



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
“ IZTACALA ”

**UN SISTEMA MODELO PARA ESTUDIAR, “IN VITRO”
LA INHIBICION EN LA TRANSCRIPCION EJERCIDA
POR EL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS.**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A**

JOSE ISABEL TAPIA RAMIREZ

MEXICO, D. F.

1986

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO
DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVES
TIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS IPN, EN EL LABORATORIO
Y BAJO LA DIRECCION DEL DR. CARLOS FERNANDEZ TOMAS.

A MIS PADRES:

Por su amor y apoyo en mi
educación y formación como
ser humano

A MIS HERMANOS :

Dagoberto y Víctor

A MIS HERMANAS :

Ade, Carmen, Manis, Emi,
Oli, Clara y Laura.

A MIS FAMILIARES :

Porque me han alentado a
seguir adelante.

A MIS "MAESTROS" :

Que trabajan "porque algún
día todos (absolutamente todos)
podamos, aunque sea parados de
puntitas, tocar las estrellas".

AGRADEZCO:

Al Doctor Carlos Fernández por sus enseñanzas, apoyo y amistad dentro y fuera del laboratorio.

Al M.en C. Aurelio Díaz M. y a Salvador Chavarría sin cuya ayuda y amistad hubiese sido difícil la terminación del presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Lilia, Rico y Ale.

A la compañía Avon Cosmetics por su apoyo económico.

A mis Profesores

A mis amigos (ellos saben quienes son).

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	X
<u>RESUMEN</u>	1
<u>INTRODUCCION</u>	3
<u>MATERIAL</u>	33
Lineas Celulares y Virus	33
Material para el cultivo de células	33
Reactivos	34
Material Radiactivo	36
Preparación de Soluciones y medios	37
<u>METODOS</u>	46
Cultivo de células CV-1 y Hela	46
Infección de Células CV-1 con SV40	46
Síntesis de DNA en células CV-1 infectadas con SV40	47
Obtención de DNA de SV40 y digestión del mis- mo con enzimas de restricción	48
Purificación de viriones SV40	50
Titulación de SV40	51
Obtención de complejos de Nucleoproteína (CNP) para transcripción "in vitro"	52

	Pág.
Infección con Poliovirus	52
Determinación de la concentración de proteína	53
Determinación de la concentración de DNA	53
Preparación de Extracto de Manley	54
Transcripción "in vitro"	55
Purificación del Transcrito (RNA- ³² P)	56
Análisis de Transcritos (RNA- ³² P) en geles de poliacrilamida-urea	56
Electroforesis en geles de agarosa	57
Transferencia y fijación de fragmentos de DNA de SV40 a papel de nitrocelulosa	57
Hibridización de RNA- ³² P sintetizado "in vitro"	58
<u>RESULTADOS</u>	59
Síntesis de DNA en células CV-1 infectadas con SV40	59
Purificación de viriones de SV40	59
Obtención de Complejos de Nucleoproteína CNP de SV40	73
Preparación del extracto de Manley	73
Transcripción "in vitro"	81
Hibridización del RNA- ³² P con el DNA de SV40	90

	Pág.
<u>DISCUSION</u>	94
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	98

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Acido Desoxirribonucleico
RNA	Acido Ribonucleico
RNAv	Acido Ribonucleico viral
RNA _m	Acido Ribonucleico mensajero
RNA _h	Acido Ribonucleico heterogéneo
SDS	Duodecil sulfato de sodio
EDTA	Etilén diamino ácido tetracético
EGTA	Etilén glicol-bis-N-N' ácido tetracético
DTT	Ditiotreitol
Doc-Na	Desoxicolato de Sodio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamina
PMSF	Fluoro de fenil-metil-sulfonilo
CNP	Complejo de Nucleoproteína
TCA	Acido Tricloroacético
ATCC	American Type Culture Collection
CO ₂	Bióxido de Carbono
DE81	Papel de Dietil-amino-etil celulosa
D.O.	Densidad optica
HEPES	Acido N-2 etanosulfónico-N'-2-hidroxi-etil-piperazina.
PVP	Polivinil Pirrolidona
PBS	Solución amortiguadora Salina de Fosfatos
Tris-HCl	Tris-Hidroximetil-aminometano-ácido clorhídrico
UFP	Unidades Formadoras de placa.

	Pág.
FIGURA 1. Clasificación de los virus animales	6
FIGURA 2. Organización Genética y procesamiento polipeptídico de poliovirus	11-12
FIGURA 3. Mapa de Restricción de SV40	25
FIGURA 4. Mapa funcional y genético del genoma de SV40.....	28-29
FIGURA 5. Síntesis de DNA en células CV-1 infectadas con SV40	60-61
FIGURA 6. Esquema que muestra el procedimiento para la purificación del virus SV40.....	63
FIGURA 7. Primera purificación del virus SV40 en gradientes de densidad	64-65
FIGURA 8. Fotografía del gradiente mostrado en la figura 7	67
FIGURA 9. Segunda purificación del virus por gradientes de densidad	68-69
FIGURA 10 Análisis en geles de agarosa del DNA en las bandas I, Ib y II	71-72
FIGURA 11 Esquema para la obtención de complejos de nucleoproteína (CNP)	74
FIGURA 12 Purificación del complejo nucleoproteico .	75-76
FIGURA 14 Piloto de infección en células Hela in- fectadas con poliovirus	79-80
FIGURA 15 Cinética de transcripción "in vitro"	82-83
FIGURA 16 Autorradiograma de los transcritos- ³² P ...	84-85
FIGURA 17 Purificación y ensayo del DNA de SV40	86-87
FIGURA 18 Restricción del DNA de SV40 purificado ...	88-89
FIGURA 19 Hibridización del RNA- ³² P con el DNA restringido de SV40	92-93

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA I . Relación de proteínas de poliovirus	13
TABLA II . Determinación de partículas infectivas	70
TABLA III. Características de extractos subcelulares .	78

RESUMEN

Durante la infección con el virus de la poliomielitis, hay una marcada inhibición en la biosíntesis de RNA de la célula huésped, se ha reportado que el efecto requiere de la síntesis de proteínas virales, además de su acumulación. Paralela a la inhibición se ha detectado productos polio-específicos en núcleo de células infectadas. Evidencias en el laboratorio y otros, sugieren que la inhibición ocurre a nivel de iniciación de la transcripción. El interés se ha centrado en estudiar el mecanismo por el cual se inhibe la transcripción celular. Por ello el objetivo del presente trabajo se fijó en obtener un sistema que inicie transcripción específica "in vitro" el cual consiste en 1) un templado de DNA del virus SV40 en forma de complejo nucleoproteico (CNP) aislado de viriones purificados y 2) extractos celulares totales dependientes de DNA exógeno (extracto de Manley).

Al ensayar el CNP obtenido de virus SV40 en presencia de extractos subcelulares provenientes de células HeLa, se observa iniciación específica de la transcripción, además de que el CNP inicia transcripción sobre ambos promotores (temprano y tardío de SV40). Lo men

cionado anteriormente se comprobó mediante hibridización del RNA sintetizado "in vitro" con el DNA de SV40 restringido.

Por otra parte al ensayar el CNP y el DNA forma I de SV40 en el sistema de transcripción "in vitro", en presencia de extractos provenientes de células infectadas con poliovirus, se observa una inhibición de aproximadamente el 50 %. Los resultados anteriores nos permiten concluir que nuestro sistema inicia transcripción de manera precisa y por otro lado los resultados apoyan la hipótesis de que la inhibición ocurre a nivel de iniciación de la transcripción y esta ocurre principalmente sobre el promotor tardío.

INTRODUCCION

Los virus. (Definición y Clasificación).

Los virus son entidades cuyos genomas son elementos de ácido nucleíco que se replican en células vivas, usando la maquinaria sintética celular y causan la síntesis de partículas maduras (viriones) los cuales pueden transferir el genoma viral a otras células (Luria y cols. 1978). Si bien es cierto que la multiplicación de los virus animales y bacterianos involucra los mismos eventos: multiplicación, transcripción, traducción y replicación, los mecanismos de expresión difieren en varios aspectos como son, la naturaleza del ácido nucleíco, el mecanismo de replicación, la polaridad y el tamaño del material genético, el tipo de huésped y su respuesta, etc. Todo lo mencionado anteriormente ha permitido generar múltiples grupos de clasificación (Baltimore, D. 1971; Matthews 1982; Bachrach 1978). Para los propósitos del presente trabajo, decidimos utilizar la clasificación propuesta por Baltimore (1971), la cual describe las diferentes estrategias para la transcripción basadas en la polaridad del componente genético del virus y las enzimas involucradas (figura 1).

Los Virus en la Biología Molecular.

A partir de la década de los años sesenta, el mayor interés de la genética ha sido puesto en el estudio de los mecanismos por el cual se regulan las funciones celulares; el interés se desplazó hacia la maquinaria fundamental de la célula, formada por el ácido desoxirribonucleico (DNA), el ácido ribonucleico (RNA) y las proteínas. Los experimentos de Avery y cols. (1944), de Hershey y cols. (1952) sobre el portador de la información genética, los de Watson y Crick (1953) sobre la estructura de la doble hélice del DNA, junto con el descubrimiento de que la molécula transmisora de la información, contenida en el DNA, es el RNA y el deciframiento de la clave genética, dieron lugar a un gran número de investigaciones tendientes a estudiar los posibles mecanismos de regulación de la expresión del genoma. No es sorprendente encontrar que estos procesos regulatorios, importantes en el metabolismo de células eucarióticas, sean prácticamente los mismos que aquéllos involucrados en la biología de virus animales. Cabe mencionar que los principales avances durante los pasados 50 años sobre las funciones celulares, desde un punto de vista molecular, se han debido al estudio de virus y de sistemas virus-célula. En

el desarrollo y avance de la biología molecular necesariamente se involucran los primeros estudios llevados a cabo, a finales de los años treinta por Delbruck, Luria y Hershey con virus bacterianos (bacteriofagos), cuyas características los hicieron un excelente sistema modelo para abordar problemas fundamentales en la biología, como por ejemplo los estudios de Hershey sobre, el material portador de la información genética, en la utilización como vehículos de clonación para contestar preguntas sobre la regulación celular, etc. Por otro lado los virus animales han sido usados como una herramienta importante para elucidar los mecanismos regulatorios involucrados en la traducción, transcripción y replicación de células eucarióticas, dentro de los avances importantes cabe mencionar: estudios de replicación del DNA con los virus SV40 y Polioma (Danna y cols. 1972; Fareed y cols. 1972; Perlman, D. 1977; Bjursell, 1978), investigaciones sobre el procesamiento del RNA (Splicing) utilizando el virus Adeno (Chow y cols. 1977; Yang y cols. 1981), experimentos sobre regulación de la transcripción usando DNAs virales (Myers y cols. 1981; Tjian, R. 1981; Brady y cols. 1980; Hansen y cols. 1981), SV40 como vehículo de clonación eucariótico (Elder y cols. 1981; Mellon y cols. 1981; Banerji y cols. 1981), en fusiones celulares con el virus Sendai y en transformación celular (Fung y cols. 1983; Wong y cols. 1981; Ransay y cols. 1982). En resumen los virus han jugado

un papel muy importante dentro de la Biología Molecular.

Los Virus como Agentes Patogenos.

Los virus son la causa más frecuente de enfermedad en el hombre, provocan aproximadamente el 60 % de todos los padecimientos infecciosos en el mundo. Se han identificado cientos de tipos de virus inmunológicamente diferentes que producen padecimiento de diversa índole (Pizarro-Suaréz, 1971). Las infecciones debidas a virus están ampliamente distribuidas en todas las regiones de la tierra, y plantean numerosos problemas que difieren completamente de los que se presentan cuando se trabaja con otros microorganismos; los antibióticos utilizados para combatir las enfermedades de origen bacteriano, espiroquetal o fúngico, resultan ineficaces para tratar enfermedades de etiología viral. Es por ello que la virología animal, ha cobrado mayor fuerza en la biología moderna. Durante este período, el mayor énfasis en la investigación de virus animales ha sido llevado no solamente hacia el aislamiento, cultivo y caracterización antigénica sino hacia entender a nivel molecular la naturaleza del virus, la interacción virus-huésped y todos los eventos de la expresión viral, es decir los mecanismos que determinan la patogenicidad viral.

El Virus de la Poliomiélitis como Agente Etiológico.

El virus de la poliomiélitis pertenece a la familia de los picornavirus (pico=pequeño y rna=ácido ribonucleico) y al género de los enterovirus (Matthews, F. 1982). Esta familia constituye el más importante grupo de patógenos humanos. La poliomiélitis es una enfermedad infecciosa, la cual afecta seriamente el sistema nervioso central y la destrucción de neuronas motores en el cordón espinal puede conducir a la parálisis. La entrada de poliovirus al organismo es por vía de tracto digestivo; se multiplica primero en la faringe y/o mucosa intestinal y es llevado, vía el torrente sanguíneo, hacia las células del sistema nervioso central. Las lesiones resultantes son amplias con varios grados de severidad en el aspecto clínico, ya sea la poliomiélitis espinal (parálisis) la más común o la forma bulbar, de menor incidencia (Fenner y cols. 1972; Melnick, 1976). Los efectos de la poliomiélitis motivaron, hacia 1909 el obtener una vacuna preventiva. Desgraciadamente los primeros experimentos utilizando suspensiones de médula espinal de monos infectados, tuvieron resultados no muy halagadores. El descubrimiento de Enders y su grupo en 1949, en cuanto a que el virus de la polio se podía propagar en células en cultivo, abrió nuevas perspectivas para el desarrollo del tratamiento preventivo. Las primeras

vacunas fueron obtenidas de cultivos de células de riñón de mono e inactivadas por formaldehído, comprobándose más tarde, que la inactivación de las suspensiones virales crudas no era completa. Paralelo a la obtención de vacunas inactivadas, Sabin en 1955, desarrollaba un nuevo tipo de vacuna, la cual consistió en la atenuación de cepas virulentas silvestres del virus. La vacuna polio atenuada, lo mismo que las otras vacunas virales de este tipo: sarampión, fiebre amarilla, rubeola, etc, sin duda han ayudado a disminuir y, en ocasiones a erradicar, dichas enfermedades de gran parte del mundo. Según datos de la OMS para 1979 se registrarón 35,747 casos de poliomiélitis en el mundo. Sin embargo la verdadera cifra de morbilidad revela que el número real oscila entre 350 mil y un millón de casos en el mundo (Contreras 1982). La cepa de poliovirus Sabin (LSc, 2ab) abreviada como - PV1 (Sab) es una vacuna de virus "vivos" derivada de la cepa virulenta Mahoney tipo 1 (PV1 M) por mutaciones espontáneas durante el proceso de atenuación (Nomoto y cols. 1981). Esta cepa es una de las que se ha utilizado para prevenir la enfermedad; sin embargo, un riesgo inherente de las vacunas que utilizan virus atenuados es el de la reversión a cepas virulentas después de varios pasajes sucesivos en su huésped natural (Nomoto y cols. 1981). En la actualidad, con la ayuda de la ingeniería genética, es posible la construcción de cepas vi

rales que no reviertan a cepas virulentas. Recientes investigaciones van encaminadas a entender las bases moleculares para la atenuación viral (Nomoto y cols. 1982 op. cit.; Stanway y cols. 1983).

Estructura Viral.

La familia de los picornavirus comprende viriones sin envoltura de 20 a 30 nm. de diámetro con simetría icosaédrica y un contenido de RNA de 29 a 32 %. El genoma es una molécula de RNA cadena sencilla con un peso molecular de 2.5×10^6 daltones (7431 nucleótidos) el cual tiene una proteína ligada covalentemente en el extremo 5' (Vpg) (Wimmer, E. 1979) y una región de 80-120 nucleótidos de adenina (poli(A)) en su extremo 3' terminal. La organización de poliovirus se ilustra en la figura 2. El RNA del virus (RNAv) PV1 (M), del virus atenuado PV1 (Sab) y Sabin tipo 3, ha sido secuenciado (Kikumura y cols. 1981; Racaniello y Baltimore 1981; Nomoto y cols. 1981 op.cit. Stanway y cols. 1983 op. cit.)

La elucidación de la estructura primaria, así como los mapas de restricción generados a partir de ésta, pueden revelar elementos importantes; los sitios de iniciación y terminación de la traducción del RNA mensajero (RNAm) del virus, señales estructurales en el procesamiento de las proteínas, señales y genes involucrados en funciones replicativas, capsulares y supresoras, etc. La cubierta de proteína de poliovirus se compone de 60 co

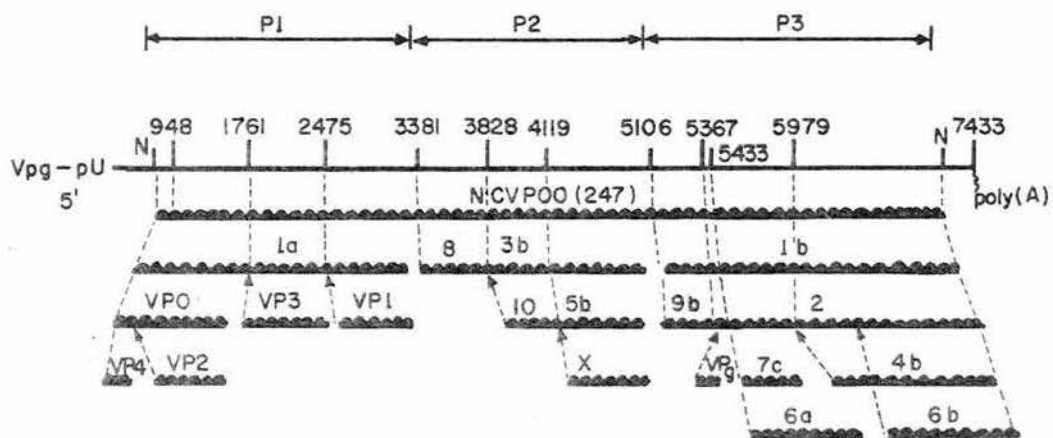


FIGURA 2. Organización genética y procesamiento polipeptídico de poliovirus. La línea sólida representa el RNA del virión con la proteína Vpg ligada covalentemente en el 5' terminal y en el 3' poly (A). (Tomado y modificado de Kitamura y cols. 1981; Hanecak y cols. 1982; Semler y cols. 1982, 1983).

