endo H y endo F.

(1). inmunoprecipitado sin incubar a 37 °C, o (2). incubado a 37 °C con endo H, o con endo F (3). 4-7. Controles de actividad de las endoglicosidasas; extractos proteicos totales incubados a 37 °C en ausencia (5 y 7) o en presencia de las enzimas (4 y 6). C. control de extracto proteico total sin incubar a 37 °C.

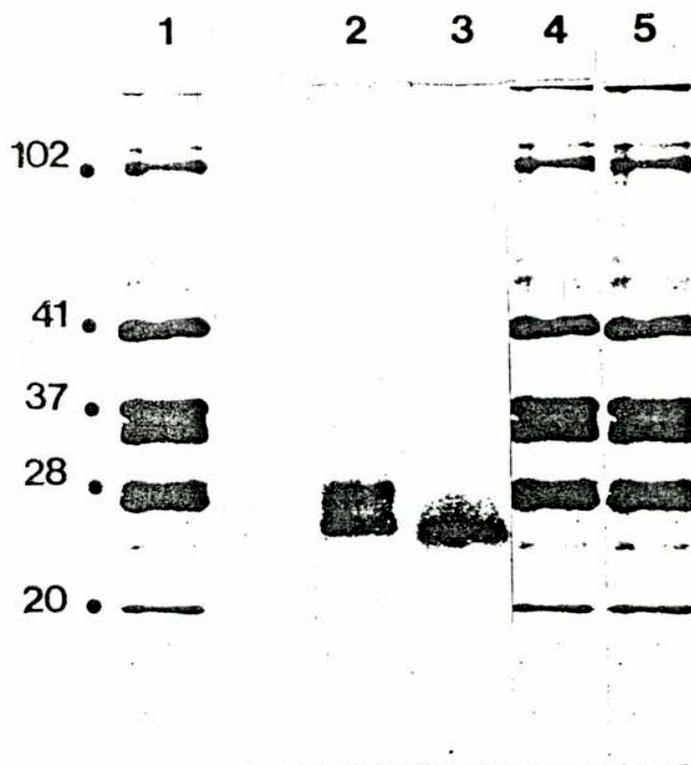


FIGURA 26 Tratamiento de VP11 por β -eliminación en condiciones alcalinas suaves. Proteínas virales totales de células MA104 infectadas con la cepa OSU, marcadas con ^{35}S (calle 1), se inmunoprecipitaron con el suero anti-VP11. El inmunoprecipitado se incubó a 23°C durante 18 horas en ausencia (calle 2) o en presencia de 0.1 M NaOH (calle 3). Como control se utilizó el extracto de proteínas virales incubado en las mismas condiciones: en ausencia (calle 4), o en presencia de álcali (calle 5).

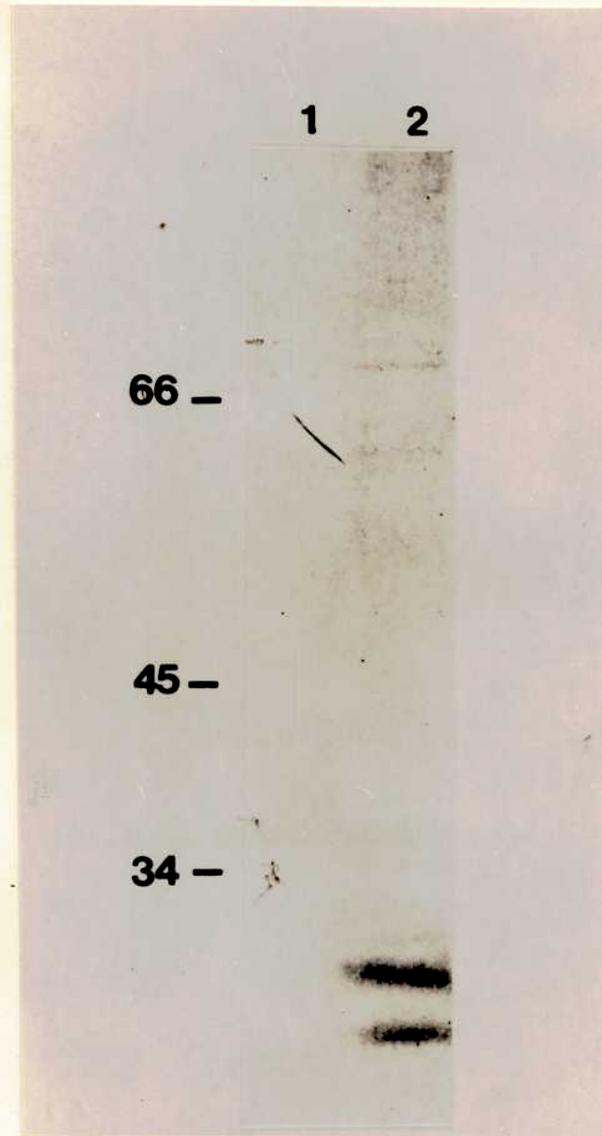


FIGURA 27 VP11 es una O-glicoproteína
Proteínas de células MA104 infectadas con virus OSU se marcaron con [^3H]-Glucosamina a las 4 h.p.i. y se inmunoprecipitaron con suero de cobayo pre-inmune (1), o inmune anti-VP11 (2). Los números indican PM en kDa.

IV. DISCUSSION

1. REORDENAMIENTOS GENOMICOS EN ROTAVIRUS

1.1. Estructura de los genes reordenados

Los resultados presentados en esta Tesis demuestran que las cepas de rotavirus porcino C60 y C117, provenientes de aislamientos de distintas zonas de la provincia de Buenos Aires, presentan reordenamientos genómicos del sg 11.

Se han aislado rotavirus con reordenamiento genómico del sg 11 de terneros (128), de conejos (127), y de humanos (125, 126). También se han descrito rearrreglos genómicos de los sg 6, 8, y 10 en rotavirus aislados de niños infectados (188).

El hecho de que éstos sean los genes que con más frecuencia se reordenan podría indicar que los reordenamientos genómicos en rotavirus ocurren principalmente en genes que codifican para proteínas virales no estructurales. Otras posibilidades son que los rearrreglos involucren a aquellos segmentos cuyo tamaño una vez reordenado puedan ser empaquetados dentro de la partícula viral, o bien que estos genes exhiban una estructura secundaria que favorezca el mecanismo de reordenamiento (ver más adelante).

Para explicar el hecho de que el sg 11 sea el segmento que con más frecuencia se rearregla, se podrían argumentar como factores determinantes algunas propiedades tales como su estructura secundaria, o su tamaño (es el segmento más pequeño del genoma).

Los estudios de secuenciación y de elongación a partir de un ADN iniciador (*primer extension*) permitieron demostrar que los genes reordenados X_1 y X_2 , de las cepas C60 y C117 respectivamente, se originaron por duplicación cabeza-cola del sg 11, habiéndose demostrado que en X_1 y en X_2 se mantiene la capacidad codificante del gen normal.

Hubiera resultado interesante poder comparar los segmentos reordenados con el sg 11 original a partir del cual se generaron, pero esto no ha sido posible ya que las cepas C60 y C117 derivan de aislamientos de campo. Sin embargo, se pudo hacer un análisis detallado de la estructura de los genes reordenados comparándolos con el gen porcino OSU (cuya secuencia fue determinada en esta Tesis) y con los genes de otras cepas, dado que la secuencia del sg 11 está altamente conservada en virus de distintas especies, presentando homologías mayores a 89 % a nivel nucleotídico.

El análisis de la secuencia del gen X_1 mostró que la unidad 5' codificante está muy conservada con respecto a la secuencia del sg 11. Se encontraron 33 mutaciones puntuales en la unidad 3' no codificante al compararla con la unidad 5' (Resultados, sección III.2.3.1.), la mayoría de las cuales son transiciones T→C. Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta que, a pesar de la alta variabilidad genómica de los virus a ARN, la región codificante del gen X_1 está sometida a presión de selección constante, por lo que la secuencia consenso de esta región cambia mínimamente. En cambio, la unidad 3', no codificante, no está sometida a presión selectiva, pudiendo acumular mayor número de mutaciones que la región traducida. Si se analizara la secuencia de los genes reordenados de los virus C60 y C117 luego de varios pasajes en cultivo, se podría comprobar si la unidad 3' no codificante ha acumulado mayor cantidad de mutaciones que la unidad 5' de X_1 .

