

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA PROTEÍNA
RESPONSABLE DEL INCREMENTO DE INFECTIVIDAD CAUSADO POR TRIPSINA
EN EL ROTAVIRUS DE SIMIO SA11

Tesis que para obtener el grado de Doctor en
en Investigación Biomédica Básica

presenta

SUSANA LOPEZ CHARRETON

México D.F.

1986

TESIS CON
EVALUACIÓN DE CALIDAD



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.

Capítulo I

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Los rotavirus son ahora ampliamente reconocidos como uno de los agentes etiológicos más importantes de gastroenteritis en neonatos y niños en todo el mundo (1-8). El descubrimiento en 1973 de los rotavirus humanos y la asociación de éstos con episodios diarreicos, representó un gran avance en la elucidación de la etiología de las gastroenteritis agudas no bacterianas (9).

A pesar de que las enfermedades diarreicas constituyen uno de los padecimientos más comunes en niños en todo el mundo, éstas tienen un significado especial en países en desarrollo en donde constituyen una de las principales causas de mortalidad en la población infantil.

El impacto de las enfermedades diarreicas en los países en desarrollo es impresionante: como ejemplo, datos epidemiológicos indican que las diarreas ocupan el primer lugar de frecuencia tanto en la incidencia de la enfermedad como en la mortalidad. En 1982, Snyder y Merson publicaron un artículo en el que estimaban que anualmente ocurren entre 744 a mil millones de episodios diarreicos y alrededor de 4.6 millones de muertes por diarrea en niños menores de 5 años en África, América Latina y Asia (excluyendo China) (10).

En 1973, Bishop y colaboradores describieron la presencia de partículas virales de 70 nm. al examinar al microscopio electrónico biopsias duodenales de niños hospitalizados que padecían gastroenteritis aguda no bacteriana (9). A partir de esta fecha han aparecido en la literatura una gran cantidad de estudios epidemiológicos y bioquímicos, que en la actualidad acreditan a los rotavirus como el agente individual más importante asociado a episodios diarreicos en niños menores de dos años en todo el mundo.

A pesar de que los rotavirus humanos solo fueron descubiertos en 1973, existían ya en 1963, reportes de la presencia de estas partículas virales en tejido intestinal de ratones infectados con el rotavirus EDIM (epizootic diarrhea of infant mice)(11). También, en 1963 Malherbe y colaboradores ya habían descrito el aislamiento de un virus de 70 nm. que fue llamado SA (simian agent)-11; este virus, encontrado en un lavado intestinal de un mono vervet, fue recuperado en cultivo de células de riñón de mono (12). Estudios posteriores han mostrado la presencia de los rotavirus en heces diarreicas de las crías de un gran número de mamíferos y aves (13).

En la actualidad, los rotavirus están clasificados como un género de la familia Reoviridae (14). Al microscopio electrónico, tienen una morfología característica: las partículas completas tienen una doble cápside y miden aproximadamente 70 nm. de diámetro; en estas partículas se observa la capa externa como un anillo liso y bien definido. También se observan partículas incompletas de ~55 nm. que poseen solamente la capa interna y que se ven como partículas rugosas debido a los capsómeros que conforman esta cápside interna y que se proyectan hacia el exterior (15). Precisamente, el nombre ROTAVIRUS (rota en latín=rueda) se deriva de su morfología, ya que su cápside externa lisa semeja el borde de una rueda de carreta y su cápside interna, las proyecciones de la rueda del centro a la periferia.

La partícula completa tiene una densidad de 1.36 g/cm en cloruro de cesio, mientras que los virus con una sola cápside tienen una densidad de 1.39 g/cm; la infectividad viral está asociada a las partículas completas. Estas partículas pierden su infectividad al ser tratadas con agentes quelantes como EGTA ó EDTA; éstos agentes provocan la pérdida de la capa externa del virus y a la vez activan a la RNA polimerasa endógena del virus. Estos eventos se deben a la reducción de la concentración de calcio que es necesaria para mantener la

integridad de los rotavirus (16).

El genoma de los rotavirus consiste de 11 diferentes segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA), que sumados dan un total aproximado de 20,000 pares de bases (4,17,18). Estos segmentos pueden ser separados electroforéticamente en geles de acrilamida, dando un patrón característico para cada rotavirus analizado (19,20).

Los polipéptidos que conforman las cápsides externa e interna de los rotavirus humanos y animales son similares, aunque existe aún algo de controversia en cuanto al número, el peso molecular y su localización precisa (ya sea en la cápside externa ó interna). Sin embargo se coincide en los siguientes puntos: existen cuando menos 5 proteínas estructurales, tres de las cuáles (VP1, VP2 y VP5) constituyen la capa interna del virión y las dos restantes, VP3 y VP7 forman la capa externa (21).

En la capa interna se ha descrito la presencia de determinantes antigénicos comunes para todos los rotavirus, éstos se encuentran localizados en la proteína más abundante de esta capa, VP5; experimentos con anticuerpos monoclonales han revelado la presencia de cuando menos un epítipo común para todos los rotavirus, al que se le ha llamado antígeno de grupo y que es característico de todos los rotavirus. Además, en esta misma proteína se ha detectado otro determinante antigénico no común, el cual ha servido para clasificar a los rotavirus en dos subgrupos bien definidos: subgrupo I y subgrupo II (22,23).

Hasta ahora sin excepción, todos los rotavirus humanos del subgrupo I tienen la característica de que sus segmentos de RNA 10 y 11 migran menos, en un gel de acrilamida ("patrón corto"), que los mismos segmentos de los rotavirus humanos del subgrupo II ("patrón largo") (Figura 1) (24). Esta característica ha hecho posible el identificar el subgrupo al que pertenecen los rotavirus humanos mediante su electroferotipo (patrón electroforético) (24). Los rotavirus

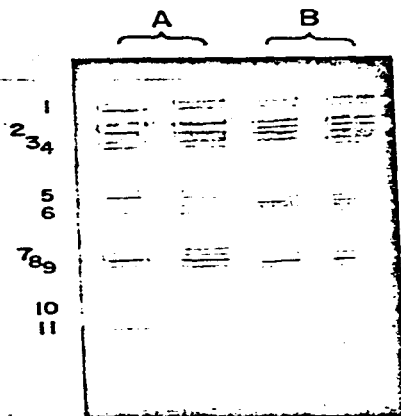


Figura 1.- Patrón electroforético de los RNA's de algunos rotavirus humanos.
 A) Rotavirus humanos de "patrón corto"
 B) rotavirus humanos de "patrón largo"
 Los números indican el número de cada segmento de RNA.

pertenecientes a otras especies animales no pueden ser subgrupados por su electroferotipo ya que, hasta ahora todos los rotavirus animales analizados tienen un "patrón largo" pero la mayoría pertenecen al subgrupo I (25).

La infección por rotavirus puede ser neutralizada si se incuba previamente el virus con anticuerpos dirigidos contra la partícula completa (26,27). Varias líneas de evidencia sugieren que VP7 es el polipéptido principalmente responsable de la inducción de estos anticuerpos neutralizantes (22,28). Los determinantes antigénicos de neutralización, localizados en la cápside externa viral, han permitido clasificar a los rotavirus en diferentes "serotipos".

El desarrollo de técnicas para el cultivo de los rotavirus humanos en líneas celulares, ha permitido identificar el serotipo de estos virus utilizando técnicas convencionales como son la neutralización del efecto citopático y la reducción del número de placas en un ensayo en placa por neutralización (PRNA= plaque reduction neutralization assay), entre otras (29-31).

El criterio acordado para establecer un nuevo serotipo, es el de encontrar una diferencia recíproca de 20 veces o más en el título del anticuerpo, cuando el serotipo candidato se prueba contra los virus prototipo que representan a los serotipos ya establecidos (32). Con este criterio se han identificado hasta ahora 4 serotipos distintos en los rotavirus humanos (Tabla I). Un resultado inesperado fue el encontrar que existen rotavirus humanos y animales que comparten su especificidad de neutralización: por ejemplo el rotavirus de simio SA11 cruza antigénicamente, por ensayos de neutralización, con los rotavirus humanos del serotipo 3. Es interesante mencionar que los serotipos 1 y 2 sólo se han encontrado entre rotavirus humanos, que no es el caso con los serotipos 3 y 4, de los cuales se han encontrado ejemplos en otras especies animales (Tabla I). También se han encontrado serotipos exclusivos de especies animales, como son los serotipos 5, 6 y 7, (25).

TABLA I

SEROTIPOS DE ROTAVIRUS DETERMINADOS POR NEUTRALIZACION a)

Serotipo	Rotavirus Humanos (cepas prototipo)	Rotavirus Animales (cepas prototipo)
1	Wa, K8, D, DB (II)*	-----
2	DS1, S2, KUN, 390 (I)	-----
3	P, M, Walk 57/14, Mo, Ito, Nemoto, YO, McM2 (II)	SA11, MMU1800E (simio), CU-1 (canino), Taka(felino)(I), H-2 (equino)
4	ST3, ST4, Hosokawa, Hochi (II)	SB-2(I), Gottfried(II), SB-1A (II) (porcinos)
5	-----	H1(equino)(I), OSU(porcino)(I)
6	-----	NCDV, UK, (bovinos)(I)
7	-----	Ch.2, Ty.1 (aves)

* Los números romanos entre paréntesis indican el subgrupo de los rotavirus.

a) Datos tomados de (45)

Hasta hace poco tiempo el panorama en cuanto a la especificidad de neutralización parecía bastante simple: se consideraba a la proteína VP7 como el antígeno de neutralización responsable de esta especificidad. Sin embargo, recientemente han aparecido datos en la literatura indicando que VP3 (la otra proteína de capa externa), es también inductora de anticuerpos neutralizantes, y que estos también participan en la especificidad de serotipo (33). Inclusive, en este trabajo se propone la necesidad de establecer un nuevo sistema de clasificación en el que se tome en cuenta la especificidad de neutralización tanto de VP7 como de VP3. Estos datos indican que los rotavirus no son sencillos antigénicamente como se pensaba inicialmente, dado que ambas proteínas de la capa externa viral inducen anticuerpos neutralizantes.

El asignamiento de las proteínas estructurales del rotavirus con sus genes correspondientes se ha llevado a cabo utilizando diferentes metodologías:

- A) Traducción in vitro de los segmentos de dsRNA desnaturalizados, (previamente fraccionados) y análisis de sus productos proteicos (34).
- B) Traducción in vitro de los RNA's mensajeros virales fraccionados, producidos por la polimerasa viral (35).
- C) Por la correlación fenotipo-genotipo al analizar virus "rearrreglantes", resultantes de la coinfección con dos cepas distintas de rotavirus (22,36).

Este último tipo de estudios han permitido no sólo conocer el asignamiento génico sino que en algunos casos se ha podido correlacionar algunas de las funciones virales con una proteína y un gene determinado. Algunos de estos datos se mencionaran posteriormente.

Hasta hace pocos años fué posible el aislar y cultivar eficientemente en líneas celulares a los rotavirus humanos, es por esto que la mayoría de los estudios bioquímicos y genéticos se han realizado en rotavirus aislados de animales, los cuáles fueron fácilmente adaptables al cultivo de células. Uno de los rotavirus más ampliamente estudiado es el rotavirus de simio SA11, con el cual se realizó este proyecto. El resto de la introducción versará principalmente sobre datos obtenidos con este virus modelo.

En cuanto a los resultados del asignamiento génico de las proteínas estructurales del rotavirus de simio SA11, se ha llegado a las siguientes conclusiones: Los segmentos de RNA 1, 2 y 6 codifican por los polipéptidos de la capa interna VP1, VP2 y VP6 respectivamente; los componentes de la capa externa VP3 y VP7 son codificados por los segmentos de RNA 4 y 7 respectivamente (34,35).

VP7 el polipéptido más abundante de la capa externa sufre además, modificaciones post-traduccionales que consisten en el rompimiento de un péptido señal y en la glicosilación con un oligosacárido del tipo de "alta manosa": esta proteína ya modificada, tiene un peso molecular de 37,000 daltones (34,37). Dentro de las funciones que se le han asignado mediante los estudios con virus rearrreglantes están el que esta proteína es el principal antígeno de neutralización y es además la principal responsable de la especificidad de serotipo (22).

La otra proteína de la cápside externa, VP3, tiene un peso molecular de ~88,000 daltones (21) y se ha descrito que es la proteína responsable de las funciones de hemaglutinación y de incremento de la infectividad por proteasas (ver más adelante), recientemente se ha encontrado que esta proteína también es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes (33).

Estos dos polipéptidos de capa externa tienen además funciones muy importantes para la replicación viral, puesto que se ha observado que partículas virales que carecen de estas proteínas son incapaces de infectar (16).

La replicación de los rotavirus in vivo se lleva a cabo en las células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado y la infección está localizada primariamente a estas células. Esta especificidad de infección y la aparente especificidad de especie de los diferentes rotavirus, sugiere que es necesaria una interacción virus-célula huésped muy específica para que se establezca la infección.

Un enfoque para entender esta especificidad es el estudio de las proteínas involucradas en las primeras interacciones virus-célula huésped, que en este caso son las proteínas localizadas en la superficie de la partícula viral (VP3 y VP7).

La adsorción del virus a la célula es un prerequisite indispensable para la infección y en varios casos se ha demostrado que el requerimiento del virus por un receptor específico, es un determinante importante del tropismo del virus hacia la célula, tejido u órganos blanco. El paso siguiente a la adsorción, es la penetración del virus a la célula huésped, la secuencia de eventos durante este paso no es clara aún: la fusión de membranas viral y celular, ó la fagocitosis (viropexis), han sido algunos de los mecanismos propuestos, sin embargo; el mecanismo de penetración es particular de cada tipo de virus y en el caso de los rotavirus, tanto los mecanismos de adsorción como de penetración se desconocen aún.

Dadas las características antes mencionadas, en este trabajo se decidió estudiar más detalladamente al polipéptido VP3; al empezar este estudio contábamos con los siguientes antecedentes:

En 1977 Matsunò y colaboradores (38) desarrollaron un ensayo en placa para la cuantificación de partículas virales infectivas. En este trabajo se describió por primera vez el requerimiento de tripsina en el medio de cultivo. A partir de este trabajo se reconoció la importancia de ésta enzima proteolítica para lograr una propagación eficiente de los rotavirus en cultivo de células. Inclusive en la actualidad se ha demostrado que la tripsina es un requerimiento indispensable para lograr la propagación de los rotavirus humanos en cultivo de células (39).

Se ha demostrado que el aumento de infectividad por tripsina se debe a un efecto directo de esta enzima sobre el virus y no sobre la célula (40). Estudios por nuestro grupo demostraron que el efecto de esta proteasa sobre el virus es el rompimiento específico de la proteína viral VP3, resultando de éste corte dos proteínas de menor peso molecular llamadas VP5 (con un peso molecular de ~50,000 daltons) y VP8 (~28,000 daltons)(21). Cabe mencionar que el efecto de tripsina, es específico para VP3 y no afecta a ninguna de las otras proteínas estructurales del virus (Figura 2). El efecto de este rompimiento específico se ha relacionado con un aumento de la infectividad viral de hasta mil veces (41).