TABLA 1. RELACION DE PROTEINAS DE POLIOVIRUS.

Kitamura y cols. (1981) Rueckert y Wimmer (1984) P.M.Kd.

L434

NCVP 00		247
P1-1a	1 ♂ P1	97
P2-3b	2 ♂ P2	65
P2-5b	2BC	48
P2-X	2C	38
P3-1b	3 ♂ P3	84
P3-9	3AB	11.5
P3-7c	3C	20
P3-4b	3D	52
P3-2	3CD	72
P3-6a+	3C'	36,4
P3-6b+	3D'	35,6
VP0	1AB	37
VP1	1D	34
VP2	1B	30
VP3	1C	26
VP4	1A	7

+ Productos de un rompimiento alternativo de P3-2

pias de cada uno de los péptidos específicos del virus; Vp1, Vp2, Vp3 y Vp4 con pesos moleculares de 34,30,26 y 7 kd. respectivamente, ver tabla 1.

Replicación Viral.

Los primeros eventos de una infección viral son: el contacto entre la partícula viral con la superficie de una célula susceptible o permisiva con lo cual se inicia una serie de eventos complejos: la adsorción, la penetración y la liberación del genoma en el citoplasma. Durante la adsorción, aparentemente las 4 proteínas participan, aunque Vp4 parece ser primordial dado que la pérdida de esta proteína está asociada a baja infectividad. La interacción viral con receptores específicos de la célula es dependiente de temperatura y puede ser inhibida por venenos metabólicos, indicando que la migración transmembranal es un proceso dependiente de energía. Existe poca información disponible acerca de la naturaleza bioquímica de los receptores, sin embargo se tienen evidencias que sugieren que puede ser una glicoproteína (Chan y cols. 1970). Una vez que el virión se ha adsorbido firmemente, cambios asociados a la membrana derivan en una entrada, por viropexis, del virión y un descubrimiento y liberación del genoma viral en el citoplasma. El siguiente período del ciclo viral es conocido como período de eclipse, en éste, el virus de RNA cadena positiva inicia la traducción para sintetizar a la

enzima encargada de sintetizar la cadena menos utilizando como templado la cadena más (replicasa). La síntesis de RNA viral se detecta en un período temprano de la infección. Baltimore y cols. (1966) demuestran la existencia de un intermediario replicativo de RNA, el cual consiste de una cadena menos de RNA y moléculas incompletas de RNA polaridad positiva. Más tarde, Girard (1969) demuestra que el intermediario replicativo es precursor del RNA cadena positiva.

Traducción Viral.

Las primeras evidencias de que el RNA de picornavirus contiene un solo sitio de iniciación, fueron aportados por Jacobson y Baltimore (1968). Reportan que cuando utilizan análogos de aminoácidos detectan la acumulación de una proteína gigante a la que se le denominó NCVP-00. El RNA del virión, después de que Vpg ha sido removido (Nomoto y cols. 1977) actúa como RNA mensajero y los ribosomas del huésped inician la traducción a partir de un sitio en el extremo 5' terminal (codón 741) hasta un sitio de terminación en el extremo 3' terminal (codón 6621). La poliproteína resultante se procesa durante la traducción en tres regiones: la región amino-terminal que contiene las secuencias para las cuatro proteínas de la cápside, la región central en la cual no

se ha establecido con claridad su función (proteasa ?) y la región carboxilo terminal que contiene las secuencias de la replicasa viral, de la proteasa encargada de la mayoría del procesamiento de la poliproteína viral y de la proteína Vpg (Strauss y cols. 1983), ver figura 2.

Durante el procesamiento de la proteína NCVP-00 ocurren al menos 10 rompimientos (Rueckert y cols. 1979); tan sólo durante la morfogénesis del virión, NCVP-00 se procesa y forma pentámeros (P1-1a), posteriormente cada monómero de la proteína se fragmenta para originar agregados de VP0, VP1 y VP3, los cuales forman el precursor proteico del virión: la procápside, con un coeficiente de sedimentación de 7.4 S. En su estadio final VP0 se fragmenta a VP2 y VP4 para originar finalmente el virión (Fernández-Tomás y cols. 1973) existiendo evidencia de que las enzimas encargadas del procesamiento, pueden ser proteasas codificadas por el virus (Korant y cols. 1979), aunque la participación de proteasa celular no puede descartarse.

Alteración de Funciones Celulares por Poliovirus.

Durante la infección con el virus del grupo picorna se detecta a nivel celular, inhibición secuencial de la biosíntesis de macromoléculas:proteínas, RNA y DNA. El efecto sobre la traducción del RNAm celular se ha descrito, fundamentalmente, en dos tipos de sistemas, en

células L infectadas con mengovirus y en células Hela infectadas con poliovirus. La estrategia seguida por el virus para inhibir traducción de la célula que infecta radica en dos hechos fundamentales: la inhibición es a nivel de la formación del complejo iniciador (Leibowitz y Penman, 1971; Kaufmann y cols. 1976; Ehrenfels y Manis 1976) y no se requiere expresión del genoma viral (Babianian, 1972). Se ha reportado desagregación de polirribosomas celulares (Penman y cols. 1973; Colby 1974) y la asociación posterior del RNAm viral en los denominados polirribosomas virales (Penman y cols. 1963).

Durante el transcurso de la inhibición la velocidad de elongación de la cadena polipeptídica es constante y el RNA mensajero celular permanece estable (Leibowitz y Penman 1971).

Durante la infección con picornavirus, se detectan cambios en la permeabilidad de la célula ocasionando una acumulación de Na^+ intracelular (Sánchez, T.A. 1983; Contreras y cols. 1979; Carrasco y Smith, 1976; Alonso y Carrasco, 1981) habiéndose propuesto que esta modificación en tonicidad, desencadena la inhibición en la traducción del RNA mensajero del huésped y favorece la traducción del viral.

Por otro lado, existe evidencia abundante en la literatura que apoya la inactivación del factor que reconoce el residuo de 7mG ppp ("cap"), no presente en el RNAm vi-

ral, en células infectadas (Rose y cols 1978; Ehrenfeld, 1982).

Síntesis de RNA, (Transcripción).

La transcripción es un proceso enzimático que implica apareamiento y polimerización de ribonucleótidos, por medio del cual la información genética contenida en el DNA se utiliza para sintetizar una hebra simple de RNA. La síntesis y metabolismo del RNA son de primordial importancia para la organización bioquímica de las células dado que, este proceso, está íntimamente asociado con la expresión final de la expresión genética: la traducción. Como se mencionó anteriormente, durante la infección con picornavirus, hay una marcada inhibición en la síntesis de RNA de la célula huésped, primariamente el fenómeno fué descrito por Salzman y cols. (1959), Martin y cols. (1962) y Franklin y Baltimore (1962), más tarde los estudios se ampliaron utilizando diferentes líneas celulares y varios miembros del grupo picornavirus (Bienz y cols. 1978; Zimerman y cols. 1963; McCormick y Penman 1967). Por otro lado, se ha reportado que la inhibición de la transcripción celular requiere de la acumulación de productos virales (Baltimore y cols. 1963; Penman y cols, 1965; Fernández-Tomás 1982) y se ha postulado que alguna proteína actúa como inhibidor de la transcripción celular (Balandin y cols. 1964; Ho y Washington 1977 Fernández-Tomás 1982), Ho y cols. proponen una lipopro-

teína como inhibidor. Lo mencionado anteriormente junto con las evidencias experimentales en cuanto a que: la estabilidad del RNA mensajero no se ve afectado (Franklin y cols. 1962; Fernández-Muños y Darnell 1976), las RNA polimerasas I, II y III obtenidas de células infectadas - están presentes y activas (Schwartz y cols. 1974; Apriletti y cols. 1974), la conducta cromatográfica y el patrón electroforético de las subunidades de la RNA polimerasa II no está modificado (Apriletti y cols. 1978), la disminución en el número de RNA polimerasas asociadas a cromatina celular (Flores-Otero y cols. 1982) y que, al suplementar en un sistema de transcripción in vitro con RNA polimerasa II, no se restaura la actividad transcripcional de extractos obtenidos de células infectadas (Crawford y cols. 1981), sugieren que la interferencia en la transcripción ocurre a nivel de iniciación del proceso.

El Proceso de Transcripción en Eucariotes.

El paso de la información genética contenida en el DNA hacia RNA es conocido como transcripción; la enzima encargada del proceso se denomina RNA polimerasa y es -- dependiente, en la célula, del DNA que actúa como templado. En células procariotes se ha encontrado una sola enzima en tanto que en células eucarióticas se han encontrado y caracterizado tres tipos, las cuales se diferencian por su localización en el núcleo, su patrón cromatográfico, por su sensibilidad a α -amanitina (compuesto tóxico producido por el hongo Amanita fhalloides) y por su función, La RNA polimerasa I se encuentra en el nucleolo y se encarga de sintetizar el RNA ribosomal, la RNA polimerasa II se localiza en el nucleoplasma y sintetiza el RNA heterogéneo nuclear, precursor del RNA mensajero, y finalmente, la RNA polimerasa III, que se encarga de sintetizar RNA de bajo peso molecular, RNA de transferencia y el RNA 5 S, se localiza en el nucleoplasma.

En general el mecanismo de transcripción se divide en -- tres etapas: la iniciación, en la cual la RNA polimerasa se une al DNA en una región específica llamada promotor, la unión de dos nucleótidos trifosfatos a la enzima inicia la transcripción de manera específica. La segunda etapa es la elongación de las cadenas de RNA, durante la cual las cadenas nucleotídicas crecen por adición secuen

cial de ribonucleótidos monofosfato al extremo 3' terminal del dinucleótido iniciador (la entrada de los diferentes ribonucleótidos depende obviamente de la complementariedad de la hebra de DNA). La terminación de la transcripción, como último evento, implica la liberación de la cadena de RNA del cual se conocen en procariotes - al menos, dos mecanismos, uno debido a una secuencia específica en el DNA y el segundo mediado por un factor proteico.

En eucariotes el proceso de transcripción es complicado y aunque la regulación del proceso ha sido ampliamente estudiado, existen varios aspectos que no han sido totalmente aclarados; el mecanismo por el cual largos segmentos del genoma no son expresados, el papel regulatorio de proteínas asociadas al DNA, el papel de secuencias repetidas encontradas en diferentes genes, así como el mecanismo de acción de secuencias consenso encontradas en la región promotora, etc. Los primeros estudios sobre el proceso de transcripción consistieron básicamente, en reproducir cada uno de los eventos involucrados en el proceso; dichas investigaciones se llevaron a cabo utilizando núcleos íntegros (Gurdon, 1973; Mertz y cols. 1977). Una de las características principales de las células eucarióticas es la enorme cantidad de DNA en forma de cromatina, organizada en unidades repetitivas llamadas nucleosomas, y los cuales están constituidos por cuatro histonas (H2a, H2b, H3 y H4) arreglados en octámeros conteniendo -- dos de cada una de ellas, sobre 200 pares de bases de DNA

(Kornberg, R. 1977). Debido a la mayor complejidad morfológica y molecular de la cromatina celular, los sistemas con núcleos íntegros ofrecen una gran desventaja para el estudio de la regulación de la transcripción. En años más recientes se ha intentado reproducir los eventos de la transcripción in vitro, utilizando DNAs virales como templado y suplementando con una fuente enzimática. Uno de los modelos de cromatina celular que más se ha utilizado es el genoma del virus SV40 y, como fuente enzimática, ya sea: a) enzimas purificadas (Westphal, 1970 ; Samrook y cols. 1972), b) extractos celulares parcialmente purificados suplementados con RNA polimerasa II purificada que permite iniciación específica (Weil y cols. 1979) y c) extractos celulares totales no dependientes de RNA polimerasa exógena y que contiene todos los factores necesarios para la iniciación de la transcripción específica (Manley y cols. 1980; Handa y cols. 1981). Weil y cols. (1979) utilizando el extracto citoplasmático (S-100) para transcribir el promotor tardío del virus Adeno-2 observa iniciación específica. Este ensayo también ha sido llevado a cabo con el gen de globina de ratón con resultados similares (Luse y cols. 1980).

Recientemente estos extractos celulares (Manley y S-100) se han fraccionado para tratar de purificar los factores involucrados en el proceso de transcripción. Matsui y cols. (1980), al fraccionar el extracto S-100 por cromatografía, identifica 4 componentes (IIA, IIB, IIC, y IID)

que son requeridos para la iniciación precisa de la transcripción del promotor tardío de adeno-2; más tarde, Samuels y cols. (1982), realizan un fraccionamiento análogo al descrito por Matsui, pero con el extracto celular total (Manley) encontrando que se requieren solamente tres fracciones (AB, CB, y DB) para la transcripción precisa. Los factores ya descritos han sido parcialmente purificados y pueden ser usados para reconstituir reacciones semejantes a las observadas con el extracto inicial. Por otro lado Dynan y Tjian (1983 a) al utilizar un método nuevo de fraccionamiento, partiendo de un extracto total de células Hela, encuentran tres componentes requeridos para la transcripción específica: un componente al que denominan Sp1, el cual es específico para la transcripción tanto del promotor temprano como del tardío de SV40 y cuyo mecanismo de acción se lleva a cabo mediante la unión a la región repetida en "tandem" de 21 p.b. (Dynan y Tjian 1983 b); el segundo componente (Sp2) es un factor general, que se requiere para la transcripción de otros promotores (incluyendo adeno); el 3er. componente corresponde a la fracción que contiene la RNA polimerasa II endógena. Lo antes mencionado, junto con las evidencias aportadas acerca de la interacción templado-factores y RNA polimerasa II-templado, ha permitido elaborar un modelo de las etapas que están involucradas en la iniciación precisa de la transcripción (Fire y cols. 1984).

El Virus SV40 (Virus de Simio 40).

Como se menciona anteriormente uno de los virus que más se ha estudiado como modelo de un gen eucariótico es el virus SV40; uno de los virus más sencillos y más ampliamente caracterizados (Tooze 1980). Pertenece a la familia de los papovavirus y se le ha utilizado como sistema modelo de cromatina celular debido a sus características; estructura nucleosómica, dependencia total de las enzimas celulares tanto para su replicación como para su transcripción; capacidad de templado en sistemas "in vitro" tamaño relativamente pequeño de su genoma, etc. Su estudio ha permitido contestar preguntas relevantes en biología, acerca del origen de replicación, de las regiones necesarias para la transcripción, de las secuencias involucradas en el empalme ("Splicing"), en la organización de cromatina activa; en la importancia de las regiones realzadoras ("Enhancer"), etc.

Estructura de SV40.

SV40 es un virus con un genoma sencillo de 5226 pares de bases y 3.5×10^6 daltones. Tiene un tamaño de 45 nm, con simetría icosaédrica compuesta por una cápside constituida por tres proteínas estructurales. La molécula de DNA es doble cadena circular cerrada, en forma superenrollada del cual se ha determinado la secuencia total (Reddy y cols. 1978 ; Fiers 1978) y el mapa de restricción (ver figura 3). SV40 puede seguir dos vías en el ciclo viral, -

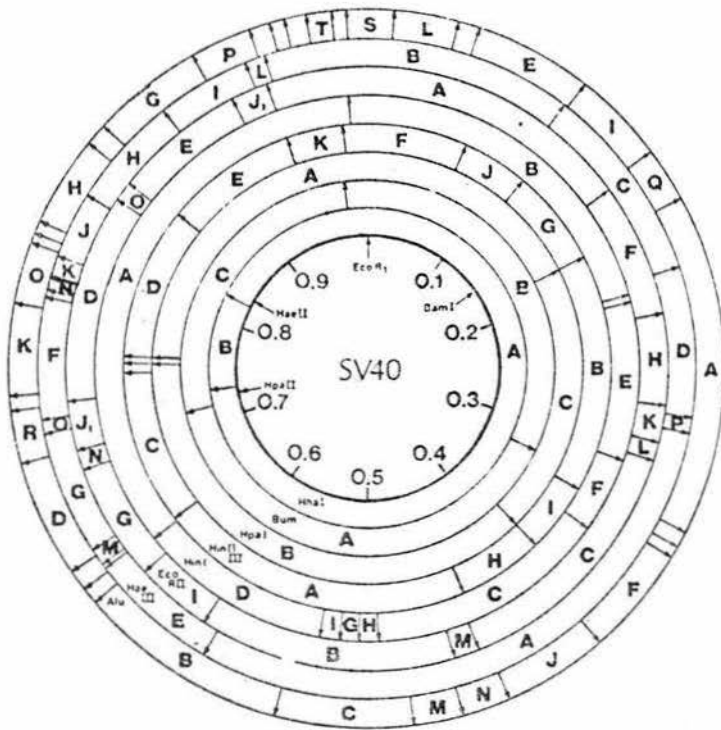


FIGURA 3. Mapa de Restricción de SV40. (Tomado de Luria y cols. 1978).

infección incompleta (abortiva) o la vía lítica (productiva) en la cual hay producción de partículas virales. Dado los objetivos del presente trabajo sólo se revisará lo referente al ciclo lítico.