Podría especularse que la presencia de una región 3' no codificante más extensa en el gen reordenado (596 bases en X₁ en comparación con 49 bases en el sg 11 normal) tenga alguna consecuencia a nivel de la regulación de la transcripción y/o traducción.

Por otra parte, los extremos 5' y 3', característicos de todos los segmentos de rotavirus, están conservados en el gen reordenado, y no están repetidos en otra región del gen como consecuencia de las deleciones parciales de las unidades 5' y 3'. Esto es consistente con el hecho de que estas secuencias terminales son importantes para la transcripción, replicación y/o ensamblado del virus, y con el hecho de no haber detectado transcritos cadena (+) truncados (que sólo involucren la unidad 5' codificante de los genes). Esto último permite descartar la posibilidad de que opere en los rotavirus un mecanismo sensor capaz de conseguir una diferencia funcional entre aquellas moléculas a ser utilizadas en la síntesis proteica y aquellas que son utilizadas como templado para la replicación genómica.

Dado que hasta el momento no se contaba con la secuencia de un sg 11 de origen porcino, se decidió secuenciar también el de la cepa OSU. Se encontró que el gen reordenado X₁ tiene un 96% de homología a nivel nucleotídico y 97% de homología a nivel proteico con el gen 11 de OSU. X₁ y el sg 11 de OSU presentan además, respecto del gen de las cepas SA11 (de simio) y UK (bovino), la deleción del codón CAU de histidina en la posición nt 442-444. Esta deleción, observada por primera vez en el sg 11 de la cepa humana Wa, sugiere un posible origen común de los genes porcino y humano, pudiendo así servir de marcador característico. Por otra parte, y dado que se desconoce hasta el momento la función de VP11, el producto del sg 11, la deleción del codón de histidina podría determinar la especificidad de especie, ya sea a través de la interacción de VP11 con determinados factores y/o proteínas celulares del huésped, o con otras proteínas virales, dependiendo de la presencia o ausencia del residuo de histidina. Esto podría ser uno de los factores que determina que un virus porcino, por ejemplo, no sea infectivo para terneros.

Como se ha demostrado en esta Tesis, los reordenamientos genómicos del sg 11 descritos mantienen la región codificante intacta, produciendo el producto proteico normal.

En cuanto a otros virus pertenecientes a la familia *Reoviridae*, se han aislado dos cepas cuyos segmentos genómicos 9 y 10 forman concatémeros en orientación cabeza-cola, dando aparentemente productos idénticos a los producidos por los ARN monoméricos (135). Sin embargo, se ha aislado también una variante de orbivirus que presenta un segmento de ARN 9 con las secuencias terminales idénticas al segmento 9 del virus salvaje, pero que tiene una deleción aproximada de 140 bases (135). Por traducción *in vitro* se encontró que el segmento 9 delecionado produce una proteína de 32 kDa, mientras que la proteína normal es de 38 kDa. Esta es la primera deleción funcional observada en *Reoviridae*. De acuerdo a los estudios realizados en esta Tesis, una deleción de este tipo en VP11 no sería viable, dado que sólo se han detectado rearrreglos del sg 11 en los cuales se conserva la región codificante del gen normal.

1.2. Mecanismo involucrado en los reordenamientos

Existen dos mecanismos generales posibles para explicar el fenómeno de reordenamientos genómicos en rotavirus: el mecanismo intramolecular y el intermolecular.

En el caso de que operara el **mecanismo intramolecular**, el gen 11 formaría una estructura de "rulo" de forma tal que, durante la síntesis de la cadena (+), la ARN polimerasa reinicia sobre el mismo templado generando así la duplicación del gen. En apoyo de este mecanismo se ha descrito que los ARNm, y por consiguiente también la cadena (-), de los genes 6 a 11 pueden formar estructuras de "tallo y rulo". En el caso del sg 11, esta estructura secundaria involucra a los extremos 5' y 3' (66).

La otra alternativa (**mecanismo intermolecular**) involucraría el "salto" de la polimerasa viral de una cadena de templado a otra.

En el caso de virus a ARNsc se ha encontrado que sufren reordenamientos genómicos a través de un mecanismo de "elección de copia" (*copy choice*), el cual involucra el "salto" de la ARN polimerasa viral de una cadena de templado a otra (189). El mecanismo de "salto" de la polimerasa o "elección de copia" ha permitido explicar la formación de partículas de ARN defectivas interferentes ("ARN DI") en virus a ARN cadena (+) y cadena (-) (ver más adelante), la fusión de secuencias de ARN no contiguas durante la transcripción de coronavirus (190) y la duplicación de pequeños segmentos de ARN en viroides (191). Una de las evidencias proviene de experimentos realizados con coronavirus, en los cuales se ha observado que los transcritos, la mayoría de los cuales presentan deleciones internas con respecto al genoma viral, no se originan de precursores de mayor tamaño, sino que se transcriben en forma discontinua (190, 192, 193). El hecho de que el "salto" de templado por la ARN polimerasa ARN dependiente sea el mecanismo aparentemente responsable de la recombinación en poliovirus (188) enfatiza la hipótesis de que los reordenamientos genómicos en virus a ARNsc puedan ocurrir por este mecanismo. De acuerdo a nuestros resultados, si un mecanismo similar operara en el caso de los rotavirus, la polimerasa viral tendría que retener especificidad de templado y reiniciar sobre otra cadena del mismo gen, evitando así la formación de estructuras "mosaico", como ocurre en el caso del virus influenza, virus a ARN cadena (-) segmentado (194).

Para determinar cuál de estos dos mecanismos, el intra o el intermolecular, es operativo en los reordenamientos genómicos en rotavirus se debería contar con un modelo de reordenamientos genómicos, o sea, tener un sistema que permitiera seleccionar y detectar reordenamientos genómicos *in vitro*, y además tener virus que lleven distintos marcadores de selección para poder luego analizar en la progenie viral el tipo de recombinación que tuvo lugar.

Independientemente del mecanismo involucrado en los reordenamientos genómicos en rotavirus, lo más probable, de acuerdo al modo conservativo de replicación del genoma viral, es que el sg 11 se reordene (es decir, se duplique) durante la síntesis de la cadena (+), lo cual es seguido por la síntesis de la cadena (-) para formar la progenie viral.

Los reordenamientos genómicos en rotavirus difieren en varios aspectos de las partículas interferentes defectivas (ARNs DI) observadas en virus cuyo genoma está formado por ARN segmentado (virus influenza, reovirus):

- a) la formación de partículas DI involucra la aparición de ARNs de bajo PM ("ARN DI") que se originan a partir de segmentos de ARN de mayor tamaño por una o múltiples deleciones internas (195). En los casos descritos en esta Tesis, por el contrario, el segmento genómico de menor PM, el sg 11, da lugar a un segmento 11 duplicado, de mayor tamaño.
- b) Los ARN DI se generan por deleciones internas o por formación de estructuras mosaico conteniendo secuencias de más de uno de los segmentos de ARN. En el caso de los rotavirus, los reordenamientos descritos involucran una duplicación del mismo gen, y no contienen secuencias de más de un segmento.
- c) las partículas virales que contienen ARN DI son defectivas en su replicación. En cambio, los virus estudiados en esta Tesis fueron clonados, y pueden replicar en cultivo de tejido en ausencia de un virus *helper*, además de conservar los segmentos reordenados. Es decir, que los virus reordenados C60 y C117, que contienen entre 400 y 600 bases de información extra respectivamente (aproximadamente 3 % del tamaño normal del genoma) son viables y estables. Además, los virus con reordenamiento genómico son indistinguibles en morfología y tamaño de los virus normales (129). Con respecto a este punto merece destacarse el hecho de que, aunque el empaquetamiento de todos los segmentos genómicos virales es estrictamente equimolecular (196, 197), estos virus son capaces de empaquetar material genético extra, no como un segmento adicional, sino como información extra de un gen.