El incremento de la infectividad viral como resultado del rompimiento proteolítico específico de una proteína viral ha sido descrito en otras familias de virus tales como los Paramixovirus (ejemplos de esta familia son los virus de Sendai, sarampión y paperas) y los Mixovirus (influenza). En éstos virus se han estudiado los productos resultantes del corte proteolítico y se ha observado que la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal recién generado por el corte proteolítico es muy conservada, inclusive comparando esta secuencia entre virus pertenecientes a las dos diferentes familias (42). Estos resultados sugerían que una secuencia específica de aminoácidos en el extremo amino terminal recién generado era requerida para que esta proteína tuviese una

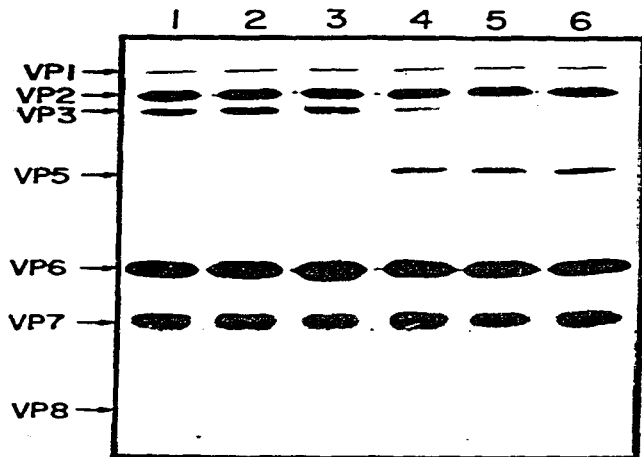


Figura 2.- Efecto de tripsina sobre el rotavirus SA11 purificado. El SA11 purificado y marcado con metionina S^{35} , fue incubado con diferentes concentraciones de tripsina: 1) sin tripsina, 2) $1 \mu\text{g/ml}$, 3) $2 \mu\text{g/ml}$, 4) $5 \mu\text{g/ml}$, 5) $10 \mu\text{g/ml}$ y 6) $100 \mu\text{g/ml}$. Posteriormente las muestras tratadas se analizaron por SDS-PAGE.

actividad biológica .

En los paramixo- y ortomixovirus, la proteína que sufre este rompimiento específico (llamada F y HA respectivamente), es la proteína responsable de la fusión de las membranas viral y celular durante la infección viral. Utilizando la secuencia conocida del extremo amino recién generado, se han sintetizado químicamente péptidos que mimetizan esta secuencia y se ha observado que estos péptidos son capaces de inhibir la infectividad del virus en cultivo de células, como consecuencia de la inhibición de la fusión de las membranas viral y celular (43).

En el caso concreto de los rotavirus, el incremento de infectividad por tripsina ha sido observado en un gran número de rotavirus de diferentes especies (4), y como se mencionó anteriormente, esta activación se debe al rompimiento específico de VP3 en la capa externa del virus: este rompimiento, probablemente activa un paso temprano de la replicación viral. En 1982, Greenberg y colaboradores, encontraron que cuando células en cultivo eran co-infectadas con un rotavirus humano no cultivable y un rotavirus bovino adaptado al cultivo de células, se obtenían como resultado rearreglantes cultivables y éstos siempre contenían el segmento de RNA 4 del virus bovino (que es el gene que codifica por VP3)(44). Estos resultados sugieren que la restricción de los rotavirus humanos para crecer in vitro es debida a que su VP3 no "funciona" debidamente en cultivo de células. ¿Es este defecto debido a que esta proteína no es cortada eficientemente con tripsina?

El conocer más detalladamente a éste polipéptido y en especial las zonas aledañas al sitio de corte, podría sugerir experimentos para conocer el mecanismo molecular de esta activación.

En este trabajo se presenta la secuenciación directa del extremo amino terminal generado por el corte con tripsina y la secuencia parcial del gene que codifica por esta proteína; a partir de la secuencia nucleotídica obtenida se dedujo la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo generado por el corte con tripsina.

Además, para estudiar la posible conservación de esta región, se secuenció la zona equivalente en varios rotavirus humanos y animales pertenecientes a diferentes serotipos.

Se presentan también, experimentos preliminares con péptidos sintetizados químicamente que mimetizan los sitios carboxilo y amino generados por el corte con tripsina en SA11, con los que se pretende investigar cual es la importancia de éstos sitios en la infectividad viral.

Capítulo II

Primary structure of the cleavage site

associated with trypsin enhancement of rotavirus

SAll infectivity.

Artículo publicado en Virology.

Primary Structure of the Cleavage Site Associated with Trypsin Enhancement of Rotavirus SA11 Infectivity

SUSANA LÓPEZ,* CARLOS F. ARIAS,* JOHN R. BELL,†
 JAMES H. STRAUSS,† AND ROMILIO T. ESPEJO*¹

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-228, D. F. 04510, México and †Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, California 91125

Received October 17, 1984; accepted February 15, 1985

The primary structure of the trypsin cleavage site in the outer layer protein VP3 of rotavirus SA11 was determined. This cleavage enhances the infectivity of rotavirus SA11. Both VP8, one of the polypeptides generated by the cleavage, and VP3 had their α -NH₂ blocked. Only VP5, the other polypeptide produced by the cleavage, was susceptible to sequential Edman degradation, indicating that it contained the new α -NH₂ terminus generated by trypsin hydrolysis. The results indicated that purified VP5 is composed of two polypeptides with the following amino acid sequence at their N terminus: (a) ¹TYVTRAQPNQDAVSKTS...; (b) AQPNDQAVSKTS... Sequencing of the DNA complementary to ds RNA segment 4 revealed a nucleotide sequence encoding the amino acid sequences indicated above, with only one different amino acid. From these results, the amino acid sequence of the site cleaved by trypsin was extended to cover the C termini (present in VP8). The following sequence, which contains two sites (indicated with asterisks) and can be cleaved by trypsin was deduced: ... VPVSIVSR*NIVYTR*AQPNDQIVVSKTS... © 1985 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

Tissue culture-adapted simian rotavirus SA11 (Malherbe and Strickland-Cholmley, 1967) has become a model system for the rotaviruses (for a recent review see Holmes, 1983). SA11 virions are composed of an RNA genome and a double-layered capsid. The genome is made up of 11 segments of double-stranded (ds) RNA (Rodger and Holmes, 1979) ranging in molecular weight from about 2.2 to 0.4 × 10⁶ (Both *et al.*, 1982). The capsid consists of at least five protein classes; three of which (VP1, VP2, and VP6) make up the inner layer, while the other two (VP3 and VP7) form the outer layer (Espejo *et al.*, 1981; Estes *et al.*, 1981). VP7, a 35,500 molecular weight glycoprotein, has been identified as the translation product of genomic segment 9 and its primary amino

acid sequence has been deduced from the nucleic acid sequence of cloned cDNA (Both *et al.*, 1983b; Arias *et al.*, 1984). This protein seems to be the most important viral antigen against which neutralizing antibodies are directed (Bastardo *et al.*, 1981; Kalica *et al.*, 1981). VP3 has been identified either as the product of gene 4 (Smith *et al.*, 1980 and Mason *et al.*, 1983) or as the product of gene 3 (Arias *et al.*, 1982). In this manuscript, we confirm the assignment of Smith *et al.* (1980) and Mason *et al.* (1983). Gene 4 has been shown to code for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation in a rhesus rotavirus (Kalica *et al.*, 1983). It was later shown that VP3 is the protein responsible for hemagglutination activity in this rhesus rotavirus and that, as does VP7, can also induce neutralizing antibodies (Greenberg *et al.*, 1983).

Enhancement of infectivity by trypsin has been widely observed with rotaviruses isolated from different species (for a re-

¹ Author to whom requests for reprints should be addressed.

cent review, see Holmes, 1983). In SA11 and in other rotaviruses, the activation is apparently due to the specific cleavage by trypsin of VP3 (88,000 molecular weight), which generates VP5 (60,000 MW) which is commonly found in rotavirus preparations, and a smaller protein of 28,000 VP8 (Espejo *et al.*, 1981; Estes *et al.*, 1981; Clark *et al.*, 1981). Clark *et al.* (1981) have shown that a bovine rotavirus untreated with trypsin can attach to cells as well as the trypsin-treated virus can, but it is uncoated less efficiently than is the trypsin-treated virus.

In this manuscript, we report the primary structure of the trypsin-sensitive site of VP3 which was obtained by sequential Edman degradation of VP5 and by sequencing cDNA of ds RNA segment 4.

MATERIALS AND METHODS

Virus strains and virus purification. The virus used for molecular cloning and sequencing studies was simian rotavirus (SA11) obtained originally from H. H. Malherbe, University of Texas, in 1977. For purposes of comparison, SA11 (clone 3) obtained from M. K. Estes, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, and SA11 obtained from I. H. Holmes, University of Melbourne, Victoria, Australia, were also used. SA11 virus was grown in MA104 cells in 750-cm² flasks and purified as described (Espejo *et al.*, 1981). The infection of MA104 confluent monolayers with SA11 virus and the labeling of infected cells were as described (Arias *et al.*, 1982).

RNA and protein analysis. Phenol-chloroform-extracted viral RNA (Espejo *et al.*, 1980) was subjected to electrophoresis in acrylamide:bis-acrylamide::10:0.27% (wt/vol) by the method of Laemmli as described by Rodger and Holmes (1979). After electrophoresis the gel was stained with silver nitrate (Herring *et al.*, 1982). To analyze proteins, purified virus was disrupted with Laemmli sample buffer and then was subjected to electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide

gels (SDS-PAGE; acryl:bis-acryl::12:0.12) as described by Mason *et al.* (1980).

Treatment of virus with trypsin, protein purification, and protein sequencing. Purified virus (1.6 μ g) was incubated with TPK-treated trypsin (100 μ g/ml) for 30 min at 25°. The reaction was stopped by the addition of an equal volume of 2× Laemmli sample buffer containing 1% mercaptopropionic acid and the mixture was boiled for 2 min in a water bath.

VP3, VP5, and VP8 were prepared from purified virus, either treated or not with trypsin, by preparative SDS-PAGE electrophoresis (separating gel: 11% acrylamide-0.26% bis-acrylamide) in which the buffer system of Laemmli (1970) was used, but with 0.01% mercaptopropionic acid in the sample buffer and upper reservoir. Protein bands stained with Coomassie blue were excised from the slab gel and the proteins were recovered by electroelution in SDS (Hunkapiller *et al.*, 1982).

The VP3, VP5, and VP8 so purified were subjected to automated Edman degradation on a noncommercial gas-phase sequencer with improved sensitivity (Hewick *et al.*, 1981) and the amino acid derivatives released at each cycle were analyzed by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (Johnson *et al.*, 1979).

Molecular cloning and subcloning and DNA sequencing. The 11 ds RNA segments derived from SA11 rotavirus were cloned as described by Arias *et al.* (1984). The recombinant clones containing hybrid plasmids with cDNA inserts corresponding to SA11 RNA segment 4 were selected by their ability to hybridize with RNA segment 4 isolated by gel electrophoresis (Arias *et al.*, 1984).

To obtain the sequence of a region that was impossible to reach by sequencing the ends of the clones, the insert in clone pSR4-9 was excised using *EcoRI* and *HindIII*, isolated by agarose gel electrophoresis, and restricted with *RsaI*. A fragment with 209 base pairs was isolated by agarose gel electrophoresis and subcloned in the *SmaI* site of pMT21 (Arias *et al.*, 1984). Positive clones were selected by colony hybridization (Grunstein and Hogness, 1975) by using as a probe the

*Rsa*I 209-bp fragment labeled *in vitro* by nick translation (Rigby *et al.*, 1977).

Sequencing of the inserts in the selected clones was done by the procedure of Maxam and Gilbert (1980), starting from the *Eco*RI, *Bam*HI, or *Hind*III sites of the plasmid as described by Ruther *et al.* (1981).

Nucleic acid hybridization. Viral RNA was subjected to electrophoresis in a 5% acrylamide gel (acryl:bis-acryl::20:0.5) in a Tris-borate buffer (0.1 M Tris base, 0.002 M EDTA, adjusted to pH 8.3 with boric acid). In the electrophoresis which was run for 5 hr at 200 V, RNA segments 1, 2, 3, and 4 were clearly separated.

Viral RNA was transferred essentially by the method of Street *et al.* (1982), with the exception that nitrocellulose paper (Schleiser and Schuell) was used, following manufacturer's recommendations. The blotting was carried out for 48 hr at room temperature. Hybridization conditions were those described by Arias *et al.* (1984), using as probes clone pSR4-2 for RNA segment 4, pSR3-4 for segment 3, and pSR2-1 for segment 2, all labeled by nick translation (Rigby *et al.*, 1977).

RESULTS

Early attempts to determine the primary structure of protein VP3 by sequential Edman degradation were unsuccessful because its N terminus was blocked. In fact, every structural protein of SA11 (VP2, VP3, VP6, and VP7) examined was found to have a blocked α -NH₂ group (Arias *et al.*, 1984, and results not shown). When gel-purified VP5 and VP8 (the trypsin cleavage products of VP3) were subjected to the same procedure, only VP5 was amenable to sequencing. Based on this observation and on the reported molecular weights of VP3, VP5, and VP8 (Espejo *et al.*, 1981; Estes *et al.*, 1981), VP5 corresponds to about two-thirds of VP3 and contains the original C terminus and the new N terminus generated by trypsin cleavage, while VP8 corresponds to the other third and contains the blocked N terminus. The results obtained by sequential Edman degradation were not

straightforward, because two different amino acid derivatives were released in each sequenator cycle, in a proportion of about 1:5. The sequences derived from the amino acid derivatives released in minor and major proportions were, respectively:

- (a) ??VYTRAQPNQDAVVSKTS . . .
- (b) AQPNDQAVVSKTS . . .

It was not possible to identify the first two amino acids released in the minor proportion. Comparison of the two sequences revealed that the VP5, as prepared, although it migrated as a single band after gel electrophoresis, probably contained two polypeptides which differed only by the presence of six extra amino acids at the N terminus of the polypeptide present in the smaller proportion. The finding of these two polypeptides could be explained by the existence in VP3 of two closely located sites which are cleaved by trypsin.

In order to determine to a greater extent the primary structure of this cleavage site, which includes the C terminus of VP8, the nucleotide sequence, of the ds RNA segment encoding VP3 was partially obtained from clones containing cDNA copies of RNA segment 4 of our SA11 strain (Fig. 1). A region capable of coding for the amino acid sequence of the N terminus of VP5 was found at the apparently appropriate place in segment 4, thus confirming the coding assignment of Smith *et al.* (1980) and Mason *et al.* (1983) (Fig. 2). The amino acid sequence deduced from the nucleic acid sequence (underlined in Fig. 2) of this region contained an isoleucine instead of the second alanine found after Edman degradation. The 2244 nucleotides from segment 4 that were sequenced would correspond to about 80% of the gene, according to the size estimate of Both *et al.* (1982). The sequence contains a long, single open reading frame coding for 747 amino acids and contains neither an ATG triplet within its first 79 codons nor any stop codons in the 3' region (Fig. 2). The deduced amino acid sequence represents about 80% of VP3, if the reported molecular weight of 88,000 (Espejo *et al.*,

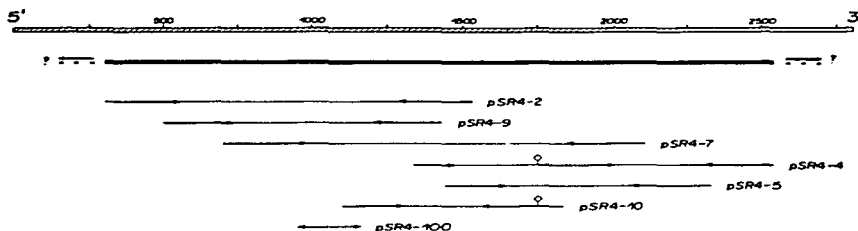


FIG. 1. Inserts of cDNA from simian rotavirus SA11 RNA segment 4 in the different clones. The hatched bar depicts the full-length positive strand, 5' to 3', taking 2800 bp as the size of the complete gene (see text). The solid bar shows the portion of the gene that was sequenced. It was arbitrarily positioned within the full-length gene according to the relative positions of the trypsin cleavage products (VP8 and VP5) in the deduced protein of this segment. The length and direction of reading of each of the sequenced portions in each clone are indicated by the heavy lines and the arrows, respectively. Sequences that were obtained from an internal *EcoRI* site are indicated (O). Clone pSR4-100 was obtained by subcloning a 207-bp *RsaI* fragment from clone pSR4-9 (see Materials and Methods).