Ciclo Lítico de SV40.

El ciclo lítico de SV40 se divide en dos períodos: el temprano y el tardío. El primero se inicia con la penetración de la partícula viral y termina al comenzar la síntesis de DNA viral, momento en el cual se inicia el período tardío.

La vía productiva del virus involucra los eventos de adsorción, penetración y descubrimiento. El virus SV40 se adsorbe a sitios en la superficie celular (entre 1-2 horas post-infección) y posteriormente, el virión pasa a el interior de la célula por pinocitosis. El evento de desnudamiento (liberación del genoma) no ha sido totalmente definido; por un lado Hummeler (1970) y Mackay y Consigli (1976) reportan la aparición de viriones intactos en el núcleo 30 minutos después de la entrada y por otra parte Frost y Bourgaux (1975) encuentran estructuras virales desproteinizadas parcialmente en el citoplasma.

Durante el período temprano (12-15 horas p.i.), se induce la síntesis de proteínas involucradas en la síntesis

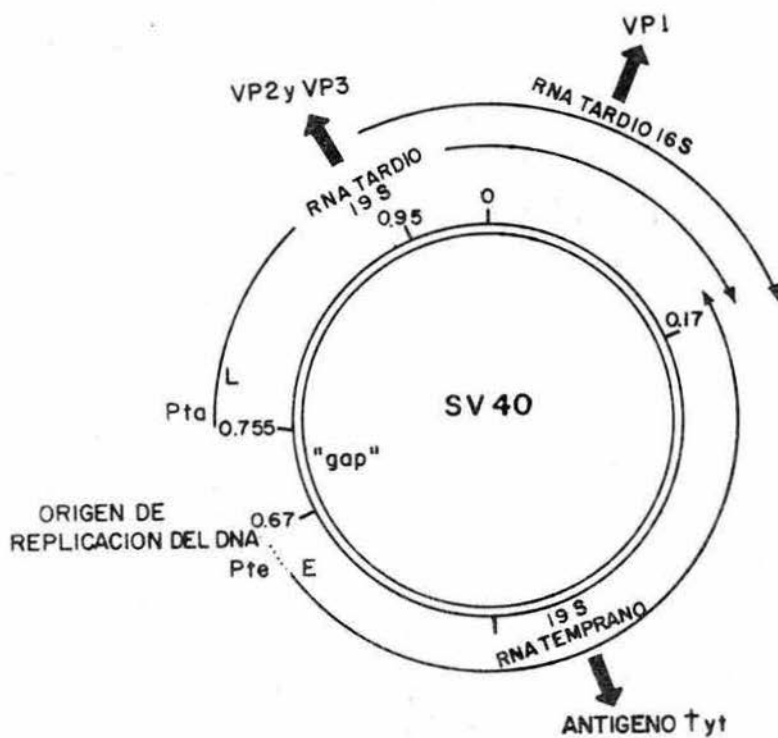
de DNA, proteínas virales no estructurales (antígenos "T" y "t") (ver figura 4). Durante el período tardío además de la síntesis de proteínas estructurales se lleva a cabo el ensamble, maduración y la liberación de partículas virales (Tooze, 1980). Los genes A y F codifican para los antígenos "T" y "t" los cuales autorregulan la transcripción temprana (Tjian 1981) y están involucrados en el establecimiento y mantenimiento del estado transformado de células no permisivas (Kimura, 1972; Steinberg, 1978).

Transcripción de SV40.

La transcripción del genoma de SV40 ocurre de manera asimétrica (Westphal 1970 op. cit.). Durante el período temprano, como se mencionó anteriormente, se transcriben genes virales utilizando la RNA polimerasa II del huésped a partir de un promotor localizado aproximadamente entre 0.6 y 0.7 unidades en el mapa de SV40 (Sambrook 1973); esta región se denomina promotor temprano y se localiza en una sola de las cadenas (cadena E). El promotor tardío que controla la expresión de proteínas estructurales se denomina promotor tardío y se localiza en la cadena complementaria (cadena L) (Sambrook, 1972 op. cit.) ver figura 4.

El DNA de SV40 aislado de células permisivas exhibe propiedades similares a los de cromatina eucariótica. Está compuesto de complejos DNA-histona arregladas en la estructura nucleosómica características (Griffith, 1975; Germon

FIGURA 4. Mapa funcional y genético de el genoma de SV40. (Tomado y modificado de Luria y cols. 1978). El sitio "cero", en unidades de mapa, se toma convencionalmente en el único sitio de restricción de la enzima Eco R1.



y Hirt 1975). Esta cromatina viral, llamada minicromosoma, ha sido aislada a tiempos tardíos de la infección y estudiada como templado para dirigir la transcripción "in vitro" (Gariglio y Mousset 1975; Brooks 1977; Green 1977). Aunque únicamente una pequeña proporción (1%) del total de la cromatina viral es activa transcripcionalmente, e "in vitro" sólo permite elongar las cadenas, ha sido un buen modelo para estudiar la relación entre estructura y función de cromatina celular. Con la utilización de fuentes enzimáticas exógenas ahora es posible reiniciar transcripción utilizando el minicromosoma (Beard y cols. 1981). Los métodos para obtener complejos DNA-histonas de SV40, a partir de células o viriones purificados, han variado grandemente desde la utilización de detergentes (Green y cols. 1976; Gariglio y cols. 1975 op. cit. ; Muñoz y cols. 1979), hasta agentes quelantes y agentes reductores (Brady y cols. 1980; 1981) y alkalis (Christiansen 1977; Meneguzzi y cols. 1978).

Como se mencionó anteriormente utilizando templados de cromatina viral y fuentes enzimáticas conteniendo los factores requeridos para la iniciación de la transcripción, el proceso de transcripción se puede reproducir "in vitro". Estos sistemas nos permiten abordar otro tipo de problemas asociados a la regulación y alteración de la expresión genética de un eucariote (Díaz-Moreno, A. 1983). Tal es el caso de la infección del virus de la poliomielitis (polio virus) la cual ocasiona que el sistema genético del hués

ped se apague. Dado el interés por estudiar el mecanismo por el cual poliovirus inhibe la transcripción celular y partiendo de la hipótesis de que la inhibición ocurre a nivel de la iniciación, el objetivo del presente trabajo fué el de obtener un sistema modelo que iniciara transcripción específica "in vitro", con el fin de estudiar, -- posteriormente, el probable efecto inhibitorio de un péptido virus-específico.

OBJETIVO: El trabajo que desarrolle lleva como objetivo principal obtener un sistema modelo que inicie transcripción específica "in vitro" con el fin de estudiar, posteriormente, el mecanismo de inhibición en la transcripción ejercido por el virus de la poliomielitis.

ESTRATEGIA : Para lograr el objetivo, el trabajo experimental se dividió en varias etapas:

- 1) Purificación de virus SV40.
- 2) Obtención a partir de virus purificados, de un complejo nucleoproteico - que inicie transcripción.
- 3) Obtención de extractos celulares que permitan transcripción específica "in vitro".
- 4) Transcripción "in vitro" del complejo suplementado con el extracto.

MATERIALES

Líneas Celulares y Virus.

Células CV-1 derivadas de riñón de mono (CCL70-ATCC) nos fueron obsequiadas por el Dr. Patricio Gariglio del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV. Células Hela derivadas de un carcinoma de cervix humano (CCL 2-ATCC). El virus de la Poliomiélitis (Mahoney-Tipo I) y el virus SV40 (cepa 777), fueron propagados a baja multiplicidad en células Hela y CV-1 respectivamente. El virus SV40 nos fué obsequiado por el Dr. Patricio Gariglio y el de la Poliomiélitis fué obtenido del laboratorio del Dr. David Baltimore.

Material para el Cultivo de Células.

De Gibco Laboratorios (EUA). Medio Eagle modificado (Dulbecco) y medio esencial (MEM) modificado por Joklik. El suero que se utilizó para el medio fué de Biocel (México).

De Falcons Labs. (EUA). Cajas de Petri para cultivo de 35, 60, y 100 mm de diámetro, tubos cónicos de 50 ml y botellas falcons de 75 cm².

REACTIVOS.

J.T. Backer (México). Alcohol etílico absoluto, Hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de potasio (KCl), fosfato de potasio (KH_2PO_4), ácido tricloroacético, bicarbonato de sodio (NaHCO_3), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de magnesio (MgCl_2), ácido bórico (H_3BO_3), difenilamina, ácido clorhídrico (HCl), Tolueno, p-Dioxano, glicerol, ácido --perclórico (HClO_4), ácido sulfúrico (H_2SO_4), dextrosa, tartrato de potasio.

Sigma Chemicals Co. (EUA). Tris-HCl, tripsina, Hepes, uridina, timidina, SDS, EDTA, citidina, tritón X-100, trifosfato de adenosina, trifosfato de guanidina, trifosfato de uridina, trifosfato de citosina, albúmina de suero bovino rojo neutro, polivinil pirrolidona, ribonucleasa A, 2-mercaptoethanol, Tris-Base, creatín fosfato, EGTA, heparina.

Merck (México). Cloruro de magnesio (MgCl_2), difosfato - tetrasódico ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), naftaleno, sulfato de amonio, cloruro de manganeso (MnCl_2), alcohol isoamílico, acetaldehido, reactivo de Folín, formamida, persulfato de amonio, azul - de bromofenol, desoxicolato de sodio.

Bethesda Research Laboratories (Bethesda, Md. EUA). TEMED, cloruro de cesio (CsCl_2), DTT, enzimas de restricción: - Hpa 1, Bgl 1, Eco R1, PMSF.

BDH Chemicals (Inglaterra). Acrilamida, N-N metilén bis--acrilamida, agarosa, SDS, sulfato cúprico, glicina.

Farmacéutico Lakeside (México). Penicilina G sódica cristalina, y sulfato de estreptomicina.

Whatman (Inglaterra). Papel Whatman 3 MM, 1 MM y DE81. Packard. Co. Solueno, PPO.

Calbiochem (EUA). Acido desoxirribonucleico de timo de ternera, bromuro de etidio, ~~α~~-amanitina.

La actinomicina D (Lyovac Cosmogen R), nos fué obsequiada por el director de Investigaciones Clínicas de Merck Sharp and Dohme de México y el Sarkosyl NL-97, nos fué obsequiado por el Sr. José Antonio Salguero de Ciba Geigy de México. La película Kodak X-Omat XS-5 fué obtenida de Ind. Fotográficas Interamericana, S.A. (México) y la película Polaroid tipo 55 fué de Michelmex (México).

Material Radiactivo.

Amersham Radiometer Center (Amersham, Inglaterra).

(6-³H) Timidina act. esp. 23 Ci/mmol, (5-³H) UTP act. esp.

11.6 Ci/mmol y (α -³²P) UTP act. esp. 3000 Ci/mmol.

Preparación de Soluciones, Amortiguadores y Medios .

Para preparar las soluciones y amortiguadores se utilizó agua bidestilada y se esterilizaron por autoclave (A) 22 libras / cm² de presión, 120 °C durante 20 minutos, o por filtración (F) utilizando membranas millipore tipo GS (0.22 um).

Medio Dulbecco 1X. Se disolvió el contenido de un paquete comercial en 890 ml de H₂O bidestilada estéril, adicionando 3.7 gr. de bicarbonato de sodio y 3.5 gr. de dextrosa, con CO₂ gaseoso se ajustó el p.H. a 7.4 y se esterilizó por filtración. Para utilizarlo en el crecimiento de células CV-1 por cada 890 ml se adicionó 100 ml de suero fetal de ternera y 10 ml de penicilina-estreptomomicina 100 X. Para preparar Dulbecco 2 veces concentrado (2X) se realizó lo mismo pero en la mitad de volumen.

Amortiguador de fosfato salino (PBS). (NaCl 137 mM; KCl 3 mM; Na₂HPO₄ 2 mM y KH₂PO₄ 2 mM). Los reactivos fueron disueltos en agua bidestilada, el p.H. se ajustó a 7.4 antes de aforarse (A).

Soluciones de Penicilina/Estreptomomicina (100 X). 5 X 10⁶ unidades de penicilina G sódica y 5 gr. de estreptomomicina se disolvieron en agua bidestilada estéril, aforados a un litro y filtrados por millipore. Almacenándose la solución a -20 °C.

Medio MEM 2X. Para preparar cuatro litros de medio, cuatro sobres del preparado comercial fué disuelto en -- 1800 ml de agua bidestilada estéril y suplementado con 8 grs. de bicarbonato de sodio. Se procedió a esterilizar por filtración en millipore 0.22 um, previo ajuste del p. H. a 7.4 con HCl 1 N.

Solución de Tripsina 0.05 % - EDTA 0.02 %. (para preparar 1000 ml). NaCl 6 gr.; KCl 0.4 gr ; Dextrosa 1 gr ; NaHCO_3 0.58 gr ; Tripsina 0.5 gr ; EDTA 0.2 gr ; rojo de fenol al 0.5% 0.5 ml. Los reactivos se disolvieron y se ajustó el p.H. a 7.4 con HCl 0.1 N. Se esterilizó por filtración y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Solución de Rojo de Fenol al 0.5 %. 0.5 gr. de rojo de fenol se disolvieron en 75 ml de agua bidestilada estéril con la ayuda de calor y 1.5 ml de NaOH 1 N; se aforó a 100 ml y se fultró en papel whatman 1 MM y se almacenó a -20°C .

Solución de Rojo Neutro al 0.5 %. 0.5 gr. del colorante fueron disueltos y aforados en 100 ml de agua bidestilada estéril, se filtró por millipore 0.45 um y se almacenó a 4°C .

Solución de agar 0.9 % para plaqueo de SV40. Para preparar 200 ml de agar al 0.9 %, se utilizaron 100 ml de agar noble especial al 1.8 % y 100 ml de medio Dulbecco 2X suplementado con 5 % de suero fetal y penicilina estreptomina. Esta mezcla se preparó a 45 °C y se conservó a esta temperatura hasta el momento de vaciarse sobre la monocapa de células.

Solución de Actinomicina D. A 1.0 mg. de actinomicina D se le añadieron 1.0 ml de agua bidestilada estéril, se disolvió y se guardó a 4 °C en la obscuridad.

Mezcla de Lisis. (Tritón X-100 0.25 %, Tris-HCl p.H. 7.9 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 0.4 M, Sarkosyl 0.4 %). Para cada 100 ml utilizamos: 0.25 ml de Tritón X-100, 1 ml de Tris-HCl p.H. 7.9 (1 M), 4 ml de EDTA (0.25 M), 8 ml del detergente sarkosyl (10 %). La mezcla se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Amortiguador I (Manley y cols. 1980). (Tris-HCl p.H. 7.9 0.01 M, EDTA 0.001 M y DTT 0.005 M). Para cada 100 ml utilizamos: 1 ml de Tris-HCl p.H. 7.9 (1 M), 0.4 ml de EDTA (0.25 M) y 2.5 ml de DTT (0.2 M). Se almacenó a 4 °C.

Amortiguador II (Manley). (Tris-HCl p.H. 7.9 0.05 M, $MgCl_2$ 0.01 M, DTT 0.002 M, sacarosa 25 % y glicerol 50 % (v/v)). Para preparar 100 ml utilizamos: 5 ml de Tris-HCl p.H. 7.9 (1 M), 1 ml de DTT (0.2 M), 25 gr. de sacarosa y 50 ml de glicerol estéril. Se almacenó a 4 °C.

Amortiguador III (Manley). (Hepes p.H. 7.9 20 mM, $MgCl_2$ 12.5 mM, KCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 2 mM, glicerol 17 %). Para preparar 500 ml de amortiguador utilizamos: 10 ml de Hepes p.H. 7.9 (1M), 6.25 ml de $MgCl_2$ (1M), 50 ml de KCl (1M), 0.2 ml de EDTA (0.25 M), 5 ml de DTT (0.2 M) y 85 ml de glicerol estéril. La solución se almacenó a 4 °C.

Amortiguador "Stop" de polimerasa (Brady y cols 1980). (SDS 1%, NaCl 0.15 M, EDTA 5 mM, Tris-HCl p. H. 7.4 10 mM). Para preparar 100 ml de amortiguador utilizamos: 10 ml de SDS (10 %), 15 ml de NaCl (1M), 2.0 ml de EDTA (0.25 M) y 1 ml de Tris-HCl p.H. 7.4 (1M). Se almacenó a temperatura ambiente.