Por otra parte, estudios recientes del laboratorio analizando distintas cepas de origen porcino y humano con reordenamientos del sg 11 sugieren que la duplicación cabeza-cola es un mecanismo general para los reordenamientos genómicos en rotavirus (S. Giambiagi, comunicación personal).

Teniendo en cuenta que en los orbivirus, otros miembros de la misma familia, también se han observado reordenamientos genómicos generados por duplicación cabeza-cola del gen normal sin ninguna modificación aparente de su capacidad codificante, se podría sugerir que los virus a ARNdc se reordenan por un mecanismo especial de duplicación cabeza-cola, que en los casos estudiados en este trabajo, no alteran el marco abierto de lectura del gen normal.

Los reordenamientos genómicos son pues, junto con la alta velocidad de aparición de mutaciones puntuales y el intercambio de segmentos genómicos entre diferentes virus (*reassortment*), otro mecanismo de evolución de los rotavirus; los resultados presentados en esta tesis sugieren que este fenómeno no tiene implicancia alguna en la codificación de las proteínas virales.

2. ESTUDIO DEL PRODUCTO DEL GEN 11

2.1. Características de VP11 deducidas de su secuencia aminoacídica

El análisis realizado en esta Tesis de la secuencia del sg 11 muestra que existen 3 marcos abiertos de lectura: el principal de 197 aminoácidos, que comprende desde el nt 22 hasta 615 y que, como se demuestra en esta Tesis, es el que se utiliza *in vivo*; otro, en fase con respecto al principal, de 146 aminoácidos y que comienza en la metionina 52; y el tercero, desfasado en (+1) con respecto al principal, que comienza en la base 80 y que tiene 92 aminoácidos.

El producto proteico, VP11 (197 aminoácidos), posee 2 sitios potenciales de N-glicosilación (residuos 20 y 117), y es inusualmente rico en serinas y treoninas. Estas características sugirieron la posibilidad de que VP11 estuviera modificada por N-glicosilación, O-glicosilación, fosforilación y/o acilación.

La secuencia aminoacídica de VP11 de diferentes especies, así como la del gen reordenado X₁, muestra cierta divergencia de aminoácidos entre los residuos 112 y 140, y se ha argumentado que esta variación reflejaría variación antigénica de la proteína si ésta estuviera en la cubierta externa (68). De hecho, la principal diferencia entre estas secuencias es debida a un cambio en el marco de lectura de la secuencia del sg 11 de rotavirus humano (cepa Wa) entre los residuos 123-132, el cual no ha sido observado en las otras secuencias conocidas, ni en las determinadas en esta Tesis. Por lo tanto, la variabilidad observada entre los aminoácidos 123-132 indicaría que esta región no es un dominio importante para el funcionamiento del gen, o bien podría ser responsable de conferir variabilidad antigénica a los virus de distintos orígenes.

Dado que hasta el momento existía muy poca información acerca de VP11, y que no se detectan anticuerpos anti-VP11 en sueros de animales infectados o hiperinmunizados con partículas virales, se decidió expresar el ADNc del gen 11 en *E. coli* con el fin de obtener anticuerpos específicos, que permitieran realizar estudios sobre la expresión y localización de VP11 en células infectadas.

2.2. Identificación de los productos del sg 11

Se expresó el ADNc del gen X₁ en *E. coli* como proteína de fusión con β -Galactosidasa, teniendo en cuenta que la región codificante del gen reordenado es la misma que la del gen 11 normal. Se obtuvieron anticuerpos dirigidos contra la proteína de fusión, lo que permitió realizar un estudio detallado de VP11.

Los datos experimentales demuestran que el producto del sg 11 tiene un PM aparente de 28 kDa.

Los estudios realizados sugieren que el producto que se sintetiza *in vivo* en células MA104 infectadas corresponde al marco abierto de lectura principal del sg 11, dado que no se detectan productos de menor PM como los esperados si la traducción ocurriera a partir del segundo marco de lectura de 146 aminoácidos (PM teórico 16 kDa) mencionado anteriormente, el cual se halla en la misma fase que el marco principal.

La secuencia aminoacídica deducida del gen 11 presenta un marco abierto de lectura de 92 aminoácidos (PM teórico 11 kDa) desfasado en (+1) con respecto al principal. La posibilidad de que

este marco abierto de lectura sea utilizado en células infectadas no ha sido analizado en este estudio. Esto podría realizarse insertando en un vector de expresión un sg 11 delecionado que iniciara en el segundo AUG, produciendo el polipéptido codificado de acuerdo a ese marco de lectura, y analizando con anticuerpos específicos contra ese producto si se detecta algún polipéptido en células infectadas. Sin embargo, es muy poco probable que la traducción inicie en un AUG interno, teniendo en cuenta que todos los genes de rotavirus se traducen a partir del primer AUG.

En células infectadas con virus reordenados se detectaron los mismos productos que en el caso de infección con virus normal. Esto confirma lo esperado a partir de la secuencia nucleotídica del gen reordenado X_1 , que presenta la región codificante inalterada. En las condiciones experimentales utilizadas, VP11 se produce aparentemente en igual nivel en virus normales y con reordenamiento.

2.3. Modificaciones post-traduccionales de VP11

La modificación post-traducciona es una vía mediante la cual las propiedades de una proteína pueden ser alteradas y/o reguladas posteriormente a su síntesis. Dentro de los grupos que más frecuentemente se encuentran unidos covalentemente a las proteínas se hallan los grupos fosfato, los azúcares (N- y O- oligosacáridos), los grupos acetilo y formilo (unidos al NH_2 -terminal) y los ácidos grasos.

El alto contenido de VP11 en serinas y treoninas sugirió la posibilidad de que esta proteína estuviera modificada por fosforilación, O-glicosilación, y/o acilación.

2.3.1. Fosforilación

La unión más común entre el grupo fosfato y la proteína involucra la esterificación del fosfato a residuos de serina, treonina, o tirosina; con menor frecuencia se hallan unidos a residuos de lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, o cisteína.

Muy recientemente, Wan Welch & col. (198) caracterizaron los productos del sg 11 mediante una estrategia similar a la utilizada en esta Tesis. Encontraron que VP11 es una fosfoproteína no estructural, cuyo producto primario es un polipéptido de 26 kDa, el cual es procesado a un producto de 28 kDa, estando ambos fosforilados. Sin embargo, no pudieron identificar cuál es la modificación responsable del aumento de PM del producto de 26 kDa, ya que la desfosforilación de estos polipéptidos no modificó sus movilidades electroforéticas.

Se ha encontrado que virus a ADN y a ARN, con o sin envoltura, contienen proteínas que están fosforiladas (199-201). Frecuentemente, estas fosfoproteínas están asociadas al ácido nucleico viral, lo que sugiere que la fosforilación regularía la biosíntesis de ácidos nucleicos y la expresión genómica. Se ha demostrado que la proteína no estructural NS2 del virus de la lengua azul, miembro de la familia *Reoviridae*, es una fosfoproteína que tiene afinidad por ARNsc (202). En muchos virus el grado de fosforilación parece determinar el grado de unión al ácido nucleico. Así, por ejemplo, la oligomerización y la actividad de unión al ADN del antígeno T del virus SV40 correlacionan con los diferentes niveles de fosforilación observados en éste (203).

La fosforilación es reconocida como uno de los principales mecanismos regulatorios post-traduccionales, mediante el cual muchas señales extracelulares regulan funciones intracelulares.

Así mismo, los eventos de fosforilación median procesos mitóticos, tales como la condensación de cromosomas, la ruptura de la envoltura nuclear, y el ensamblado y elongación del huso mitótico (204).

2.3.2. Glicosilación

Se han encontrado 3 mecanismos de glicosilación en células de mamíferos. Dos de ellos ocurren dentro de la vía secretoria celular, la cual comienza con la traslocación del polipéptido durante la síntesis a través de la membrana del R.E.R., y procede con el movimiento de la proteína a través del R.E.R. y aparato de Golgi hacia la membrana plasmática o como producto secretado.