1981) is used. According to the position of the cleavage site, this also covers a similar percentage of the trypsin cleavage products VP5 and VP8. There are nine potential sites of glycosylation in this amino acid sequence. The region around the cleavage site has several polar amino acids and the values of hydrophobicity, calculated according to Kyte and Doolittle (1982) along this region, do not indicate any special features.

It has been recently reported that SA11 consists of at least two virus subpopulations which differ in the electrophoretic migration of segment 4 (Pereira *et al.*, 1984). The SA11 employed in this study was shown to contain only one detectable segment 4, even when analyses were carried out with high concentrations of RNA and silver nitrate staining. However, our SA11 differs from that obtained by Estes or Holmes in that it has a segment 4 with a higher electrophoretic migration (Fig. 3a), suggesting that different subpopulations, or clones, have been selected from the original heterogeneous SA11. The ds RNA segment with lower electrophoretic migration, present in the SA11 obtained from both M. K. Estes or I.H. Holmes,

did not hybridize with a cDNA copy of the segment 4 present in our SA11, under highly stringent conditions; on the other hand, the other cDNA clones tested (derived from RNA segments 2, 3, and 6) did hybridize under the same conditions (results not shown). The difference between the segment 4 of these strains is also reflected in a difference in the electrophoretic migration of VP3 (Fig. 3b).

DISCUSSION

It has been generally accepted that infectivity enhancement of rotaviruses by trypsin is due to the cleavage of VP3, a protein in the outer layer of the virion (Espejo *et al.*, 1981; Estes *et al.*, 1981; Clark *et al.*, 1981). This cleavage probably activates an early step of replication which may be triggered by one or both of the terminal regions generated by the trypsin cleavage or by a possible conformational change in the VP3 molecules resulting from the cleavage. The amino acid sequences of the cleavage site reported in this manuscript will help to test the possible action of the terminal regions (a schematic representation of the trypsin

SEQUENCE OF SA11 TRYPSIN CLEAVAGE SITE

15

```

... 1 CTC ATT TAT AGA CGC TTG CTT ACT ATG TCA TAC ACA GTA GAA CTT TCA GAT GAA ATA CAA GAA GAT GCG ACT AAG ACT CCA C
  L T Y A G L T L T H S Y T V E I G S E T K T C
29 AAC GTT ACC GTT AAT CCA GCG GCA TTC GCG CAA ACA AAT TAC GCT CCA GTT AAT TCG GCA CCA CCA GCG ACT GAC TCA CCA
  N V W H A G V N H A G C O F Y Y O F T T F H F P F V S Y W M L L A F T
57 ACA GTT GAA CCA GTG CTT GAT GCA CCA GCG ACT TTT AAT CCA CCA GCG ACT TTT AAT CCA CCA GCG ACT TTT AAT CCA CCA GCG
  T V E E F V V G T D G O F Y Y O F T T F H F P F V S Y W M L L A F T
85 AAC CGC GCG GTG V V V GAA GTG GCG AAC AAC AAT ACA AAC ACG TGG TTA CCG ACA ATG TTA ATG CAA CAA AAT LTA CAG CAA GTT
  N A G C V M V V E G T M H M R M L A T I L I E P N W Q G A
113 CAG CCA ACA TAT ACA TTA TTT GCA CAA CAA GTT CAA GTA ACG GTA TCA AAT GAC TCG CAG CAA AAG TCG AAG TTT GTG GAT CTA
  E R T Y T L F G C A A C A G T V Q V T V S N D S Q T K M W K F V G D L
141 AGT AAG CAA ACA CCA GAT GAT GAT GAT TCA CAG CAT GGT TCT CTA CTG TCG ACA CCA AAA CCG TAT CCA GTV ATG AAG CAT GGT
  S K Q T Q L D G N T Y TCA CAG CAT GGT TCT CTA CTG TCG ACA CCA AAA CCG TAT CCA GTV ATG AAG CAT GGT
169 GGT AAG ATT TAC ACT TAT Y N G CAG GAG CCA AAC CCA GAT GGT TAC TCT ACA ACT AAC TTT GCA GCT GTA AAT ATG
  G K I Y T ACT TAT Y N G CAG GAG CCA AAC CCA GAT GGT TAC TCT ACA ACT AAC TTT GCA GCT GTA AAT ATG
197 ACA GCA TAT TCG GAT TTT TAT ATG ATT CCA TTA CCA CAA GCG ACA AAA TCG ACT GAA TAC TTA AAT AAT CCA TTA CCA GTA
  T A Y T T G T T T A T A T T C C A C A A G C G A A A T C G A K C T A E G A T A T A A T A A T C C A T T A C A A T A
225 CAA AAT ACG ACG AAT AAT CCA GTA CCA GCG TCG ATA TCA CCG AAT ATT GTA TAT ACA AGA CCA CCA CCG AAT CCA CAG ATC GTG
  Q N T B N I V P V S I V S P M I V Y T R A A O P M Q D I V
253 GTA TCA AAA ACT TCA TTA TGG AAA GAG ATG CAA TAT AAT AGA GAT ATG GTG ATG ACG TTT AAA TTT GCT AAC TCA ATC TTA AAA
  M S E T S L M D I V I D Y N H D I V I D Y N H D I V I D Y N H D I V I D Y N H D I V I D Y N H D I V I D Y N H D I V I D
281 TCA GCG CCA TTG GCA TAT AAA TGG TCA GAA GTG TCA TTT AAA CCA CCG TTT TAT CAG TAC CAA TAT ACC GAA GAT GGT GAA CAA
  S G G L G Y K A H TGG TCA GAA GTG TCA TTT AAA CCA CCG TTT TAT CAG TAC CAA TAT ACC GAA GAT GGT GAA CAA
309 GTT ACT CCA CAT ACT ACC TGT TCA GTA AAT GCG GTA AAT GAT TTT AAT TAT AAT GGT GCA TTA CCG ACT GAT TTC GTA ATG
  V T A H T C A T A C C T C S V N G C V M D F N Y M G D F N Y M G D F N Y M G D F N Y M G D F N Y M G D F N Y M G D F N Y M
337 TCA AAA TAT CAG GTA ATT AAG GAA AAT TCT TTT GTG TAC ATA CAC TAC TGG GAC GAT TCA CAA CCA TTT AGA AAC ATG GTA TAT
  S A A T A T C A G G T A A G G A A A T T C T T T G T G T A C A T A C A C T A C A A C C A T T T A G A A A C A T G V T A T
365 GTA CCG TCG TTG CCA GCT GAT TTA AAT TCA ATG TGT ACA CCA GGT GAC TAT AAT TTT CCG CTT CCA GTT GGT AAT TAT CCA
  V R S L A A S D A T A T A A T N C S V M C T A G G A C G D T A T A T T C C G C T T C C A G T T G T A T A A T T C A
393 GGT ATG ACT CCG GGT GCT GTG TCA TTG GAT TCA CCA GGT GTA ACT TTA TCA ACG CAG TTT ACG GAT TTT GTA TCA TTA AAT TCA
  V M T G G O G G T G T A T A T T A T A T A C A G V T L S T O G V T L S T O G V T L S T O G V T L S T O G V T L S T O G V
421 CTG AGA TTT AGA TTT AGA TTA TCA GTA GAA GAA CCG CCG TTC TCA ATT CTA CCG ACC ACA GGT AGT AGT AGA TTG TAT GCA CTT CCA
  L R R F R F R F V P V S I V S P M I V Y T R A A O P M Q D I V
449 CCG CCA AAA CCG AAT AAT TCA CAA GAA TAT TAT GAG ATA GCT CCG AGA TTT TCA TTA TCA TCA CCA GTT GTA CCG TTA AAT GAT GAT
  A A K P N H N G Q E Y V I A G R P F L E I S L V P L H D D
477 TAT CAG ACA CCA ATC ATG AAT TCA GTT ACT GTA CCA CAA GAT TTA GAA CCA CAA TGA CCA GCA CTA AGA GAT CAA TTT AAC AAT
  Y Q D F I R N H S V T V N Q D T T A G A C C A C A T E R A G C T A E L R H D E L R H D E L R H D E L R H D E L R H D
505 TTA TCA CAA CCA ATA GTC OCT ATG TCA CAA TTG ATA GAT CTT CCG TTA CTA CCG TTA GAT ATC TTT ACA TTT TTA TTT TCA AGA AIT AAC
  L S Q Q I A H S Q Q L I D L A L L P L D M F P L S H F F A S G I K
533 AGT ACA ATT CAC ACA CCG AAC TCT ATG CCG AAC GTA ATG AAG ACA TTT AAA AAG TCA AOT CTC OCT AAC CCA GTG TCA CCG
  S T I D A A K S M A T N V M K R P K K S S S L A H S V S T
561 CTC ACT GAT TCA TTG TCT GAT CCA CCA TCA ATT TCT AGA AGT CCA TCG GTT AGA TCA GTT AGT TCA ACT ACA CCA CCA CCA
  L T D S L A S D A A S S I S R S A S V P S V S S T A A H S V S T A S A M
589 ACG GAA GTT TCA AAC ATT ACA TCA GAT AAT ATG ACA CCG ACC TCA ATT TCT ACA CAG ACA TCA ACA ATG ACA CCG ACA AGG TTA
  T E V S M I A S D A T A T A T G A C A C G G T A T T T G A T A T A V L A V L K K T I S P R A T
617 AGA TTA AAA GAG ATG CCG ACT CAA ACA CAG GGT ATG AAT TTT GAT GAT ATA CCA CCG ACA CCA GTA CTT AAG ACT AAA ATT GAT AAA
  R L K E M A T Q T D G G M H F D D I S A A V L K K T I S P R A T
645 TCA ACC CAG TTA AAT ACA AAT ACA TTG CCA GAA ATG ATE ACT CAG GCT TCA CAA AAG TTT ATA CCA AAT ACA CCG TCA CCG GTA
  S T Q L H T H T L F P F E I V T E A S E K I S L I P M H R A Y R V
677 AIT AAG GAT GAT GAA GTG CAG GCG OCT AGT ATT GAT GGT AAA TAT TTC GCT TCA AAA GTT CAA ACA TTT GAA GAG ATT CCA TTC
  I K D D E V L C A S I D G E Y F A Y K V E T F E F I P F
701 GAT GTC CAG AAA TTC CCG GAC TTA GTG ACT CAG TCA CCA GGT ATG TCG CCA ATG ATT GAT TTT AAA ACT CTC AAG AAT CTA AAT
  D V Q K L V D L V T D S P V I S A I I D D F K T L R H L N
729 GAT AAT TAC GCA ATA AGE ACA CAA CAA CCA CTA AAT CTT CTA AGA TCT CAG CCG CCA GT ...
  D M Y T C I S R Q Q A L N L L R S D P R

```

FIG. 2. DNA sequence of the mRNA sense strand of RNA segment 4 and the deduced amino acid sequence for simian rotavirus SA11 protein VP3. The 5' and 3' ends are missing (see text). The predicted amino acid sequence is displayed below the nucleotide sequence. Amino acid residues are arbitrarily numbered. The underlined amino acid sequences are those obtained by Edman degradation of VP5. The heavy line indicates the portion corresponding to the amino terminal of VP5 found in major proportion.

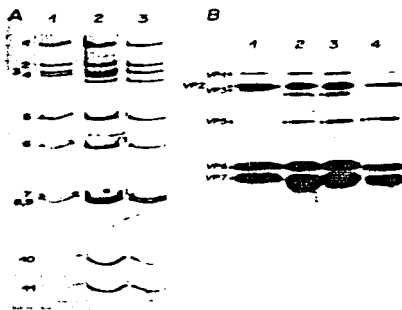


FIG. 3. Comparison of different strains of rotavirus SA11. (A) Electrophoresis of viral RNA stained with silver nitrate: (1) SA11 employed in our laboratory; (2) SA11 employed in our laboratory and SA11 obtained from M. Estes; (3) SA11 obtained from M. Estes. (B) Electrophoretic analysis of the proteins obtained from [³⁵S]methionine-labeled purified SA11. All the viruses were grown and purified under the same conditions without the addition of trypsin except where it is indicated: (1) SA11 used in our laboratory and obtained from H. H. Malherbe in 1977; (2) SA11 obtained from H. H. Malherbe in 1983; (3) SA11 obtained from M. Estes (clone 3); (4) SA11 used in our laboratory treated with 50 μ g/ml of TPCK-trypsin.

cleavage site of VP3 is shown in Fig. 4). The existence in VP3 of two sites cleaved by trypsin, as suggested by the results obtained after sequencing the N terminus of VP5, was corroborated by the amino acid sequence deduced from the cDNA. This cleavage may be similar to that occurring in the hemagglutinin of Fowl plague virus, in which there are also two cleavage sites five amino acids apart, the residues between which may be lost (Porter *et al.*, 1979). In the case of SA11, it is not known if the residues between the two cleavage sites are removed from the C terminus.

We have no simple explanation for the difference of one amino acid: isoleucine as determined in the sequence obtained by

sequential Edman degradation vs alanine as deduced from the nucleotide sequence of the complementary DNA of the gene. However, the difference is between two nonpolar amino acids which would not be expected to significantly affect the analysis of the properties of this region. In influenza and Sendai viruses, activation with trypsin generates an apolar N terminus which is thought to be involved in virus penetration (and which is also involved in hemolysis and fusion activity) (Skehel and Waterfield, 1975; Gething *et al.*, 1978). The new termini so generated in SA11 contain many polar amino acids (some of which are positively or negatively charged at neutral pH) and they might interact with the cell by a different mechanism than that postulated for influenza or Sendai viruses.

VP3 in the virion can also be cleaved by chymotrypsin, rendering a polypeptide having a molecular weight similar to that of VP5 but without enhancement of infectivity (Estes *et al.*, 1981; Espejo *et al.*, unpublished results). It is likely that chymotrypsin acts at the potential site located between the two trypsin cleavage sites; however, the newly generated termini would be different than those produced by trypsin, and this might explain why treatment of virus with chymotrypsin

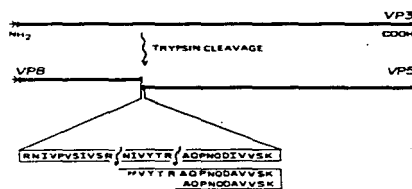


FIG. 4. Schematic representation of the trypsin cleavage site of VP3. The asterisks indicate that the α -NH₂ group is blocked. The sequence in the closed box was deduced from the nucleotide sequence of RNA segment 4. The open box contains the sequences that were obtained by sequential Edman degradation of VP5. The wavy arrows indicate the sites cleaved by trypsin.

did not result in an enhancement of infectivity.

There are at least nine potential sites of glycosylation in VP3. However, this protein is apparently not glycosylated (Arias *et al.*, 1982; Ericson *et al.*, 1982) although it does reach to the endoplasmic reticulum (Soler *et al.*, 1982; see also Holmes, 1983).

According to the estimated size for segment 4 (about 2800 bases) (Both *et al.*, 1982), the sequence reported in this manuscript, 2244 bases, should represent about 80% of the whole gene; the nonsequenced 20% should correspond to the extremities of the molecule because the conserved sequences in the 5' and 3' ends (Both *et al.*, 1982) were not found. Furthermore, the sequence reported here has a single open reading frame but neither an ATG initiation codon at its 5' end nor any stop codons at its 3' end. The other reading frames in this strand contain numerous stop codons, such that the longest polypeptide that may be derived from them would be less than 60 amino acids long.