Amortiguador para Transcripción (Brady y cols. 1980 y Manley y cols. 1980). (Hepes 12 mM p.H. 7.9 , 60 mM KCl, 7.0 mM $MgCl_2$, 30 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1.9 mM DTT, 10 % glicerol, 1mM EGTA, 0.01 % tritón-X-100, 500 uM de ATP, GTP, y γ -CTP, 10 uCi de UTP-- ^{32}P (3000 Ci/mmol) o bien 131 uCi de UTP-- 3H (23 Ci/mmol) y 10 mM creatín fosfato). Para una mezcla de reacción de un volumen final de 50 uls. se utili

zaron 12.5 ul del CNP de SV40 (1-3 ugr. de DNA) o 1-3 ugr. de DNA forma I, el volumen restante se completó con agua bidestilada estéril. La reacción se llevó a cabo a 32°C por 60 minutos.

Amortiguador E (Electroforesis) (Baltimore y cols. 1977).

(Tris-HCl p.H. 7.3 40 mM; acetato de sodio 10 mM; EDTA 1 mM, glicerol 10 %). Para preparar un litro de amortiguador se emplearon: 40 ml de Tris-HCl p.H. 7.3 (1M), 10 ml. de acetato de sodio (2M), 5 ml de EDTA (0.25M) y 100 ml de glicerol (100%) estéril. La mezcla fué aforada y almacenada a 4 °C.

Solución para lavado de filtros de Transcripción.

(Na_2HPO_4 195 gr; $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ 40 gr ; SDS 5 gr.). Los reactivos se disolvieron en 5 litros de agua bidestilada estéril y se almacenó a temperatura ambiente.

Amortiguador de Disociación. (Brady y cols. 1980).

(NaCl 0.15 M, EGTA 0.005 M, DTT 0.003 M, Tris-Base p.H.8.7 0.05 M, tritón X-100 0.05 %). Para preparar 300 uls. del amortiguador utilizamos: 45 uls. de NaCl (1M), 15 uls. de EGTA (0.1 M), 9 uls. de DTT (0.1M), 30 uls. de Tris-Base (0.5 M) y 8 uls. de tritón X-100 (2.5 %). La solución se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Solución de Agarosa (1.0 %). 10 gr. de agarosa fueron disueltos en un litro de amortiguador E con ayuda de calor repartida en alícuotas y almacenada a 4 °C.

Mezcla de centelleo líquido (Cocktail D). (PPO 40 grs; Naftaleno 800 grs) los reactivos fueron disueltos en cuatro litros de p-Dioxano y aforados con el mismo reactivo a 8 litros. La mezcla se almacenó en frascos ambar a temperatura ambiente.

Mezcla de centelleo líquido (Tolueno-Tritón III). Para preparar 1000 ml de la mezcla se disolvieron 6 grs. de PPO - en 600 ml de tolueno y 400 ml de tritón X-100.

Solución A (Lowry y cols. 1951). (Na_2CO_3 94 mM; NaOH 50 mM tartrato de sodio y potasio 47 mM). Los reactivos fueron disueltos en 500 ml de agua bidestilada estéril y la solución se almacenó a 4 °C.

Solución B (Lowry). ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 2 mM). El reactivo fué disuelto en 100 ml de agua bidestilada y almacenado a 4 °C.

Solución C (Lowry). 50 partes de la solución A más 1 parte de la solución B. Esta solución se prepara al momento de usarse.

Solución de Folín (Lowry). El reactivo comercial fué disuelto 1:2 con agua bidestilada.

Solución patrón de proteína. (Lowry). 50 mg. de albúmina bovina se disolvieron en 20 ml de agua bidestilada estéril, se repartió en alícuotas y se almacenó a 4 °C.

Solución de timidina fría. (50 ugr./ml) 25 mg. de timidina se disolvieron en 500 ml de PBS estéril. La solución se almacenó a 4 °C.

Reactivo de Difenilamina (Burton, K. 1956). 1.5 gr. de difenilamina fueron disueltos en 100 ml de ácido acético y 1.5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Almacenado en la oscuridad a temperatura ambiente. El día de su uso se añadieron 100 μ l. de una solución acuosa de acetaldehído (16 mg/ml) por cada 20 ml de difenilamina.

Solución A (Electroforesis). Para preparar 100 ml de la solución se pesaron 15 gr. de acrilamida y 0.5 gr. de bisacrilamida y se disolvieron y aforaron con 100 ml de agua bidestilada estéril. La solución se almacenó a 4 °C.

Amortiguador Tris-Boratos (10 X). (Tris-Base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2.5 mM). 108 gr. de Tris-Base, 55 gr. de ácido bórico y 9.3 gr. de EDTA fueron disueltos en 800 ml

de agua bidestilada estéril, el p.H. se ajustó a 8.3 y la solución se aforó a 1000 ml.

Gel de Poliacrilamida-Urea al 4.15 % (Para análisis de RNA)

Para preparar 31 ml de solución gelificadora se utilizó: 8.25 ml de solución A (electroforesis), 1.5 ml de amortiguador -- Tris-Borato (10X), 21ml de Urea (10 M, desionizada), 0.06 ml de TEMED y 0.2 ml de Persulfato de Amonio (10 %). La solución se colocó entre las placas y se dejó gelificar por 45-60 minutos.

Amortiguador de muestra (5X). Para preparar 50 ml de amortiguador se utilizaron: 12.5 ml de amortiguador Tris-Borato -- (10 X), 12.5 gr. de sacarosa, 2.5 ml de SDS (10 %) y 25 mg. de azul de bromofenol, todo lo anterior se aforó a 50 ml -- con agua bidestilada

Solución SSC (20 X). (Southern, 1975). NaCl 175 gr; citrato de sodio 88.23 gr. fueron disueltos en 1000 ml de agua bidestilada, esterilizada por autoclave (A) y almacenada a temperatura ambiente.

Solución de Ribonucleasa A. 1 mg. de solución comercial (100/ug./ml) se aforó a 10 ml con SSC (2 X).

Solución para pre-hibridización. (0.04 % de albúmina de suero bovino, 0.04 % de ficol, 0.04 % de PVP). 400 mg de cada componente fueron disueltos en un litro de solución SSC (6 X) y almacenados a 4 °C hasta su uso.

Solución para Hibridización. (0.04 % albúmina de suero bovino, 0.04 % de ficol, 0.04 % PVP, 0.5 % SDS, 1mM EDTA). La solución para pre-hibridizar fué ajustada con SDS y EDTA a las concentraciones señaladas. La solución fué preparada el día de su uso.

METODOS

Cultivo de Células CV-1.- Células CV-1 fueron cultivadas en monocapas con medio esencial mínimo Eagle modificado (Dulbecco), suplementado con 10 % de suero fetal de ternera y penicilina-estreptomicina, en cajas de 100 mm o cajas falcón de 75 cm². Para colectarlas, aspiramos el medio, lavamos con PBS y añadimos 5 ml de tripsina-EDTA, la monocapa de células se desprendió y resuspendió con 4 ml de medio dulbecco completo. El número de células fué determinado mediante conteo en un hematímetro.

Cultivo de Células Hela.- Células Hela fueron crecidas en suspensión, en medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 10 % de suero fetal de ternera, aminoácidos no esenciales, glutamina, metionina, leucina y penicilina-estreptomicina. La densidad celular varió entre 4×10^5 a 6×10^5 células/ml.

Infección de Células CV-1 con SV40.- Se sembraron aproximadamente 2×10^6 células CV-1 por cada caja P-100, dos días antes de infectar (el día de la infección se contó el número de células por caja). La monocapa de células se lavó con PBS estéril 2 veces y se infectó con una moi de 10 UFP/célula en un volumen de 0.5 ml/caja (la solución de virus se hizo en Dulbecco suero (-)). Se permitió la adsorción del virus por 60-90 minutos a 37 °C, 10 % CO₂, pasado el

tiempo y sin retirar el virus, se agregaron 10 ml de medio Dulbecco suplementado con 2 % de suero. Las células control fueron tratadas de idéntica manera, con medio sin virus (infección fingida).

Síntesis de DNA en Células CV-1 infectadas con SV40.- A los tiempos de infección señalados en la figura 5 la monocapa de células se lavó con PBS estéril, 2 veces (2 cajas control y 2 cajas infectadas), se añadió 2 ml de medio Dulbecco con 2 % de suero y 20 uCi/ml de timidina-³H a cada caja; se incubó a 37 °C, 10 % CO₂ durante 1 hora. Pasado el tiempo se colocaron las cajas sobre hielo y se lavó 2 veces la monocapa con una solución de PBS-timidina fría, añadiéndose posteriormente 2.3 ml de "mezcla de lisis" a cada caja y se colocaron en agitación suave (para no romper el DNA celular), recolectándose por separado el contenido de las 2 cajas -- control y las dos cajas infectadas en un tubo de centrifuga (rotor SW50.1, ultracentrifuga Beckman LB-55) e invirtiendo los tubos 2 veces con mucho cuidado, se centrifugo a 30 K durante 30 minutos a 4 °C. Alícuotas de 50 uls. se colocaron en filtros de papel Whatman 3 MM, se secaron y lavarón 3 veces con TCA 5 % y 2 veces en alcohol etílico absoluto, el papel ya seco se colocó en un vial conteniendo 7 ml de líquido de centelleo (cocktail D) y determinándose la radiactividad en un contador de centelleo líquido (Packard modelo 3385). Cabe mencionar que el DNA viral se encuentra en los primeros 800 uls del tubo al terminar de centrifugar.

Obtención de DNA de SV40 y digestión del mismo con enzimas de restricción. (Díaz-Moreno, A. 1983). Cultivos creciendo en cajas petri de 100 mm de diámetro (3×10^6 células/caja), fueron infectadas con SV40 (una moi de 10 UFP/célula). 16 horas después de la infección se aspiró el medio de cultivo y se añadieron 10 ml de medio Dulbecco suplementado con timidina - ^3H (10 uCi/ml). 72 horas después de infección - los cultivos se lavaron con PBS y las células fueron lisadas con una solución que contenía : SDS (0.6 %), Tris-HCl, p.H. 7.4 (0.01 M), EDTA (0.01 M) y se mantuvieron en agitación durante 10 minutos, la suspensión fue transferida a tubos corex de 30 ml (5 cajas/tubo) suplementada con NaCl (concentración final de 1 M) y mantenida a 4 °C durante toda la noche. La suspensión se centrifugó a 10 000 rpm (rotor SS-34, centrifuga Sorvall RC-2B) durante 60 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue removido cuidadosamente y se le añadió un volumen de fenol saturado (1/4 de volumen de -- Tris-HCl p.H. 7.4 0.2 M) agitando la suspensión a temperatura ambiente durante lo minutos. La fase acuosa fue recuperada mediante centrifugación a 8 000 rpm en un rotor SS34 durante 20 minutos, la extracción fenólica fue repetida. La fase acuosa resultante fue suplementada con un volumen de cloroformo-alcohol isoamilico (25:1 v/v), la fase acuosa - fue recuperada, dejando reposar la mezcla y ajustando a -- 0.4 M de acetato de sodio. El DNA fue precipitado medi-

ante la adición de 2 volúmenes de alcohol etílico absoluto (preenfriado a -20°C). Al día siguiente el DNA fué recuperado mediante centrifugación a 10 000 rpm, 4°C , durante 60 minutos (rotor SS34, centrífuga RC-2B). El precipitado fué resuspendido en 5 ml de una solución: Tris-HCl, p.H. 7.4 (0.01 M), EDTA (0.001 M) y ajustada a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio y 0.8 gr/ml de cloruro de cesio (índice de refracción = 1.3875-1.3880). La muestra fué centrifugada durante 48 horas (40 000 rpm en un rotor 50 Ti, ultracentrífuga Beckman LB-55) y el gradiente fraccionado. Las fracciones conteniendo al DNA forma I y forma II (I.R. = 1.585 gr/ml , 1.55 gr/ml respectivamente) fueron extraídas (cuatro veces) con isopropanol, alícuotas de las fracciones conteniendo DNA fueron colocadas en papel Whatman 3 MM y la radiactividad se determinó como ya se ha indicado. Después de la extracción con alcohol isopropílico, las preparaciones (DNA forma I y II) se suplementaron con 4 volúmenes de SSC 0.1 X con el fin de diluir la concentración de CsCl, y se ajustaron a 0.4 M de acetato de sodio. La recuperación del DNA se llevó a cabo mediante precipitación con 2 volúmenes de alcohol etílico absoluto a -20°C . El precipitado obtenido mediante centrifugación (10 000 rpm - rotor SS-34, 60 minutos, 4°C) fué resuspendido en SSC 0.1 X a una concentración de 1-4 μg . de DNA/ μl y almacenado a 4°C . El DNA de SV40 forma I, fué digerido con la enzima Hpa I (5 U/ μl) en una mezcla de reacción (100-200 μl) conteniendo: Tris-HCl, p.H. 7.4 (20 mM), MgCl_2 (10 mM), KCl (

20 mM), DTT (1 mM). La digestión con Eco RI y Bgl I se realizó en la misma mezcla de reacción ajustando la concentración de sales a : Tris-HCl, p.H. 7.4 (50 mM), MgCl₂ (10 mM), NaCl (50 mM) y DTT (1 mM).

Purificación de Viriones SV40, (modificado de Brady y cols., (1980). La infección se llevó a cabo como se describió anteriormente . Después de 7-9 días de infección las células y el medio de cultivo, se colectaron y centrifugaron a 39 000 rpm por 3 horas (rotor 50 Ti, ultracentrífuga Beckman, LB-55) a 4 °C, el sobrenadante se descartó y la pastilla de virus se resuspendió con 10 ml de PBS estéril, la solución de virus se sonicó por 30 segundos a 8,5 microns (cada 15 segundos se enfriaba la solución en hielo). La solución resultante fué llevada a una concentración final de 1.3 % de desoxicolato de sodio y 0.0125 % en tripsina, e incubada a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente la suspensión se colocó a 4 °C durante 10 minutos y se centrifugó a 10 000 rpm, 10 minutos a 4 °C (centrífuga Sorvall RC-2 B). La solución sobrenadante fué colocada en un colchón de cloruro de cesio de densidad 1.38 gr / ml y centrifugada a 24 000 rpm, 4 °C (rotor SW28, ultracentrífuga Beckman LB-55) durante 12 horas; la banda viral (debajo de la interfase) se colectó y se llevó a una densidad de 1.2 gr/ml con PBS estéril, esta solución fué colocada en otro colchón de CsCl de densidad 1.33 gr/ml y se centrifugó a 38 000 rpm, 4 °C, 19 horas (rotor SW40, ultracentrífuga --

Beckman LB-55). Las bandas vírales fueron colectadas y dializadas contra amortiguador Tris-HCl 0.01 M p.H. 7.4 a 4 °C durante 24 horas, el virus se almacenó a -20 °C.

Titulación de SV40 (método de UFP).- 24 horas antes de infectar con SV40 se sembraron células CV-1 (3×10^6 células/caja de 60 mm), al día siguiente el medio fué eliminado y las monocapas fueron lavadas con PBS estéril 2 veces (con cuidado para no desprender la monocapa). Por otra parte se prepararon diluciones del virus (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10}) en medio Dulbecco sin suero. Las monocapas fueron infectadas con 0.2 ml/ caja de cada dilución, permitiéndose la adsorción del virus por 90 minutos a 37 °C, 10 % CO_2 (agitando cada 20 minutos para una mejor distribución). Pasado el tiempo de adsorción, se retiró el exceso de virus con una pipeta pasteur y se añadieron 5 ml de la mezcla de agar-medio precalentado a 45 °C a cada caja (ver material), dejándose solidificar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las cajas con el agar ya solidificado se incubaron invertidas a 37 °C, 10 % CO_2 durante 14-16 días. Las placas se observan a partir del día 14 mediante tinción con 4 ml/caja de solución de rojo neutro estéril al 0.01 % (concentración final) en medio Dulbecco completo, permitiendo la incubación a 37 °C, 10 % CO_2 , durante 18 horas; al día siguiente se retiró el colorante y se determinó el número de placas.

Obtención de Complejos de Nucleoproteína (CNP) para Trans-
cripción " IN VITRO" .- (Brady y cols. 1978,1980).

Viriones purificados fueron disociados por tratamiento con 5 mM EGTA, 3 mM DTT, 0.15 M de NaCl en 50 mM de Tris-HCl p. H. 8.7 por 30 minutos a 32 °C. Después de la disociación - se adicionó tritón X-100 al 2.5 % (hasta dar una concentra- ción final de 0.05 %), transfiriendo la mezcla a hielo y colocándolas en un gradiente de sacarosa continuo 10-30 % - en amortiguador conteniendo: EGTA (5 mM), DTT (3 mM), NaCl (150 mM), Tris-HCl p.H.7.8 (10 mM), tritón X-100 (0.05%) , la centrifugación se llevó a cabo a 45000 rpm, 4 °C (rotor SW50.1, ultracentrífuga beckman LB-55) durante 2 horas.

Infección con Poliovirus.- Células Hela en suspensión se concentraron a una densidad de 9.8×10^6 células/ml e infec- tadas con 100 UFP/célula. La adsorción viral se permitió a temperatura ambiente durante 30 minutos, tiempo en el cu- al se diluyeron a una densidad de 5×10^6 células/ml con MEM (suero (-), penicilina-estreptomocina (-), glutamina (-)) y mantenida durante otros 15 minutos a temperatura ambiente. Al final del tiempo el virus no adsorvido fué retirado por centrifugación a 2500 rpm (centrífuga Internacional, PR 6000) durante 5 minutos. La pastilla de células fué resuspendida en MEM suplementado con suero dializado (2 % concentración final), glutamina y L-metionina-³⁵S (10 uCi/ml) hasta dar - una concentración de 5×10^6 células/ml y mantenidas a 37 °C,

10 % CO₂ (tiempo 0 de infección). A los diferentes tiempos post-infección se tomaron alícuotas y se determinó la radiactividad, las células control fueron tratadas de idéntica manera, excepto que el medio de infección no contenía virus.