Uno de ellos es co-traducciona l e involucra la unión N-glicosídica entre la asparagina y N-acetilglucosamina (GlcNAc). La adición de N-oligosacáridos comienza con la adición de Glucosa₃Manosa₉GlcNAc₂ (Glc₃Man₉GlcNAc₂) de un lípido don or a residuos de asparagina en las cadenas polipeptídicas nacientes en el R.E.. Subsiguientemente, los residuos de glucosa son removidos en el R.E., generando la estructura Man₉GlcNAc₂ (205-207). En la región cis del aparato de Golgi están las enzimas involucradas en la síntesis de azúcares de tipo complejo (208). Otros azúcares periféricos, tales como galactosa y ácido siálico, son agregados por enzimas presentes en la región trans del aparato de Golgi.

A diferencia de esta secuencia de eventos en la biosíntesis de N-oligosacáridos, la biosíntesis de O-oligosacáridos, también en la vía de secreción, es un proceso post-traducciona l, que se inicia por la adición de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a residuos de serina o treonina (209). La biosíntesis procede a través de la adición secuencial de residuos de azúcar por medio de glicosiltransferasas individuales localizadas en el aparato de Golgi. Muchas glicoproteínas de superficie contienen N- u O-oligosacáridos o ambos tipos. Así mismo, se ha encontrado que muchas proteínas virales están modificadas por N- y/o O- glicosilación (210).

Muy recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de glicosilación, el cual tiene lugar en el citoplasma, fuera de la vía secretoria, y que resulta en una unión O-glicosídica entre serina o treonina y GlcNAc (O-GlcNAc). Este mecanismo es co-traducciona l. Desde su descubrimiento, se han encontrado proteínas modificadas por O-GlcNAc en el citoplasma, en las caras de los poros nucleares, en el tegumento de citomegalovirus humano, y en la cara citoplasmática del R.E.R.. También se ha encontrado O-GlcNAc en varios factores de transcripción de la ARN polimerasa II y en proteínas cromosomales (211).

En el caso de los rotavirus se conocían hasta el momento 2 glicoproteínas; la proteína estructural VP7 y la proteína no estructural VP10. Tanto VP7 como VP10 son N-glicoproteínas de tipo "alta manosa", consistente con el hecho de que ambas son proteínas integrales del R.E..

Por los datos de secuencia el producto primario del sg 11 debería tener un PM aparente de 22 kDa. Sin embargo, en los estudios de incorporación de [³⁵S]-Met se detectaron dos productos de 26 y 28 kDa. Por los ensayos de pulso y seguimiento se determinó que el producto final es el de 28 kDa. Estos resultados demuestran que VP11 presenta una modificación post-traducciona l.

Se analizó primero la presencia de N-oligosacáridos, debido a que del análisis de la secuencia de aminoácidos de VP11 surge la presencia de dos sitios potenciales de N-glicosilación. Los productos de 26 y 28 kDa detectados por inmunoprecipitación de proteínas virales marcadas con ³⁵S fueron resistentes a la digestión con las enzimas Endo H y Endo F, lo que permitió descartar la modificación

de VP11 por N-oligosacáridos de tipo "alta manosa" y/o complejo. Sin embargo, cuando estos polipéptidos se trataron en condiciones alcalinas suaves (β -eliminación), se redujo su tamaño a aproximadamente 25 kDa. En estas condiciones de reacción los enlaces O-glicosídicos, pero no los N-glicosídicos, son sensibles a la ruptura con álcali. El enlace éster, en el caso de acilación (unión de ácido palmítico a serina), es lábil en otras condiciones (0.1 M KOH en 20 % metanol) (212). Este resultado indicó la posible presencia de O-oligosacáridos, un hecho consistente con el alto contenido de serinas (20 %) y de treoninas (5 %) de VP11. El hecho de que el producto que resulta de someter a VP11 a β -eliminación sea de aproximadamente 25 kDa, y no de 22 kDa (como se deduciría de la traducción de la secuencia del sg 11) podría explicarse por: a- una movilidad electroforética anómala de VP11 debido a su alto contenido de serinas y treoninas; b- la presencia de otra modificación post-traducciona, además de la O-glicosilación. En apoyo del primer argumento, se ha encontrado que por traducción *in vitro* del sg 11 se obtiene un producto de PM aparente de alrededor de 25 kDa (198).

La incorporación específica de [3 H]-Glucosamina a los polipéptidos de 26 y 28 kDa, los cuales son sensibles a β -eliminación, confirmó que el producto del sg 11 es una O-glicoproteína, siendo así la primera descrita en rotavirus.

El hecho de que por marcación con precursores radioactivos no se pueda detectar el producto primario del sg 11 (que podría ser aquél que se obtiene por β -eliminación de los productos marcados con 35 S) sugiere que la modificación de VP11 es de tipo co-traducciona.

Queda pues determinar si la O-glicosilación de VP11 ocurre en el aparato de Golgi (adición de GalNAc), o en el citoplasma (adición de GlcNAc). Esta última es la posibilidad más favorecida, teniendo en cuenta que: a- los rotavirus maduran en el R.E., b- por inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-VP11 de células MA104 infectadas, VP11 se detecta en el citoplasma asociada a los viroplasmata, que son estructuras citoplasmáticas fuera del R.E., y c- si la modificación fuera por GalNAc VP11 debería pasar transitoriamente por el aparato de Golgi, y luego volver al citoplasma.

Para muchas glicoproteínas la cadena de oligosacárido confiere propiedades físicas importantes, como ser la estabilidad conformacional, la resistencia a proteasas, y la capacidad de unir moléculas de agua. De igual importancia es el papel de los azúcares en el reconocimiento biológico, ya sea como señales para el *targeting* de proteínas, o para interacciones célula-célula. La importancia de la O-glicosilación (como O-GalNAc) sobre las propiedades generales de las glicoproteínas han sido menos estudiadas que en el caso de las N-glicoproteínas. Ciertamente, estos grupos proveen de carga y de propiedades de unión de moléculas de agua para la función de proteínas altamente glicosiladas como las mucinas. Krieger y col. han descrito una línea celular CHO deficiente en la enzima glucosa 4-epimerasa, en la cual se puede controlar la O-glicosilación, ya sea por omisión o inclusión de GalNAc en el medio de cultivo (213). Al examinar la expresión en estas células de glicoproteínas recombinantes, tales como el receptor de LDL se vio que éstas se expresaban y eran transportadas a la membrana plasmática, pero eran rápidamente degradadas. Estos resultados demuestran claramente que la O-glicosilación es requerida para la estabilidad de algunas proteínas.

Algunos estudios han mostrado que la aglutinina de germen de trigo puede inhibir específicamente el transporte núcleo-citoplasma, lo que sugiere un rol importante para O-GlcNAc. Otras posibles funciones incluyen el bloqueo de la fosforilación de proteínas en los residuos de serina, el impedir la proteólisis, o el servir como señal de *targeting* en el transporte intracelular (211). Dada la localización inusual de O-GlcNAc, y su posible rol en el transporte de proteínas a través de la

membrana nuclear, el interés en esta forma de modificación post-traduccionaI está creciendo rápidamente.

En síntesis, los resultados presentados demuestran que la modificación post- o co-traduccionaI de VP11, responsable del cambio de PM a 28 kDa, es la O-glicosilación.

V. CONCLUSIONES

1- Los genes reordenados X_1 y X_2 en dos cepas de rotavirus porcino (C60 y C117, respectivamente) provenientes de distintos lugares de la provincia de Buenos Aires se originaron por un mecanismo similar de duplicación cabeza-cola del sg 11 normal, lo que sugiere la existencia de un mecanismo común que podría ser relevante en la variabilidad de movilidad electroforética observada en distintos aislamientos virales.

2- Los genes reordenados X_1 y X_2 son dímeros de un gen normal, y no estructuras mosaico compuestas de regiones de varios segmentos genómicos, que es lo que se observa en virus a ARNsc segmentado.

3- Por secuenciación se demostró que el gen reordenado X_1 está formado por dos unidades delecionadas del sg 11: la unidad 5', que está muy conservada con respecto a la región codificante del sg 11, y la unidad 3' no codificante, que presenta principalmente mutaciones de tipo transición T→C.