Genomic heterogeneity of simian rotavirus SA11 has been reported for segment 5 (Sabara *et al.*, 1982) and 4 (Pereira *et al.*, 1984). This heterogeneity, also observed in other isolates, has been explained by the coexistence of rotavirus subpopulations within individual isolates (Sabara *et al.*, 1982; Spencer *et al.*, 1983). The genome of the isolate used in this study, since it was obtained from H. H. Malherbe in 1977, has been shown to be homogeneous by electrophoretic analysis. However, our strain seems to contain the segment 4 with the higher electrophoretic mobility observed in the SA11 preparation employed by Pereira *et al.* (1984) whereas the strain utilized by Holmes *et al.* and Estes *et al.* contains the segment 4 with lower electrophoretic mobility. The difference between strains of SA11 could be explained by a rapid selection of different subpopulations which could have been present in quite different proportions in the preparations generously distributed by H. H. Malherbe. The difference between the slow and fast moving segment 4 is an

important one since these two segments fail to hybridize under highly stringent conditions and code for proteins having distinct electrophoretic mobility. This heterogeneity does not seem to occur in other segments of the genome of SA11. The RNA segments 2, 3, and 6 were able to hybridize under the same hybridization conditions. Furthermore, only a few differences in the nucleotide sequences, probably due to the expected divergence occurring between strains which are repeatedly passaged or cloned in independent laboratories, have been observed in different SA11 preparations for segments 6 (Both *et al.*, 1984; Estes *et al.*, 1984; and Arias *et al.*, unpublished), 8 (Both *et al.*, 1982; Arias *et al.*, unpublished), and 10 (Both *et al.*, 1983a; Arias *et al.*, unpublished).

The conservation of the amino acid sequence in different strains, in the region cleaved by trypsin, would suggest it has an important role in infection. We are presently studying the possible conservation of this sequence in other rotaviruses and the effect of synthetic peptides with similar sequences on viral infectivity.

ACKNOWLEDGMENTS

It is a pleasure to acknowledge the excellent technical assistance of T. Ballado, and the assistance of E. Merino with the computer. We also thank A. Navarro for help in some experiments, and F. Puerto and M. A. Loroño for performing the comparison of the different strains of SA11. This work was partially supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, and the World Health Organization.

REFERENCES

- ARIAS, C. F., LÓPEZ, S., BELL, J. R., and STRAUSS, J. H. (1984). Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 as deduced from cDNA sequence. *J. Virol.* 50, 657-661.
- ARIAS, C. F., LÓPEZ, S., and ESPINO, R. T. (1982). Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J. Virol.* 41, 42-50.
- BASTARDO, J. W., MCKIMM-BRESCHKIN, J. L., SONZA, S., MERCER, L. D., and HOLMES, I. H. (1981). Preparation and characterization of antisera to electrophoretically purified SA11 virus polypeptides. *Infect. Immun.* 34, 641-647.

- BOTI, G. W., BELLAMY, A. R., STREET, J. E., and SIEGMAN, L. J. (1982). A general strategy for cloning double-stranded RNA: Nucleotide sequence of the simian-11 rotavirus gene 8. *Nucleic Acids Res.* 10, 7075-7088.
- BOTI, G. W., SIEGMAN, L. J., BELLAMY, A. R., and ATKINSON, F. H. (1983a). Coding assignment and nucleotide sequence of simian rotavirus SA11 gene segment 10: Location of glycosylation site suggests that the signal peptide is not cleaved. *J. Virol.* 48, 335-339.
- BOTI, G. W., MATTICK, J. S., and BELLAMY, A. R. (1983b). The serotype-specific glycoprotein of simian-11 rotavirus: Coding assignment and gene sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3091-3095.
- BOTI, G. W., SIEGMAN, L. J., BELLAMY, A. R., IREGAMI, N., SHATKIN, A. J., and FURUKUCHI, Y. (1984). Comparative sequence analysis of rotavirus genomic segment 6—the gene specifying viral subgroups 1 and 2. *J. Virol.* 51, 97-101.
- CLARK, S. M., ROTH, J. R., CLARK, M. L., BARNETT, B. E., and SPENDLOVE, R. S. (1981). Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: Mechanism of enhancement. *J. Virol.* 39, 816-822.
- ERICSON, B. L., GRAHAM, D. Y., MASON, B. B., and ESTES, M. K. (1982). Identification, synthesis, and modifications of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cells. *J. Virol.* 42, 825-839.
- ESPEJO, R. T., LÓPEZ, S., and ARIAS, C. (1981). Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37, 156-160.
- ESPEJO, R. T., MARTINEZ, E., LÓPEZ, S., and MUÑOZ, O. (1980). Different polypeptide composition of two human rotavirus types. *Infect. Immun.* 28, 230-237.
- ESTES, M. K., GRAHAM, D. Y., and MASON, B. B. (1981). Pre-elytic enhancement of rotavirus infectivity: Molecular mechanisms. *J. Virol.* 39, 879-888.
- ESTES, M. K., MASON, B. B., CRAWFORD, S., and COHEN, J. (1984). Cloning and nucleotide sequence of the simian rotavirus gene 6 that codes for the major inner capsid protein. *Nucleic Acids Res.* 12, 1875-1887.
- GETHING, M. J., WHITE, J. M., and WATERFIELD, M. D. (1978). Purification of the fusion protein of Sendai virus: Analysis of the NH₂-terminal sequence generated during precursor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2737-2740.
- GREENBERG, H. B., VOLDUSUSO, J., VAN WYKE, K., MIDTHUN, K., WALSH, M., MCAULIFFE, V., WYATT, R. G., KALICA, A. R., FLORES, J., and HOSHINO, Y. (1983). Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of Rhesus rotavirus. *J. Virol.* 47, 267-275.
- GRUNSTEIN, M., and HOGNESS, D. S. (1975). Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3961-3965.
- HERRING, A. J., INGLIS, N. F., OJEH, C. K., SNODGRASS, D. R., and MENZIES, J. D. (1982). Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Gen. Microbiol.* 16, 473-477.
- HEWICK, R. M., HUNKAPILLER, M. W., HOOD, L. E., and DREYER, W. J. (1981). A gas-liquid solid phase peptide and protein sequencer. *J. Biol. Chem.* 256, 7990-7997.
- HOLMES, I. H. (1983). Rotaviruses. In "The Reoviridae" (W. K. Joklik, ed.), pp. 359-423. Plenum, New York.
- HUNKAPILLER, M. W., LUJAN, E., ONSTRANDER, F., and HOOD, L. E. (1982). Isolation of microgram quantities of protein from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. In "Methods in Enzymology" (C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, eds.), Vol. 91, pp. 227-236. Academic Press, New York.
- JOHNSON, N., HUNKAPILLER, M. W., and HOOD, L. E. (1979). Analysis of phenylthioindantoin amino acids by high-performance liquid chromatography on DuPont Zorbax cyanopropylsilane columns. *Anal. Biochem.* 100, 335-338.
- KALICA, A. R., FLORES, J., and GREENBERG, H. B. (1983). Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology* 125, 194-205.
- KALICA, A. R., GREENBERG, H. B., WYATT, J., FLORES, J., SERENO, M., KAPKIAN, A. Z., and CHANOCK, R. M. (1981). Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology* 112, 385-390.
- KYTE, J., and DOOLITTLE, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- MALHERBE, H. H., and STRICKLAND-CHOLMLEY, M. (1967). Simian virus SA11 and the related O agent. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 23, 235-245.
- MASON, B. B., GRAHAM, D. Y., and ESTES, M. K. (1980). In vitro transcription and translation of simian rotavirus SA11 gene products. *J. Virol.* 33, 1111-1121.
- MASON, B. B., GRAHAM, D. Y., and ESTES, M. K. (1983). Biochemical mapping of the simian rotavirus SA11 genome. *J. Virol.* 46, 413-423.
- MAXAM, A. M., and GILBERT, W. (1980). Sequencing end labeled DNA with base specific chemical cleavage. In "Methods in Enzymology" (L. Grossman and K. Moldave, eds.), Vol. 65, pp. 499-560. Academic Press, New York.
- PEREIRA, H. G., AZEREDO, R. S., FIALHO, A. M., and

- VIDAL, M. N. P. (1984). Genomic heterogeneity of simian rotavirus SA11. *J. Gen. Virol.* 65, 815-818.
- PORTER, A. G., BARBER, C., CAREY, N. H., HALLEWELL, R. A., THRELFALL, G., and EMTAGE, J. S. (1979). Complete nucleotide sequence of an influenza virus haemagglutinin gene from cloned DNA. *Nature (London)* 282, 471-479.
- RIGBY, P. W. S., DIECKMAN, M., RHODES, C., and BERG, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA Polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.
- RODGER, S. M., and HOLMES, I. H. (1979). Comparison of the genomes of simian, bovine, and human rotaviruses by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. *J. Virol.* 30, 839-846.
- RUTHER, U., KOENEN, M., OTTO, K., and MULLER-HILL, B. (1981). PUR222, a vector for cloning and rapid chemical sequencing of DNA. *Nucleic Acids Res.* 9, 4087-4098.
- SABARA, M., DEREGT, D., BABIUK, L. A., and MISKA, V. (1982). Genetic heterogeneity within individual bovine rotavirus isolates. *J. Virol.* 44, 813-822.
- SKEHEL, J. J., and WATERFIELD, M. D. (1975). Studies on the primary structure of the influenza virus haemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 93-97.
- SMITH, M. L., LAZDINS, L., and HOLMES, I. H. (1980). Coding assignments of double-stranded RNA segments of SA11 rotavirus established by *in vitro* translation. *J. Virol.* 33, 976-982.
- SOLER, C., MUSALEM, C., LOROÑO, M., and ESPEJO, R. T. (1982). Association of viral particles and viral proteins with membranes in SA11-infected cells. *J. Virol.* 44, 983-992.
- SPENCER, E. G., AVENDAÑO, L. F., and GARCÍA, B. I. (1983). Analysis of human rotavirus mixed electropherotypes. *Infect. Immun.* 39, 569-574.
- STREET, J. E., CHOIXON, M. C., CHADDERTON, W. F., and BELLAMY, A. R. (1982). Sequence diversity of human rotavirus strains investigated by Northern blot hybridization analysis. *J. Virol.* 43, 369-378.

Capítulo III

ENSAYOS CON PEPTIDOS SINTETICOS

ENSAYOS CON PEPTIDOS SINTETICOS

Como se mencionó en la introducción, cuando los rotavirus son tratados con tripsina, se observa un incremento en su infectividad y se ha demostrado que el efecto de esta enzima es específico sobre el polipéptido de capa externa, VP3. Este efecto, el cual genera VP5 y VP8 consiste en dos cortes, separados 6 aminoácidos uno del otro (ver capítulo II). Debido a que estos cortes no se realizan con una eficiencia del 100%, generan la formación de cuatro posibles extremos terminales: dos extremos amino para la proteína VP5 y dos extremos carboxilo para VP8, con la consecuente existencia de cuatro posibles polipéptidos, dos VP5's y dos VP8's, en los que la diferencia estriba en seis aminoácidos de más o de menos en uno de sus extremos.

Los cortes proteolíticos producidos en VP3 activan probablemente algún paso temprano en la replicación viral, en el cual podría(n) estar involucrado(s) alguno(s) de los extremos recién generados, o bien alguna(s) otra(s) región(es) de VP5 y/o VP8 que hubiera(n) experimentado un cambio conformacional debido al corte.

Para tratar de determinar si alguno(s) de los extremos recién generados tiene(n) efectivamente un papel importante en la infectividad viral, se recurrió al uso de péptidos sintéticos. Basados en la secuencia de aminoácidos de los extremos producidos en el rotavirus de simio SA11 (46), se sintetizaron oligopéptidos que mimetizaran las regiones carboxilo y amino terminales generadas por el corte proteolítico, con el objetivo de estudiar cual es el efecto de estos péptidos sobre las funciones de adsorción y penetración del virus a la célula huésped. Se han realizado estudios similares en el caso de los Paramixo- y Mixovirus, en los que se ha observado que un péptido que representa el amino terminal generado por el corte, es capaz de inhibir la penetración del virus a la célula (43).

Por otro lado, probaremos la capacidad de estos péptidos sintéticos, al ser utilizados como inmunógenos, para inducir anticuerpos específicos y estudiar si estos anticuerpos "antipeptido" tienen alguna actividad de neutralización sobre el rotavirus SA11.

El uso de péptidos sintetizados químicamente, de composición previamente determinada, ya sea a partir de la secuencia de aminoácidos obtenida directamente de la proteína, ó de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica, y el uso de estos péptidos sintéticos como inmunógenos para la producción de anticuerpos específicos contra estas regiones proteicas predeterminadas, se encuentra actualmente ampliamente documentada en la literatura (ver revisiones 47,48).

Para este trabajo se sintetizaron 5 péptidos (esquematisados en la Figura 3), que representan las siguientes regiones: Dos péptidos con la secuencia de los dos extremos amino terminal detectados al secuenciar directamente la proteína VP5 (ver capítulo II): dos péptidos que mimetizan la secuencia de aminoácidos de los 2 posibles extremos carboxilo y además un péptido que comprende ambas regiones. La síntesis química de los péptidos se llevó a cabo siguiendo la técnica de síntesis en fase sólida descrita por Merrifield (49,50).

Representación de los Péptidos Sintetizados
para el Rotavirus SA11

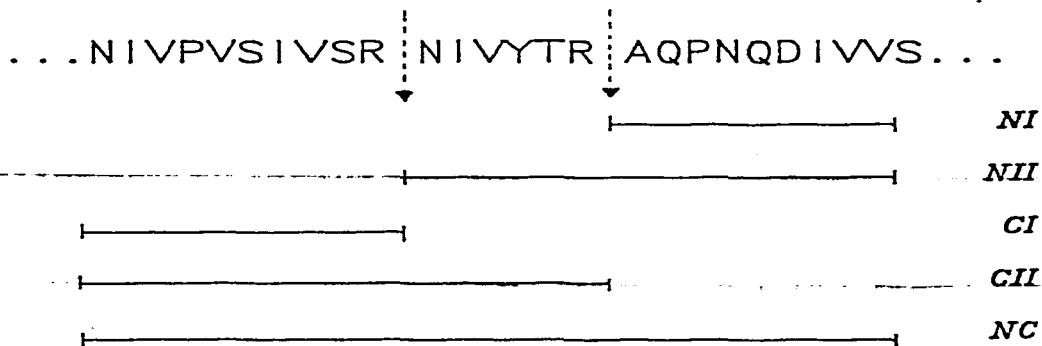


Figura 3.- Representación esquemática de los péptidos sintetizados.

SINTESIS QUIMICA DE PEPTIDOS

La técnica de síntesis en fase sólida, descrita en 1960 por B. Merrifield simplificó y aceleró enormemente la síntesis de péptidos ya que, comparandola con los métodos tradicionales de síntesis en fase líquida, esta técnica es mucho más rápida y eficiente. Además se obtiene un alto rendimiento final del oligopéptido, ya que se evitan las pérdidas debidas a la purificación de los productos intermedarios en cada paso. El principio fundamental de este método consiste en ensamblar aminoácidos uno a uno, mientras que uno de los extremos de la cadena péptidica se encuentra anclado a un soporte sólido e insoluble. Una vez terminado el péptido con la secuencia deseada, éste se libera químicamente del soporte quedando libre en solución.