Determinación de la concentración de Proteína. (Lowry y cols. 1951).- A las muestras a analizar (ajustadas a 200 ul) se les añadió 1 ml de solución C, se agitaron y 10 minutos después se agregó 0.01 ml de reactivo de fób-
lin. La solución se agitó inmediatamente permitiéndo -
la reacción al menos 45 minutos a temperatura ambiente. La densidad óptica de la reacción colorimétrica fué determinada a 660 mu en un espectrofotómetro (Carl Zeiss-
PMQ II). Se empleó la albúmina de suero bovino como solución estándar para hacer la curva tipo.

Determinación de la concentración de DNA. (Burton, K. - 1956).- La muestra a analizar (se ajustó a 200 ul) -
fué diluida con un volumen de HClO₄ (1 M) al cual se le añadieron 2 volúmenes de difenilamina, permitiendo la reacción colorimétrica a temperatura ambiente al menos -
durante 24 horas. Las muestras se analizaron a 600 mu en un espectrofotómetro (Carl Zeiss PMQ II). Se empleó HClO₄ como blanco y DNA de timo de ternera como estándar.

Preparación de Extracto de Manley. (Manley y cols. 1980).

Dos litros de células Hela en suspensión (5.85×10^5 células/ml) fueron centrifugadas a 2500 rpm (Centrifuga Internacional PR 6000) durante 5 minutos y lavadas con MEM sin suero, penicilina-estreptomicina ni glutamina. La pastilla fué resuspendida en el mismo medio a una densidad de 10^7 células/ml; la mitad del cultivo se infectó con poliovirus (como se mencionó anteriormente) y la otra se utilizó como control (infección fingida). A las 3 horas - ambos lotes (infectado y control) se procesaron por separado, de la siguiente manera: las células se lavaron con una solución de PBS-MgCl₂ (1.5 mM) y la pastilla se suspendió en 4 volúmenes con amortiguador 1, dejando la solución en hielo durante 20 minutos, pasado este tiempo las células fueron lisadas con un Dounce metálico (8 golpes), agregando cuatro volúmenes del paquete celular de amortiguador 2, agitando suavemente. Un volumen del paquete celular de sulfato de amonio saturado se adicionó (gota a gota) permitiendo la agitación, suavemente, durante 20 minutos. El extracto resultante se centrifugó a 50 000 rpm 4 °C (rotor 50 Ti, ultracentrífuga beckman LB-55) durante 3 horas, se tomó el sobrenadante y se le adicionó sulfato de amonio sólido (0.33 gr/ ml), adicionándose a la solución 0.01 ml de NaOH 1 N (por cada 10 gr. de sulfato de amonio). El precipitado fué colectado por centrifugación-

a 15 000 rpm durante 20 minutos a 4 °C (rotor SS-34, centrifuga sorvall RC-2B). La pastilla resultante se resuspendió con 1/10 del volumen del sobrenadante de alta velocidad (50 000 rpm) de amortiguador 3, la solución se dializó 16 horas (2 cambios de 100 volúmenes cada uno) a 4 °C, contra amortiguador 3, el dializado resultante se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se congeló rápidamente en pequeñas muestras en N₂ líquido, almacenándose a - 80 °C hasta usarse en los ensayos de transcripción "in vitro".

Transcripción "in vitro". El CNP y DNA forma I de SV40 fueron ensayados en la mezcla de reacción que contenía, en un volumen final de 50 ul: 12 mM Hepes p.H. 7.9, 60 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1.9 mM DTT, 10 % glicerol, 30 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.01 % tritón X-100, 500 uM ATP, CTP, GTP 10 uCi de UTP-³²P o bien 131 uCi de UTP-³H, 10 mM de creatín fosfato, 25 uls. de extracto de Manley y 1-3 ug. de DNA por mezcla de reacción (en forma de CNP o forma I). La reacción se inicia con la adición de los nucleótidos -- trifosfatos y se incuba a 32 °C durante 60 minutos, la reacción se para agregando 200 uls de amortiguador "stop" de polimerasa a la mezcla. La radiactividad del transcrito (RNA-³H) fué determinada de la siguiente manera: alícuotas de 50 ul se colocaron en filtros DE81, se secaron y se lavaron 7 veces (10 minutos cada cambio) con solución -- para lavado de transcripción (ver soluciones), posteriormente se lavaron 1 vez con agua bidestilada estéril (10 --

minutos) y un lavado rápido con etanol absoluto, se secaron y se colocaron en un vial conteniendo 7 ml de líquido de centelleo (Cocktail D). La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido (Packard modelo 3385).

Purificación del Transcrito (RNA-³²P)..- La reacción se detuvo con amortiguador "stop" de polimerasa. Para la desproteinización se añadieron 250 μ ls. de fenol saturado con 1/4 de Tris-HCl (10 mM); seguido de agitación y centrifugado (microcentrifuga eppendorf, modelo 5414) durante 3-5 minutos. Se recuperó la fase acuosa (fase superior) y se añadieron dos volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico, mezclando y centrifugando (microcentrifuga eppendorf) para separar las fases. La fase acuosa fue colectada y dos volúmenes y medio de alcohol etílico absoluto (pre-enfriado) fueron adicionados. Se dejó precipitando toda la noche a -20 °C, posteriormente se centrifugó durante 60 minutos, en la microcentrifuga a 4 °C. La pastilla de RNA-³²P fue secada con vacío.

Análisis de Transcritos (RNA-³²P) en geles de Poliacrilamida-Urea. El RNA-³²P (purificado) producido en el ensayo de transcripción "in vitro" con el CNP y DNA forma I fue resuspendido en 15 μ ls. de formamida (desionizada) al 80 %, calentado a 80 °C durante 5 minutos, adicionándosele posteriormente 10 μ l de bufer de muestra. Antes de colocar el

RNA, el gel de poliacrilamida-Urea fué precorrido a 500 volts durante 1 hora; las muestras, una vez colocadas en los pozos del gel, fueron corridas a 500 volts durante 2 horas a 45 °C, el amortiguador que se utilizó para la corrida fué Tris-Borato (0.5 X).

Electroforesis en geles de Agarosa.- El DNA de las formas I y II obtenidos de viriones, se analizaron en geles de agarosa al 1.0 % precorridos a 150 volts durante 30 minutos. La corrida de las muestras se llevó a cabo durante 4 horas, a 120 volts empleando el amortiguador E de corrida. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (2 ug/ml en amortiguador E) durante 30 minutos y desteñidos con el mismo amortiguador durante 60 minutos. Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (modelo TM-36) y fotografiadas con una camara polaroid (MP-4).

Transferencia y Fijación de fragmentos de DNA de SV40 a papel de nitrocelulosa (Díaz-Moreno, A. 1983). Los fragmentos de DNA restringidos, corridos en geles de agarosa, fueron desnaturalizados durante 20 minutos en una solución conteniendo: NaCl (1.5 M), NaOH (0.5 M). Las tiras de gel desnaturalizadas se lavaron con agua bidestilada estéril, y se colocaron en una solución: Tris-HCl p.H. (0.5 M), NaCl (3 M), durante 20 minutos para neutralizarlos. Una vez enjuagadas con agua bidestilada, se procedió a transferir

los fragmentos de DNA a papel de nitrocelulosa; esto se hace por fuerza iónica. La transferencia se permitió durante 24 horas, una vez terminada la transferencia, los papeles se lavaron con amortiguador SSC 1X (Southern, 1975). Los filtros lavados fueron colocados a 68 °C durante 12 -- horas para fijar irreversiblemente, el DNA en el filtro de nitrocelulosa.

Hibridización de RNA-³²P sintetizado "in vitro". (Díaz-Moreno, A. 1983). Los filtros con los fragmentos de DNA, fueron prehibridizados con 700-900 ul de amortiguador de prehibridización a 68 °C durante 12 horas. La pastilla de RNA-³²P se resuspendió en 700-900 ul de amortiguador de hibridización y se colocó a hibridizar con los filtros conteniendo los fragmentos de DNA (15-20 ug/filtro), a 68 °C durante 24 horas. Después de este tiempo los filtros fueron tratados con 700-900 ul de una solución de RNasa A (100 ug/ml), durante 2 horas a temperatura ambiente, y lavadas 3 veces durante 2 horas a 50 °C con una solución que contenía: SDS (0.5 %), SSC (1X), EDTA (25 mM), y una vez (2 horas) con una solución SSC (1X). Al final los filtros se secaron a 68 °C durante 20 minutos y se expusieron a películas Kodak X-Omat, XS-5 (-20 °C de 24 - 72 Hrs.).

RESULTADOS

Síntesis de DNA en células CV-1 infectadas con SV40.

Las células CV-1 derivadas de riñón de mono, permisivas a SV40 fueron infectadas como se describió en Métodos, con el fin de "monitorear" la infección, a diferentes tiempos después de iniciada (ver detalles en la figura 5). El sistema CV-1 - SV40 se suplementó con un precursor radiactivo (timidina - ^3H), cuantificándose la síntesis de DNA viral (DNA_v) según el método reportado por Hirt (1975) con algunas modificaciones. Por este método, el DNA_v por su bajo peso molecular (comparado con el DNA cromosómico) puede ser recuperado en el sobrenadante de una centrifugación a alta velocidad, en tanto que el DNA cromosómico se obtiene en la pastilla resultante. En la figura 5 se muestran los resultados. Como puede observarse, sólo en el caso de material proveniente de células infectadas se obtiene DNA de bajo peso molecular, el cual se incrementa en función del tiempo de infección.

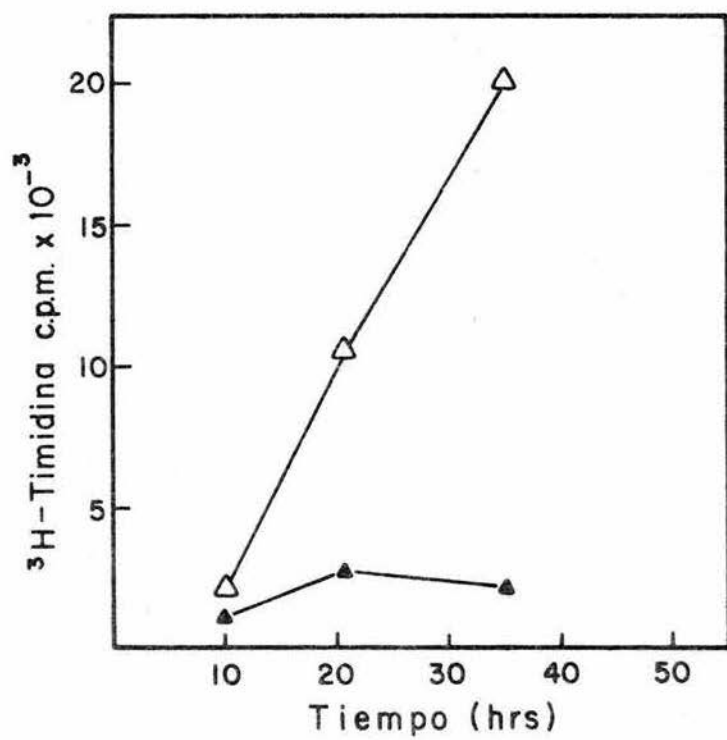
Purificación de Viriones de SV40.

Con el fin de obtener una cantidad suficiente de virus, para posteriormente obtener el complejo nucleoproteico (CNP) células CV-1 fueron infectadas con SV40 a una multiplicidad de infección (moi) de 10 UFP/célula. Después de 7-9 días, la monocapa de células fué recuperada junto con el medio de

FIGURA 5. Síntesis de DNA en células CV-1 infectadas con SV40.

A diferentes tiempos de infección células CV-1 (2.0×10^6) infectadas y no infectadas (infección fingida) se lavaron con PBS estéril y se marcaron con 20 uCi/ml de Timidina- ^3H (A.E. 23 Ci/mmol) durante 60 minutos (pulso). Una vez transcurrido el pulso de marcaje los cultivos se lavaron con PBS suplementado con un exceso de timidina no marcada (50 ugr./ml). Se añadió amortiguador de lisis y las células se recolectaron en un tubo de centrifuga, la cuantificación del DNA sintetizado se hizo en el sobrenadante de una centrifugación a 30 000 rpm/30 minutos a 4 °C.

(Δ — Δ) control; (\blacktriangle — \blacktriangle) células infectadas.



cultivo presente durante la infección; los virus intra y extracelulares fueron colectados mediante centrifugación a alta velocidad; la pastilla resultante se procesó como se indica en la figura 6 , procediéndose a una primera purificación a través de un gradiente de densidad en cloruro de Cesio. Los resultados de esta primera purificación se muestran en la figura 7 . Al determinarse el material TCA precipitable marcado con timidina-³H y el material que absorbe a 260 nM, se obtuvieron dos tipos de partículas. La primera de ellas (banda I), con una densidad de 1.32 gr/ml en cantidad discreta y otra, predominante, (banda II) con una densidad de 1.29 gr/ml. La cantidad y proporción de ambas poblaciones puede verse en la fotografía del gradiente mostrado en la figura 8,

Las bandas descritas anteriormente, se colectaron mediante punción del tubo de centrífuga y se determinó su capacidad infectiva (virus integros) mediante titulación por UFP (tabla 2). La banda I se continuó procesando tal y como se describe en la figura 6. La purificación a través de un segundo gradiente de densidad ($d=1.33$), se muestra en la figura 9, en donde puede observarse una población homogénea con una densidad de 1.33 gr/ml; este material se dializó , contra amortiguador Tris-HCl 0.01 M p.H. 7.4 En esta parte del trabajo se utilizaron varias pruebas para determinar la pureza de la muestra del virión: a) el análisis mediante geles de poliacrilamida-SDS, para conocer el patrón electroforético de proteínas; b) el ensayo de infectividad y

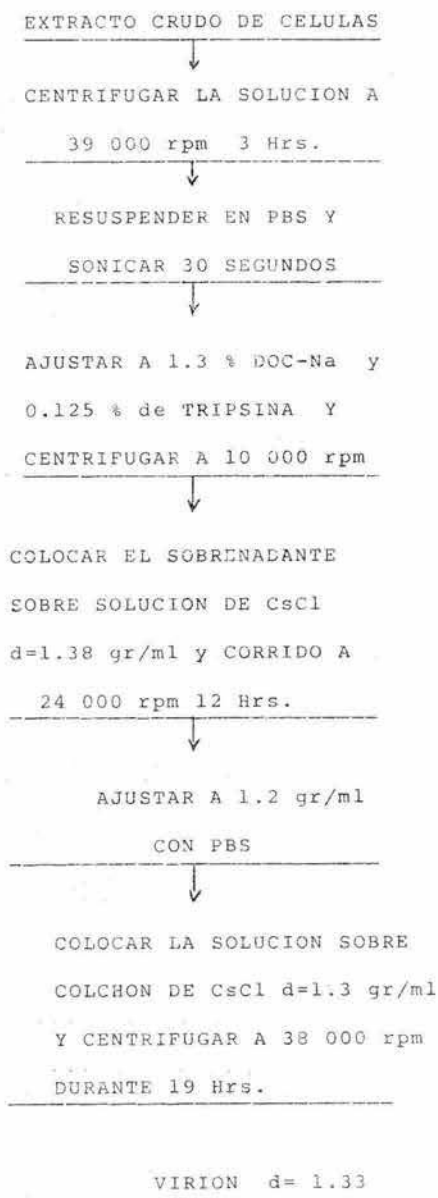
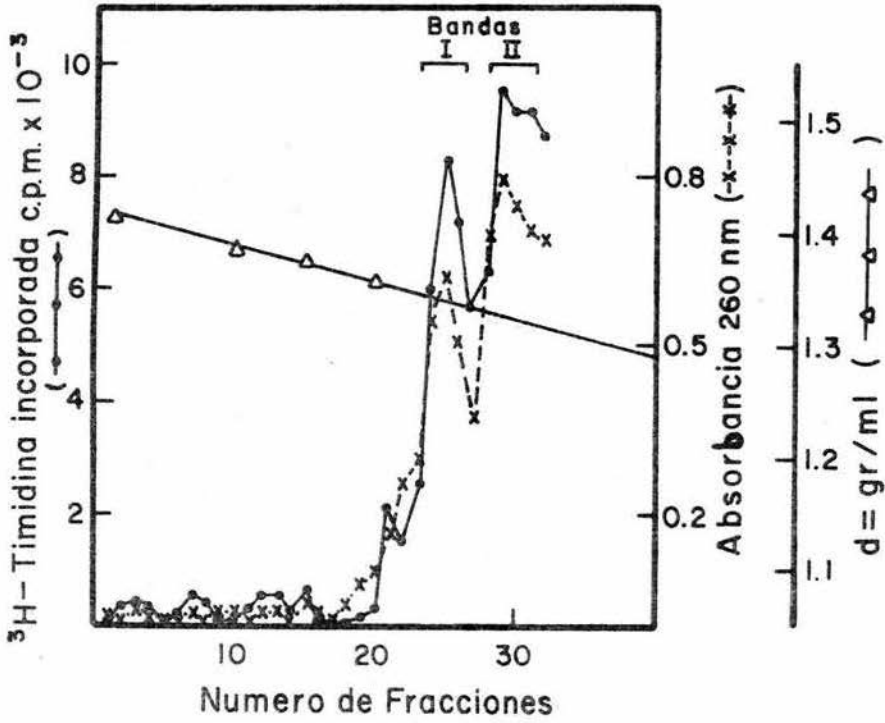


FIGURA 6. Esquema que muestra el procedimiento para la purificación del virus SV40.