4- Los transcritos de los genes reordenados, ya sea producidos en células infectadas como *in vitro* en partículas virales, tienen el mismo tamaño que los segmentos genómicos correspondientes. Si bien los genes reordenados tienen una región 3' no traducida mucho más extensa que la del gen 11 normal, no se detectan transcritos cadena (+) truncados que sólo involucren la unidad 5' codificante de estos genes. Este hecho es consistente con el modo conservativo de replicación viral y con el hecho de que las secuencias 5' y 3', conservadas en todos los segmentos virales y que están presentes en los genes reordenados, son reconocidas por la polimerasa viral durante la replicación del genoma.

5- Los reordenamientos genómicos, junto con la alta velocidad de mutaciones puntuales y el intercambio de segmentos genómicos entre diferentes virus (*reassortment*), son uno de los mecanismos de evolución de los rotavirus. El estudio realizado indica que, al menos en los casos analizados, el reordenamiento genómico no tiene implicancia a nivel de síntesis de proteínas virales.

6- El producto modificado del sg 11 tiene un PM aparente de 28 kDa.

7- Por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos, VP11 es sólo detectada en el citoplasma de células MA104 infectadas, observándose una tinción puntillosa compatible con la acumulación de esta proteína viral en los viroplasmos.

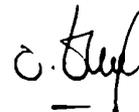
8- Los virus con reordenamientos genómicos del sg 11 producen VP11, lo que indica que, por lo menos en los casos estudiados en esta Tesis, la región codificante del sg 11 normal se mantiene.

9- VP11 es una O-glicoproteína viral no estructural. Esto quedó demostrado en base al criterio de sensibilidad al álcali en condiciones suaves (β -eliminación), a la incorporación específica de

[³H]Glucosamina, y a la resistencia de VP11 a endoglicosidasas que clivan glicoproteínas de tipo "alta manosa" y complejo.



SILVIA A. GONZÁLEZ



DR. OSCAR BURRONE

BIBLIOGRAFIA

1. Cukor, G. & Blacklow, N.R. (1984). *Microbiol.Rev.* **48**, 157-179.
2. Estes, M.K., Palmer, E.L. & Obijeski, J.F. (1983). *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **105**, 123-184.
3. Holmes, I.H. (1983). En: "The Reoviridae" (W.K.Joklik ed.). Plenum Publishing Corp., N.Y., pp. 359-423.
4. Kapikian, A.Z. & Chanock, R.M. (1985). En: "Virology" (B.N.Fields, D.N. Knipe, R.M.Chanock, J.L.Melnick, B.Roizman & R.E.Shope eds.). Raven Press, N.Y., pp. 863-906.
5. Walsh, J.A. & Warren, K.S. (1979). *N.Engl.J.Med.* **301**, 967-974.
6. Black, R.E., Merson, M.H., Rahman, A.S.M., Yunis, M., Alim, A.R.M.A., Huq, I., Yolken, R.H., & Curlin, G.T. (1980). *J.Infect.Dis.* **142**, 660-664.
7. Vesikari, T., Isolauri, E., Delem, A., D'Hondt, E., Andre, F.E. & Zissis, G. (1983). *Lancet* **2**, 807-811.
8. Tzipori, S. (1985). *Adv.Vet.Sci.Comp.Med.* **29**, 103-206.
9. Matthews, R.E.F. (1979). *Intervirol.* **11**, 133-135.
10. Bridger, J.C. & Woode, G.N. (1976). *J.Gen.Virol.* **31**, 245-250.
11. Palmer, E.L., Martin, M.L. & Murphy, F.A. (1977). *J.Gen.Virol.* **35**, 403-414.
12. Flewett, T.H., Bryden, A.S., Davies, H., Woode, G.N., Bridger, J. & Derrick, J.M. (1974). *Lancet* **2**, 61-63.
13. Newman, J.F.F., Brown, F., Bridger, J.C. & Woode, G.N. (1975). *Nature (London)* **258**, 631-633.
14. Rodger, S.M., Schnagl, R.D. & Holmes, I.H. (1975). *J.Virol.* **16**, 1229-1235.
15. Tam, J.S., Szymanski, M.T., Middleton, P.J. & Petrie, M. (1976). *Intervirol.* **7**, 181-191.
16. Elias, M.M. (1977). *J.Gen.Virol.* **37**, 191-194.
17. Cohen, J. (1977). *J.Gen.Virol.* **36**, 395-402.
18. Estes, M.K., Graham, D.Y., Smith, E.M. & Gerba, C.P. (1979). *J.Gen.Virol.* **43**, 403-409.
19. Kalica, A.R., Wyatt, R.G. & Kapikian, A.Z. (1978). *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **173**, 531-537.
20. Schnagl, R.D. & Holmes, I.H. (1976). *J.Virol.* **19**, 267-270.
21. Todd, D. & McNulty, M.S. (1976). *J.Gen.Virol.* **33**, 147-150.
22. McCrae, M.A. & Faulkner-Valle, G.P. (1981). *J.Virol.* **39**, 490-496.
23. Mason, B.B., Graham, D.Y. & Estes, M.K. (1983). *J.Virol.* **46**, 413-423.
24. Dyall-Smith, M.L. & Holmes, I.H. (1981). *J.Virol.* **38**, 1099-1103.
25. Ericson, B.L., Graham, D.Y., Mason, B.B. & Estes, M.K. (1982). *J.Virol.* **42**, 825-839.
26. Arias, C.F., López, S. & Espejo, R.T. (1982). *J.Virol.* **41**, 42-50.
27. López, S. & Arias, C.F. (1987). *Nucleic Acids Res.* **15**, 4691.
28. Mackow, E.R., Shaw, R.D., Matsui, S.M., Vo, P.T., Dang, M.-N. & Greenberg, H.B. (1988). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **85**, 645-649.
29. Mitchell, D.B. & Both, G.W. (1989). *Nucleic Acids Res.* **17**, 2122.
30. Espejo, R.T., López, S. & Arias, C. (1981). *J.Virol.* **37**, 156-160.
31. Estes, M.K., Graham, D.Y. & Mason, B.B. (1981). *J.Virol.* **39**, 879-888.
32. Kitaoka, S., Suzuki, H., Numazaki, Y., Sato, T., Konno, T., Ebina, T., Ishida, N., Nakagomi, O. & Nakagomi, T. (1984). *J.Med.Virol.* **13**, 215-222.
33. Offit, P.A., Clark, F.H., Stroop, W.G., Twist, M.E. & Plotkin, A.S. (1983). *J.Virol.Methods* **7**, 29-40.
34. López, S., Arias, C.F., Bell, J.R., Strauss, J.H. & Espejo, R.T. (1985). *Virology* **144**, 11-19.