Básicamente, la técnica consiste en cuatro pasos: (Figura 4)

- 1.- El primer aminoácido, protegido en su grupo alfa amino es unido a una resina mediante esterificación.
- 2.- El grupo protector del alfa amino del aminoácido, es removido mediante un tratamiento ácido.
- 3.- El grupo alfa amino, que queda protonado, es neutralizado con una base.
- 4.- El grupo amino libre es acoplado al extremo carboxilo del siguiente aminoácido (cuyo alfa amino esta a su vez protegido), mediante un agente acoplante.

Todos los productos no reactivos son removidos por filtración y los pasos 2 al 4 son repetidos tantas veces como aminoácidos se desee incorporar en el oligopéptido.

PLAN BASICO DE LA SINTESIS DE PEPTIDOS EN FASE SOLIDA

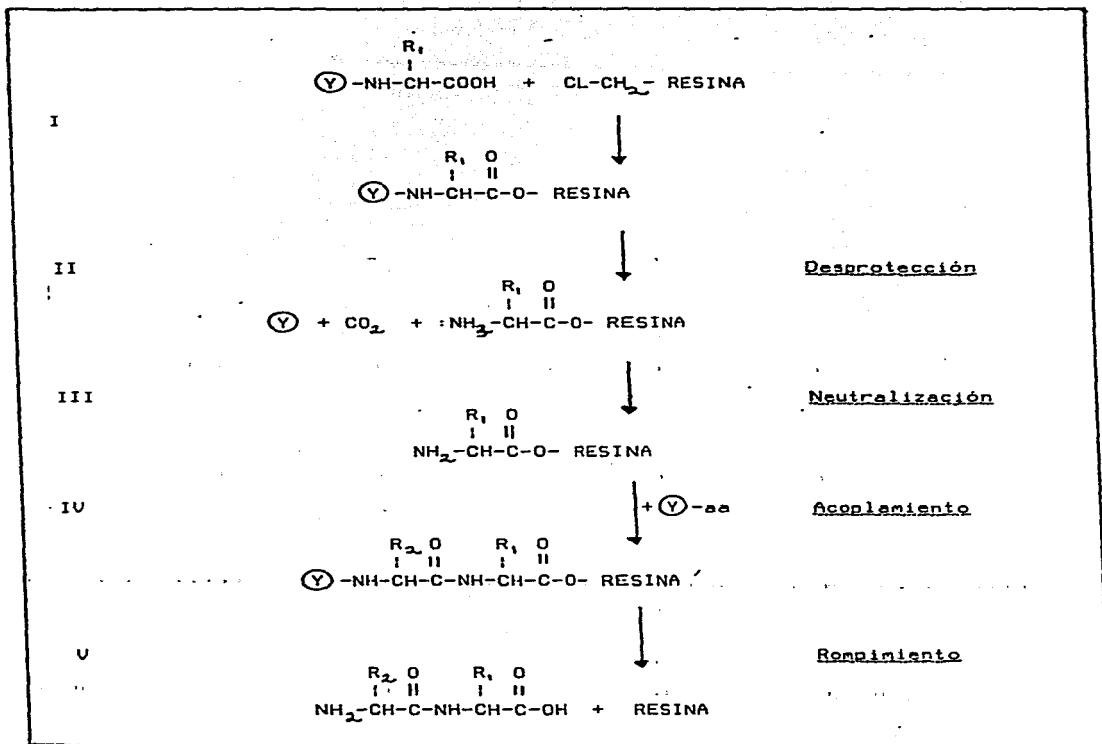


Figura 4.-



R = grupos funcionales de los aminoácidos

En este trabajo, la resina empleada es un copolimero de estireno con divinilbenceno, en la cual los anillos de benceno están clorometilados, para proveer un grupo reactivo para el acoplamiento del primer aminoácido. De hecho, existen comercialmente resinas a las cuales se les ha unido ya el primer aminoácido, de manera que se elige la resina-aminoácido necesaria para la síntesis a realizar.

Como grupo protector del alfa amino de los aminoácidos generalmente se utiliza t-butiloxycarbonil (Boc), el cual puede ser removido con un tratamiento ácido suave, que no afecta las uniones peptídicas, ni la unión del péptido a la resina.

El agente acoplante más utilizado es la dicitclohexil-carbodiimida (DCCI), la cual activa el carboxilo del aminoácido y promueve la formación del enlace peptídico con el grupo amino del otro aminoácido.

Además de la protección del grupo alfa amino de los aminoácidos, en algunos casos es necesario proteger los grupos funcionales de éstos para evitar reacciones no deseadas, en este caso, la elección de los grupos protectores de los grupos funcionales, se hace de manera que estos no sean sensibles al tratamiento utilizado para remover el grupo protector del alfa amino (51).

Una vez terminada la síntesis, es necesario remover todos los grupos protectores de los grupos funcionales y separar el péptido de la resina. El método más comúnmente empleado para este fin es el rompimiento con ácido fluorhídrico.

La dirección de esta síntesis es de carboxilo a amino (Fig. 4); por lo que para la síntesis de los péptidos NI, NII y NC (Fig. 3), se partió de 1.5 gramos de resina-valina y éstos péptidos se sintetizaron simultáneamente, retirando 0.5 g. de resina al llegar al extremo amino de cada péptido deseado. Para la síntesis de los péptidos CI y CII, se partió de 0.5 g. de resina-arginina para cada uno de ellos y se sintetizaron separadamente.

Una vez concluida la síntesis de los 5 péptidos, se tomó una pequeña muestra de cada una de las resinas-péptido y después de una hidrólisis ácida, se analizó su composición de aminoácidos. Los resultados de este análisis se muestran en las Tablas II y III, junto con la composición esperada para cada péptido; cabe aclarar que la composición de aminoácidos que se obtiene del análisis de un péptido sintético crudo (como es el caso), es la composición de la suma de los péptidos obtenidos, ya que existe la posibilidad de que durante la síntesis se formen péptidos truncados ó péptidos a los que no se les unió un cierto aminoácido. Cuando la proporción de estos péptidos defectuosos es muy alta, la composición de aminoácidos que se obtiene se desvía mucho de la composición esperada, y en estos casos se recomienda ya sea la purificación del péptido deseado ó una nueva síntesis.

En las tablas II y III se observa que la composición de aminoácidos de los péptidos NI, NII y CII, es bastante cercana a la composición esperada, mientras que la composición de los péptidos CI y NC no lo es.

En este tipo de síntesis se calcula que la eficiencia de acoplamiento en cada ciclo es de aproximadamente 99%, por lo que mientras más largo sea un péptido más probable será la aparición de péptidos "defectuosos". Esta podría ser la explicación para los resultados encontrados con el péptido NC el cual contiene 25 aminoácidos. Además, como puede observarse tanto este péptido como el péptido CI tienen un alto contenido de aminoácidos no polares, incluyendo pares de Val-Ile. Esta pareja de aminoácidos es especialmente difícil de acoplar por métodos químicos debido a su hidrofobicidad. Pensamos que esta es la explicación más plausible para los resultados del péptido CI. Dada la composición encontrada para estos dos péptidos, era de esperarse que una muy pequeña proporción de los péptidos obtenidos tuviese la secuencia deseada, por lo que se decidió no utilizarlos y repetir su síntesis en el futuro.


ro.

Tabla II


COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LOS PEPTIDOS
NI, NII Y NC

aa	NI		NII		NC	
	encontrado	esperado	encontrado	esperado	encontrado	esperado
Asp	2.05	2	3.03	3	4.37	3
Treo	--	--	0.95	1	1.17	1
Ser	--	--	--	--	0.70	2
Glu	1.98	2	2.65	2	3.65	2
Pro	0.97	1	1.20	1	2.44	2
Ala	0.96	1	1.00	1	1.90	1.33
Val	2.28	2	3.05	3	5.44	6
Ile	0.72	1	1.14	2	1.85	3
Tyr	--	--	0.45	1	0.88	2
Arg	--	--	0.94	1	1.42	1.66
total		9		15		25


NI -

A-Q-P-N-Q-D-I-U-V-

NII -

N-I-U-Y-T-R-A-Q-P-N-Q-D-I-U-V-

NC -

N-I-U-P-V-S-I-U-S-R-N-I-U-Y-T-R-A-Q-P-N-Q-D-I-U-V-
A

*) Durante la síntesis se separó un tercio de la resina al llegar a este aminoácido y se le añadió alanina en vez de arginina; posteriormente las resinas se volvieron a mezclar y se continuó la síntesis.

 Resina.

Tabla III

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LOS PEPTIDOS
CI Y CII

aa	CI		CII	
	encontrado	esperado	encontrado	esperado
Asp	2.01	2	0.84	1
Treo	1.95	1	--	--
Ser	1.61	2	2.78	2
Pro	0.99	1	0.84	1
Val	2.86	4	2.92	3
Ile	1.76	3	1.28	2
Tyr	1.79	1	0.60	1
Arg	2.99	3	1.70	1
		---		---
	total	16		11

CI = N-I-V-P-V-S-I-V-S-R-N-I-V-Y-T-R-⊗

CII = Y-N-I-V-P-V-S-I-V-S-R-⊗

*) Esta tirosina no está incluida en la secuencia original; se
se añadió para propósitos de marcaje con I-125

⊗ resina

ENSAYOS BIOLÓGICOS CON LOS PEPTIDOS

Como se mencionó en el capítulo II, cuando el rotavirus SA11 es tratado con quimotripsina, el polipéptido UP3 se corta específicamente en dos polipéptidos de pesos moleculares muy similares a VPS y VP8 (los productos obtenidos con tripsina), sin embargo este corte proteolítico no resulta en un incremento de la infectividad viral (52). Existe solamente un posible sitio para quimotripsina cercano a los dos sitios de corte por tripsina y está localizado precisamente entre ellos. Esto explicaría la similitud de los pesos moleculares de los productos obtenidos con las dos enzimas proteolíticas. Ikegami y colaboradores han presentado evidencia de que cuando el virus es tratado con quimotripsina no hay un incremento de la infectividad viral, pero si posteriormente este virus es tratado con tripsina, hay un incremento de la infectividad muy similar al observado al tratar al virus solamente con tripsina (53). Estos datos sugieren que la región localizada entre los dos sitios de corte por tripsina podría ser dispensable para la activación de la infectividad, sin embargo no se descarta la posibilidad de que esta región intermedia juegue algún papel en las primeras interacciones del virus con su célula huésped.

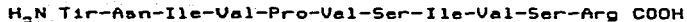
Dados estos antecedentes, se comenzaron los ensayos biológicos con los péptidos CII y NI que representan las regiones carboxilo y amino terminales y que no contienen la secuencia de aminoácidos entre los dos sitios de corte. El objetivo de estos ensayos es el de determinar si existe algún efecto de estos péptidos sobre la infectividad del rotavirus SA11. En este capítulo se presentaran datos preliminares obtenidos con algunos de estos estudios.

Un ensayo relativamente fácil para determinar el efecto de los péptidos sintéticos sobre la infección por rotavirus, consiste en observar su acción sobre la capacidad que tiene el rotavirus de destruir, de manera característica, una monocapa de células en cultivo (efecto citopático). En éstos ensayos se utilizaron monocapas de células epiteliales de riñón de mono MA 104, crecidas en cajas de 96 pozos. Cada pozo fué infectado con una cantidad igual de virus, en presencia o ausencia de concentraciones variables de péptido. Como controles se utilizaron células no infectadas con y sin péptido. El efecto citopático se determinó al microscopio a las 24 y 48 hr. después de la infección y posteriormente las células se fijaron y se tiñeron con el colorante Cristal Violeta (53).

Otra manera de detectar modificaciones en la infectividad viral, fué a través del ensayo de focos fluorescentes. Este método cuantifica, mediante la detección de los antígenos virales, el número de células que han sido infectadas. En estos experimentos se utilizaron monocapas de células MA 104, crecidas sobre cubreobjetos, las cuales fueron infectadas con una baja multiplicidad de virus. A tiempos tempranos post-infección, las células se permeabilizaron y se fijaron con acetona y se incubaron con un anticuerpo policlonal de cuyo contra el rotavirus SA11; posteriormente esta reacción antígeno-anticuerpo se reveló con un segundo anticuerpo anti-IgG de cuyo, marcado con fluoresceína. Las células así tratadas se observaron en un microscopio de epifluorescencia y se contó el número de focos fluorescentes en cada cubreobjetos. Este ensayo se llevó a cabo infectando células con cantidades iguales de rotavirus SA11 y en presencia o en ausencia de los péptidos NI y CII. Como controles se utilizaron células no infectadas con y sin péptido.

EFEECTO DEL PEPTIDO CII SOBRE LA INFECTIVIDAD POR ROTAVIRUS SA11

El péptido CII representa la región carboxilo terminal del sitio de corte por tripsina, y su secuencia es:



Como se puede notar, este péptido tiene un alto contenido de aminoácidos no cargados, lo que se refleja en su baja solubilidad en soluciones acuosas. La solubilidad máxima que se alcanzó fué de 0.5 mg/ml y por lo tanto, esta es la concentración más alta a la que se puede probar su efecto sobre las células en cultivo. Este péptido es soluble en solventes orgánicos, tales como dimetil sulfóxido, a concentraciones hasta de 20 mg/ml, pero no se utilizaron debido a que estos solventes causan algunos efectos sobre las células en cultivo, que podrían obscurecer el efecto del péptido per se.

En la figura 5, se muestra uno de los experimentos en los que se probó el efecto del péptido CII, sobre el efecto citopático viral. Las células se tiñeron con cristal violeta 48 hr después de haber sido infectadas. Como se puede observar, la monocapa de células control, no infectadas (ya sea en presencia o en ausencia del péptido) aparece integra, mientras que, cuando las células fueron infectadas con el rotavirus SA11, se observa un efecto citopático total a las 48 hr, por lo que todas las células se han desprendido y no existe material celular teñible en estos pozos. Cuando las células fueron infectadas en presencia de distintas concentraciones del péptido CII (variando desde 0.5 mg/ml hasta 0.15 mg/ml) se observó que, a las concentraciones más altas de péptido, el efecto citopático (evaluado tanto por tinción como por observación directa al microscopio) fué menos severo que en presencia de concentraciones

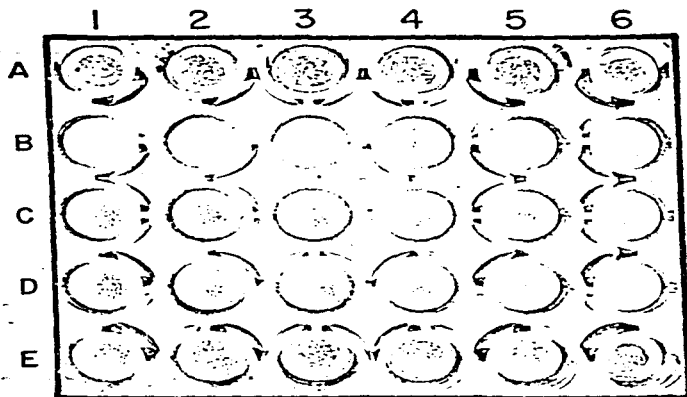


Figura 5.- Efecto del péptido CII sobre la infectividad viral. Las células se fijaron y tiñeron con Cristal Violeta a las 48 hr post-infección.

- A) 1-6 Células no infectadas
 B) 1-6 Células infectadas con una dilución 1:2 de rotavirus SA11
 C, D) Células infectadas con una dil. 1:2 de SA11, en presencia de concentraciónes variables de péptido CII (duplicado)
 E) Células incubadas en presencia de péptido CII
 En las líneas C, D y E la concentración de péptido fué la siguiente: 1) 500 $\mu\text{g/ml}$, 2) 250 $\mu\text{g/ml}$, 3) 125 $\mu\text{g/ml}$, 4) 62.5 $\mu\text{g/ml}$
 5) 31.1 $\mu\text{g/ml}$ y 6) 15.6 $\mu\text{g/ml}$

menores del péptido o en ausencia de éste.