FIGURA 7. Primera Purificación del virus SV40 en gradientes de densidad.

A los 7 días de iniciada la infección, células y medio de cultivo se colectaron como se describe en la figura 6. La pastilla de virus se resuspendió en PBS estéril mediante sonicación. La solución se ajustó con DOC-Na y tripsina sometiendo a centrifugación a baja velocidad; el sobrenadante obtenido se colocó sobre una solución de CsCl (densidad de 1.38 gr/ml). Se fraccionó el gradiente y se determinó radiactividad ácido precipitable (●—●), absorban--cia a 260 nm (x—x) y densidad (Δ—Δ).



c) el análisis de DNA como un criterio más preciso y concluyente.

La banda I b mostró los péptidos estructurales del virión (VP1, VP2, y VP3) e histonas (datos no mostrados) lo cual coincide con la composición péptidica para el virus purificado (Brady y cols. 1980). El ensayo de infectividad se muestra en la tabla 2 en donde puede observarse que ambas poblaciones de virus, presentan infectividad. Cabe mencionar que en las primeras purificaciones, la banda I no se lograba resolver de la banda II razón por la cual concluimos que se obtuvieron títulos altos de infectividad de la banda predominante (II), dado que la fracción discreta (banda I) siempre mostró títulos de infectividad bajos.

El criterio definitivo para demostrar la presencia del virus y su integridad fué el análisis del DNA viral en gels de agarosa al 1%. Los resultados se muestran en la figura 10. Como puede observarse la banda discreta con densidad de 1.33 gr./ml contiene, como era de esperarse (Fernández-Muñoz, 1979) predominantemente DNA de 5200 pares de bases en forma superenrollada (DNA forma I), que concuerda con los datos de composición péptidica e infectividad encontrados (ver tabla II). La fracción denominada banda II, contiene igual proporción de DNA forma I y II lo cual sugiere que se trata de virus parcialmente degradados, lo cual concuerda con la densidad de la fracción (1.29 gr/ml).

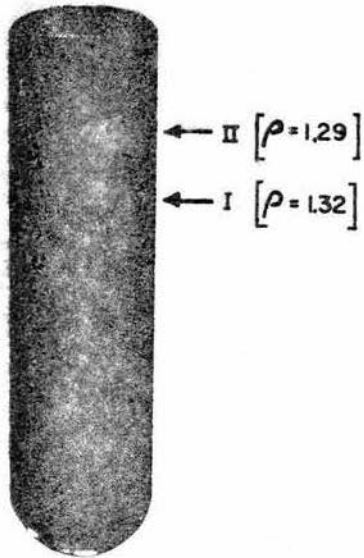


FIGURA 8. Fotografía del gradiente mostrado en
la figura 7.

FIGURA 9. Segunda Purificación de virus por Gradientes de densidad.

La banda I obtenida en la primera purificación (ver figura 7 y 8), se llevó a una densidad de 1.2 gr/ml con PBS estéril y se colocó sobre CsCl densidad 1.3 gr/ml. Las condiciones del gradiente son las mismas que las descritas en la figura 6. Timidina-³H incorporada a material ácido precipitable (●—●), absorbancia a 260 nm (×—×) y densidad en gr/ml (▲—▲).

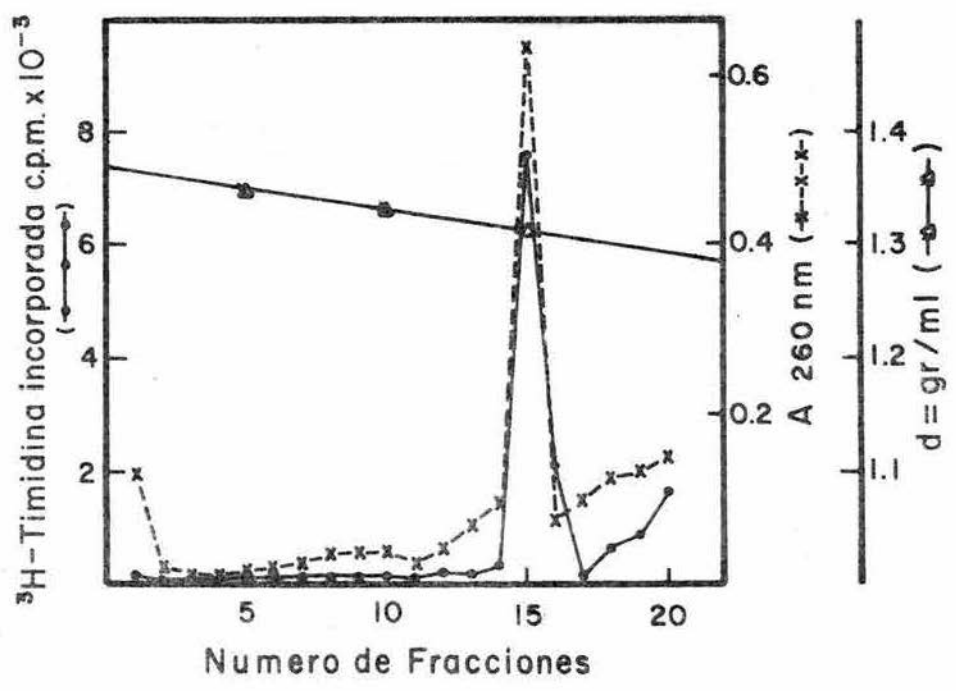
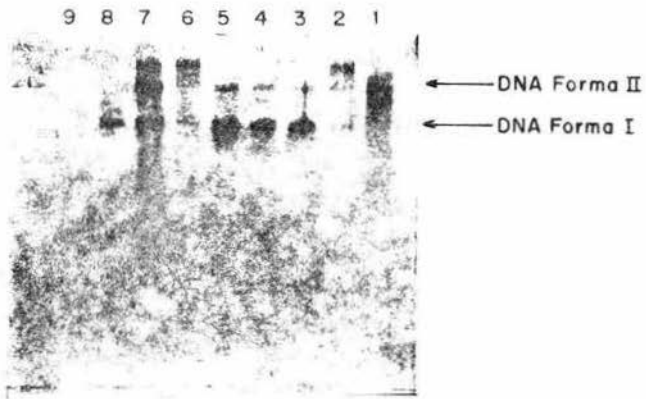


TABLA II. Determinación de partículas infectivas durante diferentes pasos de purificación de SV40. (la descripción de las fracciones se detalla en las figuras 7 y 9).

<u>FRACCION</u>	<u>UFP/ml</u>	<u>VOLUMEN (ml)</u>	<u>UFP TOTALES.</u>
EXTRACTO TOTAL	5×10^{11}	85	4.25×10^{13}
EXTRACTO SONICADO	8×10^{11}	85	6.8×10^{13}
BANDA II (1er. Grad.)	5×10^8	50	2.5×10^{10}
BANDA I "	5×10^6	20	1×10^8
BANDA Ib (2do. Grad.)	7.5×10^6	10	7.5×10^7

FIGURA 10, Análisis en geles de agarosa del DNA en las bandas I, Ib y II.

Una vez purificado el DNA de las fracciones descritas, éste fué analizado en geles de agarosa al 1%. Los carriles 1,2 y 6 corresponden a preparaciones de la banda II (banda predominante y densidad 1.29 gr/ml); los carriles 3-4 y 5 corresponden a las -- bandas I y Ib respectivamente; el carril 7 corresponde a una preparación inicial de - virión y en la cual no se lograban separar las dos bandas (I y II). Como marcador utilizamos DNA de SV40 forma I, purificado - por gradientes de CsCl-bromuro de etidio (carril 8).



Obtención de Complejos de Nucleoproteína (CNP) de SV40.

Como se mencionó anteriormente, una etapa del presente trabajo es la obtención de un complejo DNA-proteína que inicie la transcripción específica "in vitro". El tratamiento moderado en presencia de EGTA-DTT de virus purificados de SV40, da lugar a un complejo que puede ser utilizado en un sistema de transcripción "in vitro" (Brady y cols. 1980), que permite estudiar la iniciación de la transcripción viral. En esta parte del trabajo decidimos utilizar el método descrito por Brady y cols. (1978 y 1980) (ver Métodos). Los virus purificados (banda T_b) disociados y purificados a través de gradientes de sacarosa, tal y como se esquematiza en la figura 11, se sometieron al procesamiento descrito en Métodos, la purificación del CNP se muestra en la figura 12. Como puede observarse se obtuvo una población homogénea en el tercio inferior del gradiente, que corresponde a un coeficiente de sedimentación aproximado de 110 S ; coincidente con el coeficiente reportado para el CNP (Brady y cols. 1980), este se utilizó como templado para el sistema de transcripción "in vitro".

Preparación del Extracto de Manley.

En un principio se utilizó a la RNA polimerasa de E. coli (holoenzima) comercial para la transcripción del CNP (resultados no mostrados) con el fin de probar a este complejo como templado.

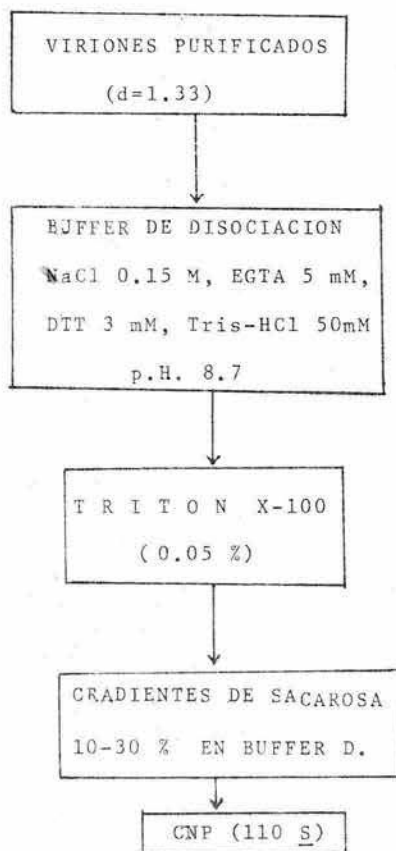
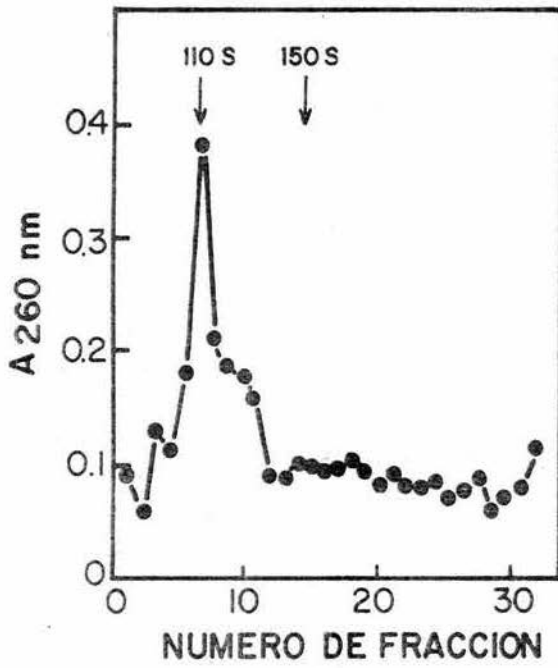


FIGURA 11. Esquema que muestra el procedimiento para la obtención de complejos de nucleoproteína (CNP) a partir de viriones purificados de SV40 (Brady y cols. 1978, 1980).

FIGURA 12. Purificación del Complejo Nucleoproteico.

Virus purificados en la fracción correspondiente a la banda Ib obtenido de células infectadas no marcadas, se disociaron como se describe en el esquema de la figura 11. La purificación se hizo mediante centrifugación en gradientes de sacarosa 10 a 30 % p/v. a 4°C, 45 000 rpm durante 2 horas. Se fraccionó el gradiente y se determinó absorbancia a 260 nm. En un gradiente paralelo se colocó una muestra de poliovirus (150 S) como marcador.



Dado que se requería un sistema que reflejara la situación "in vivo" de la transcripción eucariótica del RNAm, es decir que permitiera la iniciación precisa de la transcripción y fuera dependiente de la RNA polimerasa II y que nos permitiera ensayar, posteriormente, los extractos obtenidos de células infectadas con poliovirus, se emplearon fracciones subcelulares obtenidas de células Hela. Como se mencionó en la Introducción en 1979 y 1980 se reportaron extractos celulares de células Hela capaces de iniciar transcripción de manera específica (Weil y cols. 1979; Manley y cols. 1980) (ver tabla III). Por consiguiente se prepararon extractos parcialmente purificados (extracto de Manley) para utilizarlo como fuente de factores de iniciación, de la enzima RNA polimerasa II. Partiendo de evidencias anteriores que apoyan la existencia de un inhibidor de la transcripción en células infectadas con poliovirus (Bossart y cols. 1984), este podría localizarse en las preparaciones de extractos, por tanto se decidió preparar los extractos a partir de células Hela infectadas y no infectadas (ver Métodos).

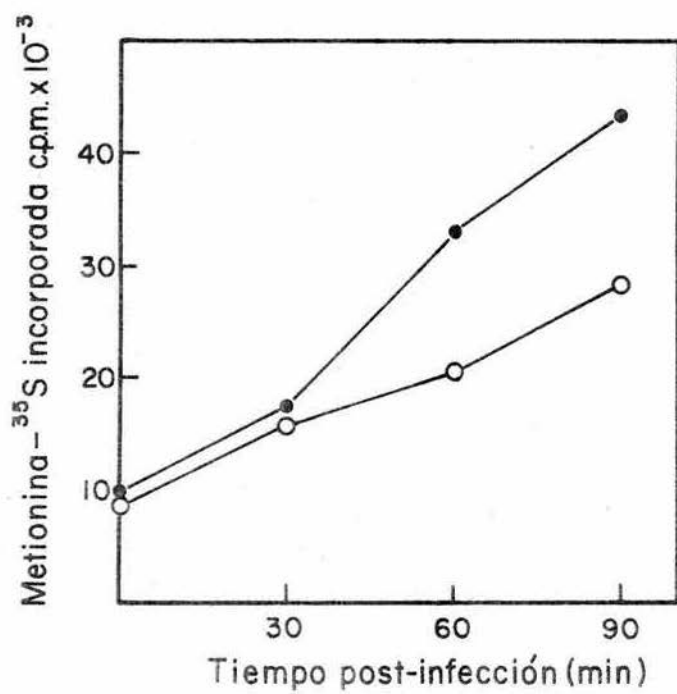
Con el fin de asegurarnos que la infección de las células Hela con poliovirus se llevó a cabo, se decidió "monitorear" la infección (ver Métodos). En la figura 14 se presentan los resultados, como puede observarse, las células Hela in-

TABLA III. Características de los extractos subcelulares utilizados para los ensayos de transcripción "in vitro".

Manley, J.L., y cols. (1980) P.N.A.S. <u>77</u> : 3855-3859 .	Weil, A.P. y cols. (1979) J.B.C. <u>254</u> : 6163-6173.
EXTRACTO TOTAL	EXTRACTO CITOPLASMATICO (S-100)
DEPENDIENTE DE DNA EXOGENO	DEPENDIENTE DE DNA Y RNA POLIMERASA EXOGENA
TEMPLADOS: SV40 Y ADENO-2	TEMPLADOS: ADENO-2 y Xenopus.

FIGURA 14. Piloto de infección en células Hela infectadas con poliovirus.

A tiempo 0 de la infección, los cultivos (5×10^6 células/ml) se suplementaron con L-(^{35}S)-metionina (5 uCi/ml) y a los tiempos indicados en la figura, se tomaron alícuotas de 100 uls (por duplicado) de terminándose la radiactividad en material ácido precipitable como se describe en Métodos. Células infectadas con poliovirus (○—○) y células control (●—●).



fectadas por poliovirus muestran, una disminución de la incorporación de ^{35}S -metionina a material ácido precipitable. Esto, es característico durante la infección de células HeLa a una moi de 100 UFP/célula.

Transcripción "in vitro".

Una de las características importantes del CNP de SV40 al ensayarse en un sistema de transcripción "in vitro" con la enzima RNA polimerasa de E. coli, es que permite transcripción de únicamente, uno de los dos promotores (promotor temprano) (Brady y cols. 1980). Esta fué una de las razones por la cual decidimos utilizar el CNP como templado para nuestro sistema, ello sería importante si se seguía comportando de la misma forma en nuestro sistema.

En esta etapa del trabajo empleamos dos tipos de templados -- el DNA de SV40, forma I, y el CNP suplementados con un extracto subcelular conteniendo a los factores y a la RNA polimerasa II (extracto de Manley) requeridos para la iniciación específica. La siguiente etapa del trabajo consistió en montar y desarrollar los ensayos de transcripción "in vitro". Al emplear como fuente de DNA el DNA forma I de SV40 con el extracto de Manley (control), se observa una incorporación lineal durante los primeros 30 minutos (ver figura 15), la transcripción endógena, no dependiente de DNA, se determinó utilizando actinomicina D, la cual fué, aproximadamente de --

FIGURA 15. Cinética de Transcripción "in vitro".