35. Gorziglia, M., Aguirre, Y., Hoshino, Y., Esparza, J., Blumentals, I., Askaa, J., Thompson, M., Glass, R., Kapikian, A.Z. & Chanock, R.M. (1986). *J.Gen.Virol.* **67**, 2445-2454.
36. Gunn, P.G., Sato, F., Powell, K.F.H., Bellamy, A.R., Napier, J.R., Harding, D.R.K., Hancock, W.S., Siegman, L.J. & Both, G.W. (1985). *J.Virol.* **54**, 791-797.
37. Kozak, M. (1984). *Nucleic Acids Res.* **12**, 857-874.
38. Kozak, M. (1982). *Cell* **44**, 283-292.
39. Chan, W.-K., Penaranda, M.E., Crawford, S.E. & Estes, M.K. (1986). *Virology* **151**, 243-252.
40. Kabcenell, A.K. & Atkinson, P.H. (1985). *J.Cell Biol.* **101**, 1270-1280.
41. Stirzaker, S.C., Whitfeld, P.L., Christie, D.L., Bellamy, A.R. & Both, G.W. (1987). *J.Cell Biol.* **105**, 2897-2903.
42. Whitfeld, P.L., Tyndall, C., Stirzaker, S.C., Bellamy, A.R. & Both, G.W. (1987). *Mol.Cell.Biol.* **7**, 2491-2497.
43. Stirzaker, S.C. & Both, G.W. (1989). *Cell* **56**, 741-747.
44. Cohen, J., Charpilienne, A., Chimonczyk, S. & Estes, M.K. (1989). *Virology* **171**, 131-140.
45. Patton, J.T. & Gallegos, C.O. (1988). *Virology* **166**, 358-365.
46. Gombold, J.L. & Ramig, R.F. (1987). *Virology* **161**, 463-473.
47. Kumar, A., Charpilienne, A. & Cohen, J. (1989). *Nucleic Acids Res.* **17**, 2126.
48. Landschulz, W.H., Johnson, P.F. & McKnight, S.L.(1988). *Science* **240**, 1759-1764.
49. Liu, M., Offit, P.A. & Estes, M.K. (1988). *Virology* **163**, 26-32.
50. Gombold, J.L., Estes, M.K. & Ramig, R.F. (1985). *Virology* **143**, 309-320.
51. Ramig, R.F. (1983). En: "Double-stranded RNA viruses". (R.W. Compans & D.H.L. Bishop eds.). Elsevier, N.Y., pp.321-327.
52. Both, G.W., Siegman, L.J., Bellamy, A.R., Ikegami, N., Shatkin, A.J. & Furuichi, Y. (1984). *J.Virol.* **51**, 97-101.
53. Cohen, J., Lefevre, F., Estes, M.K. & Bremont, M. (1984). *Virology* **138**, 178-182.
54. Estes, M.K., Mason, B.B., Crawford, S. & Cohen, J. (1984). *Nucleic Acids Res.* **12**, 1875-1887.
55. Novo, E. & Esparza, J. (1981). *J.Gen.Virol.* **56**, 325-335.
56. Gorziglia, M., Larrea, C., Liprandi, F. & Esparza, J. (1985). *J.Gen.Virol.* **66**, 1889-1900.
57. Bremont, M., Charpilienne, A., Chabanne, D. & Cohen, J. (1987). *Virlogy* **161**, 138-144.
58. Dyll-Smith, M.L., Elleman, T.C., Hoyne, P.A., Holmes, I.H. & Azad, A.A. (1983). *Nucleic Acids Res.* **11**, 3351-3362.
59. Both, G.W., Bellamy, A.R., Street, J.E. & Siegman, L.J. (1982). *Nucleic Acids Res.* **10**, 7075-7088.
60. Johnson, M.A. & McCrae, M.A. (1989). *J.Virol.* **63**, 2048-2055.
61. Ward, C.W., Elleman, T.C., Azad, A.A. & Dyll-Smith, M.L. (1984). *Virology* **134**, 249-253.
62. Both, G.W., Bellamy, A.R. & Siegman, L.J. (1984). *Nucleic Acids Res.* **12**, 1621-1626.
63. Both, G.W., Siegman, L.J., Bellamy, A.R. & Atkinson, P.H. (1983). *J.Virol.* **48**, 335-339.
64. Baybutt, H.N. & McCrae, M.A. (1984). *Virus Res.* **1**, 533-541.
65. Powell, K.H.F., Gunn, P.R. & Bellamy, A.R. (1988). *Nucleic Acids Res.* **16**, 763.
66. Okada, Y., Richardson, M.A., Ikegami, N., Nomoto, A. & Furuichi, Y. (1984). *J.Virol.* **51**, 856-859.
67. Bergmann, C.C., Maass, D., Poruchynsky, M.S., Atkinson, P.H. & Bellamy, A.R. (1989). *EMBO J.* **8**, 1695-1703.
68. Ward, C.W., Azad, A.A. & Dyll-Smith, M.L. (1986). *Virology* **144**, 328-336.
69. Spencer, E. & Arias, M.L. (1981). *J.Virol.* **40**, 1-10.

70. Bican, P., Cohen, J., Charpilienne, A. & Scherrer, R. (1982). *J.Virol.* **43**, 1113-1117.
71. Roy, P., Fukusho, A., Ritter, G.D. & Lyon, D. (1988). *Nucleic Acids Res.* **16**, 11759-11767.
72. Icho, T. & Wickner, R.B. (1989). *J.Biol.Chem.* **264**, 6716-6723.
73. Pietras, D.F., Diamond, M.E. & Bruenn, J.A. (1988). *Nucleic Acids Res.* **16**, 6225.
74. Kamer, G. & Argos, P. (1984). *Nucleic Acids Res.* **12**, 7269-7282.
75. Joklik, W.K. (1974). En: "Comprehensive Virology 2" (H.Fraenkel-Conrat & R.R.Wagner eds.). Plenum Press, N.Y., pp.231-234.
76. Gorziglia, M. & Esparza, J. (1981). *J.Gen.Virol.* **53**, 357-362.
77. Stoltzfus, C.M., Morgan, M., Banerjee, A.K. & Shatkin, A.J. (1974). *J.Virol.* **13**, 1338.
78. Shatkin, A.J. (1976). *Cell* **9**, 645-653.
79. Estes, M.K. & Graham, D.Y. (1985). En: "Immunobiology of proteins and peptides - III" (M.Z. Atassi & H.L. Bachrach eds.). Plenum Publishing Corp., N.Y., pp. 201-214.
80. Bridger, J.C. (1987). En: "Novel diarrhoea viruses" (G.Bock & J.Whelan eds.). J.Wiley & Sons Ltd., Chichester, U.K., pp. 5-23.
81. Chasey, D. & Banks, J. (1984). *Vet.Rec.* **115**, 326-327.
82. Hung, T., Chen, G., Wang, G., Chao, Z., Chao, T., Ye, W., Yao, H. & Meng, K. (1983). *Lancet* **2**, 1078-1079.
83. Hung, T., Chen, G., Wang, G., Yao, H., Fang, Z., Chao, T., Chou, Z., Ye, W., Chang, X., Den, S., Liong, X. & Chang, W.B. (1984). *Lancet* **1**, 1139-1142.
84. Susuki, H., Chen, G.M., Hung, T., Beards, T., Beards, G.M., Brown, D.W.G. & Flewett, T.H. (1987). *Arch.Virol.* **94**, 305-308.
85. Bridger, J.C., Pedley, S. & McCrae, M.A. (1986). *J.Clin. Microbiol.* **23**, 760-763.
86. Snodgrass, D.R., Herring, A.J., Campbell, I., Inglis, J.M. & Hargreaves, F.D. (1984). *J.Gen.Virol.* **65**, 909-914.
87. Chen, G., Hung, T., Bridger, J.C. & McCrae, M.A. (1985). *Lancet* **2**, 1123-1124.
88. Saif, L.J. & Theil, K.W. (1985). En: "Infectious diarrhoea in the young: strategies for control in humans and animals" (S.Tzipori ed.). Excerpta Medica, Amsterdam, pp.208-214.
89. Greenberg, H.B., McAuliffe, V., Valdesuso, J., Wyatt, R., Flores, J., Kalica, A., Hoshino, Y. & Singh, N. (1983). *Infect.Immun.* **39**, 91-99.
90. Svensson, L., Sheshberadaran, H., Venc, S., Norrby, E., Grandien, M. & Wadell, G. (1987). *J.Gen.Virol.* **68**, 643-651.
91. Green, K.Y., Sears, J.F., Taniguchi, K., Midthun, K., Hoshino, Y., Gorziglia, M., Nishikawa, K., Urasawa, S., Kapikian, A.Z., Chanock, R.M. & Flores, J. (1988). *J.Virol.* **62**, 1819-1823.
92. Hoshino, Y., Sereno, M.M., Midthun, K., Flores, J., Kapikian, A.Z. & Chanock, R.M. (1985). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **82**, 8701-8704.
93. Wyatt, R.G., James, H.D.Jr., Pittman, A.L., Hoshino, Y., Greenberg, H.B., Kalica, A.R., Flores, J. & Kapikian, A.Z. (1983). *J.Clin.Microbiol.* **18**, 310-317.
94. Matsuno, S., Hasegawa, A., Mukoyama, A. & Inouye, S. (1985). *J.Virol.* **54**, 623-624.
95. Clark, H.F., Hoshino, Y., Bell, L.M., Groff, J., Hess, G., Bachman, P & Offit, P.A. (1987). *J.Clin.Microbiol.* **25**, 1757-1762.
96. Hoshino, Y., Wyatt, R.G., Greenberg, H.B., Flores, J. & Kapikian, A.Z. (1984). *J.Infect.Dis.* **149**, 694-702.