El efecto de este péptido parece ser específico para la infección por rotavirus SA11, ya que como control se ha realizado este mismo ensayo infectando células con el virus Sindbis, el cual también produce un efecto citopático en las células, pero pertenece a otra familia completamente distinta y en este caso no se ha observado ninguna diferencia entre las células infectadas en presencia o en ausencia del péptido (datos no mostrados).

Este aparente efecto de protección a altas concentraciones de péptido se ha observado repetitivamente en varios ensayos de este tipo, sin embargo, es necesario mencionar que al observar al microscopio las células infectadas en presencia del péptido, éstas no aparecen completamente sanas, aunque tampoco presentan la apariencia de las células infectadas en ausencia del péptido.

Para corroborar esta primera observación y para cuantificar el número de células infectadas en presencia y en ausencia del péptido CII, se realizó el ensayo de focos fluorescentes. En la Tabla IV se presentan los resultados de esta cuantificación, donde se puede notar que no existe una diferencia significativa entre el número de focos fluorescentes encontrados en las células control (sin péptido) y el encontrado en las células infectadas en presencia del péptido, ya sea a 8 ó a 24 horas post-infección.

Hasta ahora, los resultados obtenidos no son muy claros, sin embargo, la disminución del efecto citopático, causada por este péptido (que representa la región carboxilo terminal), es un dato que se ha observado repetitivamente y parece ser específico para el rotavirus SA11 como se mencionó anteriormente.

El efecto citopático observado en estos ensayos es el resultado de varios ciclos de replicación viral, por lo que es posible que el péptido no interfiera en la infección inicial, sino que sólo afecte las subsiguientes rondas

Tabla IV

NUMERO DE FOCOS FLUORESCENTES AL INFECTAR EN PRESENCIA O EN AUSENCIA DE LOS PEPTIDOS CII Y NI

Celulas(*)	A		B	
no infect.	--	--	--	--
infect.	143	136	232	268
infect + pep CII (&)	148	150	241	249
infect + pep NI (O)	243	264	+++	+++

(*) Monocapas de células MA 104, crecidas en cubreobjetos de mm. fueron infectadas con un inóculo igual de virus SA11, añadiendo o no el péptido indicado durante la infección. Cada ensayo se realizó por duplicado. Los valores reportados indican el número de focos fluorescentes encontrados, contando una línea a lo largo del diámetro del cubreobjetos.

A) No. de focos fluorescentes encontrados a las 8 hr post-infección.

B) No. de focos fluorescentes presentes a las 24 hr post-infección.

(&) Células infectadas en presencia de 0.5 mg/ml de péptido CII.

(O) Células infectadas en presencia de 1 mg/ml de péptido NI.

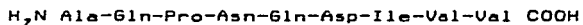
de replicación. Esto podría explicar el resultado obtenido en los ensayos de efecto citopático, en los que las células infectadas en presencia de las más altas concentraciones del péptido se observan "parcialmente" protegidas. Esta misma idea explicaría los resultados obtenidos en la cuantificación de focos fluorescentes, ya que en este ensayo se cuantifica exclusivamente la infección primaria. Si esta fuese la explicación para los resultados obtenidos, sería de esperarse que el rendimiento total de partículas virales fuese menor cuando las células son infectadas en presencia del péptido CII.

Una manera indirecta de cuantificar este rendimiento sería a través de la titulación de las unidades hemaglutinantes resultantes de la infección en presencia de péptido. Como se ha mencionado en la introducción, las partículas virales completas tienen la capacidad de hemaglutinar eritrocitos, por lo que la medición de las unidades hemaglutinantes cuantificaría indirectamente el rendimiento del virus. Otra manera más directa sería la titulación del número de partículas infectivas obtenidas en cada caso a través de un ensayo en placa. Estos ensayos aún no se han realizado.

En caso de confirmarse el posible papel inhibitorio de este péptido sobre la infectividad viral, sería muy interesante estudiar a que nivel está actuando.

EFFECTO DEL PEPTIDO NI SOBRE LA INFECTIVIDAD DEL ROTAVIRUS SA11

El péptido NI representa la región amino terminal generada por el corte proteolítico. Este péptido, cuya secuencia se muestra a continuación, no contiene la secuencia de aminoácidos que hay entre los dos sitios para tripsina.



Al estudiar el efecto del péptido NI sobre el efecto citopático causado por el virus, se encontró que las células infectadas en presencia de las más altas concentraciones de péptido presentaban un efecto citopático mucho más severo y a tiempos más cortos, que el observado en las células infectadas en ausencia de éste. El daño producido en las células infectadas en presencia del péptido es causado por la infección viral, ya que los controles de células no infectadas, pero mantenidas en presencia del péptido, aparecen sanas.

En la figura 6 se muestran los resultados de un ensayo de este tipo, en el cual las células fueron teñidas 24 hr después de la infección. Como se puede observar, a este tiempo las células infectadas en ausencia del péptido, aún no presentan muestras de daño, mientras que las células infectadas en presencia del péptido NI presentan un efecto citopático que es dependiente de la concentración del péptido. El efecto más severo se nota en las concentraciones más altas empleadas i.e. 1, 0.5 y 0.25 mg/ml.

En un experimento similar al anteriormente descrito, además de estudiar el efecto citopático, se recolectó el medio de cultivo de cada uno de los pozos y se titularon las unidades hemaglutinantes en cada caso. Esta es una manera indirecta de cuantificar la posible diferencia en la cantidad de partículas virales producidas en ausencia o en presencia del péptido NI.

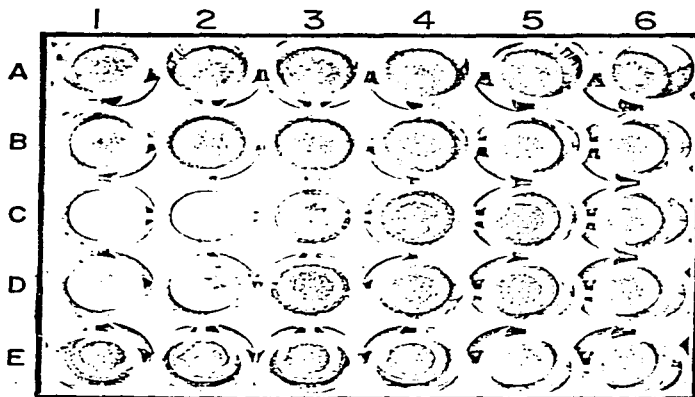


Figura 6.- Efecto del péptido NI sobre la infectividad viral. Las células se fijaron y tiñeron con Cristal Violeta a las 24 hr post-infección.

A) 1-6 Células no infectadas

B) 1-6 Células infectadas con una dilución 1:2 de rotavirus SA11

C, D) Células infectadas con una dil. 1:2 de SA11, en presencia de concentraciones variables de péptido NI (duplicado)

E) Células incubadas en presencia de péptido NI

En las líneas C, D y E la concentración de péptido fue la siguiente: 1) 2 mg/ml, 2) 1 mg/ml, 3) 500 μ g/ml, 4) 250 μ g/ml, 5) 125 μ g/ml, 6) 62.5 μ g/ml.

En esta titulación se encontró que a las 48 hr post-infección, hay del orden de 4 veces más unidades hemaglutinantes en el medio de las células infectadas en presencia del péptido NI que en el medio de las células infectadas con la misma cantidad de virus, pero en ausencia del péptido. Como control se estudió el efecto del péptido sobre la hemaglutinación y éste no tuvo ningún efecto. Estos resultados preliminares sugieren que las diferencias observadas en el tiempo de aparición y la severidad del efecto citopático entre la infección, con y sin péptido, parecen resultar además, en un incremento de la progenie viral.

Para estudiar la especificidad del efecto de este péptido sobre la infección por rotavirus, se probó su efecto sobre la infección con el virus Sindbis. En este caso, al infectar las células en presencia o en ausencia del péptido, no se encontró ninguna diferencia sobre el efecto citopático causado por este virus (datos no mostrados). Estos datos sugieren que el efecto de este péptido, es específico sobre el rotavirus SA11.

En otro de los experimentos hechos con el péptido NI, se cuantificó el número de focos fluorescentes, en las diferentes condiciones de infección. En la Tabla IV se muestran éstos resultados, junto con los obtenidos con el péptido CII. Como se puede notar, existe una diferencia entre las células infectadas en presencia o en ausencia del péptido NI. Las células infectadas en presencia del péptido presentan aproximadamente dos veces más focos fluorescentes que las células control (contados a las 8 hr post-infección). Cuando se cuantificó el número de focos fluorescentes a las 20 hr después de la infección se encontró que prácticamente el 100% de las células infectadas en presencia del péptido se veían fluorescentes, por lo que no era posible contarlas. En contraste, en las células infectadas en ausencia del péptido, sólo se nota un aumento de dos veces en el número de focos fluorescentes entre 8 hr y 20 hr post-infección.

Los resultados obtenidos con este péptido tanto en los ensayos de efecto citopático como en los de inmunofluorescencia fueron completamente inesperados. De hecho, durante mucho tiempo las observaciones del efecto citopático en presencia del péptido NI no fueron tomadas en cuenta como resultados significativos, ya que el efecto que se buscaba era el de una competencia del péptido con el virus de manera que hubiese una disminución o inhibición de la infectividad viral. Los datos obtenidos en la cuantificación de focos fluorescentes fueron los que nos llamaron la atención y entonces se revisó con más detalle el efecto de este péptido sobre el efecto citopático. La titulación de unidades hemaglutinantes parece indicar además, que el aparente aumento de la infectividad viral (observado en los ensayos de efecto citopático y de inmunofluorescencia), resulta en un aumento de la progenie viral.

El mecanismo por el cual el péptido NI actúa, dando como resultado esta aparente activación, es difícil de explicar con los ensayos hasta ahora realizados. Cabe aclarar que los resultados presentados tanto con el péptido NI como con el péptido CII, son preliminares y queda aún mucho trabajo por realizarse con ambos, para demostrar si es que la hay, su actividad sobre la infectividad viral.

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, tenemos planeado utilizar éstos péptidos, ya sea solos o acoplados a una proteína acarreadora, como inmunógenos para la producción de anticuerpos específicos. Con estos anticuerpos anti-péptido, pensamos estudiar su efecto sobre la infectividad viral en ensayos similares a los descritos en este capítulo y estudiar si alguno de estos anticuerpos tiene alguna actividad (neutralizante u otra) sobre el virus.

Capítulo IV

Conservation in rotaviruses of the protein region

containing the two sites associated with trypsin enhancement
of infectivity.

Artículo sometido a publicación en Virology

CONSERVATION IN ROTAVIRUSES OF THE PROTEIN REGION CONTAINING
THE TWO SITES ASSOCIATED WITH TRYPSIN ENHANCEMENT OF INFECTIVITY

Susana López*, Carlos F. Arias, Ernesto Méndez, and
Romilio T. Espejo

Departamento de Biología Molecular
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-228
México City, 04510, México
(905) 550-5215 (x3587)

* Author to whom requests for reprints should be adressed

ABSTRACT

The primary structure of the region in the outer layer protein VP3, containing the two sites associated with trypsin enhancement of infectivity of rotavirus was found to be greatly conserved in cultivable human rotavirus serotypes 1 (Wa), 2 (DS1), and 3 (P) and in four human rotaviruses directly purified from feces. Significant differences with this conserved sequence were found in human rotavirus serotype 4 (ST3), isolated from an asymptomatic neonate, and in seven animal rotaviruses. However, the two trypsin cleavage sites were conserved in every rotavirus VP3 sequence analyzed.

Rotavirus virions are composed of a genome made up of 11 segments of double-stranded (ds) RNA (1) and a double layered capsid. The outer layer of the simian rotavirus SA11 is made up of two proteins, VP3 and VP7 (2). VP3 is the product of RNA segment 4 and is responsible for trypsin-enhanced infectivity, hemagglutination activity and, like VP7, for induction of neutralizing antibodies (3,4). The enhancement of infectivity by trypsin, which is commonly observed among rotaviruses, is due in SA11 to the specific cleavage of VP3 at the two close arginines within the sequence ...NTRNIVPVSIVSR*NIVYTR*AQPNQDIVVSKTS...(5). This cleavage probably activates an early step of replication triggered by one or both of the ends generated or by a conformational change in VP3.

Trypsin activation of myxo and paramyxoviruses

generates a highly conserved amino terminus and the infectivity of these activated viruses can be blocked by oligopeptides that mimic this sequence (6,7). A similar phenomenon may also occur among rotaviruses. Knowledge of the degree of conservation of the region cleaved by trypsin among rotaviruses of different serotype and/or origin could help to elucidate the role of this region in the infection process. In this work, we determined the sequence of this region of VP3 in rotaviruses which had been isolated from different animal species and which belonged to different subgroups and serotypes.

All cultivable rotaviruses were grown in MA104 cells as previously described (8). Both cultivated and noncultivated rotaviruses were purified and the viral cores were used in an in vitro transcription reaction to produce viral mRNA's (9). After phenol extraction and LiCl precipitation, the resultant viral mRNA's were resuspended in water and stored at -20°C until used.

To obtain the nucleotide sequence of the region encoding the trypsin cleavage sites, the total viral mRNA was hybridized to a 18-mer synthetic primer, and the sequence was determined by the dideoxy chain termination method using AMV-reverse transcriptase as described (10). The primer was manually synthesized by the solid-phase triester method (11) with the sequence 5' TATATTGCATTTCTTCC 3', which is

complementary to the sequence in the mRNA of VP3 which starts 43 nucleotides downstream from the righthand arginine of the cleavage site (5).

The deduced aminoacid sequence of the region containing the trypsin cleavage sites in the outer layer protein (VP3) of the 15 rotaviruses which were analyzed is shown in figure 1. The four human rotaviruses directly purified from feces were selected to represent the two commonly found subgroups according to the RNA electrophoretic migration pattern (12). An identical amino acid sequence was found among viruses belonging to the same subgroup; there was also a 100% homology in the nucleotide sequence among these viruses. Comparison of the aminoacid sequence between different subgroups showed differences in three aminoacids: leucine instead of serine, leucine instead of valine and lysine instead of arginine, the two last differences being conservative changes. The nucleotide sequence homology between noncultivated rotaviruses of subgroups I and II was 88%.

The aminoacid sequence of the human rotaviruses belonging to subgroup I directly purified from feces was identical to that of the serotype 2 prototype strain DS1 which also belongs to subgroup I. The sequence of subgroup II rotaviruses was very similar to that of the serotype 3 prototype strain P and to that of serotype 1 prototype strain Wa, both of which belong to the same subgroup. This was not the case with the other

cultivable rotavirus of subgroup II, strain ST3 with serotype 4, which was isolated from the feces of an asymptomatic neonate (13). The amino acid and nucleotide sequence of this strain differed from prototype strains 1, 2, 3 and the noncultivated human rotaviruses by about 30% and 33%, respectively. Differences of the same order were observed between human rotavirus serotypes 1, 2, and 3 and rotaviruses obtained from different animal species.

The conservation found among human rotaviruses, with the exception of strain ST3, was not found among rotaviruses isolated from the same animal species. For example, the two cultivable porcine rotaviruses analyzed (Gottfried and YM) showed only 73% homology. NCDV, a cultivable bovine rotavirus, differed by 50% from the two bovine rotaviruses purified directly from feces. SAll is a special case because the two strains compared were recently recognized by the difference in the electrophoretic migration of RNA segment 4 (14), which codes for VP3, in a preparation originally obtained from the same vervet monkey. An homology of only 58% in the amino acid sequence studied was found between these two strains. Unexpectedly, the SAll containing the faster migrating segment 4 was found to be 87% homologous with the bovine rotavirus NCDV.