Para los ensayos se utilizaron 25 ul. de extracto de Manley control y 1-3 - ugr. de DNA de SV40 forma I. La incorporación independiente de DNA se tomó como la resistente a actinomicina D y las condiciones de marcaje fueron - de 131 uCi de UTP-³H por mezcla de en sayo. Incorporación dependiente de - DNA (●—●).

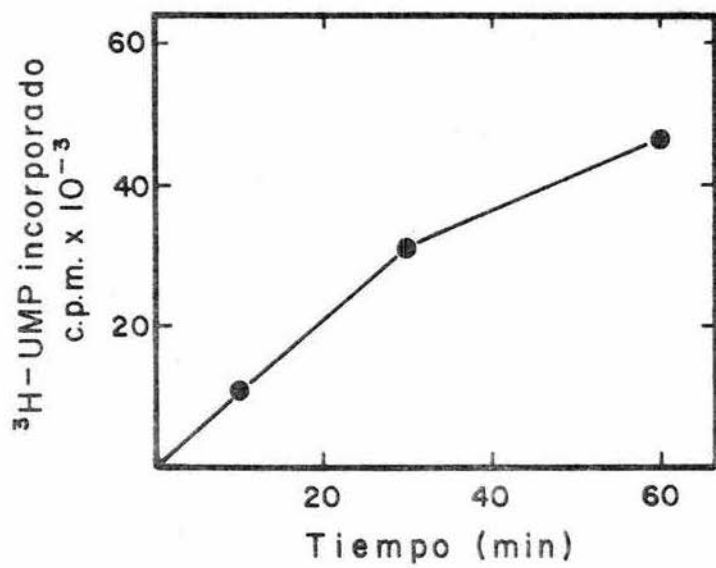


FIGURA 16. Autorradiograma de los transcritos-³²P obtenidos en el sistema de Transcripción "in vitro".

Los transcritos obtenidos en el ensayo de transcripción "in vitro", en presencia de UTP-³²P, fueron aislados como se describe en Material y Métodos, disueltos en 15 μ ls de formamida al 80 % y 10 μ ls de amortiguador de muestra y analizados en un gel de poliacrilamida-Urea a 500 volts durante - 120 minutos. Carril 1 =DNA forma 1 + Manley control; carril 2=DNA forma I + Manley infectado; carril 3 DNA (—) + Manley control; carril 4= DNA (—) + Manley control + actinomicina D; carril 5 = CNP +Manley control; Carril 6= CNP+Manley infectado y carril 7= Manley control sin DNA.

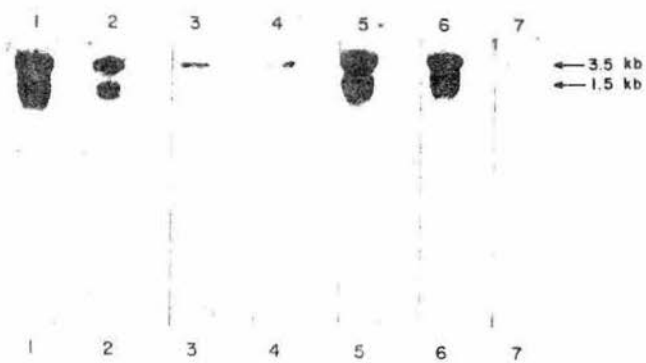


FIGURA 17. Purificación y ensayo del DNA de SV40. (Díaz-Moreno, A. 1983).

Células CV-1 fueron infectadas con SV40, una parte del cultivo fué marcado con ^3H -Timidina 16 horas después de infección y la otra se mantuvo en las mismas condiciones pero -- sin adicionar el nucleótido radiactivo. 72 horas más tarde se lisaron los cultivos y el DNA fué purificado por gradientes de CsCl--bromuro de etidio (parte superior). En la parte inferior de la figura se muestra el análisis en geles de agarosa 1.4 % de las fracciones 9-11 y 12-14, obtenidas de gradientes de densidad. Los numeros sobre los carriles indican los ugr. de DNA presentes en cada muestra. Los carriles con el DNA forma 2, de izquierda a derecha contienen 1,2, y 4 ugr. respectivamente. Extracto de células CV-1 (▲—▲) y extracto de células CV-1 infectadas con SV40 = (●—●).

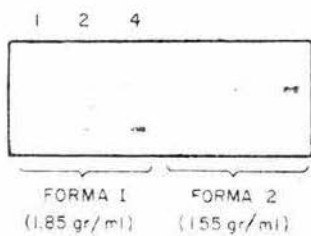
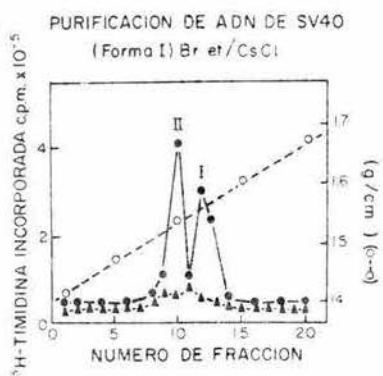
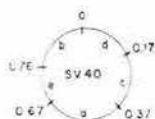
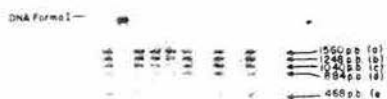


FIGURA 18. Restricción del DNA de SV40 purificado.

El DNA de SV40 purificado como se describe en la figura 17 fué cortado con varias enzimas de restricción, como describe Díaz-Moreno (1983). En la parte inferior se detalla sobre el DNA circular de SV40, el esquema de restricción escogido y las enzimas empleadas. En la parte superior se muestra el patrón obtenido al analizar la restricción por electroforésis en geles de agarosa: Carril 1, DNA no restringido; ca-rril 2, digestión con la enzima Hpa I; ca-rril 3, restricción con Hpa I y Eco R1; carriles 4-6, digestión con Hpa I, Eco R1 y Bgl I.

0



	ENZIMA	SITIO DE CORTE
1.- DNA FORMA I (F ₁)		
2.- F ₁ + Hpa I	Hpa I	0.17
3.- F ₁ + Hpa I + Eco RI	Eco RI	0.37
4.- F ₁ + Hpa I + Eco RI + Bgl I	Bgl I	0.67

15 % con respecto a la incorporación del DNA exógeno (los resultados se graficaron, restando la incorporación resistente a actinomicina D).

Con estos resultados se procedió a ensayar también el CNP como templado. Con el fin de determinar si el sistema transcribía de manera específica se analizaron los transcritos en geles de poliacrilamida-Urea (figura 16). El análisis muestra que la transcripción ocurre de manera específica y precisa, ya que, no se observan transcritos de diferentes longitudes, por el contrario se aprecian preferencialmente dos transcritos con una longitud de, aproximadamente 3.5 y 1.5 Kb. con ambos templados (DNA forma I y CNP) (carriles 1 y 5). Al realizar el ensayo con extractos subcelulares obtenidos de células infectadas, encontramos una inhibición de la transcripción (carriles 2 y 6), resultados similares han sido reportados por Crawford y Cols. (1981). Cabe mencionar y destacar que en posición muy cercana a los transcritos mencionados de 3.5 y 1.5 kb, se han reportado transcritos de origen endógeno (carril 3) (Beard y cols. 1982); ésto hace difícil concluir de manera contundente sobre la especificidad de los transcritos obtenidos.

Hibridización del RNA-³²P con el DNA de SV40.

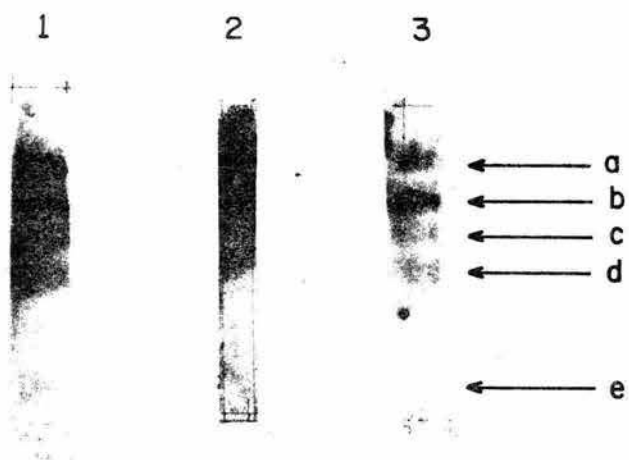
Uno de los métodos más comúnmente usados para determinar la correspondencia u homología entre el transcrito y el templa

do es la hibridización. Para este tipo de ensayo es necesario contar con una buena cantidad de DNA puro, por lo cual se hizo una purificación preparativa del DNA de SV40. Cabe mencionar que esta parte del trabajo, así como la metodología de hibridización, fue montada y desarrollada en el laboratorio por el M.C. Aurelio Díaz M. durante el desarrollo de su tesis de Maestría; se reproducen los datos referentes a la purificación del DNA y el patrón de corte de las enzimas de restricción figura 17 y figura 18.

Para determinar de manera más precisa la especificidad de los transcritos, se procedió a hibridizar el RNA sintetizado "in vitro" y marcado con ^{32}P con el DNA de SV40 cortado con varias enzimas de restricción (ver Material y Métodos), siguiendo el método reportado por Southern (1975). Los resultados de la hibridización tipo Southern se muestran en la figura 19, en donde se observa la hibridización del transcrito ^{32}P obtenido en el ensayo con extracto de Manley control y el CNP y el obtenido con extracto de Manley control y DNA forma I. Asimismo se muestra la hibridización del RNA obtenido en el ensayo con extracto de Manley infectado y DNA forma I.

FIGURA 19. Hibridización del RNA-³²P con el DNA restringido de SV40.

El DNA de SV40 forma I purificado y el CNP fueron transcritos en presencia del extracto de Manley y UTP-³²P, como describe Manley y cols. (1980). El transcrito fué purificado como se describe en Material y Métodos e hibridizado a el DNA de SV40 cortado con las enzimas Hpa I , Eco R1 y Bgl 1 (ver figura 18) (Díaz-Moreno, A. 1983). En el carril 1 se muestra la hibridización del RNA obtenido de la transcripción del CNP con extracto de Manley control; en el carril 2 hibridización del RNA obtenido de la transcripción de DNA forma I con Manley control; y en el carril 3 la hibridización del RNA obtenido de la transcripción de DNA forma I con extracto Manley infectado.



DISCUSION

La infección de células de mamífero con el virus de la poliomiélitis (poliovirus), desencadena una inhibición en la síntesis de DNA, RNA y proteínas. La inhibición en la síntesis de RNAm, la inicialmente y más drásticamente afectada de la célula huésped, ha sido ampliamente estudiada y se sabe que no es debida ni a una disminución en la poza de precursores, ni a la degradación del DNA templado o del RNA mensajero. Por otro lado la actividad y conducta cromatográfica de la RNA polimerasa II no se encuentra modificada. Las evidencias anteriores y otras sugieran que la inhibición en la transcripción ocurre a nivel de la iniciación del proceso.

Sobre el marco anterior se planteo obtener un sistema de transcripción "in vitro" que iniciara de manera específica. Una de las características importantes del sistema de transcripción que utilizamos fué que el complejo nucleoproteico (CNP) guarda una composición semejante al de la cromatina celular y, lo más importante, que aparentemente se regula "in vitro" apagando y encendiendo promotores diferencialmente. En 1979 y 1980 se describieron extractos celulares que permiten la iniciación específica de la transcripción; con ello contábamos con los elementos para desarrollar el sistema de transcripción "in vitro" y sobre todo, que nos permitió analizar la iniciación específica de la transcripción, con el objeto de estudiar la inhibición

en la transcripción causado por el virus de la poliomielitis.

Para la obtención del CNP, requerimos preparaciones de viriones de SV40 purificados. Dada la dificultad al tratar de separar dos poblaciones de virus obtenidas (virus íntegros $d = 1.3$ gr/ml y virus incompletos o vacíos $d = 1.29$), empleamos el criterio de análisis de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa (figura 10 carriles 3, 4 y 5).

La siguiente etapa del trabajo consistió en obtener el complejo de nucleoproteína (CNP) y desarrollar el sistema de transcripción "in vitro". Al ensayar el CNP en el sistema, lo primero que se observó fué transcritos de un tamaño bien definido (aproximadamente 3.5 y 1.5 kd.) (figura 16). Esto fué una prueba de que el sistema inicia en un sitio único (iniciación específica). Dado que se detecto un transcrito dependiente de transcripción endógena, con un tamaño similar a los dependientes del templado exógeno, llevamos a cabo experimentos de hibridización del transcrito con el DNA de SV40 (figura 19 carriles 1 y 2). Los resultados muestran que los transcritos correspondían al CNP y al DNA forma I respectivamente. Este resultado sugiere que el sistema inicia la transcripción de manera específica, sin embargo el CNP pierde la cualidad de "regular" la transcripción de los promotores dado que, en nuestro sistema, ambos promotores (el temprano y el tardío) se expresaron, es de-

cir, el CNP se comporta de manera análoga a un DNA de SV40 desnudo (DNA forma I).

Al ensayar la transcripción dependiente del CNP y del DNA-I en presencia de extractos celulares obtenidos de células infectadas con poliovirus (figura 16 carriles 2 y 6), se observa que hay una inhibición del transcrito de aproximadamente 40-50 %. Resultados similares han sido obtenidos en otros sistemas (Crawford y cols. 1981). Los resultados de hibridización del RNA sintetizado con el DNA forma I y extracto de Manley infectado, sugieren que el promotor que se encuentra inhibido es el tardío, ya que el transcrito del fragmento e y a del DNA restringido (correspondiente al promotor tardío) se encuentra en menor cantidad (ver figura 19 carril 3).

- Resumiendo:
- 1) el sistema de transcripción con el complejo de nucleoproteína, inicia específicamente, pero la transcripción se lleva a cabo utilizando tanto el promotor temprano, como el tardío.
 - 2) Los extractos celulares obtenidos de células infectadas transcriben deficientemente.
 - 3) Aparentemente, la inhibición detectada con extractos celulares obtenidos de células infectadas es sobre el promotor tardío.

- 4) Los resultados presentados apoyan la hipótesis de que la inhibición en la transcripción durante la infección con poliovirus ocurre a nivel de la iniciación.

Dado los resultados obtenidos en el presente trabajo, consideramos que los objetivos planteados al inicio del presente proyecto se cumplieron en su totalidad. Se obtuvo un sistema que inicia transcripción específica, aunque cabe mencionar algunos de los inconvenientes del sistema: 1) el largo y costoso trabajo experimental para la obtención del CNP (purificación de viriones, disociación, purificación del CNP, etc) 2) la pérdida de la capacidad de regulación de encendido de los promotores, 3) la cantidad de CNP obtenido, etc. En años más recientes se han reportado sistemas más sencillos de transcripción "in vitro" utilizando promotores virales específicos (del virus adenovirus), o promotores celulares (globina), que si bien no poseen estructura semejante a la cromatina celular se comportan de manera similar, pudiendo llevar a cabo la iniciación específica con el extracto subcelular obtenidos de células de mamífero en cultivo.

BIBLIOGRAFIA

Alonso, M.A. y Carrasco, L (1981). Reversion by hypotonic medium of the shutoff of protein synthesis induced by Encephalomyocarditis virus. J. of Virology. 37: 535-540.

Apriletti, J. W. y Penhoet, E.E. (1974). Recovery of DNA-dependent RNA polumerase activities from L cells after mengovirus infection. Virology 61: 597-601.

Apriletti, J. W. y Penhoet, E.E. (1978). Cellular RNA synthesis in normal and mengovirus-infected L-929 cells J. Biol. Chem. 253: 603-611.

Avery, D. T., Macleod, C. M. y McCarthy, M. (1944). Studies on the chemical natura of the substance inducing transformation of pneumococcal types. J. Exp. Med. 74 : 137-158.

Bablanian, R. (1972). Depression of macromoleculiar synthesis in cells infected with guanidine-dependent Polio virus under restrictive conditions. Virology 47: 255 - 259.

Bachrach, H. L. (1978). Comparative strategies of animal virus replication. En: Advances in virus research . Lauffer, M.A. Bang, F. B., Maramorosh, K. y Smith, K. M (eds) Academic Press. New York eua. 22 : 163-186.

- Balandin, G. I., y Franklin, M.R. (1964). The effect of mengovirus infection on the activity of the DNA-dependent RNA polymerase of L-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 15: 27-32.
- Baltimore, D., Franklin, M. R., y Callender, J. (1963). Mengovirus induced inhibition of host Ribonucleic acid and protein synthesis. *Biochem. Biophys. Acta* 76: 425-430.
- Baltimore, D., Girard, M., y Darnell, J. (1966). Aspects of the synthesis of poliovirus RNA and the formation of virus particles. *Virology* 29: 179-189.
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes *Bacteriol Rev.* 35: 235-241.
- Baltimore, D. (1977). Separation and quantitation of .." *Biochemistry* 16: 2763.
- Banerji, J., Rusconi, S. y Schaffner, W. (1981). Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* 27: 299-308.
- Beard, P., y Nyfeler, K. (1982). Transcription of simian virus 40 chromosomes in an extract of Hela cells. *The EMBO journal* 1: 9-14.
- Bjursell, G. (1978). Effects of 2'-Deoxy-2'-azidocytidine on polioma virus DNA replication: evidence for rolling circle-type mechanism. *J. of Virology* 20: 136-142.