97. Glass, R.I., Keith, J., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Askaa, J., Kapikian, A.Z., Chanock, R.M. & Flores, J. (1985). *Virology* **141**, 292-298.
98. Silverstein, S.C., Christman, J. & Acs, G. (1976). *Annu.Rev.Biochem.* **45**, 375-408.
99. Marsh, M. (1984). *Biochem.J.* **218**, 1-10.
100. Marsh, M., Matlin, K., Simons, K., Reggio, H., White, J., Kartenbeck, J. & Helenius, A. (1982). *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* **46**, 835-843.
101. Miller, D.K. & Lenard, J. (1981). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **78**, 3605-3609.
102. Kaljot, K.T., Shaw, R.D., Rubin, D.H. & Greenberg, H.B. (1988). *J.Virol.* **62**, 1136-1144.
103. Petrie, B.L., Graham, D.Y. & Estes, M.K. (1981). *Intervirology* **16**, 20-28.
104. Suzuki, H., Kitaoka, S., Sato, T., Konno, T., Iwasaki, Y., Numazaki, Y & Ishida, N. (1986). *Arch.Virol.* **91**, 135-144.
105. Mason, B.B., Graham, D.Y. & Estes, M.K. (1980). *J.Virol.* **33**, 1111-1121.
106. Cohen, J. & Dobos, P. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **88**, 791-796.
107. Imai, M., Ikegami, N., Akatomi, K. & Furuichi, Y. (1983). *J.Virol.* **47**, 125-136.
108. McCrae, M.A. & McCorquodale, J.G. (1983). *Virology* **126**, 204-212.
109. Shahrabi, M.S., Babiuk, L.A. & Lee, P.W.K. (1987). *Virology* **158**, 103-111.
110. Steinhauer, D.A. & Holland, J.J. (1987). *Annu.Rev.Microbiol.* **41**, 409-433.
111. Strauss, J.H. & Strauss, E.G. (1988). *Annu.Rev.Microbiol.* **42** 657-683.
112. Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J.L., Portela, A., Ortin, J., López-Galíndez, C., Pérez-Brena, P., Villanueva, N., Najera, R., VandePol, S., Steinhauer, D., de Polo, N. & Holland, J. (1985). *Gene* **40**, 1-8.
113. Follett, E.A.C. & Dessselberger, U. (1983). En: "Double-stranded RNA viruses". (R.W.Compans & D.H.L. Bishop eds.), Elsevier Biomedical Press, N.Y., pp. 331-342.
114. Greenberg, H.B., Kalica, A.R., Wyatt, R.G., Jones, R.W., Kapikian, A.Z. & Chanock, R.M. (1981). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **78**, 420-424.
115. Ishima, A., Mizumoto, K., Kawakami, K., Kato, A. & Honda, A. (1986). *J.Biol. Chem.* **261**, 10417-10421.
116. Kalica, A.R., Greenberg, H.B., Wyatt, R.G., Flores, J., Sereno, M.M., Kapikian, A.Z. & Chanock, R.M. (1981). *Virology* **112**, 385-390.
117. Gombold, J.L. & Ramig, R.F. (1986). *J.Virol.* **57**, 110-116.
118. Sabara, M., Deregt, D., Babiuk, L.A. & Misra, V. (1982). *J.Virol.* **44**, 813-822.
119. Pereira, H.G., Azeredo, R.S., Fialho, A.M. & Vidal, M.N.P. (1984). *J.Gen.Virol.* **65**, 815-818.
120. Estes, M.K., Graham, D.Y. & Dimitrov, D.H. (1984). *Prog.Med.Virol.* **29**, 1-22.
121. Spencer, E.G., Avendano, L.F. & García, B.I. (1983). *Infect.Immun.* **39**, 569-574.
122. Nicolas, J.C., Pothier, P., Cohen, J., Lourenco, M.H., Thompson, R., Guimbaud, P., Chenon, A., Dauvergne, M. & Bricout, F. (1984). *J.Infect.Diseases* **149**, 688-693.
123. Ward, R.L., Knowlton, D.R. & Hurst, P.F.L. (1988). *J.Gen.Virol.* **69**, 149-162.
124. Albert, M.J. (1985). *Acta Paediatr.Scand.* **74**, 975-976.
125. Besselaar, T.G., Rosenblatt, A. & Kidd, A.H. (1986). *Arch.Virol.* **87**, 327-330.
126. Pedley, S., Hundley, F., Chrystie, I., McCrae, M.A. & Desselberger, U. (1984). *J.Gen.Virol.* **65**, 1141-1150.
127. Thouless, M.E., Di Giacomo, R.F. & Neuman, D.S. (1986). *Arch.Virol.* **89**, 161-170.
128. Pocock, D.H. (1987). *J.Gen.Virol.* **68**, 653-660.

129. Bellinzoni, R.C., Mattion, N., Burrone, O., González, S., La Torre, J.L. & Scodeller, E.A. (1987). *J.Clin.Microbiol.* **25**, 952-954.
130. Hundley, F., Biryahwaho, B., Gow, M. & Desselberger, U. (1985). *Virology* **143**, 88-103.
131. Ahmed, R. & Graham, A.F. (1977). *J.Virol.* **23**, 250-262.
132. Nonoyama, M., Watanabe, Y. & Graham, A.F. (1970). *J.Virol.* **6**, 226-236.
133. Schuerch, A.R., Matsuhisa, T. & Joklik, W.K. (1974). *Intervirology* **3**, 36-46.
134. Nuss, D.L. & Summers, D. (1984). *Virology* **133**, 276-288.
135. Eaton, B.T. & Gould, A.R. (1987). *Virus Res.* **6**, 363-382.
136. Wolf, J.L., Cukor, G., Blacklow, N.R., Dambrauskas, R. & Trier, J.S. (1981). *Infect.Immun.* **33**, 565-574.
137. Woode, G.N. & Bridger, J.C. (1975). *Vet.Rec.* **96**, 85-88.
138. Lecce, J.G. & King, M.W. (1978). *J.Clin.Microbiol.* **8**, 454-458.
139. DeLage, G., McLaughlin, B. & Berthiaume, L. (1978). *J.Pediatr.* **93**, 455-457.
140. Flewett, T.H. (1982). En: "Virus Infections of the gastrointestinal tract" (D.A.J.Tyrrell & A.Z. Kapikian eds.). Marcel Dekker, N.Y., pp.125-145.
141. Chrystie, I.L., Totterdell, B. & Banatvala, J.E. (1978). *Lancet* **1**, 1176-1178.
142. Saulsbury, F.T., Winkelstein, J.A. & Yolken, R.H. (1980). *J.Pediatr.* **97**, 61-65.
143. Middleton, P.J. (1978). *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **173**, 544-546.
144. Davidson, G.P., Gall, D.G., Petrie, M., Butler, D.G. & Hamilton, J.R. (1977). *J.Clin.Invest.* **60**, 1402-1409.
145. Shirley, J.A., Bears, G.M., Thouless, M.E. & Flewett, T.H. (1981). *Arch. Virol.* **67**, 1-9.
146. Kraft, L.M. (1957). *J.Exp.Med.* **101**, 743-755.
147. Tan, J.A. & Schnagl, R.D. (1981). *Med.J.Aust.* **1**, 19-23.
148. Kapikian, A.Z., Kim, H.W., Wyatt, R.G., Cline, W.L., Arrobio, J.O., Brandt, C.D., Rodriguez, W.J., Sack, D.A., Chanock, R.M. & Parrott, R.H. (1976). *N.Engl.J.Med.* **294**, 965-972.
149. Sheridan, J.F., Aurelian, L., Barbour, G., Santosham, M., Sack, R.B. & Ryder, R.W. (1981). *Infect.Immun.* **31**, 419-429.
150. McLean, B.S. & Holmes, I.H. (1981). *J.Clin.Microbiol.* **13**, 22-29.
151. Delem, A., Lobmann, M. & Zygraich, N. (1984). *J.Biol.Stand.* **12**, 443-445.
152. Kapikian, A.Z., Midthun, K., Hoshino, Y. *et al.* (1985). En: "Vaccines 85" (R.A. Werner *et al.* eds.). Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 357-367.
153. Bellinzoni, R.C., Blackhall, J., Baro, N., Auza, N., Mattion, N., Casano, A., La Torre, J.L. & Scodeller, E.A. (1989) *Vaccine* **7**, 263-268.
154. Midthun, K., Greenberg, H.B., Hoshino, Y., Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G. & Chanock, R.M. (1985). *J.Virol.* **53**, 949-954.
155. Ebina, T., Sato, A., Umezu, K., Ishida, N., Ohyama, S., Ohizumi, A., Aikawa, K., Katagiri, S., Katsushima, N., Imai, A., Kitaoka, S., Suzuki, H. & Konno, T. (1983). *Lancet* **2**, 1029-1030.
156. Mattion, N., González, S.A., Burrone, O., Bellinzoni, R., La Torre, J.L. & Scodeller, E.A. (1988). *J.Gen. Virol.* **69**, 695-698.
157. Estes, M.K., Graham, D.Y., Gerba, C.P. & Smith, E.M. (1979). *J.Virol.* **31**, 810-815.
158. Bishop, J.M. & Koch, G. (1969). *Virology* **37**, 521-534.
159. Laemmli, U.K. (1970). *Nature (London)* **227**, 680-685.