Although differences in amino acid sequence of up to 50% were found between some isolates, every rotavirus analyzed showed not only conservation of the two trypsin cleavage sites which have been demonstrated for rotavirus SAll (5), but also significant conservation at the extremes of the sequenced region. The two trypsin cleavage sites were arginines in all the cases and occurred in the same position in every isolate analyzed, except for the two non cultivated bovine rotaviruses. The nucleotide triplet coding for the arginines was also very conserved as AGA or AGG, except in strains ST3 and Gottfried in which the arginine in the righthand trypsin site was coded by CGU.

In all the human rotaviruses analyzed except for ST3, there is an additional potential trypsin cleavage site next to the righthand site. Interestingly, among the rotaviruses analyzed this extra site was always lysine in subgroup II and arginine in subgroup I; this additional site may improve the activation by trypsin.

The serotype of the rotaviruses analyzed is also indicated in Figure 1. The region analyzed did not seem to be directly related to the serotype of the virus because, at times, it was very different between isolates of the same serotype (i.e., P vs. SAll 4f or 4s) or similar between different serotypes (i.e., DS1 vs. P; NCDV vs SAll 4f).

VP3 in S111 virions can also be cleaved by chymotrypsin, rendering a polypeptide which has a molecular weight similar to that of VP5 but which does not enhance infectivity (15; Espejo et al., unpublished observations). It is likely that chymotrypsin acts at the tyrosine located between the two trypsin cleavage sites. This potential site was conserved in NCDV and in all the human rotaviruses analyzed but was absent in the porcine and in the Mexican bovine rotaviruses.

It was very interesting to find that ST3, the strain isolated from an asymptomatic neonate, had a very different sequence to that found in all the other human rotavirus strains. This finding suggests that, at least in this case, the absence of clinical illness might have been due to infection with an atypical human rotavirus. However, one of the human rotaviruses (CI) sequenced was also obtained from an asymptomatic six-month old infant, but at this age subclinical infections may be explained differently by several other factors such as previous rotavirus infections.

As reported by others, while doing primer extension experiments, bands at a particular position in all four lanes of the sequencing gel occasionally appeared (16), but they did not change the codon meaning except for one amino acid in NCDV for which the uncertainty could not be resolved (asterisk in Fig. 1).

These artifactual bands usually occurred at the same nucleotide position among rotaviruses with similar sequence. These bands may be the result of a decreased rate of transcription by the AMV-reverse transcriptase in this region or be caused by a possible heterogeneity of the mRNA employed, particularly when the mRNA was synthesized from virus directly purified from feces.

A possible relationship between the sequence of the trypsin cleavage site and species specificity or pathogenicity may be inferred from this results, but demonstration of such a relationship requires further studies of this region in carefully chosen strains of rotavirus.

FIGURE LEGEND

Figure 1. Deduced amino acid sequence of the trypsin cleavage region in VP3 from different strains of rotavirus.

Rotaviruses are designated in the following order: animal origin, country, and year of isolation; subgroup (Roman numerals); serotype (Arabic numerals) when known, and finally, common designation.

The one letter amino acid code was used. Shaded areas represent regions not sequenced; (*) amino acid not determined due to technical difficulties. The vertical lines point out the positions of the two conserved arginines which have been shown to be cleaved by trypsin in SAll4f.

Rotavirus strains Wa, DS1, P, ST3 and Gottfried were obtained from Y. Hoshino (National Institutes of Health, Bethesda). ST3 was the direct isolate, not a reassortant. NCDV was obtained from R. S. Spendlove (Utah State University, Salt Lake City). SAll4f is an isolate which has been successively passed in our laboratory since originally obtained from H. H. Malherbe (University of Texas, Houston) in 1977. SAll4s was supplied by M. K. Estes (Baylor College of Medicine, Houston). The difference between these two SAll's has been previously described (5,14). YM is a

cultivable strain originally obtained in México from a diarrheic piglet. CII, LI, and LII were obtained from feces of children with diarrhea. CI was obtained from the stools of an asymptomatic six-month old child. BI and BII were obtained from feces of diarrheic calves.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to X. Soberón, M. A. Cuevas Guerrero and F. Márquez for the synthesis of the oligonucleotide. This work was partially supported by grant PCCBBNA-021711 from the Programa Nacional Indicativo de Salud of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of México.

1. Rodger S. M., and Holmes I. H. J. Virol. 30: 839-846 (1979).
2. Espejo R. T., López S., and Arias C. J. Virol. 37: 156-160 (1981).
3. Kalica A. R., Flores J., and Greenberg H. B. Virology 125: 194-205 (1983).
4. Greenberg H. B., Valdesuso J., Van Wyke K., Midthun K., Walsh M., Mc Auliffe V., Wyatt R. G., Kalica A. R., Flores J., and Hoshino Y. J. Virol. 47: 267-275 (1983).
5. López S., Arias C. F., Bell J. R., Strauss J. H., and Espejo R. T. Virology 144: 11-19 (1985).
6. Richardson C. D., Scheid A., and Choppin P. W. Virology 105: 205-222 (1980).
7. Richardson C. D., and Choppin P. W. Virology 131: 528-532 (1983).
8. Espejo R. T., Calderón E., González N., Salomon A., Martuscelli A., and Romero P. J. Infect. Dis. 139: 474-477 (1979).
9. Flores J., Myslinski J., Kalica A. R., Greenberg H. B., Wyatt R. G., Kapikian A. Z., and Chanock R. M. J. Virol. 43: 1032-1037 (1982).
10. Hamlyn P. H., Brownlee G. G., Cheng Ch., Gait M. J., and Milstein C. Cell 15: 1067-1075 (1978).

11. Ito H., Ike Y., Ikuta S., and Itakura K. Nucleic Acid Res. 10: 1755-1769 (1982).
12. Kalica A. R., Greenberg H. B., Espejo, R. T., Flores, J., Wyatt R. G., Kapikian A. Z., and Chanock R. M. Infect. Immun. 33: 958-961 (1981).
13. Wyatt R. G., James H. D., Pittman A. L., Hoshino Y., Greenberg H. B., Kalica A. R., Flores J., and Kapikian A. Z. J. Clin. Microbiol. 18: 318-317 (1983).
14. Pereira H. G., Azeredo, R. S., Fialho A. M., and Vidal M. N. P. J. Gen. Virol. 65: 815-818 (1984).
15. Estes M. K., Graham D. Y., and Mason B. B. J. Virol. 39: 879-888 (1981).
16. Sleigh M. J., Both G. W., Underwood A. P., and Bender V. S. J. Virol. 37: 845-853 (1981).

Capítulo V

Consideraciones generales.

CONSIDERACIONES GENERALES

Como se mencionó en la introducción, VP3 es el polipéptido responsable del incremento de infectividad causado por tripsina en los rotavirus. En este trabajo se presenta la caracterización de esta proteína en el rotavirus de simio SA11, principalmente de la región que comprende el sitio de corte con tripsina.

Para estudiar esta región se emplearon dos estrategias: Por un lado la secuenciación de aminoácidos de los extremos amino terminales de la proteína VP3 y sus productos de rompimiento (VP5 y VP8), mediante la técnica de secuenciación automática de Edman (55). Este estudio nos permitió conocer la secuencia de aminoácidos de los extremos amino generados por el corte con tripsina y la posición relativa de los productos del corte proteolítico VP5 y VP8, dentro de la proteína VP3.

Por otro lado con la intención de conocer la secuencia del extremo carboxilo resultante del corte con tripsina y dado que la secuenciación de proteínas en dirección COOH-->NH presentaba muchos problemas técnicos, entre los cuales el principal era la cantidad de proteína que se requería, se decidió atacar este problema a través de la secuenciación del gen que codifica para esta proteína y a través de la secuencia nucleotídica obtenida, deducir la secuencia de aminoácidos. Para este objetivo, contábamos con clones de cDNA con porciones del gen 4, que experimentos de traducción in vitro y experimentos genéticos sugerían como el gen que codificaba para VP3 (35,56,57). La secuencia de nucleótidos de este gen nos permitió conocer la secuencia de aminoácidos (deducida) de los extremos carboxilo generados por el corte con tripsina, además de que nos permitió corroborar la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal recién generado obtenido directamente de la proteína. Estos datos también dieron lugar al asignamiento génico inequívoco del gen 4. Por

otra parte, esta secuenciación de nucleótidos nos permitió conocer la secuencia de casi todo el gene 4 y deducir la secuencia de aminoácidos de aproximadamente 90% de la proteína VP3 del rotavirus SA11 (Capítulo II).

Conociendo la secuencia de los extremos amino y carboxilo generados por el corte con tripsina y para tratar de determinar si alguno de estos extremos o ambos, tienen algún papel en la infectividad viral, se sintetizaron químicamente péptidos que mimetizan estos extremos. Se presentan algunos resultados preliminares obtenidos con dos de estos péptidos (Capítulo III).

Como otro intento alternativo y/o complementario para determinar el papel de alguno de los extremos terminales generados por el corte proteolítico sobre la infectividad viral, e influenciados por los trabajos previos realizados con los Mixo y Paramixovirus, en los que se ha reportado que el extremo amino terminal generado por el corte con tripsina está altamente conservado, inclusive entre miembros de diferentes familias, se comparó la secuencia de aminoácidos de la región alrededor del sitio de corte de rotavirus obtenidos de distintos huéspedes, con distintos serotipos y adaptados o no al cultivo de células (Capítulo IV).

La proteína VP3 en SA11 es cortada por tripsina en dos argininas separados por 6 aminoácidos. Estas dos argininas se encuentran conservadas en todos los rotavirus analizados. Sin embargo, a 11 aminoácidos tanto a la derecha como a la izquierda de estas dos argininas existen sitios susceptibles de ser cortados por tripsina (que también son muy conservados en los 14 rotavirus estudiados). En el caso del rotavirus de simio SA11 (4f) con el que se ha realizado la mayor parte de este trabajo, se ha demostrado que estos otros dos aminoácidos no son procesados por tripsina, a pesar de estar tan cercanos al sitio de corte. Cabe mencionar además que existen residuos de arginina y lisina a lo largo de toda la proteína VP3 y también en la otra proteína de

capa externa VP7 (cuya secuencia de aminoácidos es conocida (58)). Sin embargo, cuando el virus purificado es incubado con tripsina a concentraciones hasta de 100 ug/ml, los únicos cortes proteolíticos detectados son los previamente mencionados (21). Esta especificidad en la localización del corte de la tripsina sugiere que la región que comprende los dos sitios de corte se encuentra especialmente expuesta en la estructura del polipéptido VP3 de manera que es accesible a la proteólisis, mientras que el resto de las argininas y/o lisinas tanto de VP3 como de VP7, se encuentran de alguna manera ocultas a la acción de la tripsina.

La accesibilidad de un sitio específico y la inaccesibilidad del resto de los posibles sitios susceptibles a la acción de la tripsina, se debe probablemente a la estructura tridimensional de la proteína VP3 y a la conformación de VP3 y de VP7 dentro de la estructura del virión.

Para tratar de explicar la especial susceptibilidad de los dos sitios antes mencionados, a ser cortados por tripsina, recurrimos al uso de algoritmos que permiten predecir el perfil de hidrofobicidad e hidrofili- cidad de una proteína, a partir de su secuencia primaria. Para este propósito utilizamos los programas descritos por Hopp y Woods (59) y por Kyte y Doolittle (60), cuya diferencia principal estriba en los valores de hidrofobicidad-hidrofili- cidad asignados a cada uno de los aminoácidos. En ambos casos el resultado obtenido fué que el perfil de hidropatía de la región susceptible a tripsina no presenta ninguna particularidad especial con respecto al resto del poli- péptido, que pudiese explicar su mayor susceptibilidad a la tripsina (datos no mostrados).

Existen también algunos algoritmos que permiten predecir, en base a la secuencia de aminoácidos de una proteína, la estructura secundaria más probable de esta (Chow and Fasman (61), Garnier (62)). La figura 7 muestra los re- sultados obtenidos al aplicar el programa descrito por Garnier y col. (62)

ESTA TESIS
 SALIR DE LA
 NO DEBE
 BIBLIOTECA

SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE VP3 Y SU POSIBLE
 ESTRUCTURA SECUNDARIA

LIYRQLLTNSYTVLSDEIQEIGSTKTONUTUNPGFFAUNYAPUNW6PGETNDSTTVEPVLDPGYOPTT HHHHHHHHHH CCC EEE	70
FNPPUSYWMLLAPTNAVGVUVEGTNNTNRWLATILIEPNVQQVERTYTLFGQQVQVTVSNDSTQKWKFDL CC PPP EEE	140
SKQTQDGNYSQHGSLLSTPKLYGVMKHGGKIYTYNGETPNANTGYSTTNFDVTUNMTAYCDFYIIPLAQE CCC HHHH	210
AKCTEYINNGLPPIQNTRNIIVPUSIVSRN <u>LIUYTRAQPNQD</u> IUVSKTSLWKEMQYNRDIVIRFKFANSIIK HHHHH PPP HHHHH	280
SGGLGYKWSEVSFKPAFYQYTYTRDGEETAHHTCSUNGUNDFNTNG6SLPTDFVISKYEVIKENSFUYI HHHHHH CCC HHHHHHHHHH	350
DYWDSQAFRNMUYVRS LAADLNSUMCTGGDYSFALPVGNYPVMTGGAVSLHSAGVTLSTQFTDFVSLNS HHHHH EEE	420
LRFRFRLSVEEPPFSILRTRVSGLY6LPAAKPNNSQEYIEIAGRFSLISLUPLNDYQTPIMNSUTVRQD HHH HHH	490
LERQLGELRDEFNNLSQOIAMSQLIDLALLPLDMFSMFGIKSTIDAAKSMATNUMKRFKSSLANSVST HHH HHH HHHH HHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	560
LTDSLSDAASSISRSASVRSVSSTASAWTEVSNIASDINVTSSISTQTSTISRRTLKEMATQTDGMNF HHHH HHHHHH HHHHHHH	630
DDISA AVLKTKIDKSTQLNTNLP EIVTEASEKFI PNRAYRVIKDDEVLEASIDGKYFAYKVETFEEIPF HHHHHHHHHHHH -CCCHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHH	700
DVQKFADLVTDSPVISAIDFKTLKNLNDNYGISRQALNLLRSDPR HHHHHHH HHHHHH	747

Figura 7.-

Figura 7.- Predicción de la estructura secundaria más probable de la proteína VP3. Debajo de secuencia de aminoácidos de VP3 se indican aquellas regiones con una estructura secundaria 5.0 veces más probable que cualquier otra.

La región entre los dos sitios de corte se muestra subrayada.

Codigos estructurales:

H= Alfa helice
E= Beta strand
A= Antiparallel beta strand
P= Parallel beta strand
T= Turn
C= Coil

Los resultados de esta predicción fueron obtenidos con una computadora IBM, en el National Institute of Health.

Este programa utilize los siguientes algoritmos:

La predicción de la estructura secundaria está basada en el método descrito por Garnier y colaboradores (62).

El asignamiento de las estructuras beta como paralela o antiparalela es según Lifson y Sanders (63).

a la secuencia de aminoácidos de la proteína VP3. Este programa predice que la mayor parte de la proteína VP3 se encuentra en una estructura de alfa hélice (45%). Es interesante notar que existen estructuras de alfa hélice a los lados de la región cortada por tripsina y una posible estructura de β -plegamiento justamente en el sitio de corte lo que facilitarían la exposición de esta región en la superficie de la molécula. El significado de esta predicción, aunque interesante no deja de ser puramente especulativa y requiere de ser demostrada por otros métodos que actualmente son poco accesibles, como serían estudios cristalográficos de esta proteína y de la estructura de ésta dentro del virión. Sin embargo, es claro que la susceptibilidad de un sitio específico dentro de la capa externa de los rotavirus (que consta de dos polipéptidos) obedece a restricciones conformacionales muy precisas dadas tanto por la proteína VP3 per-se, como por el ensamblaje de éstas proteínas en la estructura del virión.