Bossart, W., Egger, D., Rasser, Y. y Bienz, K. (1984). Accumulation of poliovirus proteins in uninfected isolated Hep-2 cell nuclei in vitro. *Intervirology* 21: 150-158.

Brady, J. N., Winston, V.D., y Consigli, R.A. (1978). Characterization of DNA-Protein complex and capsomere subunit derived from poluoma virus by treatment with ethyleneglycol-bis N,N'-tetraacetic acid and dithiothreitol. *J. of Virology* 27: 193-204.

Brady, J. N., Laviaille, Ch. y Salzman, N.P. (1980). Efficient transcription of a compact nucleoprotein complex isolated from purified simian virus 40 virions. *J. of Virology* 35: 371-381.

Brooks, L. T., y Green, M. (1977). The SV40 transcription complex. I. Effect of viral chromatin proteins on endogenous RNA polymerase activity. *Nucleic Acids Research* 4: - 4261-4278.

Burton, K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxiribonucleic acid. *Biochem. J.* 62:315.

Carrasco, L. y Smith, A.E. (1976). Sodium ions and the shut-off of host cell protein synthesis by picornavirus. *Nature (London)* 264: 807-809.

Colby, S.D., Finnerty, V. y Lenard-Lucas, J. (1974). Fate of mRNA of L-cells infected with mengovirus. *J. of Virology* 13: 858-869.

Contreras, g. (1982). Control de las enfermedades mediante vacunas virales. En: Adelantos en microbiología y enfermedades infecciosas. Buenos Aires, Argentina. Vol. 1: 131-136.

Crawford, N., Fire, A., Samuels, M., Sharp, A. P., y Baltimore, D. (1981). Inhibition of transcription factor activity by poliovirus. Cell 27: 551-561.

Chan, V.F., y Black, F, L. (1970). Uncoating of poliovirus by isolated plasma membranes. J.of Virology. 5: 309-312.

Chow, R.L., Gelinas, E.R., Broker, R.T., y Roberts, J. R. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. Cell 12: 1-8.

Christiansen, G., Landers, T., Griffith, J., y Berg, P. (1977). Characterization of components released by alkali disruption of simian virus 40 J. of Virology 21: 1079-1084.

Danna, J., Kathleen y Athans, D. (1972). Bidirectional replication of simian virus 40 DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 69 3097-3100.

Díaz-Moreno, A. (1983). Tesis de Maestría, Depto. Biología Celular. CINVESTAV-IPN. México, D.F.

Dynan, W.S., y Tjian, R. (1983 a). Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. Cell 32: 669-680.

Dynan, W.S., y Tjian, R. (1983 b). The Promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. Cell 35: 79-87.

Ehrenfel, E. (1982). Poliovirus-induced inhibition of host cell protein synthesis. *Cell* 28: 435-436.

Elder, T.J., Spritz, A.R., y Weissman, M.S. (1981). Simian Virus 40 as a eukariotic cloning vehicle. *Ann. Rev. Genet.* 15: 295-340.

Fareed, C.G., Garon, F.C., y Salzman, P.N. (1972). Origin and direction of Simian Virus 40 deoxiribonucleic acid replication. *J. of Virology* 10: 484-491.

Fenner, F., White, D.D. (1972). *Medical Virology*. Academic Press. New York. pp. 269-277.

Fernández-Muñoz, R. y Darnell, J.E. (1976). Structural difference between the 5' termini of viral and cellular mRNA in poliovirus-infected cells. *J. of Virology* 126: 719-726.

Fernández-Tomás, C., y Baltimore, D. (1973). The morphogenesis of poliovirus II. Demonstration of a new intermediate the provirion. *J. of Virology* 12: 1122-1130.

Fernández-Tomás C. (1982). The presence of viral-induced - proteins in nuclei from poliovirus-infected Hela cells. - *Virology* 116: 629-634.

Fiers, W., Contreras, R., Haegeman, G., Rogiers, R., Van - de Voorde, A. Van Heaverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G., and Ysebaert, M. (1978). Complete nucleotide - sequence of SV40 DNA. *Nature*: 273: 113-120.

Fire, A., Samuels, M. y Sharp, P. A. (1984). Interactions between RNA polymerase, Factors, and template leading to accurate transcription. *The Journal of Biological Chemistry* 259: 2509-2516.

Flores-Otero, G., Fernández-Tomás, C. (1982). DNA-bound RNA Polymerases during Poliovirus infection: reduction in the number of form II enzyme molecules. *Virology* 116: 619-628.

Franklin, R.M., y Baltimore, D. (1962). Patterns of macromolecular synthesis in normal and virus-infected mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27: 175-198.

Frost, E., y Bourgaux, P. (1975). Decapsidation of polyoma virus : Identification of subviral species. *Virology* 68: 245-255.

Fung, T.Y., Crittenden, B.L., Fadly, M.A. y Kung, H.J. (1983). Tumor induction by direct injection of cloned v-src DNA into chickens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 353-357.

Gariglio, P., and Mousset, S., (1975). Isolation and partial characterization of a nuclear RNA polymerase-SV40 - DNA Complex. *FEBS Letters* 56: 149-155.

Germond, J. E., Hirt, B., Oudet, P., Bellard-Gross, M., y Chambon, P. (1975). Folding of the DNA Double Helix in Chromatin-like structures from SimianVirus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 1843-1847.

- Girard, M. (1969). In vitro synthesis of poliovirus ribonucleic acid: Role of the replicative intermediate. *J. of Virology* 3: 376-384.
- Green, H.M., y Brooks, T.L. (1977). The SV40 transcription II. Non dissociation of protein from SV40 chromatin during transcription. *Nucleic Acids Research* 4: 4279-4289.
- Griffith, J.T. (1975). Chromatin structure: Deduced from a minichromosome *Science* 187: 1202-1203.
- Gurdon, J. B., Lingrel, J.B., y Marbaix, G. (1973). Message stability in infected frog oocytes: Long life of mammalian α and β -globin messages *J. Mol. Biol* 80:539-551.
- Handa, H., Kaufman, J.R., Manley, J., Gefter, M. y Sharp, A.P. (1981). Transcription of simian virus 40 DNA in a HeLa Whole cell extract. *The Journal of Biological Chemistry*. 256: 478-482.
- Hanecak, R., Semler, L. B., Ariga, H., Anderson, W.C., y Wimmer, E. (1984). Expression of a cloned gene segmente of poliovirus in E. coli: Evidence for autocatalytic production of the viral proteinase. *Cell* 37: 1063-1073.
- Hansen, U., Tenen, G.D., Livingston, M.D. y Sharp, A. P. (1981). T antigen repression of SV40 early transcription -- from two promoters. *Cell* 27: 603-612.
- Hershey, A.D. y Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage *J. Gen. Physiol.* 36: 39-56. *

Ho, K. P.P., y Washington, L.A. (1971). Evidence for a Cellular Ribonucleic acid synthesis inhibitor from poliovirus-infected Hela cells. *Biochemistry* 10: 3646-3651.

Holland, J.J. (1964). Inhibition of host cell macromolecular synthesis by high multiplicities of poliovirus under conditions preventing virus synthesis. *J. Mol. Biol.* 8: 574-581.

Hu, S.L., y Manley, J.L. (1981). DNA sequence required for initiation of transcription in vitro from the major late promoter of adenovirus 2. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78: 820-824.

Hummeler, K., Tomassini, N. y Sokol, F. (1970). Morphological aspects of the uptake of Simian Virus 40 by permissive cells. *J. of Virology* 6: 87-93.

Jacobson, M., y Baltimore, D. (1968). Morphogenesis of poliovirus. I Association of the viral RNA with coat protein. *J. Mol. Biol.* 33: 369-378.

Kaufman, Y., Goldstein, E. y Penman, S. (1976). Poliovirus-induced inhibition of polypeptide initiation "in vitro" on native polyribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 1834-1838.

Kimura, G. y Dulbecco, R. (1973). A temperature-sensitive mutant of Simian Virus 40 affecting transforming ability. *Virology* 52: 529-534.

- Kitamura, N. Semler, L.B., Rothberg, G. P., Larsen, R.G., Alder, J. Ch., Dorner, J.A., Emini, A. E., Hanecak, R., - Lee, J.J., Van der Warf, S., Anderson, W.C., y Wimmer, E. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 291: 547-553.
- Korant, B., Chow, N., Lively, N., y Powers, J. (1979). Virus-specific protease in poliovirus-infected Hela cells.- *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76: 2992-2995.
- Kornberg, R. (1977). Structure of Chromatin. *Annual Review of Biochemistry.* 46: 931-954.
- Leibowitz, R., y Penman, S., (1971). Regulation of protein synthesis in Hela cells. *J. of Virology* 8: 661-668.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, Farr, A.L. y Randall, R.T. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Luria, S.E., Darnell, E.J., Baltimore, D., Campbell, A. (1978). *General Virology*. Hohn Wiley & Sons, U.S.A.
- Luse, D.S. y Roeder, R.G. (1980). Accurate transcription initiation on a purified mouse β -globin DNA fragment in a cell-free system. *Cell* 20: 691-699.
- Mackary, R.L. y Consigli, R.A. (1976). Early events in Polyoma virus infection: Attachment, penetration and nuclear entry. *J. of Virólogy* 19: 620-636.

Manley, J.L., Fire, A., Cano, A., Sharp, P.A., y Ceffer, L.M. (1980). DNA dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell extract. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 3855-3859.

Martin, M.E., Malec, J., Sved, S., y Work, T.T. (1962). Studies on protein and nucleic acid metabolism in virus-infected mammalian cells. Biochem J. 80: 585-597.

Matsui, T., Segall, J., Weil, A.P. y Roeder, R.G. (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. The Journal of Biological Chemistry 256: 11992-11996.

Matthews, F.E., (1982). Classification and Nomenclature of Viruses: 4o. report of the International Committee on taxonomy of viruses. Ed. Kerger.

McCormick, W. y Penman, S. (1967). Inhibition of RNA synthesis in HeLa and L cells by mengovirus. Virology 31:135-141.

Melnick, L.J. (1976). Viral infections of humans: Enterovirus. Edit. Plenum Medical. pp. 163-261.

Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y. y Maniatis, T. (1981) Identifivation of DNA sequences required for transcription of the human α -globin gene in a new SV40 host-vector system. Cell 27: 279-288.

Meneguzzi, G., Pignatti, P.F., Brodano-Barbanti, G. y Milanesi, G. (1978). Minichromosome from BK virus as a template for transcription in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 1126-1130.

Mertz, J.E. y Gurdon, J.B. (1977). Purified DNAs are transcribed after microinjection into Xenopus oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 1502-1506.

Muñoz-Fernández, R., Prados-Coca, M. y Hsu, M.T. (1979). Intracellular forms of Simian Virus 40 nucleoprotein complexes. J. of Virology. 29: 612-623.

Myers, R.M. y Tjian, R. (1980). Construction and analysis of Simian Virus 40 origins defective in tumor antigen binding and DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. 77:6491-6495.

Nomato, A., Detjen, B., Pozzatti, R. y Wimmer, E. (1977). The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. Nature 268: 208-213.

Nomoto, A., Kitamura, N., Lee, J.J., Rothberg, P. G., Imura, N., y Wimmer, E. (1981). Identification of point mutations in the genome of the genome of the poliovirus Sabin vaccine LSc 2ab₁ and catalogue of RNase T1-and RNase A resistant oligonucleotides of poliovirus tipe 1 (Mahoney) RNA. Virology 112: 217-227.

Nomoto, A., Toyoda, H., Imura, N., Noguchi, S. y Sekiya, T. (1982). Restriction map of double-stranded DNA copy - synthesized from poliovirus sabin 1 RNA. *J. Biochem.* 91: 1593-1600.

Penman, S., Scherren, K., Becker, Y., y Darnell, J.E. (1963). Polyribosomes in normal and poliovirus infected HeLa cells and their relationship to mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 49: 654-662.

Penman, S. y Summers, D. (1965). Effects on Host cell metabolism following synchronous infection with poliovirus. *Virology* 27: 614-620.

Perlman, D. (1977). Asymmetric Okazaki piece synthesis during replication of simian virus 40 DNA in vivo. *Cell.* 12 1029-1043.

Pizarro-Suárez, E. (1971). Los virus. Monografía No. 8 serie de Biología, O.E.A. Washington, D.C.

Racaniello, V. y Baltimore, D. (1981). Molecular cloning of poliovirus c DNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 4887-4891.

Ransay, G., Hayman, M.J. y Bister, K. (1982). Phosphorylation of specific sites in the gag-myc polyproteins encoded by MC29-type viruses correlates with their transforming ability. *The EMBO Journal* 1: 1111-1116.

Reddy, V.B., Thimmappaya, B., Dhan, R., Subramanian, N.K. Zain, S.B., Pan, J., Ghosh, P.K., Celma, L.M., y Weisman,

S. M. (1978). El genome de simian virus 40. *Science* 200: 494.

Rose, J.K., Trachsel, H., Leong, K. y Baltimore, D. (1978) Inhibition of translation by poliovirus: Inactivation of a specific initiation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:2732-2736.

Rueckert, R.R., Matthews, R.J., Kew, O.M., Pallansch, M., McLean, C., Omilianowski, D. (1979). Synthesis and processing of picornaviral polypeptide. In: Pérez-Bercoff R. (ed.) *The molecular biology of Picornaviruses*. Plenum, New York.

Rueckert, R.R., y Wimmer, E. (1984). Systematic Nomenclature of Picornavirus proteins *J. of Virology* 50: 957-959.

Salzman, N.P., Lockart, R.Z., y Serring, E.D. (1959). Alterations in Hela cell metabolism resulting from poliovirus infection. *Virology* 9: 244-259.

Sambrook, J. Sharp, A.P. y Keller, W. (1972). Transcription of Simian Virus 40. *J. Mol. Biol.* 70: 57-71.

Sambrook, J., Sugden, B., Keller, W. y Sharp, A.P. (1973). Transcription of simian virus 40. III Mapping of early and late species of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 3711-3715

Samuels, M., Fire, A. y Sharp, P.A. (1982). Separation and characterization of factors mediating accurate transcription by RNA polymerase II. *The Journal of Biological Chemistry* 257: 14419-14427.

Sanchez, T.A. (). Tesis de Licenciatura. UNAM-ENEP Iz
tacala. México. D.F.

Semler, B.L., Hanecak, R., Anderson, C.W., Dorner, L.F., y
Wimmer, E. (1982). A membrane-associated precursor to po-
liovirus VPg identified by immunoprecipitation with anti-
bodies directed against a synthetic heptapeptide. *Cell* 28
405-412.

Semler, B.L., Hanecak, R., Dorner, L.F., Anderson, S.W.,
y Wimmer, E. (1983). Poliovirus RNA synthesis in vitro:-
structural elements and antibody inhibition. *Virology* 126
624-635.

Shwartz, L. B., Lawrence, C., Tach, R.E. y Roeder, R. G.
(1974). Encephalomyocarditis virus infection of mouse pla-
macitoma cells II Effect on host RNA synthesis and RNA po-
lymerases. *J. Virology* 14: 611-619.

Southern, E. M. (1975). Detection of sequences among DNA-
fragments separated by gel electroforesis. *J. Mol Biol.* -
98: 503-517.

Stanway, G., Cann, J.A., Hauptmann, R., Hoghes, P., Clarke
L. D., Mountford, C., Minor, D.P., Schil, C.G. y Almond, W.
J. (1983). The nucleotide sequence of poliovirus type 3 -
leon 12 a₁b comparison with poliovirus type 1. *Nucleic A-
cids Research* 11: 5629-5643.

Steinberg, B. y Pollack, R. (1978). Isolation and characterization of T antigen-negative revertants from a line of transformed rat cells containing one copy of the SV40 genome. *Cell* 13: 19-32.

Strauss, J. H. y Strauss, E.G. (1983). Replication strategies of the single stranded RNA viruses of eukaryotes. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 105: 1-98.

Tjian, R. (1981). T antigen binding and the control of SV40 gene expression. *Cell* 26: 1-2.

Tooze, J. (1980). The molecular biology of tumour viruses. Cold Spring Harbor.

Watson, J.D. y Crick, F.H.C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 171: 737.

Weil, P.A., Segall, J., Harris, B., Ny, S. y Roeder, R.G. (1979). Faithful transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III en systems reconstituted with purified DNA templates. *The Journal of Biological Chemistry* 254: 6163-6173.

Wengler, G. y Wengler, G. (1972). Medium Hypertonicity and polyribosome structure in Hela cells. *Eur. J. Biochem.* 27: 162-173.

Westphal, H. (1970). SV40 DNA strand selection by E.coli RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 50: 407-420.

Wimmer, E. (1979). The genome-linked protein of picornaviruses: discovery properties and possible functions. En: The molecular biology of picornavirus. Peréz-Bercoff, R. ed. Plenum New York, EUA. pp. 175-188.

Wong, W.T. y Goldberg, R.A. (1981). Synthetic peptide fragment of src gene product inhibits the src protein kinase and crossreacts immunologically with avian onc kinases and cellular phosphoproteins Proc. Natl Acad. Sci. 78: 7412-7416.

Yang, W.V., Lorner, R.M., Steitz, A.J. y Flint, J.S. (1981) A small nuclear ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 1371-1375.

Zimmerman, E.P., Heeter, M., y Darnell, J.E. (1963). RNA - synthesis in poliovirus-infected cells. Virology 19: 400 - 408.