160. Arrand, J.E. (1985). En: "Nucleic acid hybridisation. A practical approach" (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.). Oxford IRL Press, pp. 34-35.
161. Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982). "Molecular cloning. A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y..
162. Rigby, P.W.J., Dieckman, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977). *J.Mol.Biol.* **113**, 237-251.
163. Crespi, M., Sánchez, D., Tisminetzki, S., Bellinzoni, R., Bercovich, A., Rossi, M.S., Corley, E., De Mendoza, D., Hopp, E., Zorzopulos, J., Frasc, C., Baralle, F. & Burrone, O. (1986). *Medicina. Buenos Aires* **46**, 693-697.
164. Gubler, U. & Hoffman, J. (1983). *Gene* **25**, 263-269.
165. Gubler, U. (1988). *Nucleic Acids Res.* **16**, 2726.
166. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **74**, 5463-5467.
167. Henikoff, S. (1984). *Gene* **28**, 351-359.
168. Hanahan, D. (1983). *J.Mol.Biol.* **166**, 557-580.
169. Sanger, F., Coulson, A.R., Barrel, B.G., Smith, A.J.H. & Roe, B.A. (1980). *J.Mol.Biol.* **143**, 161-178.
170. Auffray, C. & Rougeon, F. (1980). *Eur.J.Biochem.* **107**, 303-314.
171. Thomas, P.S. (1980). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **77**, 5201-5205.
172. Rütger, U. & Müller-Hill, B. (1983). *Embo J.* **2**, 1791-1794.
173. Tautz, D. & Renz, M. (1983). *Anal. Biochem.* **132**, 14-19.
174. Bradford, M.M. (1976). *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
175. Bonner, W.M. & Laskey, R.A. (1974). *Eur.J.Biochem.* **46**, 83-88.
176. Salacinski, P.R.P., McLean, C., Sykes, J.E.C., Clement-Jones, V.V. & Lowry, P.J. (1981). *Anal. Biochem.* **117**, 136-146.
177. Burnette, W.N. (1981). *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
178. Hancock, K. & Tsang, V.C.W. (1983). *Anal. Biochem.* **133**, 157-162.
179. Trimble, R.B. & Maley, F. (1984). *Anal. Biochem.* **141**, 515-522.
180. Freeze, H.H. & Varki, A. (1986). *Biochem.Biophys.Commun.* **140**, 967-973.
181. Baenziger, J. & Kornfeld, S. (1974). *J.Biol.Chem.* **249**, 7270-7281.
182. Herring, A.J., Inglis, N.F., Ojeh, C.K., Snodgrass, D.R. & Maziens, J.D. (1982). *J.Clin.Microbiol.* **16**, 473-477.
183. Mitchell, D.B. & Both, G.W. (1988). *Nucleic Acids Res.* **16**, 6244.
184. Peabody, D.S. & Berg, P. (1986). *Mol.Cell.Biol.* **6**, 2695-2703.
185. Chen, E.Y. & Seeburg, P.H. (1985). *DNA* **4**, 165-170.
186. Ostermayr, R., von der Helm, K., Gauss-Müller, V., Winnacker, E.L. & Deinhardt, F. (1987). *J.Virol.* **61**, 3645-3647.
187. Kabcenell, A.K., Poruchynsky, M.S., Bellamy, A.R., Greenberg, H.B. & Atkinson, P.H. (1988). *J.Virol.* **62**, 2929-2941.
188. Hundley, F., McIntyre, M., Clark, B., Beards, G., Wood, D., Chrystie, I. & Desselberger, U. (1987). *J.Virol.* **61**, 3365-3372.
189. Kirkegaard, K. & Baltimore, D. (1986). *Cell* **47**, 433-443.
190. Baric, R.S., Stohlman, S.A., Razavi, M.K. & Lai, M.M.C. (1985). *Virus Res.* **3**, 19-33.
191. Keese, P. & Symons, R.H. (1985). *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* **82**, 4582-4586.
192. Jacobs, L., Spaan, W.J.M., Horzinek, M.C. & van der Zeijst, B.A.M. (1981). *J.Virol.* **39**, 401-406.

193. Stern, D.F. & Sefton, B.M. (1982). *J.Virol.* **42**, 755-759.
194. Fields, S. & Winter, G. (1982). *Cell* **28**, 303-313.
195. Lazzarini, R.A., Keene, J.D. & Schubert, M. (1981). *Cell* **26**, 145-154.
196. Whitton, J.L., Hundley, F., O'Donnell, B. & Desselberger, U. (1983). *J.Virol.Methods* **7**, 185-198.
197. Shatkin, A.J., Sipe, J.D. & Loh, P. (1968). *J.Virol.* **2**, 986-991.
198. Wan Welch, S.-K., Crawford, S.E. & Estes, M.K. (1989). *J.Virol.* **63**, 3974-3982.
199. Pal, B.K. & Roy-Burman, P. (1975). *J.Virol.* **15**, 540-549.
200. Rosemond, H. & Moss, B. (1973). *J.Virol.* **11**, 961-970.
201. Clinton, G.M., Burge, B.W. & Huang, A.S. (1978). *J.Virol.* **27**, 340-346.
202. Huismans, H., van Dijk, A.A. & Bauskin, A.R. (1987). *J.Virol.* **61**, 3589-3595.
203. Scheidtmann, K.-H., Hardung, M., Echle, B. & Walter, G. (1984). *J.Virol.* **50**, 1-12.
204. Hunter, T. & Cooper, J.A. (1985). *Annu.Rev.Biochem.* **54**, 897-930.
205. Grinna, L.S. & Robbins, P.W. (1979). *J.Biol.Chem.* **254**, 8814-8818.
206. Elting, J.J., Chen, W.W. & Lennarz, W.J. (1980). *J.Biol.Chem.* **255**, 2325-2331.
207. Hubbard, S.C. & Robbins, P.W. (1979). *J.Biol.Chem.* **254**, 4568-4576.
208. Goldberg, D.E. & Kornfeld, S. (1983). *J.Biol.Chem.* **258**, 3159-3165.
209. Hanover, J.A., Elting, J., Mintz, G.R. & Lennarz, W. (1982). *J.Biol.Chem.* **257**, 10172-10177.
210. Hubbard, S.C. & Ivatt, R.J. (1981). *Annu.Rev.Biochem.* **50**, 55-583.
211. Hart, G.W., Haltiwanger, R.S., Holt, G.D. & Kelly, W.G. (1989). *Annu.Rev.Biochem.* **58**, 841-874.
212. Sefton, B.M., Trowbridge, I.S. & Cooper, J.A. (1982). *Cell* **31**, 465-474.
213. Kingsley, D.M. & Krieger, M. (1986). *Cell* **44**, 749-759.