Los dos sitios susceptibles a tripsina encontrados en el rotavirus de simio SA11 se conservan en los otros 14 rotavirus analizados. Cabe preguntarse ¿Por qué dos sitios susceptibles a tripsina?: ¿Es necesario que se corten ambos?: ¿Es necesario eliminar los 6 residuos que existen entre ambos sitios?. En la literatura existe el ejemplo del Fowl plague virus, un mixovirus, el cual requiere para la activación de la infectividad, de dos cortes con tripsina, cuya función es la de eliminar un péptido "conector" de 6 aminoácidos, cuya característica es la de ser muy rico en aminoácidos básicos, para así exponer un extremo amino terminal hidrofóbico que es necesario para la penetración del virus a la célula.

En el caso de los rotavirus, la secuencia de aminoácidos entre los dos sitios de corte no presenta ninguna particularidad en cuanto a las cargas de esta región que pudiera sugerir algún mecanismo de este tipo. De hecho, al analizar la secuencia de esta región obtenida en distintos rotavirus parece ser

una de las regiones más variables. Otra posible explicación es que sea necesario que los dos extremos generados por el corte requieran estar espaciados una cierta distancia y esta región intermedia cumple esta función.

De cualquier modo, el papel biológico de éstos dos sitios susceptibles a tripsina y el papel del péptido "conector" quedan por ser elucidados. Los estudios con péptidos sintéticos que mimetizan estas zonas proteicas quizás revelen algunas de las propiedades de esta región.

Recientemente se ha encontrado que la proteína VP3 es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes. En 1984, Ikegami y colaboradores reportaron el aislamiento y caracterización de un anticuerpo monoclonal (originalmente inducido con el rotavirus de simio SA11) que es capaz de neutralizar además de al propio rotavirus SA11, a un rotavirus bovino (NCDV) de serotipo distinto al de SA11. Este anticuerpo reacciona con ambos productos del corte con tripsina de VP3 es decir con VP5 y VP8 y es capaz de inhibir la acción de la tripsina sobre el virus (65), lo que indica que está dirigido contra la zona del sitio de corte o una región muy cercana a ésta.

Por otro lado Offit y colaboradores (65) han descrito que, anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos contra VP3 son capaces de proteger pasivamente de la diarrea a ratones neonatos a un reto con rotavirus. Estos mismos investigadores han encontrado a través de estudios con virus rearreglantes y con un sistema modelo in vivo, que aparentemente el gene 4, que codifica por VP3 es el gene responsable de la patogenicidad viral, ya que este carácter segrega exclusivamente con el gene 4.

Estos datos tomados en conjunto, sugieren fuertemente que la proteína VP3 juega un papel importante en las primeras interacciones del rotavirus con su célula huésped. Los estudios estructurales de esta proteína, junto con ensayos biológicos ya sea con péptidos sintéticos, con anticuerpos anti-péptido, con

anticuerpos monoclonales o con rearrreglantes virales, seguramente nos llevarán a conocer precisamente a que nivel participa esta proteína durante el proceso de la infección viral y quizá nos sugieran medidas no convencionales tanto preventivas como profilácticas para el control de la diarrea por rotavirus.

REFERENCIAS

- 1.- BARNETT B. (1983): Viral gastroenteritis. *Med. Clin. North Am.* 67:1031
- 2.- CUKOR G., & BLACKLOW N.R. (1984): Human viral gastroenteritis. *Microbiol. Rev.* 48:157
- 3.- ESTES M.K., PALMER E.L., & OBIJESKI J.F. (1983): Rotaviruses: a review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 105:123
- 4.- HOLMES I.H. (1983): Rotaviruses. En "The Reoviridae" editado por W.K. Joklik, pp 359-423. Plenum, New York.
- 5.- KAPIKIAN A.Z., GREENBERG H.B., KALICA A.R., WYATT R.G., KIM H.W., BRANDT C.D., RODRIGUEZ W.J., FLORES J., SINGH N., PARROTT R.H., & CHANOCK R.M. (1981): New developments in viral gastroenteritis. En "Acute enteric infections in children: new prospects for treatment and prevention" editado por T. Holme, J. Holmgren, M. Merson & R. Molby, pp 9-57. Elsevier North Holland, Amsterdam.
- 6.- KAPIKIAN A.Z., GREENBERG H.B., WYATT R.G., KALICA A.R., KIM H.W., BRANDT C.D., RODRIGUEZ W.J., PARROTT R.H., & CHANOCK R.M. (1982): Viral gastroenteritis. En "Viral infections of humans" Editado por A.S. Evans, pp 282-326. Plenum. New York.
- 7.- KAPIKIAN A.Z., WYATT R.G., GREENBERG H.B., KALICA A.R., KIM H.W., BRANDT C.D., RODRIGUEZ W.J., PARROTT R.H., & CHANOCK R.M. (1980): Approaches to immunization of infants and young children against gastroenteritis due to rotaviruses. *Rev. Infect. Dis.* 2:459
- 8.- WOLF J.L. (1982): Viral gastroenteritis. *Med. Clin. North Am.* 66:575
- 9.- BISHOP R.F., DAVIDSON G.P., HOLMES I.H., & RUCK B.J. (1973): Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute gastroenteritis. *Lancet* 1:149
- 10.- SNYDER J.D., & MERSON M.H. (1982): The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bull WHO*, 60:605
- 11.- ADAMS W.R., & KRAFT L.M. (1963): Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*, 141:359
- 12.- MALHERBE H.H., HARWIN R., & ULRICH M. (1963): The cytopathic effect of vervet monkey viruses. *S. Afr. Med. J.*, 37:407
- 13.- Mc NULTY M.S. (1978): Rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 40:1
- 14.- MATTHEWS R.E.F. (1979): The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in the Hague, september 1978. *Intervirology*, 11:133
- 15.- HOLMES I.H., RUCK B.J., BISHOP R.F., & DAVIDSON G.P. (1975): Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. *J. Virol.* 16:937

- 16.- ESTES M.K., GRAHAM D.Y., SMITH E.M., & GERBA C.P. (1979): Rotavirus stability and inactivation. *J. Gen. Virol.* 43:403
- 17.- SCHNAGL R.D., & HOLMES I.H. (1976): Characteristics of the genome of human infantile enteritis (rota) virus. *J. Virol.* 19:267
- 18.- BOTH G.W., BELLAMY A.R., STREET J.E., & SIEGMAN L.J. (1982): A general strategy for cloning double-stranded RNA: nucleotide sequence of the simian-11 rotavirus gene B. *Nucleic Acids Res.* 10:7075
- 19.- ESPEJO R.T., CALDERON E., & GONZALEZ N. (1977): Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol* 6:502
- 20.- KALICA A.R., GARON A.F., WYATT R.G., MEBUS C.A., VANKIRK D.H., CHANOCK R.M. & KAPIKIAN A.Z. (1976): Differentiation of human and calf reovirus-like agents associated with diarrhea using polyacrylamide gel electrophoresis of RNA. *Virology*, 74:86
- 21.- ESPEJO R.T., LOPEZ S., & ARIAS C.F. (1981): Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37:156
- 22.- KALICA A.R., GREENBERG H.B., WYATT R.G., FLORES J., SERENO M.M., KAPIKIAN A.Z. & CHANOCK R.M. (1981): Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology*. 112:385
- 23.- GREENBERG H.B., McAULIFFE V., VALDESUSO J., WYATT R.G., FLORES J., KALICA A., HOSHINO Y., & SINGH N.H. (1983): Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 39:91
- 24.- KALICA A.R., GREENBERG H.B., ESPEJO R.T., FLORES J., WYATT R.G., KAPIKIAN A.Z., & CHANOCK R.M. (1981): Distinctive ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroups 1 and 2. *Infect. Immun.* 33:958
- 25.- HOSHINO Y., WYATT R.G., GREENBERG H.B., FLORES J., & KAPIKIAN A.Z. (1984) Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque reduction neutralization. *J. Infect. Dis.* 149: 694
- 26.- WOODS G.N., BRIDGER J.C., JONES J.M., FLEWETT T.H., BRYDEN A.S., DAVIES H.A., & WHITE G.B., (1976): Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. *Infect. Immun* 14:804
- 27.- MATSUNO S., INOUE S., & KONO R. (1977): Antigenic relationships between human and bovine rotaviruses as determined by neutralization, immune adherence hemagglutination and complement fixation tests. *Infect. Immun.* 17:661
- 28.- GREENBERG H.B., VALDESUSO J., VAN WYKE K., MIDTHUM K., WALSH M., McAULIFFE V., WYATT R.G., KALICA A.R., FLORES J., & HOSHINO Y. (1983): Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* 47:267

- 29.- GERNA G., BATTAGLIA M., MILENESI G., PASSARANI N., PERCIVALLE E., & CATTANEO E. (1984): Serotyping of cell culture-adapted subgroup 2 human rotavirus strains by neutralization. *Infect. Immun.* 43:722
- 30.- TANIGUCHI K., URASAWA S., & URASAWA T. (1982): Electrophoretic analysis of RNA segments of human rotaviruses cultivated in cell culture. *J. Gen. Virol.* 60:171
- 31.- URASAWA S., URASAWA T., & TANIGUCHI K. (1982): Three human rotavirus serotypes demonstrated by plaque neutralization of isolated strains. *Infect. Immun.* 38:781
- 32.- WYATT R.G., GREENBERG H.B., JAMES W.D., PITTMAN A.L., KALICA A.R., FLORES J., CHANOCK R.M., & KAPIKIAN A.Z. (1984): Definition of human rotavirus serotypes by plaque reduction assay. *Infect. Immun.* 37:110
- 33.- HOSHINO Y., SERENO M.M., MIDTHUM K., FLORES J., KAPIKIAN A.Z., CHANOCK R.M. (1985): Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* en prensa
- 34.- ARIAS C.F., LOPEZ S., & ESPEJO R.T. (1982): Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J. Virol.* 41:42
- 35.- MASON B.B., GRAHAM D.Y., & ESTES M.K. (1983). Biochemical mapping of the simian rotavirus SA11 genome. *J. Virol.* 46: 413
- 36.- GREENBERG H.B., MIDTHUM K., WYATT R., FLORES J., HOSHINO Y., CHANOCK R.M., & KAPIKIAN A. (1984): Use of reassortant rotaviruses and monoclonal antibodies to make gene coding assignments and construct rotavirus vaccine candidates. En "Modern approaches to vaccines: Molecular and chemical basis of virus virulence and immunogenicity". Editores R. M. Chanock y R. M. Lerner, pp 319-327. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 37.- ERICSON B. L., GRAHAM D.Y., MASON B.B., HANSEN H. H., & ESTES M. K. (1983): Two types of glycoprotein precursors are produced by the simian rotavirus SA11. *Virology* 127:320
- 38.- MATSUNO S., INOUE S., & KONO R. (1977): Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera. *J. Clin. Microbiol.* 5:1
- 39.- WARD R. L., KNOWLTON D. R., & PIERCE M. J. (1984): Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 19:748
- 40.- BARNETT B. B., SPENDLOVE R.S., & CLARK M. L. (1979): Effect of enzymes on rotavirus infectivity. *J. Clin. Microbiol.* 10:111
- 41.- McNULTY M. S. (1978) Rotaviruses, *J. Gen. Virol.* 40:1
- 42.- RICHARDSON C. D., SCHEID A., & CHOPPIN P.W. (1980): Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with aminoacid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides. *Virology* 105:205

- 43.- RICHARDSON C.D., & CHOPPIN P. W. (1983): Oligopeptides that specifically inhibit membrane fusion by paramyxoviruses: Studies on the site of action *Virology*. 131:528
- 44.- GREENBERG H. B., WYATT R. G., KAPIKIAN A. Z., KALICA A. R., FLORES J., & JONES R. (1982): Rescue and serotypic characterization of noncultivable human rotavirus by gene reassortment. *Infect. Immun.* 37:104
- 45.- KAPIKIAN A. Z., & CHANOCK R. M. (1986) Rotaviruses en : "Virology" 37:863 editado por B. N. Fields et al. Raven press. NY.
- 46.- LOPEZ S., ARIAS C. F., BELL J. R., STRAUSS J. H., & ESPEJO R. T. (1985). Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* 144:11
- 47.- SUTCLIFFE J. G., SHINNICK T. M., GREEN N., & LERNER R. A. (1983). Antibodies that react with predetermined sites on proteins. *Science* 219:660
- 48.- SHINNICK T. M., SUTCLIFFE J. G., GREEN N., & LERNER R. A. (1983) Synthetic peptide immunogens as vaccines. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:425
- 49.- BARANY G., & MERRIFIELD R. B. (1980) Solid phase peptide synthesis. En: "The peptides: Analysis, synthesis, biology" 2:3 editado por E. Gross y J. Meienhofer. Academic Press. NY.
- 50.- STEWART J. M., & YOUNG J. D. (1968) "Solid phase peptide synthesis" W. H. Freeman and Company. San Francisco.
- 51.- Protection of functional groups in peptide synthesis.(1981) En: "The peptides: Analysis, synthesis, biology". 3:1. editado por E. Gross y J. Meienhofer. Academic Press. NY.
- 52.- ESTES M. K., GRAHAM D. Y., & MASON B. B. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: Molecular mechanisms. *J. Virol.* 39:879
- 53.- IKEGAMI N. (1984). Characterization of outer capsid proteins of rotaviruses. Resumen en: Working conference on rabies, arboviruses including dengue and viral gastroenteritis. Oiso, Japon. pp.18
- 54.- GUNN P. R., SATO F., POWELL K. F. H., BELLAMY A. R., NAPIER J. R., HARDING D. R. K., HANCOCK W. S., SIEGMAN L. J., & BOTH G. W. (1985). Rotavirus neutralizing protein VP7: Antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis. *J. Virol.* 54:791
- 55.- HEWICK R. M., HUNKAPILLER M. W., HOOD L. E., & DREYER W. J. (1981). A gas liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* 256:7990
- 56.- SMITH M. L., LAZDINS L., & HOLMES I. H. (1980). Coding assignments of double-stranded RNA segments of SA11 rotavirus established by in vitro translation. *J. Virol.* 33:976

- 57.- KALICA A. R., FLORES J., & GREENBERG H.B. (1983). Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology* 125:194
- 58.- ARIAS C. F., LOPEZ S., BELL J. R., & STRAUSS J. H. (1984). Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 as deduced from cDNA sequence. *J. Virol.* 50:657
- 59.- HOPP T. P., & WOODS K. R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:3824
- 60.- KYTE J., & DOOLITTLE R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105
- 61.- CHOU P. Y., & FASMAN G. D. (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry.* 13:222
- 62.- GARNIER J., OSGUTHORPE D. J., & ROBSON B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120:97
- 63.- LIFSON S., & SANDER C. (1979). Antiparallel and parallel β -strands differ in amino acid residue preferences. *Nature (London).* 282:109
- 64.- BOSCH F. X., GARTEN W., KLENK H. D., & ROTT T. (1981). Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: Primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of avian influenza viruses. *Virology.* 113:725
- 65.- IKEGAMI N. & AKATANI K. (1984) Resumen en el congreso internacional de virologia. Sendai, Japon. W22-2 p. 209.
- 66.- OFFIT P. A., SHAW R., & GREENBERG H. B. (1985). Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to VP3 and VP7. *J. Virol.* (en prensa)